

Jorge Javier Cebolla Sanz

Estudio Epidemiológico y funcional
de variantes en el gen GLA, en
pacientes con miocardiopatía
hipertrófica de ventrículo izquierdo
de origen desconocido

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

Gervas Arruga, Javier
Pocovi Mieras, Miguel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y FUNCIONAL DE
VARIANTES EN EL GEN GLA, EN PACIENTES CON
MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA DE
VENTRÍCULO IZQUIERDO DE ORIGEN
DESCONOCIDO

Autor

Jorge Javier Cebolla Sanz

Director/es

Gervas Arruga, Javier
Pocovi Mieras, Miguel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2019

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**Universidad
Zaragoza**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y FUNCIONAL DE VARIANTES EN EL
GEN *GLA*, EN PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA
DE VENTRÍCULO IZQUIERDO DE ORIGEN DESCONOCIDO.**

JORGE JAVIER CEBOLLA SANZ

2019

D. MIGUEL POCOVÍ MIERAS, Doctor en Ciencias Químicas, catedrático del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y

D. JAVIER GERVÁS ARRUGA, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular,

Directores de esta Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral titulada: **“Estudio epidemiológico y funcional de las variantes en el gen *GLA*, en pacientes con miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo de origen desconocido”**, presentada por D. Jorge Javier Cebolla Sanz, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección, y que reúne los requisitos para ser presentadas por su autor para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 30 de septiembre de 2019

D. Miguel Pocoví Mieras

D. Javier Gervás Arruga

“En las cenizas del fracaso está la sabiduría”

Amaral (Canción: Robin Hood, Álbum: Hacia lo salvaje, 2011)

Tú eres mi α y mi Ω

A.C.G. + E.G.A

AGRADECIMIENTOS

Todo el tiempo dedicado a la investigación no habría sido posible sin las personas que me han enseñado, guiado y apoyado, sien ellos, hoy no sería quién soy profesionalmente y personalmente.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis: el Dr. Miguel Pocoví, que con sus enseñanzas, consejos, tiempo, paciencia y buen hacer, me ha guiado durante esta travesía; y el Dr. Javier Gervás, que siempre me apoyó, enseñó y apostó por mí incluso cuando menos me lo merecía.

Agradecer enormemente la oportunidad que me brindó la Dra. Pilar Giraldo al confiar en mí y potenciarme en el laboratorio, incluso cuando las condiciones eran más adversas. Por supuesto, agradecer a Conchita todos estos años.

Quiero agradecer también las enseñanzas y buenos consejos que me han brindado a lo largo de estos años mis queridas compañer@s del grupo de investigación: Pili Irún, Laura López, Isabel de Castro, Sofía Aznárez, María Pueyo, Blanca Medrano, Beatriz Escuder, Pilar Alfonso, Carlos Gómez, Vanesa Andreu, Marta Andrés, Carlos Lahoz y Eva Mora. Por supuesto a todos aquellos estudiantes que como yo un día pasaron por el laboratorio.

A todas las personas que han estado vinculadas a los grupos de investigación (Adriana, Vidal, Diego, Lourdes, etc.) y profesores del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza (Javier Naval, María Ángeles, Mari, Pedro, Fermín, Julio etc.). A todos los miembros de los grupos de investigación la Unidad de Investigación Traslacional y muy especialmente al Dr. Fernando Civeira, Ana Cenaarro, Ana, Rocío, Sofía, Lucía, Itzi y Estíbaliz.

Sin duda, dar las gracias a todas esas personas con las que he trabajado codo con codo y que me han enseñado todo lo que ellos sabían, en estos años desde los Servicios Científico Técnico del IACS y desde los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza: Pili Mozas, Mark Strunk, Irene Santos, María Jesús Pueyo, Irene Orera, Giuseppe Lattanzio, César, Gracia etc.

Un recuerdo muy especial a mis orígenes en el mundo del laboratorio y de la genética molecular, CAGT siempre tendrá un sitio en mi corazón y vosotras también Alba, Ruthy, Sandra, Isabel,

Cristina, Pili, Rosa, Natalia, María etc. Vosotras fuisteis mis primeras maestras en este mundo investigador.

A todos esos profesionales sanitarios y pacientes, que tanto he aprendido de vosotros.

Mis amigos del alma. Nos conocemos desde los tres años y algunos ya os conocí más mayores pero la sensación es la de conoceros desde siempre. Hemos estado en buenos y malos momentos, hemos compartido risas y broncas, hemos intercambiado cubatas y partidos de tríos, hemos viajado y nos hemos hecho lo que hoy somos... sois mi otra familia y no podría haber deseado unos amigos y hermanos como vosotros...hace falta que os nombre?..... vale, vale.....Marcos, Rafa, Fran, Nico, Javi, Quino, Rubén, Pablo, Jose y Joaquín.

Mis abuelos, todos ellos, aunque no estéis algunos conmigo para disfrutar de este triunfo; mis tíos y mis primos que, aunque estamos ahí nunca está de más decirnos lo que nos queremos, toda mi familia paterna y materna. Mis suegros Ángel y Elena que ya no sabría qué sería de mi vida sin vosotros; mi familia política cerverana, dominicana, zaragozana.... Todos estáis aquí presentes

Va llegando lo más complicado.... por eso quiero dejar abierta una línea para que todas aquellas personas que crean que deben figurar en esta nota de agradecimientos:

“

“

Mi hermana, esa persona que un día mis padres me la regalaron y que hemos crecido juntos y que ha sido en la adultez cuando más nos hemos unido, frente a las adversidades y frente a los buenos momentos. Te quiero Leyre y siempre te querré.... no cambies nunca!

Los mejores maestros que tendré y que me han acompañado de la mano desde el día de mi nacimiento hasta el día de hoy; no tengo palabras para agradecer vuestro esfuerzo, tesón dedicación, sacrificio etc. para que mi hermana y yo seamos quienes somos hoy día.

Amor, tú y yo no nos hace falta decirnos lo mucho que nos queremos, parece que hubiera estado toda la vida contigo y doy gracias al destino por habernos puesto en el mismo camino y darme el mejor regalo que una persona puede ofrecer a otra; no diré más que estás cosas no te gustan demasiado.

Esta última línea es para ti mi pitusito, la vida sin ti no tendría sentido.

ÍNDICES

Índice de Páginas

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	2
1.2	PREVALENCIA	3
1.2.1	Cribado neonatal.....	4
1.2.2	Poblaciones de riesgo.....	4
1.3	PATOGENIA.....	6
1.3.1	Sustratos acumulados	6
1.3.2	Fisiopatología general	7
1.4	ESTRUCTURA DE LA A-GALACTOSIDASA A HUMANA.....	8
1.5	GENÉTICA MOLECULAR.....	10
1.5.1	Patrón de herencia.....	11
1.5.2	Espectro mutacional.....	11
1.5.3	Correlación genotipo-fenotipo.....	14
1.5.4	La EF en las mujeres. Bases genéticas y moleculares.....	14
1.6	SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA EF	16
1.6.1	Síntomas precoces de la EF	17
1.6.2	Manifestaciones renales	19
1.6.3	Manifestaciones cardíacas	20
1.6.4	Manifestación cerebrovascular	21
1.6.5	Otras manifestaciones.....	22
1.7	DIAGNÓSTICO	22
1.7.1	Biomarcadores	23
1.7.2	Diagnóstico enzimático	24

1.7.3	Análisis mutacional.....	26
1.7.4	Otros métodos.	27
1.8	TRATAMIENTO.....	27
1.8.1	Terapia enzimática sustitutiva	28
1.8.2	Terapia con chaperonas moleculares.....	29
1.8.3	Nuevas aproximaciones terapéuticas	31
2	HIPÓTESIS	35
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIALES Y METODOLOGÍA	39
4.1	PACIENTES Y CONTROLES.....	39
4.2	DISEÑO DEL ESTUDIO	41
4.3	ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO	41
4.4	EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PARA LOS ESTUDIOS A REALIZAR EN DBS	42
4.5	EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PARA LOS ESTUDIOS A REALIZAR EN PLASMA, CONCENTRADO DE LEUCOCITOS, DNA Y RNA	43
4.6	OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA PARA ESTUDIO DE MARCADORES EF	44
4.7	OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO DE LEUCOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.....	44
4.8	AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO	45
4.8.1	Procedente de muestras de DBS.....	45
4.8.2	Procedente de muestras de sangre venosa	46
4.9	AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL	47
4.10	ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN, PUREZA Y PURIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS AISLADOS (DNA GENÓMICO Y RNA TOTAL).....	48
4.10.1	Concentración y pureza del DNA genómico aislado de sangre venosa	48
4.10.2	Purificación del DNA genómico aislado de sangre venosa.....	48
4.10.3	Concentración y pureza del RNA total:	49

4.10.4	Purificación del RNA total	49
4.10.5	Determinación de la integridad del RNA total	49
4.11	DETERMINACIÓN DE MARCADORES BIOLÓGICOS SUBROGADOS A LA EF	50
4.11.1	Determinación de la concentración de Gb ₃ en orina	50
4.11.2	Determinación de la concentración de Liso-Gb ₃ en plasma	51
4.12	MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA A-GALACTOSIDASA A	53
4.12.1	Medida de la actividad enzimática en muestras de gota de sangre seca	53
4.12.2	Medida de la actividad enzimática en muestras de plasma K ₂ EDTA	54
4.12.3	Medida de la actividad enzimática en concentrado de leucocitos	54
4.13	ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN GLA. SECUENCIACIÓN CAPILAR.....	55
4.13.1	Amplificación mediante PCR de las regiones codificantes del gen GLA.....	57
4.13.2	Amplificación mediante PCR de las regiones no codificantes del gen GLA	59
4.13.3	Purificación del producto de PCR.....	60
4.13.4	Reacción de secuenciación de Sanger, electroforesis capilar y análisis de secuencias	61
4.14	ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN GLA. ESTUDIOS DE REORDENAMIENTOS.....	62
4.15	ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS IDENTIFICADAS.....	64
4.16	ANÁLISIS DE VARIANTES EN REGIÓN REGULADORA 5'-UTR.....	65
4.17	ANÁLISIS DE VARIANTES EN REGIÓN NO CODIFICANTE (INTRONES)	66
4.17.1	Síntesis de cDNA total	66
4.17.2	Amplificación del cDNA del gen GLA.....	68
4.17.3	Caracterización electroforética del cDNA específico del gen GLA.....	69
4.17.4	Análisis molecular del cDNA del gen GLA. Secuenciación capilar.....	70
4.18	GENOTIPADO POBLACIONAL DE LAS VARIANTES EN REGIÓN REGULADORA Y NO CODIFICANTE.....	71
4.19	ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN GLA	72
4.19.1	Determinación de la eficiencia cinética de la reacción de qPCR.....	74

4.19.2	Normalización de los datos de expresión génica determinados mediante qPCR	75
4.19.3	Cuantificación relativa de la expresión génica	76
4.20	DETERMINACIÓN DEL ACÚMULO INTRACELULAR DE SUSTRATO	76
4.20.1	Modelo in vitro de acúmulo lisosomal	76
4.20.2	Cuantificación del acúmulo de galactoesfingolípidos en los pacientes	77
4.21	ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y EPIDEMIOLÓGICO	77
4.21.1	Análisis estadístico general	77
4.21.2	Estudio epidemiológico y de la segregación	78
5	RESULTADOS	81
5.1	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	81
5.2	ACTIVIDAD DE A-GAL A EN DBS Y ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN GLA	83
5.3	ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS EN EL GRUPO DE SECUENCIACIÓN ...	88
5.4	ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN DE NM_000169.2:c.-34C>T; NM_000169.2:c.192C>T; NM:000169.2:c.640-25A>G.....	90
5.4.1	Estudio Bioinformático	90
5.4.2	Estudio en gel de retardo. “Electrophoretic Mobility Shift Assay”	91
5.4.3	Análisis enzimático en muestra de plasma y leucocitos de los pacientes 1,2 y 3... 92	
5.4.4	Determinación de Gb ₃ en orina y Liso-Gb ₃ en plasma de los pacientes 1, 2 y 3.....	93
5.4.5	Caracterización electroforética en gel de poliacrilamida al 6% del paciente 2	94
5.4.6	Identificación de transcritos alternativos mediante secuenciación del cDNA completo del gen GLA en los pacientes 1, 2 y 3.....	95
5.4.7	Perfil de reordenamientos en el gen GLA de los pacientes 1, 2 y 3.....	95
5.5	ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES QUE FORMAN HAPLOTIPOS COMPLEJOS	97
5.5.1	Análisis enzimático en muestra de plasma y leucocitos de los pacientes con haplotipos complejos	97
5.5.2	Determinación de Gb ₃ en orina y Liso-Gb ₃ en plasma de los pacientes con haplotipos complejos	98

5.5.3	Caracterización electroforética en gel de poliacrilamida al 6% de los pacientes con haplotipos complejos	98
5.5.4	Identificación de transcritos alternativos mediante secuenciación del cDNA completo del gen GLA en los pacientes con haplotipos complejos.....	99
5.5.5	Perfil de reordenamientos en el gen GLA de los pacientes con haplotipos complejos	99
5.5.6	Análisis de la expresión génica de los pacientes mediante qPCR	100
5.5.7	Identificación de nuevas variantes en la región 5'-UTR y en los intrones del gen GLA en pacientes con haplotipos complejos.....	102
5.6	CUANTIFICACIÓN DEL ACÚMULO DE SUSTRATO EN CULTIVOS CELULARES DE PACIENTES CON HCI I	106
5.6.1	Confirmación de la validez del modelo in vitro de acúmulo lisosomal.....	106
5.6.2	Determinación del acúmulo lisosomal de galactolípidos en las células de los pacientes con HCI I.....	107
6	DISCUSIÓN.....	111
7	CONCLUSIONES.....	119
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
ANEXO A: PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE LA TESIS EN LA ENFERMEDAD DE FABRY . A		
ANEXO B: PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE LA TESIS EN OTRAS ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL.....		B

Índice de Figuras

Figura 1.1. Defecto metabólico en la enfermedad de Fabry.	1
Figura 1.2. Evolución histórica de hitos asociados a la enfermedad de Anderson-Fabry.....	3
Figura 1.3. Glucoesfingolípidos.	7
Figura 1.4. Monómero de la α -Gal A humana.....	9
Figura 1.5. Centro activo de la enzima.	9
Figura 1.6. Mecanismo de reacción	10
Figura 1.7. Representación gráfica del gen <i>GLA</i>	10
Figura 1.8. Modelo de herencia ligado al cromosoma X.....	11
Figura 1.9. Distribución de las mutaciones del gen <i>GLA</i>	12
Figura 1.10. Variantes de la EF estratificadas por el efecto sobre el fenotipo.	13
Figura 1.11. Expresión fenotípica del mosaicismo germinal.....	15
Figura 1.12. Organización del locus XIC	16
Figura 1.13. Angioqueratomas.....	18
Figura 1.14. Cornea verticillata.	19
Figura 1.15. Acúmulo renal de Gb ₃	19
Figura 1.16. Ecocardiografía.....	21
Figura 1.17. Reacción in vitro de la α -Gal A.	24
Figura 1.18. Algoritmo para la interpretación de las VUS en la EF	27
Figura 1.19. Mecanismo acción de las chaperonas moleculares	30
Figura 4.1. Flujo del estudio.	41
Figura 4.2. Tarjeta de papel de filtro utilizada en el estudio de cribado.	42
Figura 4.3. Isómeros conformacionales de la Gb ₃	51
Figura 4.4. Isómeros conformacionales de la Liso-Gb ₃	52
Figura 4.5. Recta de calibrado de la 4-metilumbeliferona.....	53
Figura 4.6. Esquema del proceso de lisado del concentrado de leucocitos	55
Figura 4.7. Reacción de MLPA®	63
Figura 4.8. Sondas para qPCR.....	73
Figura 5.1. Esquema de las fases y resultados del estudio.	84
Figura 5.2. Desequilibrio de ligamiento	88
Figura 5.3. Resultados del EMSA de la variante NM_000169.2:c.-34C>T.....	92
Figura 5.4. Actividad de α -Gal A en plasma y extracto leucocitario. Población control	93
Figura 5.5. Electroforesis PAGE 6% del paciente 2.....	94

Figura 5.6. MLPA® en los pacientes 1, 2 y 3	96
Figura 5.7. Actividad de α -Gal A en plasma y extracto leucocitario. Población HCl	97
Figura 5.8. Electroforesis PAGE 6% (m/v) de los pacientes HCl I y III.	99
Figura 5.9. MLPA® en los pacientes HCl I y III	100
Figura 5.10. Cuantificación relativa del gen <i>GLA</i> en los pacientes con HCl.	101
Figura 5.11. Cuantificación relativa del gen <i>GLA</i> en los pacientes HCl (género)	101

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Principales estudios de búsqueda de pacientes en el cribado neonatal.....	4
Tabla 1.2. Principales estudios de búsqueda de pacientes en población con miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo de origen desconocido.....	5
Tabla 1.3. Principales estudios de búsqueda de pacientes en población menor de 60 años e ictus recurrente.....	6
Tabla 1.4. Principales oligosacáridos que conforman los glucoesfingolípidos.....	6
Tabla 1.5. Principales signos y síntomas relacionados con la EF.....	17
Tabla 4.1. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.....	39
Tabla 4.2. Centros participantes en el estudio.....	40
Tabla 4.3. Cebadores para la amplificación de las regiones codificantes del gen <i>GLA</i>	56
Tabla 4.4. Cebadores para la amplificación de las regiones no codificantes del gen <i>GLA</i>	57
Tabla 4.5. Estequeometría para la amplificación de las regiones codificantes del gen <i>GLA</i> a partir de DNA de DBS.....	58
Tabla 4.6. Estequeometría para la amplificación de las regiones codificantes del gen <i>GLA</i> a partir de DNA de sangre EDTA líquida.....	58
Tabla 4.7. Programas térmicos empleados para la amplificación de las regiones codificantes del gen <i>GLA</i>	59
Tabla 4.8. Estequeometría para la amplificación de las regiones no codificantes del gen <i>GLA</i>	59
Tabla 4.9. Programas térmicos empleados para la amplificación de las regiones no codificantes del gen <i>GLA</i>	60
Tabla 4.10. Estequeometría para la reacción de secuenciación de Sanger.....	61
Tabla 4.11. Estequeometría de la mezcla alcohólica para la eliminación de terminadores.....	62
Tabla 4.12. Cebadores específicos para la amplificación de una región del cDNA complementario al mRNA del gen <i>ACTB</i>	67
Tabla 4.13. Estequeometría para la amplificación de una región del cDNA complementario al mRNA del gen <i>ACTB</i>	67
Tabla 4.14. Programa térmico empleado para la amplificación de una región del cDNA complementario al mRNA del gen <i>ACTB</i>	68
Tabla 4.15. Cebadores específicos para la amplificación del cDNA complementario al mRNA del gen <i>GLA</i>	68
Tabla 4.16. Estequeometría para la amplificación del cDNA complementario al mRNA del gen <i>GLA</i>	69

Tabla 4.17. Programa térmico empleado para la amplificación del cDNA complementario al mRNA del gen <i>GLA</i>	69
Tabla 4.18. Cebadores específicos para la amplificación anidada del cDNA complementario al mRNA del gen <i>GLA</i>	70
Tabla 4.19. Estequiometría para la amplificación anidada del cDNA complementario al mRNA del gen <i>GLA</i>	71
Tabla 4.20. Programa térmico empleado para la amplificación anidada del cDNA complementario al mRNA del gen <i>GLA</i>	71
Tabla 4.21. Premezcla de sondas de hidrólisis y cebadores (TaqMan®) empleadas para el estudio de expresión del gen <i>GLA</i> y del gen de control endógeno <i>GAPDH</i>	72
Tabla 4.22. Estequiometría para el estudio de expresión del gen <i>GLA</i> y el gen de control endógeno <i>GAPDH</i>	74
Tabla 4.23. Programa térmico empleado para el estudio de expresión del gen <i>GLA</i> y el gen de control endógeno <i>GAPDH</i>	74
Tabla 5.1. Características demográficas y de exploración ecocardiográfica de la población de estudio.....	81
Tabla 5.2. Características demográficas y de exploración ecocardiográfica de la población de estudio, estratificada por centro reclutador.....	82
Tabla 5.3. Variantes genéticas en el gen <i>GLA</i> identificadas en el Grupo de secuenciación	85
Tabla 5.4. Resultado del análisis de desequilibrio de ligamiento en el Grupo de secuenciación.....	89
Tabla 5.5. Resultados del test de correlación/tendencia para la actividad de α -Gal A en DBS y los genotipos.	89
Tabla 5.6. Frecuencias haplotípicas.....	90
Tabla 5.7. Factores de transcripción que potencialmente se unen a la secuencia consenso circundante a la variante NM_000169.2:c.-34C>T.....	91
Tabla 5.8. Actividad de α -Gal A en plasma K ₂ EDTA y extracto leucocitario en la población control.	92
Tabla 5.9. Actividad de α -Gal A en plasma K ₂ EDTA y extracto leucocitario medidas en los pacientes 1, 2 y 3.....	93
Tabla 5.10. Niveles de Gb ₃ en orina y de Liso-Gb ₃ medidas en los pacientes 1, 2 y 3.	93
Tabla 5.11. Niveles de Gb ₃ en orina y de Liso-Gb ₃ medidas en el Grupo HCl I y HCl III.	98
Tabla 5.12. Variantes genéticas que conforman el HCl I.	102
Tabla 5.13. Variantes genéticas que conforman el HCl III.	103

Tabla 5.14. Resumen del protocolo de genotipado de las variantes asociadas a HCl I y III, mediante técnica de RFLPs.....	104
Tabla 5.15. Resultados de la estimación de la frecuencia alélica y genotípica en nuestra población control.	105
Tabla 5.16. Análisis comparativo de las frecuencias alélicas de los marcadores asociados a HCl en la población de estudio y en la población control.	106

Índice de Ecuaciones

Ecuación 4.1. Cálculo de pureza de los ácidos nucleicos.	48
Ecuación 4.2. Cálculo de la eficiencia cinética de la reacción de qPCR.....	75
Ecuación 4.3. Algoritmo empleado en la normalización de los datos de expresión génica determinados por qPCR.	76
Ecuación 4.4. Algoritmo empleado en el cálculo de la expresión del gen <i>GLA</i> mediante qPCR..	76

Acrónimos

α -Gal A	Alfa galactosidasa A
λ	Longitud de onda
4-MU	4-metilumbeliferona
4-MU-Gal	4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido
A	Amperio
Abs	Absorbancia
ACMG	American College of Medical Genetics
AEM	Agencia Europea del Medicamento
AF	Ácido Fórmico
APS	Persulfato amónico
Br-Et	Bromuro de etidio
cDNA	DNA complementario
CR	Cuantificación relativa de la expresión génica
Ct	Ciclo Umbral
DBS	Gota de sangre seca
ddH ₂ O	Agua ultrapura libre de DNAasas/RNAasas
DE	Desviación estándar
dNTP	deoxi-nucleótido-tri-fosfato
DGJ	1-deoxigalactonojirimicina
dH ₂ O	Agua desionizada estéril
ddNTP	di-deoxi-nucleótidos-tri-fosfato
DMEM	Dubelco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DNAp	DNA polimerasa
E	Eficiencia de la reacción de qPCR
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Estándar externo
EF	Enfermedad de Fabry
EG	Enfermedad de Gaucher
EI	Estándar interno
EM	Espectrometría de masas
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ER	Retículo endoplásmico
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico
ERC	Enfermedad renal crónica
EtOH	Etanol
EVI	Espesor del septo ventricular y/o pared ventricular izquierda posterior
ExM	Algoritmo de expectación-maximización
FOS	Fabry Outcome Survey
FRET	Transferencia de energía de resonancia de resonancia de Förster
g	Fuerza de la gravedad
Gb3	Globotriaosilceramida
GCS	Glucosilceramida sintasa
GFR	Tasa de filtrado glomerular
H ₂ O	Agua
HCI	Haplotipo complejo intrónico
HCl	Ácido Clorhídrico
HSF	Human Splicing Finder

HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
IVS	Intrón
kb	Kilobase
m	Masa
MeOH	Metanol
MHVI	Miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo
Mg ₂ Cl	Cloruro de magnesio
MIM	Mendelian Inheritance in Man
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mRNA	RNA mensajero
∅	Diámetro
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Masa molecular
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
R ²	Coefficiente de determinación
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR de retrotranscripción
SD	Sonda Derecha
SFB	Suero Fetal Bovino
SI	Sonda Izquierda

SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SSPNN	Splice Site Prediction by Neural Network
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Boro-EDTA
TCM	Triclorometano
TE	Tris-Clorhídrico-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilendiamina
TES	Terapia enzimática sustitutiva
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRS	Terapia de reducción de sustrato
UI	Unidades internacionales
UTR	Región genómica no traducida
UV	Ultra-violeta
V	Voltio
v	Volumen
VUS	Variante de significado incierto
W	Vatio

Enlaces

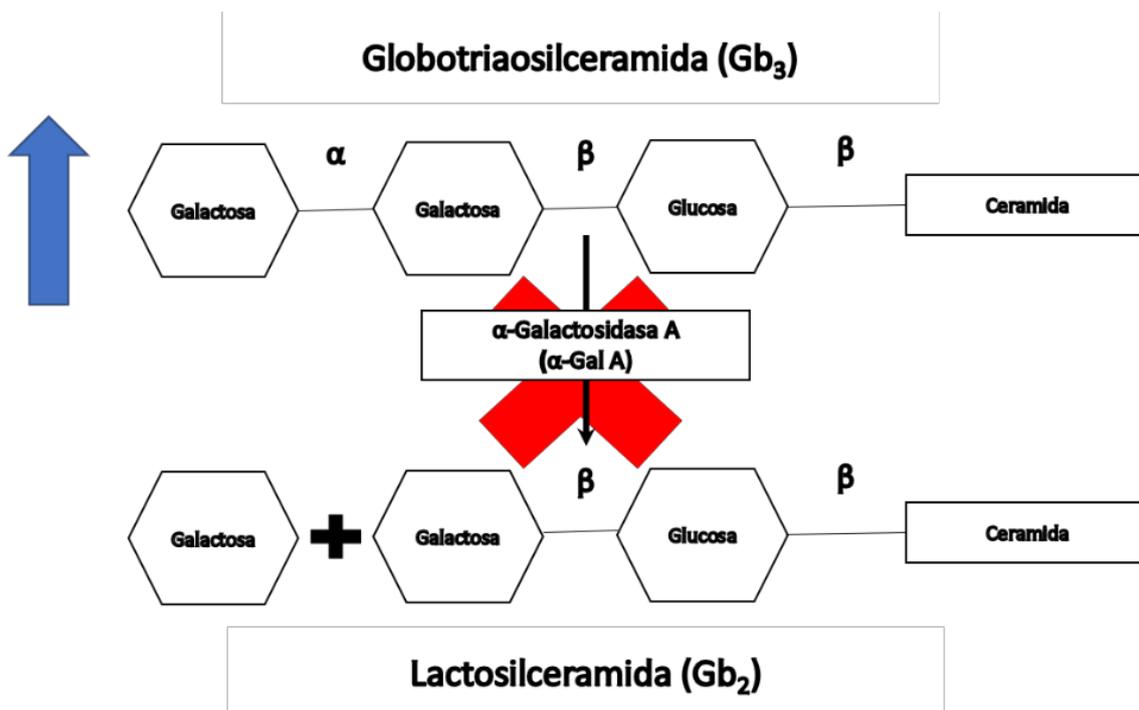
Avanti Polar Lipids	https://avantilipids.com/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
Google	https://www.google.es/
HGMD	https://www.hgmd.cf.ac.uk
HGSV	https://www.varnomen.hgvs.org
HSF	http://www.umd.be/HSF3/
LOVD	https://www.lovd.nl/3.0/
Lysosomal storage research	http://www.lysosomalstorageresearch.ca/
MatInspector	http://www.genomatix.de/matinspector.html
Matreya	https://www.matreya.com
MRC-Holland	https://www.mrc-holland.com
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
National Fabry Disease Foundation	https://www.fabrydisease.org/
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov
PROMO	http://algggen.lsi.upc.es
Protein Data Bank	https://www.rcsb.org/
RestrictionMapper	http://www.restrictionmapper.org/
SSPNN	https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
TaqMan	https://www.thermofisher.com/taqman
Universidad de Navarra	https://www.unav.edu/

INTRODUCCIÓN

1 Introducción

La enfermedad de Anderson-Fabry (EF, MIM#301500), históricamente conocida como “Angiokeratoma corporis difusum” o “Lipidosis hereditaria distópica”, es una metabolopatía de tipo congénita ligada al cromosoma X, que se caracteriza por un defecto en el catabolismo de glucoesfingolípidos neutros a nivel sistémico cuya consecuencia es el acúmulo de éstos en el lisosoma¹. La causa de este defecto metabólico es la alteración estructural o de los niveles de la enzima α -galactosidasa A (α -Gal A; EC3.2.1.11), debido a la mutación o desregulación del gen *GLA* ubicado en el brazo largo del cromosoma X (q22.1). Esta enzima tiene la función de hidrolizar los residuos α -galactosa terminales de los glucoesfingolípidos neutros (figura 1.1), principalmente globósidos como la ceramidatrihexósido o globotriaosilceramida (Gb_3)¹

Figura 1.1. Defecto metabólico en la enfermedad de Fabry.

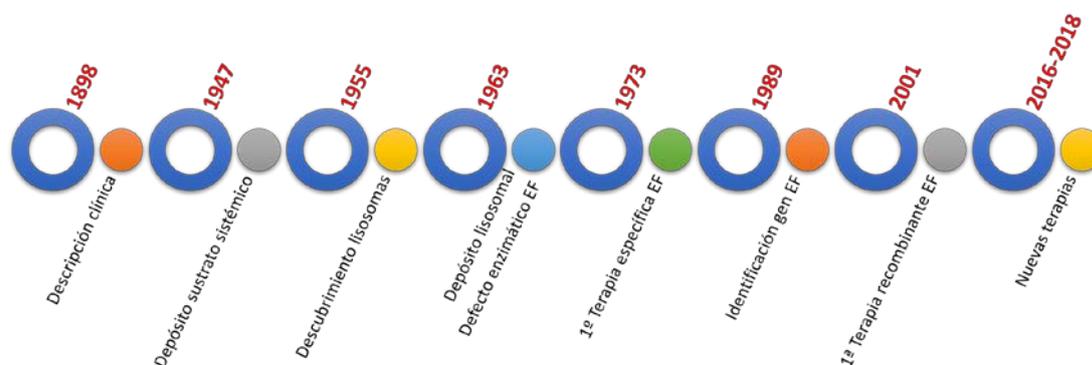


1.1 Antecedentes históricos

Desde la descripción de los primeros signos y síntomas de la enfermedad hasta el desarrollo de las aproximaciones terapéuticas actuales, han transcurrido poco más de 100 años, dándonos idea del vertiginoso progreso en el entendimiento de la enfermedad. La EF fue descrita por primera vez en el siglo XIX, concretamente en 1898 por los doctores Sir William Anderson en Inglaterra ² y Johannes Fabry en Alemania ³ de manera independiente. Ambos describieron sendos varones con erupciones cutáneas que refirieron como “ectasia de los capilares cutáneos”. En 1947, Pompen *et al.*, intuyó una alteración de depósito generalizada tras la realización de la autopsia a dos pacientes fallecidos de la EF ⁴. Pocos años más tarde, en el año 1955 de Duve *et al.* describen por primera vez a nivel citológico la existencia de unas organelas citoplásmicas diferentes a los microsomas y a las mitocondrias con una naturaleza ácida. El hallazgo de los lisosomas les valió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1974 ⁵. Una vez establecido un depósito generalizado y la existencia de una pequeña organela, en 1963 Sweely and Klionsky consiguen aislar del riñón, conservado en formaldehído de un varón de veintiocho años fallecido de insuficiencia renal, la fracción lipídica de este órgano e identifican a la Gb₃ como el lípido mayoritario en ella ⁶. En ese mismo año, Hers *et al.* fue el primero en relacionar un error innato del metabolismo con el acúmulo de un producto sin degradar en el interior del lisosoma. Desarrolló un método *in vitro* para cuantificar la actividad de la hidrolasa lisosomal α -glucosidasa ácida y la cantidad de glucógeno presente en varios tejidos. Estudió el depósito de glucógeno en cinco casos pediátricos fallecidos entre los 4,5 y 19 meses de vida, a causa de una cardiomegalia producida por la enfermedad de Pompe, y determinó la relación de la ausencia de la actividad enzimática con el acúmulo de glucógeno en el tejido cardíaco ⁷. Transcurrido unos pocos años, en 1967, uno de los investigadores más relevantes en el área de las enfermedades de depósito lisosomal, Roscoe O. Brady, identificó el defecto enzimático que causaba la EF a partir del estudio bioquímico realizado en muestras de mucosa intestinal de individuos control vs individuos Fabry (dos varones y una mujer, madre de uno de los varones) usando como sustrato de la reacción una molécula de Gb₃ marcada con isótopos radiactivos ⁸. Este mismo investigador consiguió uno de los hitos más importantes en la historia de la enfermedad: en 1973 publicó el primer trabajo de abordaje terapéutico específico de la EF, al purificar la enzima α -Gal A del tejido placentario humano e infundirlo a dos varones (20 y 35 años) con síntomas clásicos de la EF y cierta afectación renal ⁹. Brady *et al.* constataron que, tras una hora de infusión, eran capaces de detectar actividad de α -Gal A en las células de la serie blanca y en tejido hepático. En la década siguiente, La biología molecular sufriría una revolución por el

desarrollo en 1986 por parte de Mullis *et al.* de un protocolo de amplificación *in vitro* de la molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) denominado “reacción en cadena de la polimerasa”¹⁰. Este descubrimiento propició que en 1989 Konreich *et al.* consiguieran descifrar la secuencia genética codificante de la α -Gal A en el gen *GLA*¹¹. Con la aproximación terapéutica de Brady *et al.* en 1973, se ponen en marcha de proyectos de investigación focalizados en el desarrollo de terapias específicas para la EF en el tratamiento de la enfermedad, culminando en el año 2001 con el primer estudio preclínico de la primera enzima recombinante para terapia enzimática sustitutiva (TES) en la EF¹² y la aprobación por la Agencia Europea del Medicamento (AEM) en ese mismo año^{13,14}. La disponibilidad de métodos sencillos análisis de muestras, como supuso el uso de muestra de gota de sangre seca o “*dried blood spot*” (DBS)¹⁵ y de la disponibilidad de un tratamiento específico para la EF, propició la carrera investigadora y de desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas como las chaperonas moleculares¹⁶, que finalizarían en la aprobación de la AEM en el año 2016¹⁷. El futuro de la EF se encuentra en el desarrollo de terapias de reducción de sustrato (TRS), mediante inhibición de la enzima glucosilceramida sintasa (GCS)¹⁸, y en la terapia génica¹⁹ (figura 1.2).

Figura 1.2. Evolución histórica de hitos asociados a la enfermedad de Anderson-Fabry.



1.2 Prevalencia

La EF se trata de una patología panétnica y considerada como una enfermedad rara. Según la definición adoptada por los países miembros de la Unión Europea en el programa de acción de la comunidad 1993-2003 y en la directiva europea 141/2000 para la designación de medicamentos huérfanos, la prevalencia de estas patologías es de 5 afectados de cada 10.000 habitantes de la Unión.

La prevalencia para la enfermedad se postuló en 1 de cada 40.000 varones. Los estudios de prevalencia en población general (1 de cada 117.000 - 1 de cada 476.000)^{20,21} y en poblaciones

especiales o de riesgo (ver apartados 1.2.1-1.2.3) muestran grandes discrepancias, permitiéndonos pensar en una enfermedad cuya prevalencia real se encuentra subestimada. Las casusas más probables de esto las encontramos muy probablemente, por la dificultad diagnóstica y de interpretación, así como la falta de correlación genotipo-fenotipo. El agravamiento de esas diferencias y la evidencia de que la prevalencia real está subestimada queda patente en el análisis de la prevalencia de la EF en poblaciones especiales o de riesgo.

1.2.1 Cribado neonatal

Los datos publicados respecto a las diferentes iniciativas de cribado neonatal, aumentan en gran manera la prevalencia de la enfermedad respecto a los datos mostrados en población general, haciendo que la EF dejase de ser considerada como rara. Las principales publicaciones en este grupo poblacional se recogen a continuación en la tabla 1.1 observándose un rango de prevalencia de 1 de cada 1.250 a 1 de cada 7.575 recién nacidos vivos ²²⁻²⁷.

Tabla 1.1. Principales estudios de búsqueda de pacientes en el cribado neonatal.

Estudio	Población	Prevalencia*	Observaciones y limitaciones del estudio
Spada <i>et al.</i> 2006	Italiana	1 / 1.500	Estudio enzimático + molecular DBS
Hwu <i>et al.</i> 2009	Taiwanesa	1 / 1.250	86% mutación intrón 4 (NM_000169.2:c.639+919G>A)
Mechtler <i>et al.</i> 2012	Austríaca	1 / 3.859	Estudio enz. espectrometría de masas + molecular DBS
Inoue <i>et al.</i> 2013	Japonesa	1 / 7.057	Estudio enzimático + molecular en DBS
Hopkins <i>et al.</i> 2015	Americana	1 / 2.913	Estudio enz. microfluídica digital DBS
Colon <i>et al.</i> 2017	Española	1 / 7.575	Estudio enzimático + molecular DBS

DBS=Gota de sangre seca.

*Prevalencia referida a los recién nacidos vivos independientemente de su género, excepto en el estudio de Colon *et al.* que solo hace referencia a los varones recién nacidos vivos.

1.2.2 Poblaciones de riesgo.

1. **Enfermedad renal:** Los estudios de prevalencia de la EF en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) muestran datos similares bien en población europea (Tsakiris *et al.* publica 1 de cada 5.309 pacientes con ERC) ²⁸ bien en población estadounidense (Thadhani *et al.* publica 1 de cada 5.906 pacientes con ERC) ²⁹, sin embargo los estudios de pacientes sometidos a hemodiálisis muestran una prevalencia mayor: Moiseev *et al.* identifica 1 de cada 2.786 pacientes rusos en ³⁰ y Frabasil *et al.* encuentran 1 de cada 437 pacientes argentinos ³¹. Un claro ejemplo de la efectividad de estos programas de búsqueda de pacientes, es el realizado en pacientes españoles hemodializados en el que se consiguió una

relación de 1 de cada 332 pacientes, sin tener en cuenta los pacientes diagnosticados en los estudios familiares a partir de los casos índices anteriores ³².

2. **Enfermedad cardíaca:** La práctica totalidad de los estudios publicados de prevalencia de la EF en sujetos con enfermedad cardíaca, se refieren a la miocardiopatía debida a la hipertrofia del ventrículo izquierdo (MHVI) de origen desconocido. A diferencia del resto de programas desarrollados en poblaciones de riesgo, la prevalencia de la EF en la población con MHVI de origen desconocido es muy superior, como se observa en los datos extraídos de los diferentes estudios y plasmados en la tabla 1.2. ³³⁻⁴³

Los programas de búsqueda de pacientes con MHVI de origen desconocido resultan en una “rentabilidad” diagnóstica superior a la de los otros programas orientados a poblaciones especiales, ya que suponen entre el 0,5% y 12% de las muestras cribadas ³⁴⁻⁴⁴.

Tabla 1.2. Principales estudios de búsqueda de pacientes en población con miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo de origen desconocido.

Estudio	Prevalencia*	Observaciones y limitaciones del estudio
Nakao <i>et al.</i> 1995	1 / 33	Varones; estudio enzimático plasma + molecular
Sachdev <i>et al.</i> 2002	1 / 26	Varones; estudio enzimático plasma + molecular
Chimenti <i>et al.</i> 2004	1 / 9	Mujeres; estudio histológico + enzimático leucocito + molecular
Monserrat <i>et al.</i> 2007	1 / 54	Varones y mujeres; estudio enzimático plasma + molecular
Elliott <i>et al.</i> 2011	1 / 198	Varones y mujeres; estudio molecular
Hagège <i>et al.</i> 2011	1 / 98	Varones y mujeres; estudio enzimático + molecular DBS
Palecek <i>et al.</i> 2014	1 / 25	Varones; estudio enzimático + molecular DBS
Kubo <i>et al.</i> 2017	1 / 89	Varones; estudio enzimático plasma + molecular
Maron <i>et al.</i> 2018	1 / 293	Varones y mujeres; estudio enzimático + molecular DBS
Newman <i>et al.</i> 2019	1 / 239	Varones y mujeres; estudio enzimático + molecular DBS
Woo-Shik <i>et al.</i> 2019	1 / 141	Varones; estudio enzimático plasma + molecular

DBS=Gota de sangre seca.

3. **Enfermedad cerebrovascular:** La mayoría de los programas de búsqueda de pacientes se han dirigido a población adulta joven (principalmente entre 18-60 años) con ictus isquémico de causa no aclarada o criptogénico.

Los principales programas de búsqueda de pacientes con ictus (muchas veces recurrente) en población menor de 60 años se recogen en la tabla 1.3 con menor “rentabilidad” diagnóstica que los indicados en el apartado 1.2.3 ⁴⁵⁻⁵².

Tabla 1.3. Principales estudios de búsqueda de pacientes en población menor de 60 años e ictus recurrente.

Estudio	Prevalencia*	Observaciones y limitaciones del estudio
Rolfs <i>et al.</i> 2005	1 / 26	Varones y mujeres; estudio enzimático plasma + molecular
Dubuc <i>et al.</i> 2013	1 / 14	Género no especificado; estudio molecular + biomarcadores DBS
Shi <i>et al.</i> 2014	1 / 20 -1 / 30	Meta-análisis valorando 9 estudios y n=8.302
Romani <i>et al.</i> 2015	1 / 36	Varones estudio enzimático + molecular; Mujeres estudio molecular
Fazekas <i>et al.</i> 2015	1 / 111	Varones y mujeres; estudio enzimático + molecular DBS
Bersano <i>et al.</i> 2016	1 / 33	Varones estudio enzimático + molecular; Mujeres estudio molecular
Reisin <i>et al.</i> 2018	1 / 311	Varones estudio enzimático + molecular; Mujeres estudio molecular
Lee <i>et al.</i> 2019	1 / 500	Varones y mujeres; estudio molecular

DBS=Gota de sangre seca.

1.3 Patogenia

1.3.1 Sustratos acumulados

La causa fundamental de la EF es el acúmulo sistémico de lípidos neutros pertenecientes a la familia de los esfingolípidos (figura 1.3) ⁶. Estos lípidos derivan de la esfingosina, un aminoalcohol de cadena alifática (figura 1.3 H). A su vez, la esfingosina, se halla unida a un ácido graso de cadena larga mediante un enlace amida dando lugar a la ceramida (figura 1.3 G). Unida al grupo hidroxilo 1 de la ceramida mediante enlace O-glucosídico encontramos un oligosacárido de diferente composición y tamaño (tabla 1.4), formando los glucoesfingolípidos (figura 1.3 A-B-C-E-F).

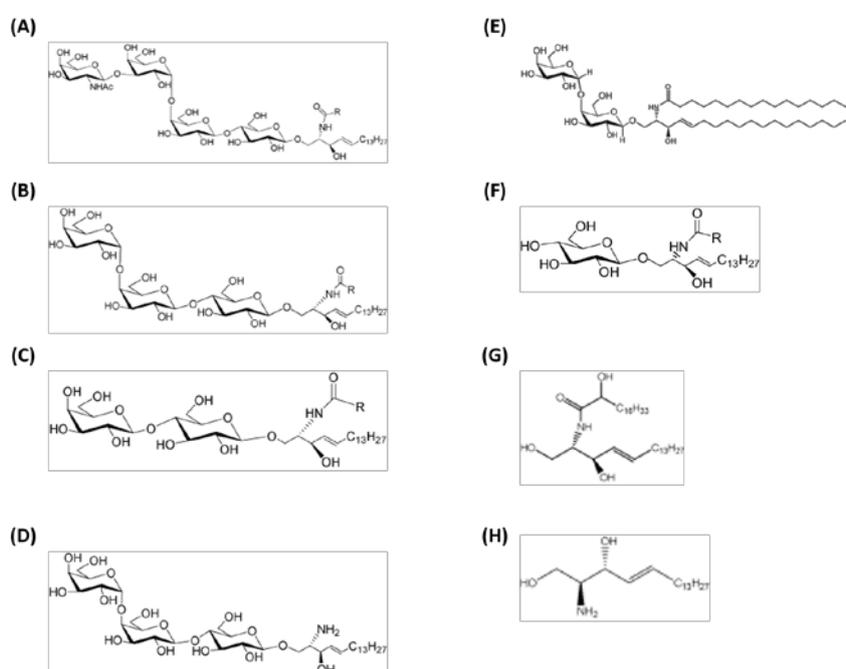
Tabla 1.4.Principales oligosacáridos que conforman los glucoesfingolípidos.

Familia	Estudio	Oligosacárido*
Gangliósidos	GM1	Gal+NAC-Gal+NANA+Glu+Cer
	GM2	NAC-Gal+NANA+Glu+Cer
	GM3	NANA+Glu+Cer
Globósidos	Globotetraosilceramida (Gb ₄)	NAC-Gal+Gal+Gal+Glu+Cer
	Globotriaosilceramida (Gb ₃)	Gal+Gal+Glu+Cer
	Lactosilceramida (Gb ₂)	Gal+Glu+Cer
	Galabiosilceramida (Ga ₂)	Gal+Gal+Cer
Cerebrósidos	Glucosilceramida (Gb ₁)	Glu+Cer
	Galactosilceramida (Ga ₂)	Gal+Cer

*Gal=Galactosa; Glu=Glucosa; NAC-Gal=N-Acetil Galactosamina; NANA=Ácido N-Acetil Neuroamínico; Cer=Ceramida.

En la EF, el glucoesfingolípido que se acumula en mayor proporción es la Gb₃ (figura 1.3 B). Este glucolípido es llamado también antígeno pk de los grupos sanguíneos p⁵³ y CD77 actuando como receptor de la toxina Shiga (*Shigella dysenteriae*) o semejante a Shiga también llamada verotoxina (*Escherichia coli*)^{54,55}. Otras sustancias acumuladas son: la globotriaosilesfingosina (liso-Gb₃, figura 1.3 D), derivado deacilado de la Gb₃ generado por la acción catalítica de la ceramidasa ácida⁵⁶ y la galabiosilceramida (Ga₂, (figura 1.3 E), presente mayoritariamente en riñón⁵⁷.

Figura 1.3. Glucoesfingolípidos. (A) Globotetraosilceramida o Gb₄; (B) Globotriaosilceramida o Gb₃; (C) Globotriaosilesfingosina o Liso-Gb₃; (D) Lactosilceramida o Gb₂; (E) Galabiosilceramida o Ga₂; (F) Glucosilceramida o Gb₁; (G) Ceramida; (H) Esfingosina; Fuente: imagen adaptada de www.matreya.com y www.avantilipids.com.



1.3.2 Fisiopatología general

La principal alteración fisiopatológica en la EF es la disfunción vascular, participando de la patogenia de ésta los siguientes factores⁵⁸:

1. **Acúmulo de Gb₃**: El origen del acúmulo de Gb₃ bien es debido a la síntesis endógena, bien a la autofagocitosis de las membranas celulares. En el segundo caso, cabe destacar que los glucoesfingolípidos son moléculas que se encuentran en las membranas plasmáticas de la mayoría de las células de todos los tejidos en el organismo. Debido a la elevada tasa de recambio de los hematíes, es esta fuente de glucolípidos la que más contribuye al desarrollo de la EF. Excepto en las personas con grupos sanguíneos pk y p, el principal

glucoesfingolípido de la membrana del hematíe es la globotetraosilceramida (Gb₄, figura 1.3 A). Cuando las células rojas se vuelven senescentes son retiradas del organismo por los macrófagos. Todos los componentes de la membrana de las células fagocitadas son degradados enzimáticamente en el lisosoma. Por medio de la catálisis enzimática de la Hexosaminidasa B, las moléculas de Gb₄ son hidrolizadas formando Gb₃. En los pacientes con la EF, puesto que la actividad de la α -Gal A está reducida o es nula, se acumulan cantidades patológicas de Gb₃ en todos los tejidos del organismo. La importancia de la fuente constante de glucoesfingolípidos procedente del estroma de los hematíes senescentes fue confirmada por experimentos con el modelo en ratón de EF. En este ratón se produce un acúmulo significativo de Gb₃ en los órganos ⁵⁹.

2. **Alteración estructural de los vasos:** La pared vascular se encuentra alterada ya que existe un engrosamiento de la íntima y media de la capa muscular de la pared arterial, siendo esta hiperplasia la que precede a la disfunción endotelial en el devenir de los acontecimientos que llevan a la vasculopatía ^{60,61}.
3. **Activación endotelial y estado protrombótico:** este fenómeno se pone de manifiesto al estimularse en leucocitos circulantes la síntesis y liberación de moléculas para la adhesión al endotelio vascular, debido a la presencia de glucoesfingolípidos; a su vez, una mayor interacción de los leucocitos con el endotelio estimula en los primeros una mayor síntesis de moléculas proinflamatorias como interleucinas o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) ⁶². Otro factor a tener en cuenta en la activación endotelial y del estado protrombótico, es el exceso de producción de especies reactivas de oxígeno y la reducción de la actividad del óxido nítrico, propiciando la regulación a alza de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular ⁶³. Se ha constatado que en los pacientes EF existe una menor expresión de factores trombolíticos que propician el estado protrombótico edades precoces.

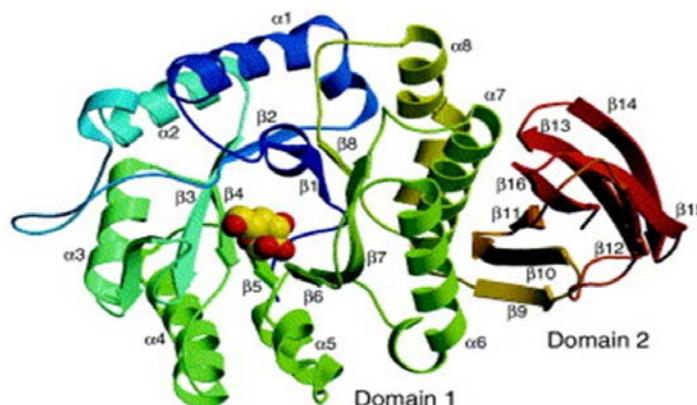
1.4 Estructura de la α -galactosidasa A humana

La estructura de la α -Gal A humana fue determinada mediante cristalografía de rayos X en el año 2004 ⁶⁴ y se encuentra indizada en el repositorio público "*Protein Data Bank*" del Instituto Nacional de la Salud de EE. UU con el número de acceso 1R46 (ver enlaces).

La enzima comprende 429 aminoácidos y se estructura como un homodímero, en el que cada monómero lo forman dos dominios: el dominio 1 o N-terminal es un barril (β/α) y el dominio 2 o C-terminal es un sándwich β que contiene 8 hebras β antiparalelas (figura 1.4). El dominio N-

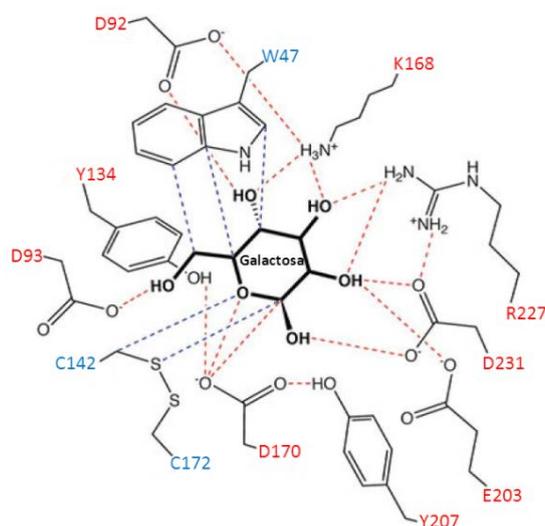
terminal está comprendido entre los residuos 32 al 328 y el dominio antiparalelo C-terminal entre los residuos 329 al 421. El dominio N-terminal contiene el centro activo de la enzima el cual está colocado al final del dominio C-terminal en las hebras β (β 1- β 7) al lado del centro del barril β .

Figura 1.4. Vista 3D de uno de los monómeros de la α -Gal A humana. Fuente: Protein Data Bank, imagen adaptada de Garman SC y Garboczi DN 2004.



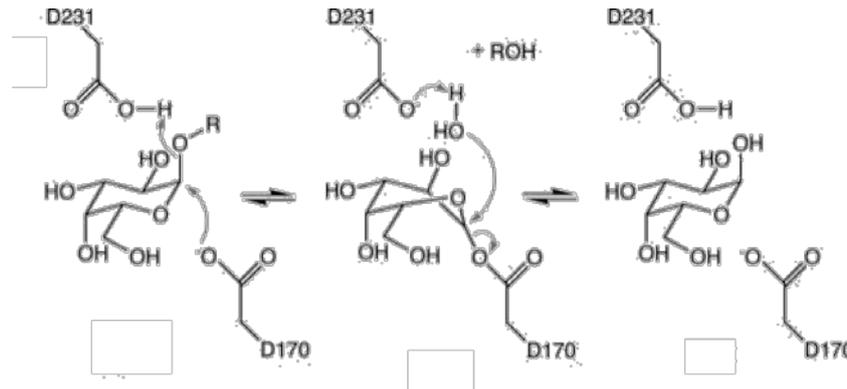
En la superficie de la molécula se encuentran tres motivos N-glicosilados unidos a los residuos de ácido aspártico N139, N192 y N215. El centro activo de la molécula (figura 1.5) está formado por las cadenas laterales de los residuos W47, D92, D93, Y134, C142, K168, D170, C172, E203, L206, Y207, R227, D231, D266 y M267. Los residuos C142 y C172 forman un puente disulfuro. Los dos centros activos en el dímero están separados a una distancia aproximada de 50 Å⁶⁵.

Figura 1.5. Centro activo de la enzima. En azul están representadas las interacciones de van der Waals y en rojo los puentes de hidrógeno con el ligando de α -galactosa. Fuente: imagen adaptada de Guce A y Garman SC 2010.



La α -Gal A, usa un mecanismo de reacción de doble desplazamiento (figura 1.6), donde se producen dos ataques nucleófilos consecutivos en el carbono anomérico del sustrato, rompiendo el enlace glucosídico con la retención global del carbono anomérico del producto. En la α -Gal A, el catalizador nucleófilo es el residuo D170 y la catálisis ácido/base está producida por el residuo D231 ⁶⁶.

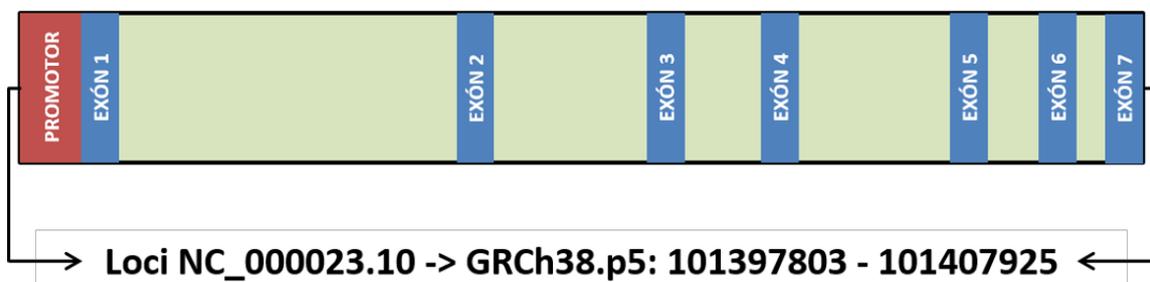
Figura 1.6. Mecanismo de reacción. Fuente: imagen adaptada de Guce A 2010.



1.5 Genética Molecular

El gen *GLA* codifica la hidrolasa ácida lisosomal α -Gal A (EC.3.2.1.22) y está localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq22.1). Está compuesto por una región promotora, siete exones (el tamaño oscila entre 92 y 291 pares de bases [pb]) y por seis zonas intrónicas (Figura 1.7.). La región codificante comprende 1.292 pb. Como peculiaridades de este gen, es que es uno de los que más elementos Alu contiene en el genoma y que carece de zona 3' no traducida o "UTR"; esta última peculiaridad hace que la señal de poliadenilación se sitúe en la región codificante ⁶⁷.

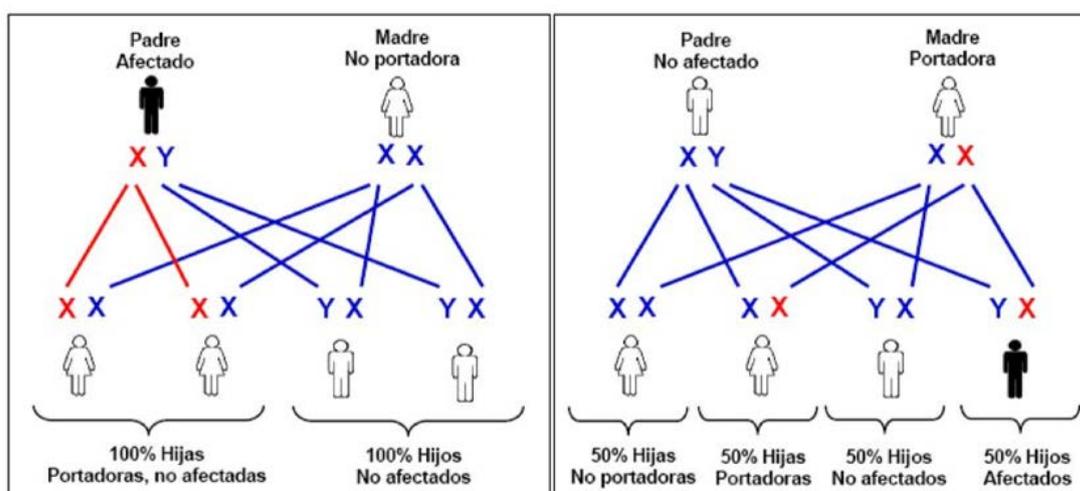
Figura 1.7. Representación gráfica del gen *GLA*. Zonas intrónicas en verde. El tamaño de exones e intrones no se encuentra a escala.



1.5.1 Patrón de herencia

La localización del gen *GLA* supone que el modelo de herencia se encuentre ligado al cromosoma X. Los varones portadores hemizigotos de las variantes causales de la enfermedad, van a transmitir las variantes al 100% de sus hijas y a ningún varón en la siguiente generación; en el caso de las mujeres heterocigotas, la van a transmitir al 50% de sus descendientes sin importar el género de éstos (figura 1.8).

Figura 1.8. Modelo de herencia ligado al cromosoma X. Fuente: imagen adaptada de www.google.com.

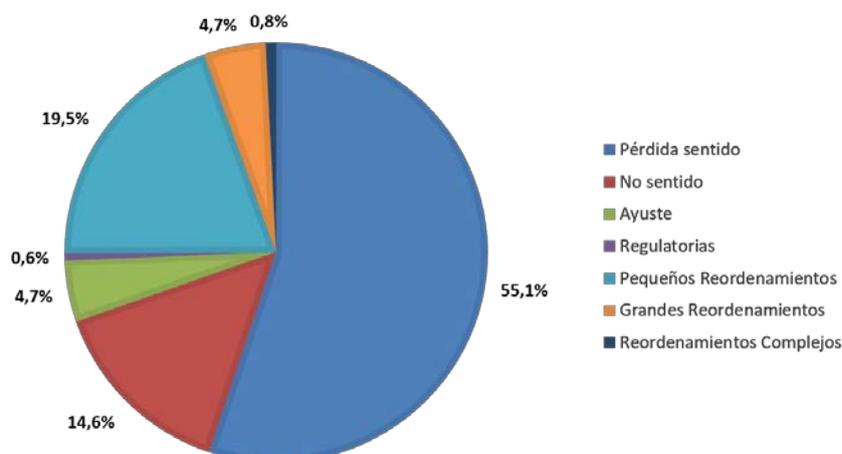


Tradicionalmente se ha considerado que la herencia de esta enfermedad era de tipo ligada al X recesiva. Las definiciones estándar de herencia ligada al X dominante o recesiva no tienen en cuenta la diferente expresividad de las patologías en mujeres ni tampoco los mecanismos que provocan esa expresión diferencial, por lo que se propone la discontinuación de esas definiciones y tan solo describirse las patologías como herencia ligada al X⁶⁸.

1.5.2 Espectro mutacional

Se han descrito 967 variantes en el gen *GLA* (MIM*300644) en septiembre de 2019, todas ellas recogidas en la base de datos de variantes en genes humanos del Instituto de Genética Médica de Cardiff (HGMD, ver enlaces)⁶⁹. Atendiendo a la distribución de las mutaciones presentada en la figura 1.9, aproximadamente, el 75% de las variantes indizadas son variaciones puntuales (cambio de aminoácido, generación de codón de parada prematuro, de ajuste o polimorfismos) y el 25% restante corresponden a pequeños reordenamientos (deleciones y duplicaciones).

Figura 1.9. Diagrama de sectores de la distribución de las mutaciones del gen *GLA*, indizadas en la base de datos HGMD, según la naturaleza de las mismas.



No existen claros puntos calientes o “*hot spots*” que concentren la mayoría de mutaciones puntuales, aunque es frecuente encontrarlas en los exones 5 y 6 siendo menos habituales en el exón 4. Tampoco existen mutaciones recurrentes en general o para las distintas poblaciones [a excepción de la asiática donde la mutación intrónica NM_000169.2:c.639+919G>A presenta una gran prevalencia como vimos en el apartado 1.2.1 ²³], ya que la mayoría de las mutaciones son privativas o exclusivas de cada familia. Este hecho es frecuente en enfermedades de baja prevalencia y obliga a estudiar la totalidad del gen cuando se sospecha la enfermedad; el 5-10% de los casos de diagnosticados de la EF es debido a mutaciones que han surgido *de novo* ^{70,71}

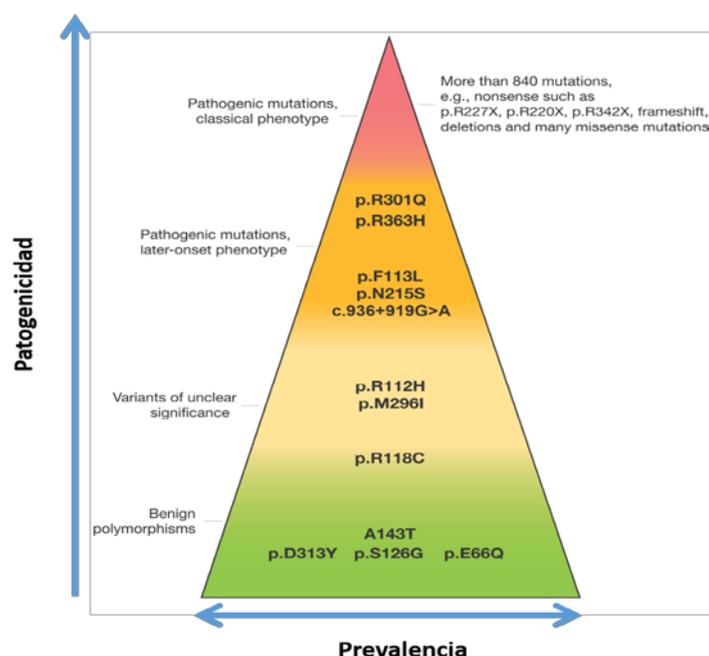
Debido a la auge de los estudios de secuenciación masiva, Las últimas recomendaciones de la “*American College of Medical Genetics*” (ACMG) tratan de estandarizar las recomendaciones a la hora de interpretar variantes genéticas e indican que éstas deben clasificarse atendiendo a criterios estructurales, poblacionales, *in silico* etc. ⁷². Esta asociación categoriza las variantes de la siguiente manera:

- **Patogénica:** variante que causa la enfermedad avalada por evidencia robusta genética y experimental, incluyendo análisis de cosegregación familiar consistente y estudios funcionales.
- **Probablemente patogénica:** variante con evidencias no definitivas, la evidencia se basa en su similitud con variantes patogénicas conocidas, cosegregación con familiares o poblaciones con enfermedad y la evidencia funcional.
- **Significado incierto (VUS):** variante que no reúne los criterios de las anteriores o cuando hay contradicciones en cuanto a su significado patológico o benigno.

- **Probablemente benignas:** variante con evidencia que apoya que no causa enfermedad (pero no concluyente).
- **Benigna:** variante con evidencia concluyente de que no causa la enfermedad, típicamente determinada (no exclusivamente) por su presencia en la población general (sana) con una prevalencia que excede la sospechada para la enfermedad.

A la vista de esta clasificación, encontramos variantes genéticas detectadas solas o en conjunto, en pacientes con sintomatología de la EF en la EF que por lo tanto deben ser consideradas VUS y generan amplio debate sobre su implicación patogénica ⁷³⁻⁸³. Otro grupo muy importante de variantes (ver figura 1.10) ⁸⁴, lo constituyen algunas variantes como NM_000169.2:c.-30A>G ^{85,86}, NM_000169.2:c.196G>C (p.Glu66Gln) ^{87,88} NM_000169.2: c.937G>T (p.Asp313Tyr) ⁸⁹⁻⁹¹ en las que los diferentes grupos de investigación no unifican su criterio respecto al carácter patogénico o benigno de las mismas y que presentan una elevada prevalencia en la población. Por último, dentro del grupo de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas, cabría resaltar aquellas en las que están causando la enfermedad por alteración del patrón de ajuste fisiológico del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) inmaduro; dentro de éstas, hay algunas variantes que causan la EF por el mecanismo anterior al cambio de aminoácido en el polipéptido ⁹² otras sin embargo son variantes intrónicas alejadas de la zona dadora o aceptora que también desregulan el mecanismo de ajuste ^{93,94}.

Figura 1.10. Representación triangular de las variantes genéticas identificadas en el fenotipo clásico, tardío, variantes de significado incierto e incluso polimorfismos en la EF. Fuente: imagen adaptada de Ortiz *et al.* 2018.



1.5.3 Correlación genotipo-fenotipo

En la EF es difícil establecer una correlación entre el genotipo identificado con el fenotipo debido a la alta proporción de mutaciones privadas ⁹⁵, la variabilidad clínica de la EF, la elevada variabilidad fenotípica intrafamiliar, la influencia de otros factores no genéticos ⁹⁶ y la similar presentación clínica respecto a otras entidades más prevalentes

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, es necesario afirmar que la naturaleza de las mutaciones y su localización en la estructura proteica van a condicionar la actividad enzimática residual y en consonancia la expresión fenotípica. Así pues, se asocia un fenotipo “clásico” a mutaciones que afectan al centro activo y/o a la estabilidad conformacional de la enzima, mientras que se asocia un fenotipo “atípico o tardío” a mutaciones alejadas del centro activo de la enzima o bien que desregulen la expresión de ésta. En este último, la actividad residual enzimática juega un papel importante en el retraso en la aparición de los síntomas de la EF. Con el conocimiento actual sobre la historia natural de la enfermedad, se ha propuesto que resultaría más apropiado describir la EF como una enfermedad con amplio espectro de fenotipos clínicos heterogéneos y progresivos.⁹⁶

Un condicionante importante en la expresión del fenotipo, además de la actividad residual de la enzima, sería la presencia de factores modificadores genéticos y ambientales. Entre los primeros se identifican variantes en genes codificantes para moléculas proinflamatorias o de la cascada de la coagulación como el gen de la interleucina 6, el gen de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial, el gen del Factor V de Leiden o del receptor de la vitamina D. Entre los segundos son importantes factores aquellos relacionados con el riesgo vascular (hipertensión arterial, colesterolemia, tabaquismo etc.)⁹⁷.

1.5.4 La EF en las mujeres. Bases genéticas y moleculares.

En la EF el término portador no es el más adecuado, ya que las mujeres pueden no desarrollar sintomatología o bien la pueden presentarla variando desde fenotipos clásicos a atípicos como lo harían los varones con la salvedad que la edad de presentación de los síntomas de la enfermedad está ligeramente retrasado unos diez años respecto de los varones ^{36,98-101}.

El hecho de que las mujeres no sean meras portadoras y presenten una amplia variabilidad fenotípica podría ser explicado por los mecanismos epigenéticos de compensación de dosis génica durante la fase embrionaria, en los que se inactiva de forma aleatoria el cromosoma X

paterno o materno, fenómeno conocido con el nombre de “Lyonización” por ser descubierto por la Dra. Mary F. Lyon en el año 1962 ¹⁰². Posteriormente, todas las células descendientes mantendrán el patrón de inactivación adquirido en la fase de blastocisto de modo que las mujeres presentan una situación de mosaicismo somático respecto las características genéticas segregadas en dicho cromosoma.

Un ejemplo visual (Figura 1.11.) de este fenómeno es la expresión del color naranja en la capa de las hembras felinas. El color naranja en esta especie está codificado por el locus O-o localizado en el cromosoma X; una hembra heterocigota para ese locus (Oo) expresará un fenotipo mosaico en su capa, con zonas naranjas y no naranjas. Una salvedad a este patrón, es el color blanco ya que éste se produce por falta de expresión de los locus que controlan la coloración de la capa. Debido a la condición quimérica de las células somáticas de las mujeres, cabe destacar entre otras implicaciones a nivel fenotípico, que aproximadamente una tercera parte de las mujeres portadoras de una variante genética patogénica y que desarrollaron signos y síntomas de la EF, no presentaban actividad enzimática reducida ¹⁰³

Figura 1.11. Expresión fenotípica del mosaicismo germinal del locus O-o en la capa de las gatas carey. Fuente: imagen adaptada de www.google.com

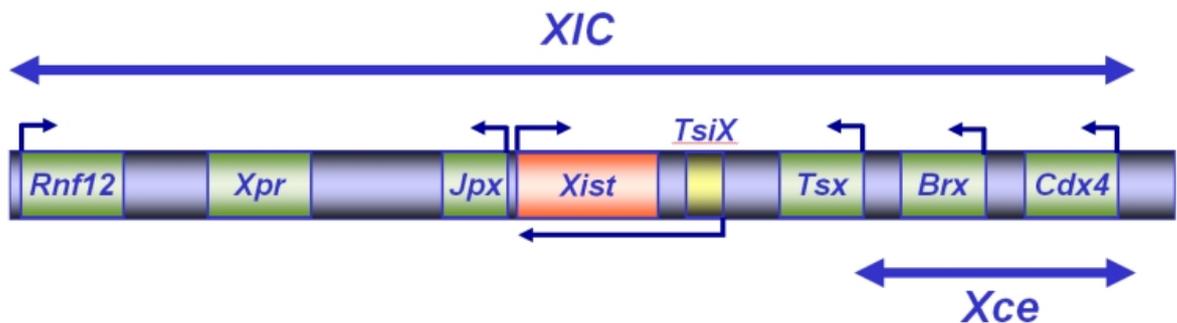


La epigenética es un mecanismo de regulación del DNA involucrado en la expresión de los genes durante el desarrollo celular. Este mecanismo no modifica la secuencia nucleotídica del DNA

siendo estable y heredable tanto en células somáticas como gaméticas. Los principales mecanismos de regulación epigenética son:

- a. Modificación covalente del DNA (Metilación): adición enzimática, por medio de metiltransferasas, de un grupo metilo a la base nitrogenada de citosinas que preceden a guaninas (dinucleótidos Cp.) principalmente, formando 5-metilcitosina e inactivando así la expresión génica. Es el principal mecanismo de regulación epigenética.
- b. Modificación covalente de Histonas (Deacetilación): eliminación enzimática, por medio de histona-deacetilasas de los grupos acetilo unidos a residuos de Lisina del extremo aminoterminal de alguna de las Histonas que intervienen en la formación del nucleosoma e inactivando así la expresión génica.
- c. RNAs no codificantes: este tipo de moléculas presenta tamaños que oscilan entre 20-300 pb siendo el mejor ejemplo de este tipo de moléculas es el gen *XIST* dentro del locus XIC (figura 1.12). Este locus es responsable de la regulación de la inactivación de uno de los cromosomas X; se trata de un locus complejo del que participan diferentes genes cada uno importante en el proceso de inactivación, pero sin duda el más importante es el gen *XIST* que codifica para un RNA no codificante con función de modificación epigenética.

Figura 1.12. Organización del locus XIC. Fuente: imagen adaptada de www.unav.edu.



1.6 Signos y síntomas de la EF

Los síntomas tempranos de la EF se experimentan generalmente antes en los varones que en las mujeres, por lo que deberemos aplicar esta premisa durante la revisión de los signos y síntomas de la enfermedad ¹⁰⁴. En la tabla 1.5 se recogen los principales signos y síntomas de la EF agrupados por sistema afectado ¹⁰⁵.

Tabla 1.5. Principales signos y síntomas relacionados con la EF.

Sistema, órgano, tejido	Síntoma observado
Sistema nervioso y anejos	Accidentes cerebrovasculares
	Cansancio, mareo, depresión
	Dolor neuropático crónico o agudo (acroparestesia)
	Opacidad corneal, tortuosidad vascular, córnea verticillata
Intestino	Tinnitus y sordera neurosensorial
	Náuseas, vómitos, diarrea
Piel	Dolor abdominal postprandial
	Angioqueratomas
Pulmón	Dishidrosis
	Obstrucción de vías aéreas
	Falta de aliento, fatiga
Riñón	Insuficiencia respiratoria
	Proteinuria, hematuria
	Síndrome nefrótico
Corazón	Insuficiencia renal, diálisis, trasplante renal
	Hipertrofia ventricular
	Alteraciones en la conducción
	Valvulopatía

1.6.1 Síntomas precoces de la EF

Uno de los principales síntomas precoces en la EF es el dolor producido por las alteraciones del sistema nervioso periférico. Éste es padecido entre el 60-80% de los varones y mujeres jóvenes afectadas comenzando antes de los 10 años ¹⁰⁶. Se han descrito dos tipos de dolor: las crisis episódicas “Crisis de Fabry”, caracterizadas por dolor ardiente en brotes originado en las zonas distales de las extremidades que se irradia hacia otras partes del cuerpo (acroparestesias) y el dolor crónico, caracterizado por parestesias ardientes y hormigueos de menor intensidad pero constantes ¹⁰⁷. Las crisis de Fabry pueden ser precipitadas por la fiebre, el ejercicio, el estrés y el cambio drástico de temperaturas ¹⁰⁸. Como consecuencia del dolor, los pacientes de EF experimentan un malestar constante y tienen una calidad de vida muy deficiente. Otros síntomas de aparición temprana y que perduran en la edad adulta (56% de los varones vs 46% de las mujeres, presentándose en la segunda década) son las manifestaciones gastrointestinales, que, aunque son comunes, suelen pasar desapercibidas o suelen ser poco

valoradas ¹⁰⁹. Los pacientes pueden presentar dolor abdominal (normalmente después de comer), diarrea, náuseas y vómitos.

Otro síntoma característico es la ausencia de sudoración (anhidrosis, 18% de los varones, presentándose antes de los diez años) ¹¹⁰ o la disminución de la misma (hipohidrosis, 49% de los varones vs 21% de las mujeres, presentándose antes de los diez años), ¹¹¹, provocando intolerancia al calor y al ejercicio debido a la dificultad para disipar el aumento de la temperatura corporal¹¹².

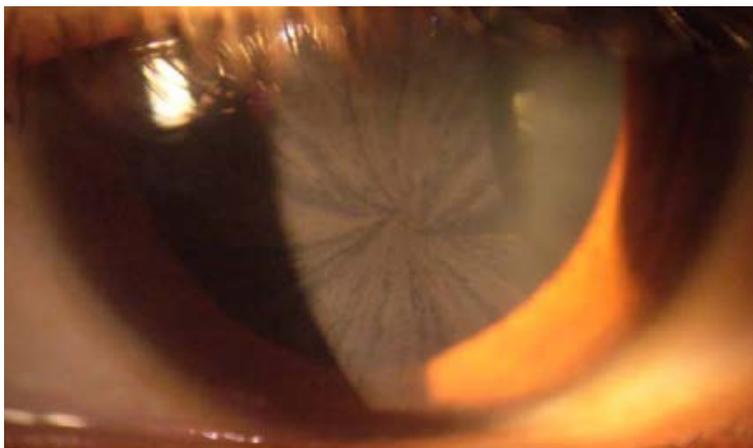
Un signo visible y precoz es el angioqueratoma. Éstos son lesiones vasculares caracterizadas por dilataciones de los vasos sanguíneos de la dermis papilar con cambios epidérmicos secundarios, como acantosis y/o hiperqueratosis típicamente encontrados en la parte baja de la espalda, ombligo, zona de las nalgas y parte alta de los muslos (pequeñas dilataciones vasculares cutáneas) y los agrupamientos en forma de pequeñas pápulas de color burdeos (figura 1.13) típicamente ubicadas en la zona de las nalgas, zona inguinal y ombligo.

Figura 1.13. Angioqueratomas. Fuente: imagen adaptada de “*National Fabry Disease Foundation*” de EE. UU. (ver enlaces).



Es frecuente encontrar cambios en la córnea, imagen en rueda de carro producidos por los depósitos de material glucolipídico no degradado dando lugar a “*cornea verticillata*” (figura 1.14).

Figura 1.14. *Cornea verticillata*. Se observa la típica imagen en rueda de carro debido al depósito subepitelial de Gb₃. Fuente: imagen adaptada de Germain DP 2010



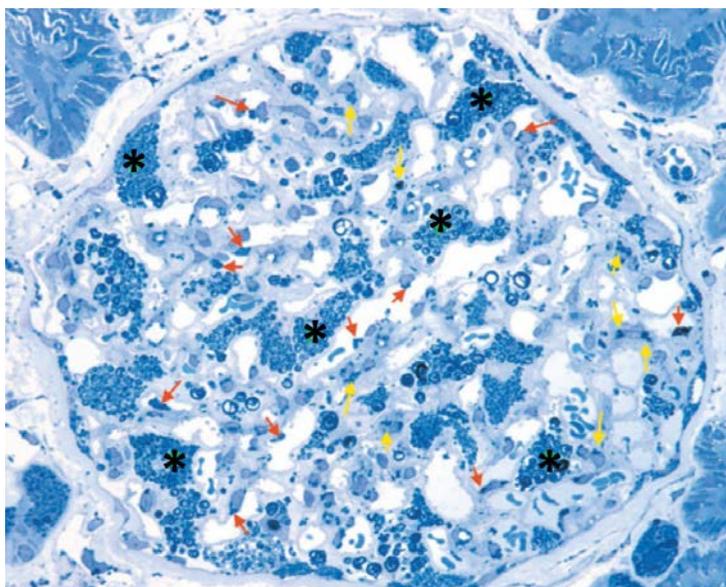
También se puede ver afectado el aparato auditivo provocando hipoacusia, tinnitus y vértigo ¹¹³.

El tinnitus puede ser un síntoma temprano y ha sido descrito en niños ¹¹⁴.

1.6.2 Manifestaciones renales

La afectación renal es bastante común en la EF produciendo a largo plazo insuficiencia renal crónica. Los depósitos de glucoesfingolípidos se pueden encontrar en los podocitos, mesangio, el epitelio tubular distal, endotelio vascular y las células musculares lisas del endotelio ^{115,116} (figura 1.15).

Figura 1.15. Acúmulo renal de Gb3. Detalle 40x de la biopsia renal de un paciente de la EF donde se observa con detalle la nefrona. Los puntos azules con textura granular son los acúmulos de sustrato en el podocito (asterisco negro), endotelio vascular (flecha amarilla) y mesangio (flecha roja) Fuente: imagen adaptada de Thurberg *et al.* 2002



La fase inicial de la afectación renal está caracterizada por la aparición de microalbuminuria, la cual incrementa cuantitativamente con el progreso de la enfermedad siendo unos de los principales factores desencadenantes de la progresión de la enfermedad renal en la EF. El mesangio ensanchado, la destrucción de los glomérulos y su reemplazo por tejido fibrótico producido por el acúmulo de Gb₃ conducen a la glomeruloesclerosis y finalmente a la insuficiencia renal. Si los túbulos están afectados mayoritariamente, el análisis urinario muestra aminoaciduria, glucosuria y acidosis tubular renal. La evaluación de la función renal incluye la creatinina en suero, cistatina C, la estimación de la tasa de filtrado glomerular (GFR), proteína total, micro o albuminuria y natriuria ¹¹⁷. La albuminuria o la proteinuria suele ser detectada en varones hemizigotos en la segunda o tercera década de la vida. La degeneración progresiva de la función renal es típica de la cuarta y la quinta década ⁷⁰.

1.6.3 Manifestaciones cardíacas

En un estudio de Linhart *et al* con más de 700 pacientes afectados de la EF, se observó que el 53% padecía afectación cardíaca de algún tipo, siendo la edad media de presentación en varones de 31,5 años y en mujeres de 39,9 años. Entre los eventos cardíacos que se registran asociados a la EF se encuentran: el infarto de miocardio (0,8% varones vs 1,6% mujeres), anomalía de la conducción eléctrica (12% varones vs 7% mujeres), MHVI (33% varones vs 21% mujeres), valvulopatías (9% varones vs 7% mujeres). Se observa que uno de los eventos cardíacos más frecuentes en la EF es la MHVI ¹¹⁸.

La MHVI no explicada por otras causas como la hipertensión arterial (HTA), estenosis aórtica o miocardiopatía hipertrófica primaria debida a variantes en genes de proteínas sarcoméricas, es la principal entidad en la afectación cardíaca de la EF. La MHVI se observa en el 53% de los varones vs 33% de las mujeres sin TES ³⁸. El patrón hipertrófico más habitual en la EF es el concéntrico, aunque se detecta también un remodelado asimétrico en el 5% de los pacientes. Entre otras consecuencias, la MHVI conlleva disnea, angina y palpitaciones ¹¹⁸.

Tras detectar signos de hipertrofia ventricular en el electrocardiograma ¹¹⁹, el método más utilizado para valorar la hipertrofia es el ecocardiograma (figura 1.16). Otras técnicas utilizadas en la valoración de la HVI es el Doppler tisular permitiendo detectar la afectación cardíaca previa a la hipertrofia ¹²⁰, la resonancia magnética permitiendo identificar presencia de fibrosis mediante el realce tardío con gadolinio ¹²¹ y una técnica derivada de ésta como es el T1 *mapping* en el que no se emplea contraste ¹²²

Figura 1.16. Ecocardiografía: Vista paraesternal eje corto mostrando HVI. Fuente: Imagen adaptada de Germain DP 2010



La isquemia de miocardio y el infarto pueden ser debidos al compromiso de la función de la red vascular coronaria ¹²³. Con la edad se desarrolla fibrosis intersticial que va desplazando progresivamente al miocardio ¹²⁴ y en los estadios finales de la enfermedad, la fibrosis es tan intensa que se reduce la función cardíaca gradualmente hasta que se produce la insuficiencia cardíaca ¹²⁵. Las arritmias malignas son las responsables de un gran número de muertes en pacientes afectados por EF ¹²⁵.

1.6.4 Manifestación cerebrovascular

La neuropatía periférica temprana suele estar seguida de complicaciones cerebrovasculares y disfunciones autonómicas en la edad adulta. Algunos de los rasgos neurológicos más devastadores de la EF están causados por lesiones cerebrovasculares, resultado de la implicación multifocal de los pequeños vasos sanguíneos ¹²⁶. La afectación cerebrovascular puede llevar a una amplia variedad de síntomas desde un grado moderado a grave, incluyendo cefalea, vértigos, isquemia cerebral transitoria e ictus ¹²⁷. Según los datos del “Fabry Registry[®]”, la prevalencia de ictus en la EF está estimada en el 6,9% de los hombres y el 4,3% en las mujeres. Esta prevalencia es superior a la de la población general de la misma edad. Datos del “Fabry Registry[®]” ¹¹² y del “Fabry Outcome Survey[®] (FOS)” ¹²⁶, han demostrado que la mayoría de los episodios de ictus en la EF están producidos por eventos trombóticos en los pequeños vasos.

1.6.5 Otras manifestaciones

Los trastornos auditivos y vestibulares son frecuentes en EF, resultando en una variedad de síntomas como la pérdida auditiva, tinnitus y vértigo ⁷⁰. Se ha descrito una mayor incidencia de hipoacusia y sordera súbita en pacientes con fenotipo clásico de EF ¹²⁸. Se ha encontrado una correlación entre la afectación neuropática y el daño vascular con la pérdida auditiva en varones en los que la actividad residual de la α -Gal A tenía un efecto protector frente a la pérdida auditiva ¹²⁹. Otra observación importante es la pérdida vestibular progresiva en el 80% de los varones y en el 77% de las mujeres cuando se ha evaluado mediante la prueba de potenciales evocados ¹³⁰.

Las opacidades corneales (visibles mediante microscopio de lámpara de hendidura) son los síntomas oculares más iniciales y frecuentes. Ocurren en la mayoría de varones hemizigotos. Se observa también una tortuosidad en los vasos retinianos y conjuntivales. Con frecuencia aparecen también cataratas subcapsulares llamadas “Cataratas de Fabry” y representan un síntoma ocular patognomónico en la EF “córnea verticillata” (figura 1.14) ⁷⁰.

La afectación respiratoria es frecuente en ambos sexos manifestándose como disnea con el ejercicio, tos crónica y ruidos respiratorios. Es frecuente encontrar obstrucción en los bronquios. En los casos graves, la infiltración de Gb3 en la barrera alvéolo capilar y la pérdida de la elasticidad pulmonar debido a la infiltración intersticial, se materializa en una reducción de la capacidad y otros índices espirométricos ¹³¹.

1.7 Diagnóstico

La edad de diagnóstico promedio en la EF para varones se encuentra en $25,7 \pm 15,3$ años mientras que para mujeres es de $31,3 \pm 17,4$ años, con un retraso promedio desde la aparición de los síntomas hasta el diagnóstico de aproximadamente 12 años para ambos sexos ¹³². Una vez que se tiene una sospecha de EF, el diagnóstico definitivo en varones debe realizarse con el análisis de la actividad de la α -Gal A en una muestra de sangre, el cual puede ser llevado a cabo en muestras de células blancas, plasma/suero ¹²⁸ o en gota de sangre seca ¹³³. La deficiencia enzimática puede ser demostrada en cultivo de fibroblastos, orina y otros tejidos ¹²⁸. La confirmación del diagnóstico es llevada a cabo por la detección de la mutación causal en el gen *GLA*. Las mujeres heterocigotas no se pueden diagnosticar de forma fidedigna mediante el análisis de actividad enzimática en leucocitos y plasma, debido a la inactivación aleatoria del

cromosoma X, ya que pueden tener niveles de actividad normales ¹²⁸. El análisis mutacional es imprescindible para confirmar el diagnóstico de los pacientes heterocigotos ¹³⁴. La detección y cuantificación de los productos de acúmulo, Gb₃ en plasma ¹³⁵ y orina ¹³⁶; liso-Gb₃ en plasma ¹³⁷ y Ga₂ en orina ⁵⁷, pueden ser de gran ayuda como prueba que evidencia el diagnóstico y como marcador de seguimiento de la enfermedad. El desarrollo de la TES ^{138,139} enfatizó la importancia del diagnóstico temprano para la EF. Los métodos de cribado basados en el análisis de la actividad enzimática en gota de sangre seca ¹³³ y de acúmulo de sustrato en orina recogida en papel de filtro ¹⁴⁰; han sido diseñados para realizar el cribado masivo y en poblaciones con alto riesgo de EF.

1.7.1 Biomarcadores

Los biomarcadores se definen como analitos que indican la presencia de un proceso biológico, el cual se encuentra en estrecha relación con las manifestaciones clínicas y el resultado de una patología particular. Un biomarcador idealmente, debería proveer indirectamente de la información de la carga de enfermedad a la hora del diagnóstico y seguimiento de la progresión de la enfermedad, así como de la medida de la corrección terapéutica de ésta ¹⁴¹. Los biomarcadores pueden ser simples metabolitos o bien moléculas complejas.

1. Gb₃: Durante mucho tiempo, el acúmulo primario de Gb₃ ha sido considerado el biomarcador de referencia de la EF ¹. Los niveles anormalmente elevados de este glucolípido no solo ocurren en el interior celular si no que se puede encontrar a elevadas concentraciones en plasma u orina como se ha constatado en varones afectados de la EF, sin embargo pueden encontrarse niveles ligeramente elevados en orina y niveles normales en plasma de mujeres portadoras sintomáticas de la EF ^{1,142,143}. La utilidad de los niveles urinarios en la monitorización de la progresión de la enfermedad no son efectivos, como lo demuestran diferentes estudios en los que además hay una falta de correlación entre niveles urinarios y sintomatología ¹⁴³. Por otro lado, los niveles plasmáticos no muestran mejores valores predictivos para las manifestaciones de la enfermedad ¹⁴³. Las técnicas habituales para medir este metabolito tanto en orina como en plasma son cromatografía líquida de alta eficacia (CL) acoplada a un sistema de monitorización múltiple de espectrometría de masas (EM) ^{144,145}
2. Liso-Gb₃: se constatan unos niveles elevados en plasma en pacientes de la EF ¹³⁷. A diferencia de la Gb₃ presenta cierto valor diagnóstico ya que los niveles de Liso-Gb₃ se encuentran mucho más elevados y permiten diferenciar entre los sujetos con formas clásicas, de las

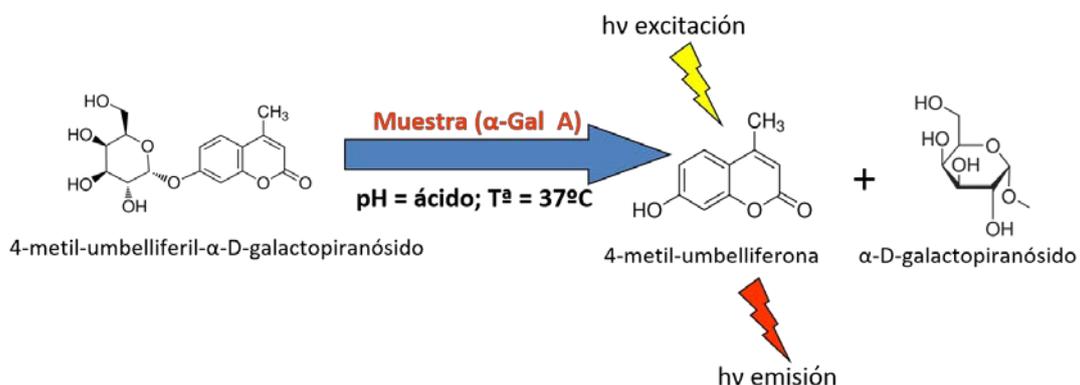
atípicas incluso de las inciertas de la enfermedad resulta incrementado ¹⁴⁶. Otra diferencia importante respecto de la Gb₃ es que los niveles de Liso-Gb₃ correlacionan con la gravedad de los síntomas de la EF y se observa un claro descenso de sus niveles bajo la TES ^{147,148}. En varones tratados con la TES, se produce un descenso de los niveles de Liso-Gb₃ de manera rápida (3-6 meses post-inicio TES) para continuar con niveles elevados respecto a la población control ^{148,149}. Sin embargo, encontramos una serie limitaciones en el uso de la Liso-Gb₃ como biomarcador de la EF: se desconoce la implicación de las variaciones de la concentración del analito en la clínica ^{148,150}; los niveles pueden verse modificados por una serie de variables (edad, género, tipo de mutación etc.) ¹⁴⁶; la presencia de anticuerpos anti enzima exógena provocan que se modifique la respuesta de ésta a la Liso- Gb₃ ¹⁴⁸.

3. Otros: se han publicado trabajos en los que se estudió el comportamiento de moléculas proinflamatorias como mieloperoxidasas, metaloproteinasas, proteína C reactiva e incluso la actividad quitotriosidasa ¹⁵¹⁻¹⁵³, considerada uno de los principales biomarcadores en la EG ¹⁵⁴. Otras muchas moléculas se han descrito como potenciales biomarcadores de la EF asociados a fenotipos cardíacos (Cistatina C y domino amino terminal del péptido natriurético atrial) ¹⁵⁵ y se continúan los esfuerzos para identificar nuevos biomarcadores con aproximaciones proteómicas ¹⁵⁶.

1.7.2 Diagnóstico enzimático

La actividad de la α -Gal A habitualmente se mide en muestras de suero/plasma, en leucocitos y DBS, mediante el uso del sustrato fluorogénico sintético, 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido a un pH de 4,6 ^{1,133,134}. En la figura 1.17 se ilustra esquemáticamente la reacción *in vitro* de la medida de la actividad enzimática utilizando el sustrato fluorogénico mencionado anteriormente.

Figura 1.17. Esquema de la reacción *in vitro* de la α -Gal A.



Para inhibir a la α -*N*-acetil galactosaminidasa (llamada también α -Gal B) se añade a la reacción *N*-acetilgalactosamina¹⁵⁷. Esta enzima es la responsable de más del 20% de la actividad total de la α -Gal A en el plasma y entre el 5-10% en leucocitos usando el sustrato sintético. Otros factores que afectan a la actividad son: el pH, la temperatura, los inhibidores endógenos, anticoagulantes y contaminación por eritrocitos. Todos esos factores se han tenido en cuenta a la hora de desarrollar el protocolo estándar y establecer los rangos de referencia. La hemoglobina liberada por los eritrocitos puede bloquear la fluorescencia emitida por el sustrato sintético. Las muestras lipémicas presentan otro problema potencial ya que los lípidos en suspensión pueden interferir con los reactivos de la reacción y afectar las medidas de fluorescencia. En el caso de medidas en leucocitos, la hemólisis en el proceso de obtención también puede ser un problema bloqueando la fluorescencia emitida por el sustrato.

Los pacientes varones con fenotipo clásico, generalmente, presentan una actividad en plasma/suero y leucocitos, baja o indetectable. El diagnóstico debe confirmarse por análisis mutacional. Los niveles de sustrato en plasma u orina están elevados en la mayoría de los pacientes y pueden utilizarse como soporte para el diagnóstico. Algunos pacientes con fenotipo clásico moderado tienen niveles residuales bajos de actividad enzimática. En pacientes con las formas atípicas de la enfermedad, que no muestran fenotipos clásicos, con síntomas tardíos, se suelen encontrar niveles de actividad residual altos^{1,16,134} incluyendo las variantes cardíacas⁴⁴ y renales⁸⁷. Los pacientes varones con una presentación clínica atípica y actividad residual alta, deben ser investigados a través de una caracterización de la actividad residual, secuenciación completa del gen *GLA* y medida de los productos de acúmulo en orina o plasma antes de establecer un diagnóstico definitivo. La actividad en mujeres afectadas varía desde los niveles bajos encontrados en varones afectados hasta niveles dentro de la normalidad. Un 30% de las mujeres portadoras tiene actividad enzimática normal¹. Una actividad normal no tiene por qué contradecir una sospecha clínica en mujeres. Aunque muchos heterocigotos tienen una actividad baja en plasma/suero y leucocitos otros no se pueden detectar por métodos enzimáticos. La identificación de los portadores está basada en la detección de las mutaciones causantes de enfermedad en el gen *GLA*. Se asume que los niveles de actividad de la α -Gal A en los leucocitos de los heterocigotos reflejan el patrón de inactivación del cromosoma X en las células de la muestra. La inactivación del cromosoma X, se propone como mayor factor determinante del desarrollo de la enfermedad en heterocigotos. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de la puntuación de gravedad de la enfermedad y la inactivación

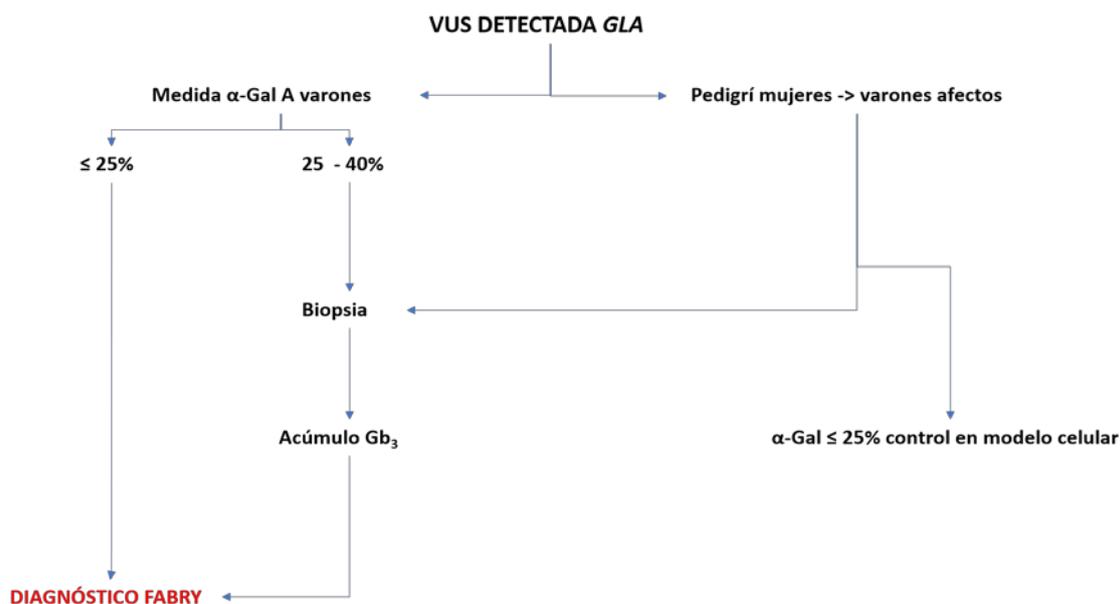
del cromosoma X ¹⁵⁸ y se ha observado que en heterocigotos en edad avanzada, a veces se encuentran valores de actividad altos dentro del rango de los heterocigotos.

1.7.3 Análisis mutacional

Para identificar las diferentes mutaciones en el gen *GLA* se pueden utilizar diferentes técnicas dependiendo de la naturaleza de la mutación ^{1,134}. El 90% de las mutaciones (mutaciones puntuales, pequeños reordenamientos) pueden ser detectados amplificando mediante la reacción de PCR, los exones, incluyendo las regiones que lo flanquean, seguido de la detección de los cambios en la secuencia por diferentes métodos. El método más preciso es la secuenciación. La mejor manera de identificar variantes (nuevas y conocidas) y las pequeñas inserciones y deleciones es secuenciar toda la zona codificante y las regiones que lo flanquean en ambas direcciones ¹⁵⁹. Otro método para detectar mutaciones de una forma rápida y sencilla, es el basado en la disociación de temperatura de dos hebras y el análisis de las curvas de fusión ¹⁶⁰. Este método ha sido utilizado en el cribado mutacional en una población con síntomas de EF ⁷⁴. Los métodos de secuenciación masiva, en los que el gen *GLA* se integra en paneles de genes agrupados por fenotipo o en exomas clínicos, son una realidad en el análisis mutacional ^{161,162}. Los grandes reordenamientos, que forman parte del 4-5% del total de las mutaciones, pueden ser detectados mediante la técnica “*Southern blot*” utilizando el DNA codificante del gen *GLA* como sonda ¹⁶³. Es difícil detectar deleciones en uno o varios exones especialmente en mujeres heterocigotas. Esas mutaciones pueden ser detectadas mediante la técnica “*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*” ¹⁶⁴. Si la mutación no se encuentra en la región codificante del gen o flanqueando a esas regiones y no es un gran reordenamiento, debe ser valorada la posibilidad de que exista una mutación de ajuste (aproximadamente 5% de las mutaciones conocidas) y debe ser caracterizada mediante el análisis del DNA codificante ⁹³ o mediante la PCR cuantitativa (qPCR) ⁹⁴ para analizar la molécula de RNA. Es importante estudiar la expresión del ajuste alternativo de la α -Gal A ya que el transcrito, en condiciones normales, está expresado entre el 1 y el 10% en tejidos. Un desbalance en el ajuste alternativo entre el transcrito fisiológico y el alternativo puede resultar en un déficit enzimático. Se ha sugerido que la qPCR debería estar incluida en el análisis genético de rutina en EF ⁹³.

Schiffmann *et al.* realizaron un algoritmo para ayudar a evaluar las VUS (figura 1.18) y llegaron a la conclusión que demostrar el acúmulo de sustrato en el tejido implicado o en la piel, si no fuera posible biopsiar el órgano diana, es la alternativa necesaria ¹⁶⁵.

Figura 1.18. Algoritmo para la interpretación de las VUS en la EF. Fuente: Imagen adaptada de Schiffmann et al. 2016



1.7.4 Otros métodos.

La observación de biopsias mediante microscopía óptica no suele ser una gran contribución al diagnóstico. Cuando la microscopía electrónica no es accesible, las secciones teñidas con azul de toluidina o tricrómico de Mason facilitan el diagnóstico. Debido al elevado número de falsos positivos y al ser un proceso invasivo no suele ser un procedimiento utilizado en el diagnóstico. Los estudios de la ultraestructura mediante microscopía electrónica del endomiocardio y las biopsias de riñón pueden mostrar acúmulo lisosomal en los cardiomiocitos o diferentes tipos celulares renales. La apariencia de las ultraestructuras de las inclusiones se presenta como capas en espiral que alternan material denso y claro (cuerpos de cebra o figuras de mielina).

La biopsia de piel observada por microscopía electrónica puede utilizarse como apoyo al diagnóstico pero es de difícil interpretación ¹⁶⁶. Como hemos visto en el apartado 1.7.3, la realización de una biopsia dirigida al órgano afectado o bien a la piel si no fuese posible la primera alternativa, puede ayudarnos a la interpretación de un VUS ¹⁶⁷.

1.8 Tratamiento

En los últimos años se han llevado a cabo muchos avances en el tratamiento de las enfermedades lisosomales. Antes del año 1990, no existía un tratamiento específico para estas enfermedades y únicamente se podían ofrecer tratamientos paliativos para las morbilidades asociadas a la enfermedad. La situación cambió radicalmente desde que apareció la primera

enzima sustitutiva obtenida de placentas humanas para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher ¹⁶⁸, que fue la primera en disponer de un tratamiento eficaz para combatir los síntomas de la enfermedad. Posteriormente y por tecnología recombinante se han obtenido otras enzimas sustitutivas aplicables a otras enfermedades lisosomales. Primeramente, en Estados Unidos y más tarde en Europa, la regulación para los fármacos huérfanos, ha propiciado que la industria farmacéutica desarrolle productos para las patologías poco prevalentes a través de un programa de beneficios como otorgarles la exclusividad en el mercado por un periodo de 10 años. Actualmente, nuevas aproximaciones terapéuticas han sido aprobadas como las chaperonas farmacológicas o se encuentran en fase de desarrollo como la terapia de reducción de sustrato o la terapia génica.

1.8.1 Terapia enzimática sustitutiva

En el año 2001 se introdujo por primera vez el uso de la enzima humana α -Gal A como TES. En Europa, actualmente, se comercializan dos enzimas: la algalidasa alfa (Replagal[®]; Takeda; Cambridge, MA, USA), producida mediante la tecnología de activación génica a partir de líneas celulares de fibrosarcoma humano (dosis: 0,2 mg/kg cada dos semanas) ¹⁶⁹ y la algalidasa beta (Fabrazyme[®]; Genzyme-Sanofi, Cambridge, MA, USA) producida a partir del cDNA de la α -Gal A en líneas celulares de ovario de hámster chino (dosis: 1 mg/kg cada dos semanas) ¹⁷⁰. Aunque los dos productos tienen la misma secuencia de aminoácidos, las dos enzimas recombinantes difieren en la cantidad de residuos de manosa-6-fosfato y en la proporción de ácido siálico en relación a la galactosa. Esto influye en la interacción de la proteína con los receptores de asialoglicoproteínas, mayoritariamente localizados en los hepatocitos y los receptores de manosa-6-fosfato distribuidos por varios tejidos afectando a la biodisponibilidad ¹⁷¹. Otro ámbito de diferenciación de ambos productos es el perfil de seguridad, ya que por la naturaleza de los motivos de glicosilación de ambas moléculas, algalidasa alfa presenta menor porcentaje de eventos adversos relacionados con la inmunogenicidad ^{169,170}

A diferencia de otras enfermedades lisosomales como la enfermedad de Gaucher (EG) en la que el acúmulo de material en el lisosoma está mayoritariamente restringido a la línea celular monocito-macrófago, en la EF están comprometidos un número mayor de tejidos. Por ese motivo la accesibilidad de la enzima es menor que en la EG. Aunque el proceso patológico en el tejido endotelial juega un papel muy importante, no puede explicar por completo el cuadro clínico en la EF, únicamente con el acúmulo de Gb₃ en este tejido. Se han realizado varios estudios clínicos comparando los parámetros bioquímicos pre- y postratamiento en muestras

de plasma y tejidos. La TES aporta beneficios sobre órganos como el corazón, riñón y otros tejidos como el endotelial ¹⁷². La variedad y gravedad de los síntomas en la EF es muy grande y no existen buenos biomarcadores para su seguimiento ^{137,146}. La TES tiene varias limitaciones: la primera es que la enzima recombinante, como ocurre en otras enfermedades de depósito, no puede atravesar la barrera hematoencefálica, con lo cual no llega a ser distribuida al sistema nervioso central. Pueden producirse reacciones de hipersensibilidad a la administración de la enzima intravenosa. Los anticuerpos generados a la larga pueden decrecer la eficacia de la terapia bloqueando la enzima ¹⁷³. La terapia no tiene eficacia sobre órganos que han sido afectados de forma irreversible como la afectación renal en estadio III, sin embargo permite la estabilización de la fibrosis y evita su evolución ¹⁷⁴. Muchas de las limitaciones de la TES posiblemente estén relacionadas con el momento en el que se empieza a administrar el fármaco, por eso un diagnóstico temprano es importante para el éxito terapéutico.

1.8.2 Terapia con chaperonas moleculares

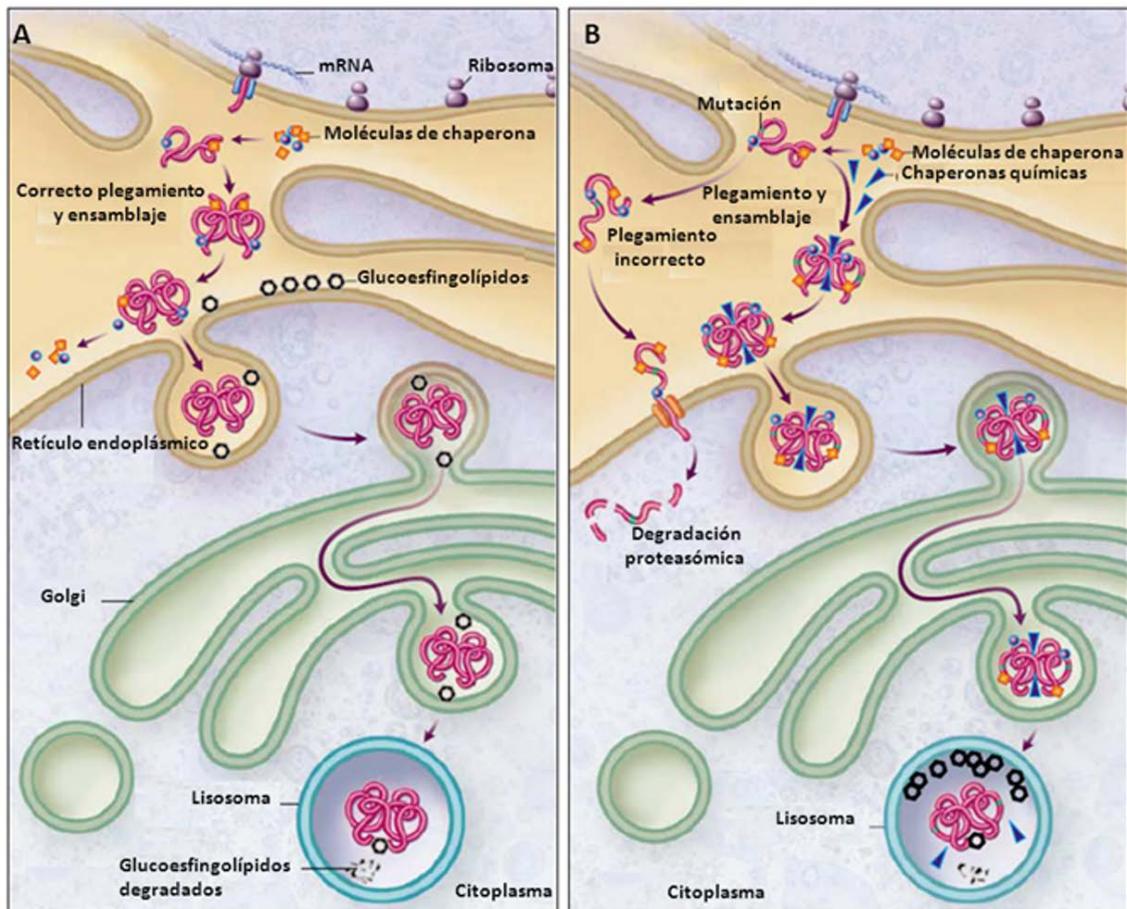
En la EF un gran número de mutaciones son puntuales generando una proteína inestable, aunque catalíticamente funcional ⁶⁴. La forma purificada de la enzima mutante es catalíticamente comparable a la proteína no mutada ¹⁶, sin embargo no es capaz de alcanzar el lisosoma por un problema conformacional, haciendo que se altere el tráfico intracelular. Los estudios del tráfico intracelular y degradación de las enzimas mutadas indican que éstas quedan retenidas en el retículo endoplasmático (RE) y son degradadas por el mecanismo programado asociado al RE (ERAD) ¹⁶. Este es el fundamento para el uso de pequeñas moléculas, las chaperonas, que estabilizan las conformaciones intermedias de la proteína y así reducir la degradación prematura mediante ERAD ¹⁶. Los inhibidores enzimáticos que provienen de la familia de los iminoazúcares pueden actuar también como chaperonas farmacológicas activas, incrementando la actividad residual enzimática y estabilizándola ^{175f}

Los iminoazúcares mimetizan a los monosacáridos, debido al cambio de un átomo de nitrógeno en lugar del átomo de oxígeno presente en la estructura cíclica de los monosacáridos y pueden actuar como potentes inhibidores de las glucosidasas. Debido a que los iminoazúcares tienen una alta afinidad por el centro activo de la enzima diana, éstos pueden actuar como chaperona específica de sitio activo estabilizando las formas de plegamiento intermedias ¹⁷⁶.

Actualmente en Europa, se comercializa una única chaperona molecular para la EF denominada 1-deoxigalactonojirimicina (DGJ) o migalastat (Galafold®; Amicus Therapeutics; Cranbury, NJ, USA). Se trata de la primera terapia oral para la EF, se distribuye bajo la formulación química de

hidrocloruro (150 mg/48h) y está indicada para el tratamiento de la EF en pacientes mayores de 16 años y que presenten una mutación “susceptible”¹⁷. El término “susceptibilidad” hace referencia al aumento de la actividad de la α -Gal A mutante en presencia de migalstat, obteniendo en modelo celular *in vitro* un incremento relativo mayor o igual al 3% o un incremento absoluto mayor o igual a 1,20¹⁷⁷. La eficacia y seguridad del producto se ha testado en varios ensayos clínicos obteniéndose resultados de mantenimiento de la función renal, disminución de la HVI, reducción y mantenimiento de niveles plasmáticos de Liso-Gb₃ etc.^{149,178}. Respecto a las bondades de una terapia oral, segura y eficaz para la EF. Pueden aparecer una serie de inconvenientes en esta terapia como una posible falta de adherencia persé al tratamiento oral en pacientes crónicos¹⁷⁹, la limitación al acceso del tratamiento ya que poco más del 30% de las mutaciones descritas en la EF serían susceptibles¹⁷, variabilidad inter-laboratorio en cuanto a los ensayos de susceptibilidad¹⁸⁰.

Figura 1.19. Mecanismo propuesto para las chaperonas específicas del centro activo. A) Mecanismo para la enzima no mutada, B) mecanismo para la enzima mutada. Imagen adaptada de Lysosomal storage research (ver enlace)



1.8.3 Nuevas aproximaciones terapéuticas

1. Terapia de reducción o inhibición de sustrato: La inhibición de la síntesis de sustrato es una alternativa terapéutica para las enfermedades de acúmulo lisosomal. Esta aproximación terapéutica en la EF lleva a la reducción de la síntesis de Gb₃ a través del descenso de la deposición de ceramida. La glucosilceramida sintasa es una de las dianas potenciales para esta aproximación terapéutica. Su inhibición conduce a una reducción en la síntesis de la glucosilceramida, precursor de glucoesfingolípidos neutros y gangliósidos. La N-butildeoxinojirimicina (miglustat, Zavesca®; Johnson and Johnson) ha sido probada con éxito en el tratamiento de la EG¹⁸¹, sin embargo el fármaco produce efectos secundarios reversibles como la diarrea y temblor. En la EF actualmente se está desarrollando un nuevo inhibidor de la glucosilceramida sintasa, llamado Lucerastat que se trata de un iminoazúcar similar a miglustat que se ensaya en pacientes de la EF tratados previamente con la TES^{182,183}.
2. Terapia enzimática sustitutiva pegilada: este tipo de tratamiento sigue los principios vistos en el apartado 1.8.1, en los que se produce una enzima recombinante a partir del cDNA de la α -Gal A en líneas celulares vegetales para posteriormente unir covalentemente sus subunidades mediante intercalado de moléculas de polietilenglicol, de esta forma se trata de incrementar la vida útil de la molécula en el plasma sin perjuicio del perfil de seguridad y pudiendo espaciar las dosis sin afectarse la eficacia del tratamiento. Se están desarrollando tres ensayos clínicos en fase II habiéndose publicado resultado positivos en cuanto a función renal por *Schiffmann et al*¹⁸⁴.
3. Terapia combinada: esta aproximación pretende combinar el uso de la chaperona farmacológica DGJ o migalastat con la TES, para conseguir alargar la vida útil de ésta sin perjudicar a la eficacia. Los resultados en animales de laboratorio fueron positivos consiguiendo incrementar en 2,5 veces la vida útil de la enzima exógena en el plasma, además de conseguir una reducción aproximada del 30% del acúmulo tisular de Gb₃¹⁸⁵. Basado en esos resultados, se está desarrollando un ensayo clínico en fase II en el que se está probando diferentes dosis de chaperona y enzima y por el momento Warnock *et al.* ha comunicado un aumento de la vida media de la enzima en plasma entre 1,2 y 5,1 veces, resultado que también constata en proporciones similares en piel y células de la serie blanca de pacientes con la EF¹⁸⁶.
4. Terapia génica: actualmente se está llevando a cabo un ensayo de terapia génica en EF, que consiste en la inserción del gen *GLA* corregido en el genoma celular mediante un vector

lentiviral; las células que son transducidas con este vector con células hematopoyéticas CD34+ del propio individuo. Los resultados obtenidos tras 6 meses del inicio del ensayo son un incremento de la actividad enzimática en sangre y tejidos y una disminución del acúmulo lipídico.¹⁹

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 Hipótesis

Los signos y síntomas compatibles con la enfermedad de Fabry, encontrados en un grupo de pacientes españoles diagnosticados como afectados de miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo de origen desconocido, están relacionados con la segregación de variantes genéticas en regiones reguladoras e intrónicas del gen *GLA*.

3 Objetivos

La EF es una metabopatía congénita ligada al cromosoma X causada por un defecto funcional de la hidrolasa ácida lisosomal α -Gal A. Este defecto conduce al depósito progresivo de sustratos glucolípidicos, en los lisosomas de varias estirpes celulares siendo, el depósito de mayor importancia fisiopatológica, aquel que se produce en el endotelio vascular ¹.

Desde el punto de vista clínico, la EF se trata de una patología multisistémica, de carácter grave, en el que se ven comprometidos diferentes órganos (riñones, sistema nervioso central y/o periférico, piel etc.) entre los que se encuentra el corazón. En este órgano, el acúmulo intracelular se produce en todas las principales estructuras cardiacas desencadenando alteraciones estructurales y/o funcionales del corazón siendo la HVI de forma mayoritaria entre otras ⁷⁰.

Se han descrito 967 variantes en el gen *GLA* a fecha de septiembre de 2019, todas ellas recogidas en la base de datos HGMD de la Universidad de Cardiff (ver enlaces). En las enfermedades raras (menos 5 de cada 10.000 habitantes, en la Unión Europea) como es el caso de la EF, la frecuencia de aparición de mutaciones privadas es muy elevada. El estudio de las variantes genéticas es en muchas ocasiones complicado, ya que hay variantes que implicarían cambios de aminoácido en el polipéptido, pero “in silico” e “in vitro” están causando la enfermedad por alteración del patrón de ajuste canónico del mRNA inmaduro ⁹². Otro ejemplo lo constituyen algunas variantes intrónicas (NM_000169.2:c.639+81A>T o NM_000169.2:c.640-801G>A) que al igual que las anteriores, alteran el patrón de ajuste canónico del mRNA ⁹³. Otro ejemplo de la complejidad lo representan la implicación de las variantes de carácter polimórfico identificadas, en pacientes con signos y síntomas compatibles con la EF, en regiones reguladoras o intrónicas y que se segregan conformando un haplotipo (haplotipo complejo intrónico, HCI) como por ejemplo NM_000169.2:c.-12G>A, NM_000169.2:c.-10C>T, NM_000169.2:c.370-81_370-77delCAGCC, NM_000169.2:c.548-125C>G, NM_000169.2:c.639+68A>G, NM_000169.2:c.640-16A>G y NM_000169.2:c.1000-

22C>T⁷³⁻⁸³. Por último, un caso muy representativo de la complejidad en el consenso sobre la patogenicidad de ciertas variantes genéticas, lo constituyen algunas como NM_000169.2:c.-30G>A^{85,86} o NM_000169.2: c.937G>T (p.Asp313Tyr)^{89,90}.

Desde el punto de vista epidemiológico, se desconoce la prevalencia real de la EF, debido a la complejidad diagnóstica de la enfermedad y a la variabilidad en cuanto a criterios de cribado, por lo que no se cuenta con un valor fiable de prevalencia en población general y menos si cabe en población afectada de la EF cuyos síntomas se restringen a un único órgano o sistema, como por ejemplo la MHVI^{33,34,37,45}.

A la luz de los precedentes anteriores, planteamos los siguientes objetivos:

1. Conocer la incidencia de la EF en pacientes (mujeres y varones) diagnosticados de MHVI de origen desconocido.
2. Valorar la capacidad de cribado en la EF, de un método de análisis enzimático y genético basado en gota de sangre seca sobre papel de filtro.
3. Caracterizar funcionalmente las variantes genéticas nuevas que se identifiquen en el gen *GLA* en individuos con signos y síntomas de la EF.
4. Realizar un análisis epidemiológico de la relación de las variantes genéticas identificadas en este estudio con diversos parámetros clínico-analíticos de la población, y su segregación en forma de haplotipos.
5. Profundizar en el estudio molecular y funcional de los individuos con signos y síntomas compatibles con la EF, en los que se haya identificado las variantes genéticas.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

4 Materiales y Metodología

4.1 Pacientes y controles

Se reclutaron pacientes, independientemente del género: pacientes diagnosticados de MHVI idiopática que se encontraban en el momento de la inclusión en seguimiento clínico en las consultas de cardiología de los hospitales participantes (reclutamiento retrospectivo); pacientes evaluados en la práctica clínica habitual en dichas consultas (reclutamiento prospectivo). En la tabla 4.1 se recogen los criterios de inclusión y exclusión para los pacientes.

Tabla 4.1. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN
Varones o mujeres.
Mayoría de edad en el momento del reclutamiento (≥ 18 años).
Pacientes con MHVI de origen desconocido (espesor del septo ventricular y/o pared ventricular izquierda posterior (EVI) >14 mm).
Pacientes no relacionados entre sí (1 paciente por familia).
Firma del consentimiento informado de participación en el estudio.
<u>OPCIONAL (NO EXCLUYENTE):</u>
Pacientes con estenosis aórtica ligera (gradiente medio <20 mm de Hg o área valvular aórtica $>1,5$ cm ²).
Pacientes HTA ligera (presión sistólica <160 mm de Hg y/o diastólica <95 mm de Hg).
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Pacientes con MHVI secundaria a causa orgánica.
Pacientes con MHVI debido a causa genética conocida.
Pacientes con MHVI de origen idiopático cuyo patrón de herencia genética no fuese ligado al cromosoma X.
Pacientes con estenosis aórtica moderada o grave (gradiente medio ≥ 20 mm de Hg o área valvular aórtica $\leq 1,5$ cm ²).
Pacientes con HTA moderada o grave (presión sistólica ≥ 160 mm de Hg y/o diastólica ≥ 95 mm de Hg).
Pacientes con coartación aórtica.

El período estimado para el reclutamiento de los pacientes fue de nueve meses desde la inclusión del primer paciente o bien hasta alcanzar el número de 600 pacientes entre los 8 centros participantes (tabla 4.2).

Tabla 4.2. Centros participantes en el estudio.

CENTRO	PROVINCIA
Hospital General Universitario de Alicante	Alicante
Hospital Universitario Puerta de Hierro	Madrid
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela	A Coruña
Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia	Murcia
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca	Murcia
Hospital Universitari Son Llàtzer	Palma de Mallorca
Hospital General Universitario de Elche	Alicante
Hospital Universitario de Donostia	Guipúzcoa

Con el fin de normalizar las posibles variables preanalíticas relacionadas con la toma de la muestra de DBS, se solicitó a cada uno de los centros anteriores, que aportasen un mínimo de 20 muestras de individuos de ambos géneros sin patología cardíaca conocida ni historia familiar de la misma, con el fin de poder ajustar unos rangos de referencia para cada centro para todas las determinaciones que se fuesen a realizar en DBS.

Para el resto de determinaciones en muestras diferentes al DBS, se utilizaron los excedentes del diagnóstico de individuos varones y mujeres, a los que se les descartó mediante método enzimático y/o genético la compatibilidad con la EF, procedentes de la colección de muestras de Enfermedades Lisosomales gestionadas por el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón.

Todos los pacientes y controles fueron informados verbalmente y por escrito, de los objetivos y metodología a seguir en este estudio, aceptando de manera voluntaria su participación en el mismo y firmando el correspondiente consentimiento informado.

Este estudio fue aprobado el 30 de marzo de 2011 por el Comité de ética de investigación clínica de la Comunidad Valenciana de la Agència Valenciana de Salut (Alicante) y categorizado el 20 de enero de 2011 como “estudio observacional no posautorización (No-EPA)” por la Subdirección general de medicamentos de uso humano de la Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. La investigación fue llevada a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki de la promulgada por la Asociación Médica Mundial en su 18º asamblea general del año 1964

en Helsinki (Finlandia), y enmendada por esta misma asociación en la 64ª asamblea general del año 2013 celebrada en Fortaleza (Brasil) ¹⁸⁷.

4.2 Diseño del estudio

El estudio constó de 3 fases como se muestra en la figura 4.1: una primera fase de inclusión de pacientes siguiendo los criterios de inclusión/exclusión (ver tabla 4.1) y toma de muestra en DBS; una segunda fase que afecta a la totalidad de los pacientes que componen la muestra y que consiste en cribado enzimático en DBS y/o secuenciación de las regiones 5'-UTR y codificantes del gen *GLA*; una tercera fase de caracterización de aquellos pacientes en los que se hayan identificado variantes potencialmente causales de la EF.

Figura 4.1. Diagrama del flujo del estudio.



4.3 Estudio ecocardiográfico

Para satisfacer el criterio de inclusión relativo al espesor del septo ventricular y/o pared ventricular izquierda posterior (EVI, ver tabla 4.1), esta determinación se podía obtener de cualquier ecocardiograma que se le hubiera realizado al paciente con una antigüedad máxima de 6 meses al momento de la inclusión en el estudio (retrospectivo). En caso de no tener ninguna determinación anterior, se debía realizar una ecocardiografía previa a la inclusión que permitiera confirmar la existencia de criterios de HVI (prospectiva). Además del espesor septal y/o pared ventricular se registró el patrón de distribución de la HVI.

Los estudios ecocardiográficos se llevaron a cabo por los médicos especialistas de cada una de las consultas externas de cardiología de los ocho centros participantes (ver tabla 4.2), siguiendo las recomendaciones de la Sociedad americana de ecocardiografía ¹⁸⁸.

4.4 Extracción de muestras de sangre para los estudios a realizar en DBS

Las muestras de sangre destinadas a los estudios de cribado enzimático y análisis molecular del gen *GLA* sobre muestra de DBS, se recogieron en las consultas externas de cardiología de los centros participantes (tabla 4.2).

La sangre se obtuvo por dos procedimientos diferentes, siguiendo las recomendaciones emitidas por nuestro laboratorio, eligiendo uno u otro según criterio de cada centro: En el primer procedimiento la sangre se obtuvo mediante flebotomía de la vena cubital, utilizando una palomilla de extracción de sangre con activación automática y portatubos premontado (BD Vacutainer® Push Button, Becton Dickinson™ o similar) para recoger un volumen variable de sangre venosa en tubos de vacío que contenían el anticoagulante sal dipotásica del ácido etilendiaminotetraacético (K₂EDTA) a concentración de 1,8 mg/mL (BD Vacutainer®, Becton Dickinson™ o similar). Una vez obtenida la sangre, se homogeneizó el contenido del tubo mediante inversión suave y se tomaron 35 µL del homogeneizado, depositándose de forma continua en cada una de las áreas delimitadas de las tarjetas de papel de filtro Whatman nº 903 (Whatman™, GE Healthcare™). En el segundo procedimiento la sangre se obtuvo mediante punción de la vena digital palmar del dedo índice, depositándose una sola gota de sangre en cada una de las áreas delimitadas de las tarjetas de papel de filtro Whatman nº 903. (ver figura 4.2)

Figura 4.2. Tarjeta de papel de filtro utilizada en el estudio de cribado.

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES LISOSOMALES DE DEPÓSITO

Nombre/Código del paciente: FAU-AL01-010

Diagnóstico: Enfermedad de Fabry Enfermedad de Gaucher

Edad: 53 Sexo: H M Fecha recogida de la muestra: 26-07-2011

Hospital: HOSPITAL GENERAL PUIGCOSTE

Médico solicitante: [REDACTED]

Teléfono contacto: [REDACTED] Email: [REDACTED]

Enviar: Prof. Miguel Pocovi
Laboratorio de Lípidos
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza
50009 Zaragoza, Spain

FEETEG

Copia para el Laboratorio

Whatman 903®
REF: 635078 LOT: W-092

Tras depositar la sangre, se codificó anonimizando la identidad del paciente y se procedió al posterior secado durante un mínimo de cuatro horas a temperatura y humedad relativa ambiente. Finalizado el secado, las tarjetas se conservaron dentro de una bolsa de plástico de

cierre hermético (eliminando el aire residual) junto con un material higroscópico, a temperatura de refrigeración (+4 °C) durante un período máximo de tres días hasta el momento del envío al laboratorio mediante servicio de mensajería, siguiendo las recomendaciones previamente publicadas^{189,190}.

4.5 Extracción de muestras de sangre para los estudios a realizar en plasma, concentrado de leucocitos, DNA y RNA

Las muestras de sangre destinadas a los estudios funcionales sobre muestra de plasma, concentrado de leucocitos, DNA y RNA, se recogieron en las consultas externas de cardiología de los centros participantes mencionados (tabla 4.2)., siguiendo las recomendaciones emitidas por nuestro laboratorio.

La sangre para los estudios del plasma, concentrado leucocitario y DNA se obtuvo mediante flebotomía de la vena cubital, utilizando una palomilla de extracción de sangre con activación automática y portatubos premontado (BD Vacutainer® Push Button, Becton Dickinson™ o similar) para recoger 10 mL de sangre venosa en tubo de vacío con anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutainer®, Becton Dickinson™ o similar); una vez obtenida la sangre, se homogeneizó el contenido del tubo mediante inversión. Adicionalmente, para llevar a cabo estudios sobre el RNA se solicitaron 5 mL de sangre venosa recogida en 2 tubos (2,5 mL/tubo) PAXgene® Blood RNA tube (PreAnalytix™, Becton Dickinson™/Quiagen™) que contenían un reactivo químico que permite la estabilización del RNA total (metodología de extracción según recomendación del fabricante).

Las muestras de sangre se codificaron con el mismo código que se le asignó a la muestra de DBS y se enviaron el mismo día de la extracción, mediante servicio de mensajería, manteniéndolas a temperatura de refrigeración (+4 °C) hasta la recepción en el laboratorio 24h post-extracción.

Se separó el plasma de las células sanguíneas, de las muestras de sangre con K₂EDTA, mediante centrifugación a 2.000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Allegra® X-15R (Beckman Coulter™). La fase superior (plasma) se alicuotó convenientemente en microtubos de 1,5 mL (Daslab) previamente codificados. El volumen de plasma aislado fue reconstituido añadiendo el mismo volumen de una solución de suero salino NaCl 0,9% (p/v) (PM=58,4 g/mol; Sigma-Aldrich®) estéril para evitar alterar la concentración de elementos celulares. De este reconstituido, se separó un volumen de 3 mL que se congeló a -20°C para

extraer el DNA a posteriori, mientras que los otros 7 mL restantes se utilizaron para obtener un concentrado de leucocitos.

El plasma aislado se conservó a -80°C para estudios posteriores.

Los tubos PAXgene® Blood RNA se congelaron durante 24h a -20°C y posteriormente se conservaron a -80°C para procesarlos a posteriori.

4.6 Obtención de muestra de orina para estudio de marcadores biológicos subrogados a la EF

Las muestras de orina destinadas a estudios de marcadores biológicos subrogados a la EF se recogieron en las consultas externas de cardiología de los centros participantes (tabla 4.2), siguiendo las recomendaciones del laboratorio de referencia.

Se recolectó la orina durante 24 h, posteriormente se homogeneizó por inversión contenido y se alicuotó 5 mL de este homogeneizado en tubos de polipropileno.

Se congelaron durante 24h a -20°C y posteriormente se conservaron a -80°C hasta el envío de las mismas al laboratorio de referencia.

4.7 Obtención de un concentrado de leucocitos a partir de sangre periférica

El concentrado de leucocitos se obtuvo a partir de 7 mL de sangre periférica en viales K₂EDTA, no congelada previamente y reconstituida con suero salino estéril (véase apartado 4.5).

Para proceder con la separación por gradiente continuo de densidad se mezcló en una jeringa de 20 mL (Terumo®), los 7 mL de sangre reconstituida con 5 mL de una solución de dextrano 6% (p/v) (PM=282 g/mol; Sigma-Aldrich®) disuelto en suero salino estéril. Se homogeneizó suavemente por inversión el contenido. Durante una hora y media se dejaron separar las diversas fases celulares por gravimetría. Pasado ese tiempo se recogió la fase superior en un tubo de fondo cónico de 15 mL de polipropileno (TPP®), evitando tomar contenido de la fase inferior que contiene los hematíes. La fase recogida se centrifugó a 2.000xg. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1 mL de suero salino estéril; se añadió 5 mL de una solución de cloruro amónico 0,83% (p/v) (PM=53,5 g/mol; Sigma-Aldrich®) disuelto en agua desionizada estéril (dH₂O); se homogeneizó por inversión suave y se dejó incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese

tiempo se centrifugó a 2.000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 5 mL de suero salino estéril, para después ser centrifugado a 2.000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado limpio de hematíes, se resuspendió en 2 mL de suero salino estéril y se dividió entre 2 microtubos de 1,5 mL. Para finalizar se centrifugaron los microtubos a temperatura ambiente en una microfuga Spectrafuge™ 24D (Labnet) a 10.000xg durante 30 segundos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante.

EL concentrado leucocitario se conservó a - 80°C para estudios posteriores.

4.8 Aislamiento del DNA genómico

4.8.1 Procedente de muestras de DBS

Mediante un troquel se obtuvo un disco de 3 mm de diámetro (\emptyset) impregnado en sangre (“spot”), de la muestra de DBS y se depositó en un microtubo de 1,5 mL convenientemente codificado. Se le añadieron 300 μ L de agua ultrapura libre de DNAasas/RNasas (ddH₂O) (Gibco®, ThermoFisher Scientific), se homogeneizó con un pulso de vórtice, se dio un pulso de microfuga y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se eliminó el sobrenadante mediante pipeteo y se repitió la operación 2 veces más. Finalizado el lavado del disco, se procedió a eluir el DNA genómico mediante lisis alcalina con 35 μ L de solución acuosa 0,1 N NaOH (PM=40 g/mol; Sigma-Aldrich®) +0,3 mM EDTA pH=13,0 (PM=292,2 g/mol; Sigma-Aldrich®) incubándolo 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se neutralizó la lisis alcalina añadiendo 65 μ L de solución acuosa 0,1 M Tris-ácido clorhídrico (HCl) pH=7,0 (PM=121,1 g/mol; Sigma-Aldrich®) homogeneizando e incubándolo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó con una microfuga a 10.000xg durante 30 segundos a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante (DNA genómico disuelto en solución acuosa 66mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA) con micropipeta, para transferirlo a un microtubo de 1,5 mL convenientemente codificado.

El DNA aislado se conservó bien a temperatura de refrigeración (+4 °C) para períodos de conservación menores a 3 días bien a -20°C para períodos de conservación menores a 90 días. El archivado de la muestra se realizó a -80°C.

4.8.2 Procedente de muestras de sangre venosa

El DNA genómico se obtuvo de sangre venosa reconstituida con suero salino estéril (véase apartado 4.4.) tras descongelación a temperatura de refrigeración (+4 °C). Se utilizó la batería de reactivos Nucleon Bacc 3 Genomic DNA extraction Kit® (Illustra™, GE Healthcare™), adaptando el protocolo indicado por el fabricante. Los únicos reactivos no incluidos en este batería fueron: Triclorometano (TCM) estabilizado con etanol (EtOH, Panreac, ITW Reagents), EtOH absoluto (Panreac, ITW Reagents) y EtOH al 70% (v/v) diluido en dH₂O. Brevemente, se añadieron 3 mL de sangre venosa reconstituida con suero salino estéril en un tubo de fondo cónico de 50 mL de polipropileno (TPP®) junto con 5,5 volúmenes del reactivo A cuyo objeto es lisar la sangre mediante un choque hipotónico. El reactivo A se abrió a la llama para poder trabajar en condiciones de esterilidad. La mezcla se homogeneizó en un agitador orbital vertical Falc F200, a velocidad constante de 9 rpm durante 10 minutos, y posteriormente se centrifugó a 1.500xg durante 15 minutos. Después el sobrenadante se decantó, quedándonos con el precipitado. Se añadieron 800 µL del reactivo B y se aplicó vórtice a una intensidad media para lisar las células. Este lisado se transfirió a un tubo cónico de 15 mL. Se añadieron 200 µL de perclorato sódico, para producir arrastre osmótico de proteínas, y se homogeneizó la mezcla por inversión. A continuación, se añadieron 800 µL de TCM y se homogeneizó de nuevo por inversión. La mezcla anterior se dejó incubar a temperatura ambiente hasta la formación, mediante gravimetría, de 2 fases (fase orgánica inferior y fase acuosa superior). Se añadió 300 µL de resina de manera cuidadosa para no perturbar las fases, y se centrifugó a 1.300xg durante 3 minutos. La fase superior, se transfirió a un tubo de fondo cónico de 10 mL de poliestireno y se añadió el mismo volumen de etanol absoluto conservado a -20°C, para producir la precipitación del DNA presente cuando ambas fases se homogeneizaron cuidadosamente por inversión. Mediante el uso de una pipeta "Pasteur" de vidrio, por adhesión, se aisló el DNA y se introdujo durante 5 segundos en EtOH al 70% (v/v) para eliminar las sales. Seguidamente, el DNA se transfirió a un microtubo de 1,5 mL (convenientemente codificado) donde se rehidrató con 300 µL de tampón Tris-HCl 10,0 mM + EDTA 1,0 mM pH=8,0 (Sigma-Aldrich®) (TE) 1× en un agitador orbital vertical a temperatura ambiente durante 24 horas.

El DNA aislado se conservó bien a temperatura de refrigeración (+4 °C) para períodos de conservación menores a 3 días bien a -20°C para períodos de conservación menores a 90 días. El archivado de la muestra se realizó a -80°C.

4.9 Aislamiento del RNA total

El RNA total se obtuvo a partir de sangre periférica conservada en un tubo PAXgene® Blood RNA, tras descongelación a temperatura ambiente durante toda la noche. Se utilizó la batería de reactivos PAXgene® Blood RNA Kit (PreAnalytix™, Becton Dickinson™/Quiagen™), adaptando el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, una vez descongelados las muestras, se homogeneizaron por inversión y se centrifugaron a temperatura ambiente en una centrífuga 5810R (Eppendorf™) a 4.000xg durante 11 minutos. Se decantó el sobrenadante y sin voltear el tubo a la posición inicial, se limpió el borde del mismo con papel secante. Se cerró con un tapón nuevo y se homogeneizó mediante un vórtice consiguiendo la disgregación del precipitado. En este punto, se continuó con el protocolo especificado por el fabricante utilizando una microfuga refrigerada Digicen21R (Ortoalresa). Finalmente, para eluir el RNA se descartó el microtubo colector, se introdujo la columna en un microtubo de 1,5 mL y se añadieron 40 µL de tampón de elución directamente sobre la membrana de la columna. Se incubaron las muestras durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000xg durante un minuto a temperatura ambiente. Este paso de elución se repitió una vez más y el eluato obtenido en estos dos pasos se unificó.

Una vez eluida la columna, se procedió a la digestión de las moléculas de DNA genómico que pudieran persistir tras el aislamiento del RNA de la muestra. Para ello, se trató 1 µg de RNA total (completando con ddH₂O hasta volumen final de 8 µL) con una mezcla de reacción que contenía 1 µL de tampón 10x de acondicionamiento para la exonucleasa DNAasa I y 1 UI de dicha enzima (Ambion®, ThermoFisher Scientific), la muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific); finalizado el período de incubación, se inactivó la enzima adicionando 1 µL de solución de EDTA 50,0 mM e incubando la mezcla en el termociclador anterior a 65°C durante 10 minutos. El RNA resultante estaba listo para determinar su concentración y pureza, así como a la purificación del RNA si fue preciso, manteniendo siempre las muestras sumergidas en baño de hielo.

El RNA total se conservó a -80°C para estudios posteriores.

4.10 Análisis de concentración, pureza y purificación de los ácidos nucleicos aislados (DNA genómico y RNA total)

Los ácidos nucleicos, debido a las estructuras aromáticas de sus bases nitrogenadas, absorben radiación electromagnética en el espectro del ultra-violeta cercano (UV) (máximo de absorción $\lambda=260$ nm) lo que permite determinar su concentración.

Las proteínas, debido a la presencia de residuos aromáticos en su estructura, absorben en la radiación electromagnética en el espectro del UV cercano, a una longitud de onda diferente que los ácidos nucleicos (máximo de absorción $\lambda=280$ nm).

Para valorar el uso en ensayos moleculares los ácidos nucleicos aislados, según los procedimientos descritos en los apartados 4.8.2. y 4.9., se aceptó como criterio de idoneidad cuando el resultado de la ecuación 4.1 se encontraba en el rango (1,8-2,0).

Ecuación 4.1. Cálculo de pureza de los ácidos nucleicos.

$$\text{Pureza} = \text{Abs } \lambda_{260 \text{ nm}} / \text{Abs } \lambda_{280 \text{ nm}}$$

Si no se superaban los criterios de pureza se procedió a su purificación.

4.10.1 Concentración y pureza del DNA genómico aislado de sangre venosa

El DNA genómico aislado de muestra de sangre venosa líquida (véase apartado 4.8.2.) se cuantificó su concentración y determinó su pureza mediante espectrofotometría de absorción UV con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000C (Thermo Electron, ThermoFisher Scientific) a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm.

4.10.2 Purificación del DNA genómico aislado de sangre venosa

Las muestras de DNA genómico, cuyo valor de la ecuación 4.1. no estuviese incluido en el rango de idoneidad anteriormente mencionado, necesitaron ser purificadas. Para ello, se añadió en un microtubo de volumen adecuado una alícuota del DNA genómico, 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH=5,2 (Sigma-Aldrich®) y 2,5 volúmenes de EtOH absoluto a -20°C (Panreac, ITW Reagents); se homogeneizó mediante agitación mecánica y se dejó precipitar durante 1 hora a -20°C. Pasado ese tiempo se centrifugaron los microtubos en una microfuga a 16.300xg durante 20 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante por decantación. A continuación, se procedió a lavar el precipitado con 500 μ L de EtOH al 70 % (v/v) frío, homogeneizándose por

inversión suave. Se centrifugaron los microtubos a 16.300xg durante 20 minutos, eliminando el sobrenadante por decantación. Esta operación de lavado se repitió y el precipitado se desecó al aire hasta que se evaporó el etanol residual. El precipitado se resuspendió en 100 μ L de TE 1x y se dejó hidratar durante toda la noche en un agitador orbital vertical a velocidad constante de 9 rpm. Al día siguiente se procedió a cuantificar y determinar su pureza según lo especificado en el apartado 4.10.1.

4.10.3 Concentración y pureza del RNA total:

El RNA total aislado (véase apartado 4.9.) se cuantificó su concentración y determinó su pureza mediante espectrofotometría de absorción UV con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000C a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm.

4.10.4 Purificación del RNA total

Las muestras de RNA total, cuyo valor de la ecuación 4.1. no fuese el tolerado, necesitaron ser purificadas según el protocolo descrito en el apartado 4.10.2 para DNA genómico, a excepción de la resuspensión del material último purificado en el que en el caso del RNA se emplearon 30 μ L de ddH₂O y se homogeneizó mediante pipeteo suave; Posteriormente se colocó este resuspendido en baño de hielo y se procedió a cuantificar y determinar su pureza de nuevo según lo especificado en el apartado 4.10.3.

4.10.5 Determinación de la integridad del RNA total

La determinación de la integridad del RNA total aislado se llevó a cabo mediante procedimiento electroforético. Brevemente, se preparó un gel de agarosa al 1% (m/v) (Ecogen) utilizando Tris-Acetato 40 mM + EDTA 1 mM pH=8,0 (TAE) 1x como disolvente y que contenía 0,5 μ g/mL de Bromuro de Etidio (Br-Et, Sigma-Aldrich®) como agente revelador de los ácidos nucleicos. En este gel se añadió en cada pocillo la mezcla de 500 ng de RNA total (ver apartado 4.9) y 2 μ L azul de bromofenol-glicerol como tampón de carga; también se añadió en un pocillo independiente 1 μ L de marcador de alto PM (1.000-10.000 pb) “High DNA Mass Ladder” (Invitrogen®, ThermoFisher Scientific). La electroforesis tuvo lugar en tampón TAE 1x durante 30 minutos a 90V en una célula horizontal Wide mini-sub® cell GT (Bio-Rad) y una fuente de alimentación Power Pac™ 300 (Bio-Rad).

El resultado se visualizó, irradiando con luz UV el gel en un transiluminador Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad) y capturando la imagen con el programa Multi-Analyst® v1.0 (Bio-Rad).

Para valorar el uso en ensayos moleculares del RNA total aislado y/o purificado, se aceptó como criterio de idoneidad la observación de una banda de tamaño 1,9 kb (RNA ribosomal 18S) y otra banda de tamaño 5 kb (RNA ribosomal 28S).

4.11 Determinación de marcadores biológicos subrogados a la EF

En este estudio como marcadores biológicos analizamos en muestra de orina y plasma K₂EDTA conservada a -80°C, la concentración de la Gb₃ (ver apartado 4.5.) y la concentración de la Liso-Gb₃ (ver apartado 4.4.) respectivamente. Ambos metabolitos fueron enviados mediante transporte especial en nieve carbónica y analizados en sendos laboratorio de referencia: La Gb₃ fue analizada por el Dr. Kai Bruns en el Instituto de Química Clínica y Laboratorio de Medicina del Centro de Médico de la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz (Alemania) y la Liso-Gb₃ fue analizada por los doctores José María Hernández Pérez y Lourdes Fluvía Cams en la Unidad de Proteómica y Metabolómica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, Barcelona (España).

4.11.1 Determinación de la concentración de Gb₃ en orina

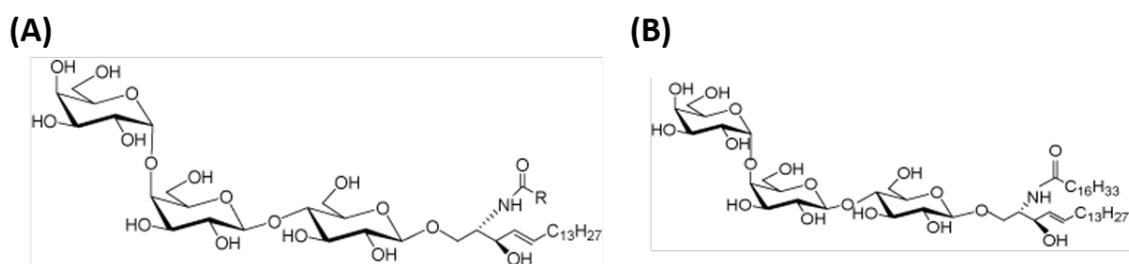
La cuantificación de la Gb₃ se realizó de acuerdo a la metodología previamente publicada por Krugër *et al.* 2010¹⁹¹. Brevemente, se tomaron 200 µL de orina descongelada (ver apartado 4.5.) y se le añadieron 1.200 µL de una mezcla 2:1 de TCM:metanol (MeOH) (v/v) y 20 µL de una solución de estándar interno (EI) de concentración 0,5 mg/L de Gb₃ modificada covalentemente (N-heptadecanoil-Gb₃, ver figura 4.3) (Matreya LLC) en una mezcla 2:1 de TCM:MeOH (v/v) como disolvente. La mezcla anterior se sonicó durante 5 minutos, se homogeneizó mediante vórtice y se centrifugó 2.800xg durante 10 minutos. Finalizado este período, se secó el sobrenadante mediante el uso de una centrifuga de vacío y se resuspendió el precipitado con 1.000 µL de TCM para ser sonicado de nuevo, homogeneizado y centrifugado a 13.000xg durante 10 minutos. La Gb₃ se separó del producto anterior mediante extracción en fase sólida, utilizando como fase estacionaria perlas de sílica (100 mg/mL) altamente retentivas para compuesto apolares equilibradas con MeOH y TCM; una vez el producto interaccionó con la fase estacionaria se lavó con MeOH y etil-acetato y se eluyó el metabolito con una mezcla 8:2 de acetona:MeOH (v/v). El eluato se secó con una centrifuga de vacío y se resuspendió el precipitado con 100 µL de MeOH para ser sonicado de nuevo, homogeneizado y centrifugado a 13.000xg durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue transferido a viales de cristal y estaba listo para ser analizado por CL.

Se generaron los calibradores de la Gb₃ a partir de conjuntos de orinas recolectadas durante 24 horas de individuos no afectados de la EF. Estos conjuntos de orinas se procesaron de la misma manera que las muestras de los pacientes. El precipitado obtenido mediante secado a vacío se resuspendió con una solución de la Gb₃ de porcino (estándar externo, EE) de concentración conocida en la mezcla 2:1 de TCM:MeOH (v/v) como disolvente. Los calibradores obtenidos abarcaban el rango (0,0-7,2) mg/L.

Se procedió con la EM: la fragmentación y cuantificación del metabolito se realizó en modo electroespray con un instrumento triple-cuadrupolo (TSQ Quantum Discovery, ThermoFisher Scientific).

La concentración de la Gb₃ en las muestras de orina de los pacientes se normalizó con la concentración de la creatinina de las mismas y el resultado se expresó como mg de Gb₃ por mmol de creatinina. El valor de referencia del laboratorio fue menor de 0,03 mg Gb₃/mmol creatinina para ambos géneros

Figura 4.3. Isómeros conformacionales empleados como estándar externo (A) e interno (B) en el proceso de cromatografía líquida-espectrometría de masas para la cuantificación de la Gb₃ en muestra de orina. Fuente: imagen adaptada de www.matreya.com.



4.11.2 Determinación de la concentración de Liso-Gb₃ en plasma

La cuantificación de la Liso-Gb₃ se realizó, con ligeras modificaciones sobre el método publicado por Boutin *et al.* 2012¹⁹². Brevemente, las alícuotas de plasma K₂EDTA (ver apartado 4.4.) se descongelaron a +4°C y se homogeneizaron mediante agitación con vórtice y sonicación. Como paso previo al aislamiento del metabolito en la muestra de plasma, fue necesario acondicionar el cartucho de extracción en fase sólida (Oasis[®]MCX, Waters Corp.) mediante la adición secuencial de 1.200 µL de MeOH y 1.200 µL HCl 1,0 mol/L en H₂O de grado apto para CL como disolvente. Una vez acondicionado el cartucho, se cargaron con una mezcla de 200 µL de plasma sonificado, 500 µL de una solución de EI de concentración 4,0 nmol/L de 1-β-D-glucosilesfingosina de origen vegetal (ver figura 4.4, Matreya LLC) en MeOH como disolvente y 100 µL de una

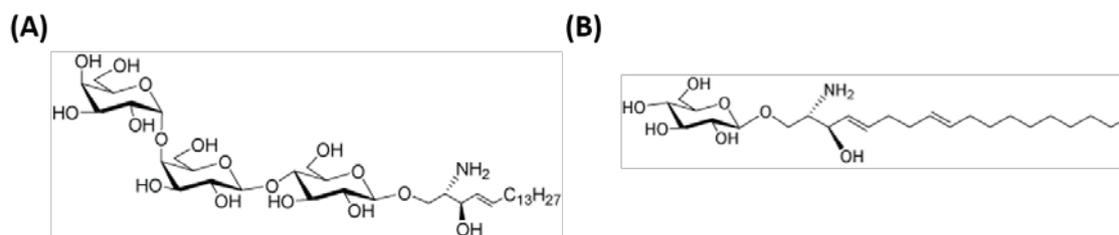
dilución de HCl 1,0 mol/L en H₂O de grado apto para CL como disolvente. Tras finalizar la carga de la mezcla anterior, se procedió al lavado secuencial del cartucho con una solución al 2,0% de ácido fórmico (AF; m/v) en H₂O de grado apto para CL y con otra solución al 0,2% de AF (m/v) en MeOH. Los metabolitos retenidos fueron eluidos mediante la adición al cartucho de 4,0 mL de una solución al 5,0% de amoniaco (v/v) en MeOH. El eluato se recogió en tubos de cristal y se secó con una centrifuga de vacío; el precipitado obtenido se resuspendió con una mezcla 50:28,8:0,2 de acetonitrilo:AF:H₂O de grado CL (v/v) y se transfirió a viales de cristal aptos para la CL.

Los calibradores de la Liso-Gb₃; se generaron mediante conjuntos de plasmas K₂EDTA de individuos no afectados de la EF a los que se les deplecionó la Liso-Gb₃ endógena mediante tratamiento de los mismos con carbón dextrano durante 12 horas a +4°C; una vez se eliminó el metabolito endógeno se procesaron de la misma manera que las muestras de plasma de los pacientes. El precipitado obtenido mediante secado a vacío se resuspendió con una solución de la Liso-Gb₃ (EE) de concentración conocida en la mezcla 50:28,8:0,2 de acetonitrilo:AF:H₂O de grado CL (v/v) como disolvente. Los calibradores obtenidos abarcaban el rango (0,0-400,0) nmol/L.

La fragmentación y cuantificación del metabolito asociada al proceso de EM, se realizó en modo electroespray positivo con un instrumento triple-cuadrupolo (Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies).

La concentración de la Liso-Gb₃ en las muestras de plasma K₂EDTA de los pacientes se expresó como nmol Liso-Gb₃ por litro de plasma. El valor de referencia del laboratorio fue menor de 1,0 nmol Liso-Gb₃/L para ambos géneros.

Figura 4.4. Isómeros conformacionales empleados como estándar externo (A) e interno (B) en el proceso de cromatografía líquida-espectrometría de masas para la cuantificación de la Liso-Gb₃ en muestra de plasma K₂EDTA. Fuente: imagen adaptada de www.matreya.com.



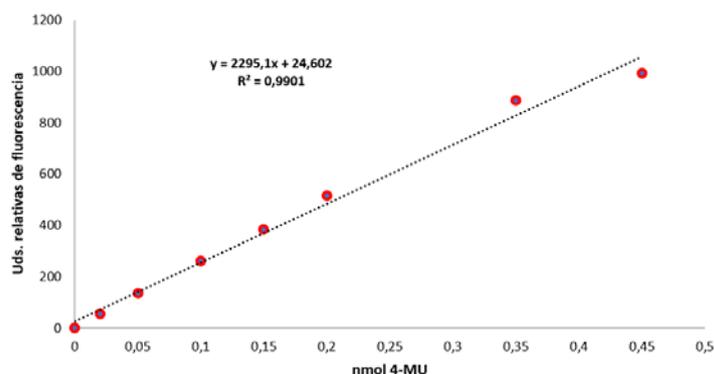
4.12 Medida de la actividad de la enzima α -galactosidasa A

4.12.1 Medida de la actividad enzimática en muestras de gota de sangre seca

El ensayo de la actividad de la α -Gal A en DBS se realizó por triplicado y fue llevado a cabo según el método descrito por Chamoles *et al* 2001¹⁹³. Brevemente, mediante un troquel se obtuvo un disco de 3 mm \varnothing de la muestra de DBS, se depositó en un microtubo de 1,5 mL convenientemente codificado y se incubó a temperatura ambiente con una solución de 0,25 M de N-Acetil-D-galactosamina preparada en dH_2O (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.), como inhibidor de específico de la enzima α -galactosidasa B. A este producto se le añadió una solución de 5 mM del sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (4-MU-Gal) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) preparado en tampón 0,07 M citrato / 0,15 M fosfato (Panreac) a pH=4,6. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 horas en un baño termostático seco con agitación de 550 rpm (Thermomixer®, Eppendorf™). Finalizado este período, se paró la reacción mediante tampón alcalino 0,1 M de etilendiamina diluida en dH_2O a pH=11,4 (Sigma-Aldrich®). El producto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-MU) obtenido se midió con una cubeta de cuarzo de 10,0 x 4,0 mm de paso óptico (Hellma®) en un fluorímetro PerkinElmer LS-45 (PerkinElmer®), empleando $\lambda_{\text{excitación}}=366$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=445$ nm.

Las medidas de fluorescencia se interpolaron en una recta de calibrado construida con calibradores de diferente concentración de 4-MU, abarcando el rango (0,00-0,50) nmol (figura 4.5).

Figura 4.5. Recta de calibrado de la 4-metilumbeliferona para los ensayos de actividad enzimática en DBS.



El resultado se expresó como micromoles de sustrato procesado por hora y por “spot” y se normalizó relativizándolo respecto al valor medio de un conjunto de controles del mismo género obtenidos en el mismo centro que el probando.

4.12.2 Medida de la actividad enzimática en muestras de plasma K₂EDTA

El ensayo de la actividad de la α -Gal A en plasma K₂EDTA se realizó por triplicado y fue llevado a cabo según el método modificado descrito por Mayes *et al* 1981¹⁹⁴. Brevemente, se añadieron a microtubos de 1,5 mL el plasma diluido con dH₂O y una mezcla en proporción 1:1 de solución 8,75 mM del sustrato 4-MU-Gal en dH₂O y tampón 0,2 M citrato / 0,4 M fosfato (v/v) a pH=4,6. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas en termostato de bloque seco (Selecta P®). Finalizado este período, se paró la reacción mediante tampón alcalino 0,2 M de glicina/hidróxido de sodio (NaOH) en dH₂O a pH=11,0 (Sigma-Aldrich®). La 4-MU se midió con una cubeta de cuarzo de 10,0 x 10,0 mm de paso óptico (ver apartado 4.12.1).

Las medidas de fluorescencia se interpolaron en una recta de calibrado construida con calibradores de 4-MU, abarcando el rango (0,0-2,0) nmol. El resultado se expresó como nanomoles de sustrato procesado por hora y por mL de plasma K₂EDTA.

4.12.3 Medida de la actividad enzimática en concentrado de leucocitos

El ensayo de la actividad de la α -Gal A en muestra de concentrado de leucocitos se realizó por triplicado y fue llevado a cabo según el método modificado descrito por Mayes *et al* 1981¹⁹⁴. Brevemente, los concentrados de leucocitos obtenidos según el apartado 4.7, fueron lisados mediante resuspensión en tampón de taurocolato sódico al 1% (m/v) (Sigma-Aldrich®) y sonicación (B. Braun Labsonic®U, B. Braun Biotech. International) de acuerdo con el esquema indicado en la figura 4.6; a continuación, se centrifugaron a 2.000xg. durante 10 minutos a +4°C y el sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo microtubo de 1,5 mL inmerso en baño de hielo. La concentración de proteína total presente en el extracto celular se cuantificó mediante espectrofotometría de absorción UV con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000C a $\lambda=280$ nm y se diluyeron a concentración de trabajo 0,0013 mg proteína/ μ L utilizando taurocolato sódico al 1% como diluyente.

Figura 4.6. Esquema del proceso de lisado del concentrado de leucocitos. El color rojo indica aplicación de pulso de ultrasonido y el color azul no aplicación del pulso.



Una vez se obtuvo el extracto leucocitario a la concentración de ensayo, se añadieron a microtubos de 1,5 mL una mezcla en proporción equivolúmetrica de este extracto, solución 14,0 mM del sustrato 4-MU-Gal en dH₂O, solución 0,4 M de N-Acetil-D-galactosamina preparada en dH₂O y tampón 0,4 M citrato / 0,8 M fosfato (v/v) a pH=4,6. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora en termostato de bloque seco. Finalizado este período, se paró la reacción mediante tampón alcalino 0,3 M de glicina/NaOH en dH₂O a pH=10,6. La 4-MU se midió con una cubeta de cuarzo de 10,0 x 10,0 mm de paso óptico (ver apartado 4.12.1).

Las medidas de fluorescencia se interpolaron en una recta de calibrado construida con calibradores de 4-MU, abarcando el rango (0,0-3,0) nmol. El resultado se expresó como nanomoles de sustrato procesado por hora y por mg de proteína total celular.

4.13 Análisis molecular del gen *GLA*. Secuenciación capilar.

Para realizar el análisis de la secuencia nucleotídica del gen *GLA*, se realizaron amplificaciones específicas de dicho gen mediante PCR y posterior aplicación de técnicas de secuenciación de primera generación (método Sanger o de los di-deoxi-nucleótidos-tri-fosfato [ddNTPs]).

Para ello diseñamos parejas de cebadores específicos mediante el programa Oligo v.7 (Molecular Biology Insights Inc., CO, EE. UU.) que cubriesen todas las regiones codificantes (la región 5'-UTR y exones, tabla 4.3) así como las regiones no codificantes (promotor del gen y todos los intrones, tabla 4.4). Para el diseño de los cebadores, tomamos como referencia la secuencia genómica de dicho gen (NG_007119.1), depositada en el repositorio público del centro nacional de información biotecnológica de Estados Unidos (NCBI, ver enlaces).

Tabla 4.3. Cebadores específicos para la amplificación de las regiones codificantes del gen *GLA*.

CEBADOR	5' - SECUENCIA - 3'	Ta (°C)	AMPLICIÓN (pb)
5'-UTR	CCCACACACCAACCTCTAACGATAC	54,0	424
	GGTGACCGGACAGCATAAAT		
Exón 1	TAGGGCGGGTCAATATCAAG	54,0	596
	TCACACAGAGAAAGTTTAGG		
Exón 2	GTGAAATCCCAAGGTGCCTA	54,0	345
	GCCATGAGGGCTGTTTCTAA		
Exón 3	CCCAATACCTGGTGAAGTAA	54,0	407
	TTTCCAGTATTGTGACAGGGTATTT		
Exón 4	GGAAGCTGAGACAGAAGAGT	54,0	494
	AGACACAAGGATGACTTTCC		
Exón 5	GTAAACTCAAGAGAAGGCTACA	54,0	430
	AAAGTTACCTAGATGACCCATA		
Exón 6	AGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATAAG	54,0	349
	GGGAAGCAACTGCGATGGTATAAGA		
Exón 7	CCAAACTAACAGGGCCACTT	57,5	434
	ATGAGCCACCTAGCCTTGAG		

Ta=Temperatura de anillamiento o hibridación; UTR=Región no traducida ("Untranslated region").

Tabla 4.4. Cebadores específicos para la amplificación de las regiones no codificantes del gen *GLA*.

CEBADOR	5' - SECUENCIA - 3'	Ta (°C)	AMPLICIÓN (pb)
Promotor	AACCCGTCATTTAATTCC	59,0	862
	CTCGCTATAGCCGTTTGAGG		
Intrón 1 frag. A	CCCTTGCTTTCCATGTGT	59,0	825
	TTGCTCTGTAAGCGCAGTTG		
Intrón 1 frag. B	GGAAGGTTGACATGGAGGAA	59,0	809
	TTGCCATTAGCCAAACATGA		
Intrón 1 frag. C	CCAGAAATAATCATGGTTTAAATGTT	59,0	960
	GTATTATCTTCAGGTAGGAAAGGACTT		
Intrón 1 frag. D	AATACAGTGGTTCTTCTATGTGTTGG	59,0	845
	GGTTTTGCATTTGGCTAGGCTA		
Intrón 1 frag. E	TTTGTAAATGTTGTGCCAAGTTCC	54,0	871
	ACCTCCATTATTAGGCACCTT		
Intrón 2 frag. A	TACAGAAGCTTGTTAGAAACAGC	59,0	870
	AAGGTTATATGGAAATACATGCAC		
Intrón 2 frag. B	ATGTTTTGTAATAGCTCTTGAGGC	59,0	634
	AATCTGCTCATTGGCTATAAATCT		
Intrón 2 frag. C	CTTGTAAATCCGCCACCTT	59,0	767
	CCCTAGCTTCAGTCCTTTGCT		
Intrón 3	CCAGAGATTTAGCCACAAAGG	59,0	822
	GAATTTCCAGCTGGGGCTAT		
Intrón 4 frag. A	CCCAGGTTCCAACCACTTCTC	59,0	826
	CCCTGCCCTCATGAAACTTA		
Intrón 4 frag. B	AGCCCTCTGTCCATTCTTCT	59,0	916
	TAATTGGGCTGTGAAAACAGA		
Exón 5 + Intrón 5	AAGGCTACAAGTGCCTCCTTT	57,5	521
	GGGCCATCTGAGTTACTTGC		
Exón 6 + Intrón 6	CTCCTTGTTCAAGACCTGCGGTAG	57,5	785
	GGGAAGCAACTGCGATGGTATAAGA		

4.13.1 Amplificación mediante PCR de las regiones codificantes del gen *GLA*

Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo en microtubos de 0,2 mL (4titude® Ltd, UK) incorporando en este el DNA aislado (ver apartado 4.8) y todos los reactivos necesarios: enzima

polimerasa del DNA termoestable “Taq”, tampón de reacción de la misma, cloruro de magnesio (Mg_2Cl), deoxi-nucleótidos-tri-fosfato (dNTPs), cebadores específicos (tabla 4.3) y ddH₂O. Las proporciones de cada uno de los reactivos empleados para la reacción de PCR, fueron diferente bien si el DNA de partida se aisló a partir de DBS (ver 4.8.1, tabla 4.5) bien si fue aislado de sangre EDTA líquida (ver 4.8.2, tabla 4.6).

Tabla 4.5. Estequiometría para la amplificación de las regiones codificantes del gen *GLA* a partir de DNA de DBS.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	11,45	
Tampón 10x, Biorline®	2,00	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	2,00	200,000 μM
Mg ₂ Cl (50mM), Biorline®	0,60	1,500 mM
Cebador Directo (10 μM)	0,40	200,000 nM
Cebador Reverso (10 μM)	0,40	200,000 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/μL, Biorline®	0,15	0,038 UI/μL
DNA genómico de DBS	3,00	

Volumen final de reacción=20 μL/amplificación

Tabla 4.6. Estequiometría para la amplificación de las regiones codificantes del gen *GLA* a partir de DNA de sangre EDTA líquida.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	6,20	
Tampón 10x, Biorline®	1,00	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	1,00	200,00 μM
Mg ₂ Cl (50mM), Biorline®	0,30	1,50 mM
Cebador Directo (10 μM)	0,20	200,00 nM
Cebador Reverso (10 μM)	0,20	200,00 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/μL, Biorline®	0,10	0,05 UI/μL
DNA genómico de sangre EDTA líquida (50 ng/μL)	1,00	5,00 ng/μL

Volumen final de reacción=10 μL/amplificación

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 según el programa térmico indicado en la tabla 4.7. El producto de la reacción (amplificación) se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v) con tinción de Br-Et utilizando como tampón TAE 1X (30 minutos 90V). El resultado se documentó con el equipo descrito en el apartado 4.9. Los amplicones se conservaron bien a +4 °C para períodos de conservación menores a 3 días bien a -20°C para períodos de conservación superiores.

Tabla 4.7. Programas térmicos empleados para la amplificación de las regiones codificantes del gen *GLA*.

PROGRAMA	REGIONES	PROGRAMA TÉRMICO
GLA CDS 1	Resto	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
		Ciclo: 45 x (94°C 30'' 54,0°C 30'' 72°C 30'')
		Elongación final: 72 °C 7'
		Conservación: 4°C ∞
GLA CDS 2	Exón 7	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
		Ciclo: 40 x (94°C 30'' 57,5°C 30'' 72°C 30'')
		Elongación final: 72 °C 7'
		Conservación: 4°C ∞

Nota: se emplearon los mismos programas térmicos indistintamente del origen del DNA aislado.

4.13.2 Amplificación mediante PCR de las regiones no codificantes del gen *GLA*

La amplificación de las regiones no codificantes del gen *GLA* se realizó exclusivamente a partir de muestras de DNA aislado de sangre EDTA líquida (apartado 4.8.2) de manera idéntica a lo descrito en el apartado 4.13.1, utilizándose los cebadores indicados en la tabla 4.4. Hubo modificaciones en cuanto a la estequiometría de la reacción (tabla 4.8) y el programa térmico (tabla 4.9).

Tabla 4.8. Estequiometría para la amplificación de las regiones no codificantes del gen *GLA*.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	5,80	
Tampón 10x, Bioline®	1,00	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	1,00	200,00 μM
Mg ₂ Cl (50mM), Bioline®	0,30	1,50 mM
Cebador Directo (10 μM)	0,40	400,00 nM
Cebador Reverso (10 μM)	0,40	400,00 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/μL, Bioline®	0,10	0,05 UI
DNA genómico de sangre EDTA líquida (50 ng/μL)	1,00	5,00 ng/μL

Volumen final de reacción=10 μL/amplificación

Tabla 4.9. Programas térmicos empleados para la amplificación de las regiones no codificantes del gen *GLA*

PROGRAMA	REGIONES	PROGRAMA TÉRMICO
GLA IVS 1	Promotor	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
	Intrón 1 frag. E	Ciclo: 40 x (94°C 45'' 54,0°C 45'' 72°C 45'')
		Elongación final: 72 °C 7' Conservación: 4°C ∞
GLA IVS 2	Exón 5 + Intrón 5	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
	Exón 6 + Intrón 6	Ciclo: 40 x (94°C 45'' 57,5°C 45'' 72°C 45'')
		Elongación final: 72 °C 7' Conservación: 4°C ∞
GLA IVS 3	Resto	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
		Ciclo: 40 x (94°C 45'' 59,0°C 45'' 72°C 45'')
		Elongación final: 72 °C 7' Conservación: 4°C ∞

4.13.3 Purificación del producto de PCR

Como etapa preparativa para la secuenciación de los amplicones del gen *GLA*, utilizamos conjuntamente 2 enzimas: Exo I (Exonucleasa I) (USB®, Affymetrix™) que degrada el DNA monocatenario subproducto de PCR, y SAP (Fosfatasa alcalina de gamba) (USB®, Affymetrix™) que hidroliza el exceso dNTPs no incorporados al producto de PCR.

Para preformar la reacción, a microtubos de 0,2 mL se dispensaron 5 µL del producto de PCR obtenido (apartado 4.13.1 o 4.13.2), 1 µL de Exo I de concentración 10 UI/µL y 1 µL de SAP de concentración 10 UI/µL. Las muestras se incubaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 a 37°C durante 15 minutos seguido de una etapa de inactivación enzimática de 80°C durante 15 minutos y se mantuvo a 4°C. El producto purificado se conservó bien a +4 °C para períodos de conservación menores a 3 días bien a -20°C para períodos de conservación superiores.

4.13.4 Reacción de secuenciación de Sanger, electroforesis capilar y análisis de secuencias

Para la secuenciación tipo Sanger, basada en ddNTPs terminadores marcados con un fluorocromo, se utilizó la batería de reactivos BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific). Estos reactivos consisten en una mezcla de enzima DNA polimerasa (DNAp) termoestable que carece de actividad exonucleasa 5' (tipo "secuenasa"), dNTPs y ddNTPs marcados con fluorocromos (un fluorocromo diferente para cada ddNTP); se establecerá una reacción convencional de PCR con la salvedad que cuando se polimerice un determinado ddNTP en la posición 3' de la hebra naciente, se detendrá la reacción pues la secuenasa no tendrá disponible un grupo hidroxilo (R-OH) libre en 3' en la hebra naciente para transferirlo al grupo fosfato (R-₃PO₄) de otro dNTP o ddNTP; se generaran amplicones que diferirán 1 nucleótido y con el marcaje diferencial de los ddNTPs se podrá elucidar la secuencia del mismo. En la tabla 4.10 se recogen las proporciones de los reactivos y producto de PCR purificado (4.13.3):

Tabla 4.10. Estequiometría para la reacción de secuenciación de Sanger.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	4,75	
BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer	1,75	1x
Producto de PCR purificado	1,50	1,5 mM
Cebador Directo o Reverso (2,1 μM)	1,50	315,0 nM
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	0,50	

Volumen final de reacción=10 μL/hebra/amplicón

Para preformar la reacción se utilizaron placas de 96 pocillos precortadas en columnas (4titude® Ltd, UK) selladas con una lámina de aluminio (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific). La reacción tuvo lugar en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 siguiendo el programa térmico especificado por el fabricante.

Una vez finalizada la reacción se procedió con la purificación del producto de secuenciación mediante un protocolo de precipitación alcohólica: a cada pocillo se le añadió 4 μL de una solución de EDTA 62,5 mM pH=8,0 en ddH₂O y 60 μL de una mezcla de precipitación alcohólica mantenida en un baño de hielo (tabla 4.11). Se selló la placa y se homogeneizó suavemente por inversión, se centrifugó brevemente a 150xg durante 30 segundos a +4°C Allegra™ 25R (Beckman Coulter®) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos protegida de la luz.

Finalizada la incubación se centrifugó a 2.100xg durante 30 minutos a +4°C. Pasado ese tiempo se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación inversa a 150xg durante 1 minuto a +4°C. Seguidamente se añadió a cada pocillo 70 µL de Et-OH 70 % (v/v), se selló de nuevo la placa y se sometió a una nueva centrifugación 2.100xg durante 15 minutos a +4°C. Pasado ese tiempo se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación inversa a 150xg durante 1 minuto a +4°C. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 10 µL de una solución de formamida apta para electroforesis capilar (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific) y se aplicó un programa térmico de desnaturalización (94°C 2 minutos) con objeto de desnaturalizar los productos de la reacción y eliminar estructuras secundarias. La electroforesis capilar tuvo lugar en secuenciador automático de DNA ABI-3500 XL Genetic Analyzer for Resequencing and Fragment Analysis (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific).

Tabla 4.11. Estequiometría de la mezcla alcohólica para la eliminación de terminadores.

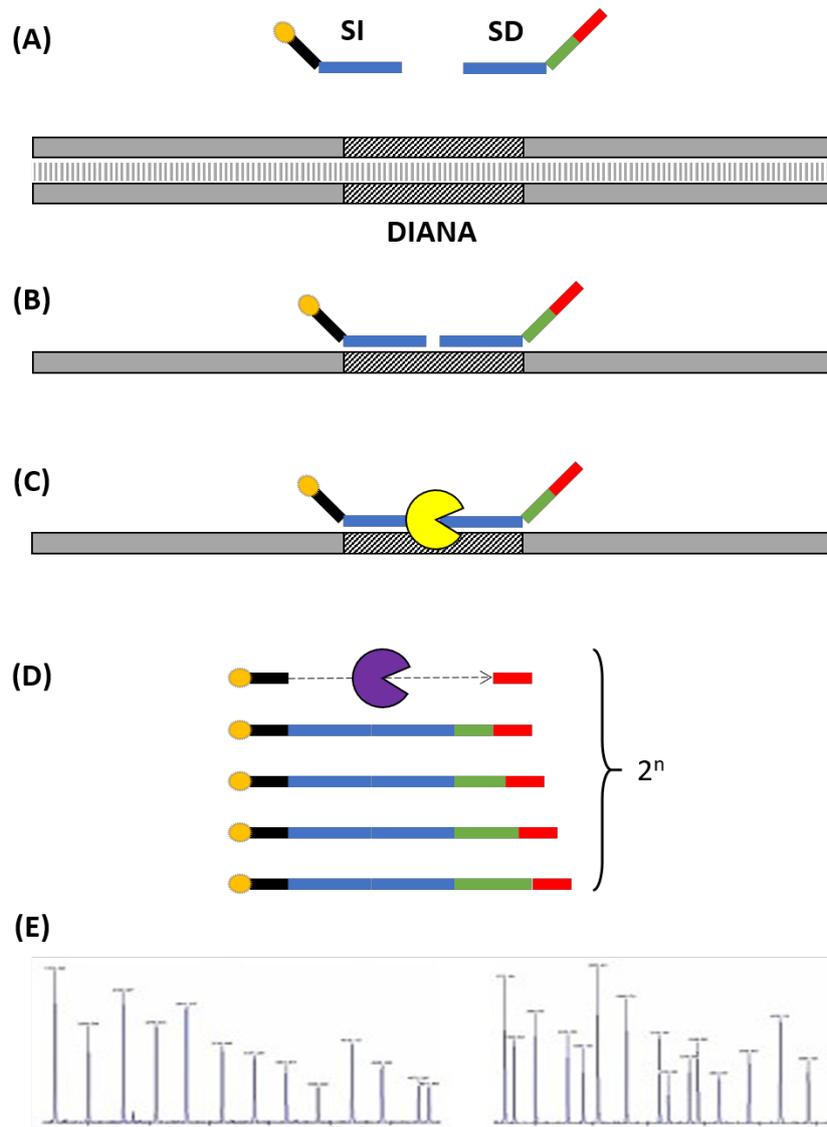
REACTIVO	CANTIDAD (µL)
Etanol 96% (v/v), Panreac™ (calidad PA)	50,0
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	7,5
Acetato de sodio 3 M pH=5,2, Sigma – Aldrich ®	2,5
Volumen final de precipitación=60 µL/hebra/amplicón	

Para la normalización, alineamiento automático y análisis de las secuencias obtenidas, se empleó el programa Variant Reporter v1.1 (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific).

Todas las variantes genéticas diferentes de su alelo salvaje, se describieron de acuerdo con las últimas recomendaciones de la “*Human Genetic Variation Society*” (ver enlaces) ¹⁹⁵ utilizando como secuencias de referencia para el cDNA NM_000169.2 y para la proteína NP_000160.1 (NCBI, ver enlaces).

4.14 Análisis molecular del gen *GLA*. Estudios de reordenamientos.

Para realizar el análisis de reordenamientos del gen *GLA*, se utilizó la técnica de “*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*” (MLPA®). Esta técnica consiste en una combinación de hibridación de sondas nucleotídicas específicas de las regiones codificantes del gen *GLA* y otros genes cuyo número de copias es constante en el genoma, ligación termoestable, amplificación mediante PCR y electroforesis capilar (figura 4.7)

Figura 4.7. Diagrama de la reacción de MLPA® (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

(A) Se ilustra un fragmento del genoma o región diana al que se quiere interrogar la existencia de reordenamientos anómalos (rayas diagonales); Sonda izquierda (SI) compuesta por parte de la secuencia complementaria a la región diana (azul) y un cebador universal directo de PCR (negro) marcado con un fluorocromo (amarillo); Sonda derecha (SD) compuesta por otra parte de la secuencia complementaria a la región diana (azul), una secuencia de relleno que no hibrida con el genoma (verde) y un cebador universal reverso de PCR (rojo). (B) Fase de hibridación de las regiones complementarias a la diana de SI y SD. (C) Si se ha producido hibridación complementaria de SI y SD con la región diana, una ligasa termoestable une el $3'$ de la SI con el $5'$ de la SD. (D) PCR utilizando cebadores directos y reversos universales para todos los productos ligados en (C). (E) Electroferograma resultante del proceso de electroforesis capilar de los productos de PCR marcados generados en (D).

Se emplearon muestras de DNA genómico diluido hasta concentración de 20 ng/ μ L en tampón TE con menor concentración de EDTA que el utilizado en los apartados 4.8.2 y 4.10.2 (Tris-HCl 10,0 mM + EDTA 0,1 mM pH=8,0), para evitar la quelación de Magnesio y otros cofactores esenciales para las enzimas que se utilizaran en el proceso. En cada experimento se utilizaron 4 muestras de 4 individuos heterocigotos sanos sin ninguna variante puntual, a los que previamente se les había genotipado el gen *GLA* según procedimiento descrito en el apartado 4.13. La técnica se llevó a cabo utilizando la batería de reactivos SALSA®MLPA® EK1 con marcaje fluorescente FAM™ ($\lambda_{excitación}=495$ nm y $\lambda_{emisión}=517$ nm) y la mezcla de sondas SALSA®MLPA® probemix P159-A4 *GLA*, según especificaciones del fabricante¹⁹⁶ (MRC-Holland, ver enlaces), en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700. Una vez finalizado el experimento, el producto de la reacción se diluyó con ddH₂O y se mezcló en proporción 19:0,8:0,2 obteniendo una mezcla de formamida apta para electroforesis capilar: Fragmentos diluidos: Marcador de pesos molecular fluorescente GeneScan™-600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific). Se aplicó un programa térmico de desnaturalización (94°C 2 minutos) y se realizó la electroforesis capilar en secuenciador automático de DNA ABI-3500 XL Genetic Analyzer for Resequencing and Fragment Analysis.

Para la cuantificación de la señal de cada fragmento generado se empleó el programa GeneMapper® v4.0 (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific). Los datos se analizaron mediante hojas de cálculo de diseño propio en los que se realizó en primer lugar una normalización intramuestra, en el que se comparan en cada muestra las señales de los fragmentos de las sondas específicas del gen *GLA* con las señales de los fragmentos de las sondas del resto de genes de referencia; en segundo lugar una normalización intermuestra en el que se compara la señal normalizada intramuestra para todas las sondas (*GLA* y genes de referencia) de la muestra de un individuo con la señal normalizada intramuestra para todas las sondas de las muestras de los 4 individuos heterocigotos sanos.

Se consideraron resultados anómalos cuando el valor normalizado para cada sonda del gen *GLA* era menor a 0,5 (delección) o mayor a 1,5 (duplicación).

4.15 Estudios bioinformáticos de las variantes genéticas identificadas

Se evaluó la patogenicidad de las variantes genéticas identificadas en el apartado 4.13 y 4.14, en un primer momento mediante análisis con el predictor MutationTaster (ver enlaces)¹⁹⁷; las variantes cuya probabilidad era cercana a 1, indicaron elevada probabilidad de ser causantes de

enfermedad. A continuación, se comprobó su indización en los repositorios de variantes patogénicas (HGMD, ClinVar y Leiden Open Variation Database [LOVD])^{69,198,199} (ver enlaces) o de variantes polimórficas o “SNP” (dbSNP) (ver enlaces). Aquellas que no hubieran sido indizadas previamente en los repositorios anteriores se clasificaron según las recomendaciones de la ACMG⁷² se consideraron como VUS; en función de la naturaleza de la VUS y del potencial cambio sobre la proteína, se evaluaron los predictores Splice Site Prediction Program by Neural Network (SSPPNN) y Human Splicing Finder (HSF) en el caso de ajuste alternativo del RNA mensajero (mRNA, ver enlaces)^{200,201}, y se evaluó PROMO y MatInspector para las variantes que pudieran afectar a la interacción de la región 5'-UTR de *GLA* y los elementos reguladores tipo Trans (ver enlaces)^{202,203}.

4.16 Análisis de variantes en región reguladora 5'-UTR

El estudio “*in vitro*” de las posibles interacciones de los elementos reguladores tipo Trans con el promotor del gen *GLA*, se realizó mediante geles de retardo o *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA); esta técnica consiste comprobar el diferente patrón electroforético del producto de incubación de un extracto de proteínas nucleares con un oligonucleótido sintético que contenga el alelo silvestre y otro oligonucleótido sintético que contenga el alelo mutado. Estos experimentos fueron realizados por el grupo de investigación del profesor José Carlos Rodríguez Rey en la Universidad de Cantabria (Santander).

Brevemente, por cada variante genética en la región promotora del gen *GLA* que se quiso estudiar, se sintetizaron dos parejas de oligonucleótidos con marcaje fluorescente IRDye®680 ($\lambda_{\text{excitación}}=680$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=694$ nm) (LI-COR® Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU.). Los extractos nucleares se prepararon a partir del lisado de una línea celular Hep-G2 cultivada hasta el 90% de confluencia en medio de cultivo “*Dubelco's Modified Eagle's Medium*” (DMEM) suplementado con una mezcla de 20% (v/v) suero fetal bovino (SFB), 1% (v/v) penicilina-estreptomicina y 0,5% (v/v) β -anfotericina. Los extractos nucleares y los oligonucleótidos marcados se incubaron y posteriormente los complejos DNA-proteína se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 5,0% (PAGE) no desnaturizante utilizando tampón Tris-Borato 0,089 M + EDTA 20,0 mM pH=8,0 (TBE) 0,25x. Los geles fueron revelados mediante un transiluminador de infrarrojos Odyssey® (LI-COR® Biosciences).

La afinidad relativa de cada alelo por el extracto nuclear se consideró mediante competencia con una cantidad creciente de sonda sin marcaje del alelo mutado (“sonda fría”); se cuantificó

la señal en el gel de cada una de las condiciones de competitividad y se calculó la variación en la afinidad representando la recta que relaciona los valores inversos de las intensidades de cada condición vs el exceso de “sonda fría”. La relación de la pendiente de la recta y la afinidad relativa de cada alelo por el extracto nuclear es inversamente proporcional.

4.17 Análisis de variantes en región no codificante (intrones)

Para comprobar que ciertas variantes en región no codificante (intrones) identificadas en el análisis molecular del gen *GLA* (apartado 4.13), pudieran alterar el normal mecanismo normal de ajuste del pre-RNA mensajero (mRNA), se estudió la molécula complementaria (cDNA) del mRNA del gen *GLA*.

4.17.1 Síntesis de cDNA total

Para la síntesis de cDNA mediante retrotranscripción del mRNA a partir del RNA total aislado en el apartado 4.9, se tomó 1 µg de RNA total en un volumen final de 20 µL. Se utilizó la batería de reactivos PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio INC.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En un primer paso se llevó a cabo la hibridación de OligodT a las colas de poli-Adenilación del extremo 3' de todas las moléculas mRNA presente en el RNA total aislado; para este paso se adicionó a 1 µg de RNA total, una mezcla de reacción que contiene por cada muestra: 1 µL de cebador OligodT 50 µM, 1 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM de cada dNTP) y cantidad suficiente de ddH₂O para volumen final de 10 µL. Se incubó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 a 65°C durante 10 minutos y después se mantuvo a +4°C. En un segundo lugar se llevó a cabo una reacción de PCR de retrotranscripción (RT-PCR), en la que por cada molécula de mRNA que haya hibridado la cola OligodT, se generará una molécula de cDNA (relación 1:1). Al producto de hibridación OligodT-mRNA se le añadió una mezcla de RT-PCR que contenía por cada muestra: 5 µL de tampón PrimeScript 5x, 0,5 µL de inhibidor de RNAasas (40 UI/µL), 1 µL de PrimeScript retrotranscriptasa (200UI/µL) y cantidad suficiente de ddH₂O para 10 µL de volumen final de reacción. Se incubó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 a 42 °C 60minutos, seguido de 95°C 5 minutos y después se mantuvo a 4°C. El producto de RT-PCR se conservó, bien a +4 °C para períodos de conservación menores a 3 días bien a -20°C para períodos de conservación superiores.

La comprobación de la correcta síntesis de cDNA se realizó mediante amplificación de un fragmento del gen constitutivo β-Actina (*ACTB*, MIM*102630), utilizando como molde la molécula de cDNA sintetizada a partir del mRNA total.

Para el diseño de los cebadores, tomamos como referencia la secuencia del transcrito de mRNA maduro del gen *ACBT* (NM_001101.5, NCBI) y se empleó el programa Oligo v.7 (tabla 4.12).

Tabla 4.12. Cebadores específicos para la amplificación de una región del cDNA complementario al mRNA del gen *ACTB*.

CEBADOR	5' - SECUENCIA - 3'	Ta (°C)	AMPLICIÓN (pb)
Exón 4 – Exón 6	ACACTGTGCCCATCTACGAGG	60,0	621
	AGTATGACGAGTCCGCCCCCT		

La reacción de PCR se llevó a cabo en microtubos de 0,2 mL y las proporciones de cada uno de los reactivos empleados para la reacción se muestran en la tabla 4.13.

Tabla 4.13. Estequiometría para la amplificación de una región del cDNA complementario al mRNA del gen *ACTB*.

REACTIVO	CANTIDAD (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	6,24	
Tampón 10x, Biorline®	1,00	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	1,00	200,00 µM
Mg ₂ Cl (50mM), Biorline®	0,30	1,50 mM
Cebador Directo (10 µM)	0,20	200,00 nM
Cebador Reverso (10 µM)	0,20	200,00 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/µL, Biorline®	0,06	0,03 UI/µL
cDNA molde	1,00	

Volumen final de reacción=10 µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 según el programa térmico indicado en la tabla 4.14. El producto de la amplificación se conservó a +4°C hasta que se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v) con tinción de Br-Et utilizando como tampón TAE 1X (30 minutos 90V). El resultado se documentó con el equipo descrito en el apartado 4.9.

Tabla 4.14. Programa térmico empleado para la amplificación de una región del cDNA complementario al mRNA del gen *ACTB*.

PROGRAMA	REGIÓN	PROGRAMA TÉRMICO
<i>ACTB</i> cDNA	Exón 4 – Exón 6	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
		Ciclo: 32 x (94°C 30'' 60,0°C 30'' 72°C 30'')
		Elongación final: 72 °C 7'
		Conservación: 4°C ∞

4.17.2 Amplificación del cDNA del gen *GLA*

Para poder estudiar el efecto de las variantes intrónicas sobre el hipotético ajuste alternativo, fue necesario obtener una cantidad razonable de cDNA específico de gen *GLA*, para ello se realizó una amplificación del cDNA de éste como fase preparativa para usos posteriores.

Los cebadores fueron diseñados de tal manera que abarcara la mayor extensión posible de la molécula de mRNA (1418 pb). Se utilizó como referencia la secuencia del transcrito de mRNA maduro del gen *GLA* (NM_000169.2, NCBI) y se empleó el programa Oligo v.7 (tabla 4.15).

Tabla 4.15. Cebadores específicos para la amplificación del cDNA complementario al mRNA del gen *GLA*.

CEBADOR	5' - SECUENCIA - 3'	Ta (°C)	AMPLICIÓN (pb)
Exón 1 – Exón 7	TGCAGCTGAGGAACCCAGAACTACA	59,0	1.114
	TACCATCGCAGTTGCTTCCT		

La reacción de PCR se llevó a cabo en microtubos de 0,2 mL y las proporciones de cada uno de los reactivos empleados para la reacción se muestran en la tabla 4.16.

Tabla 4.16. Estequiometría para la amplificación del cDNA complementario al mRNA del gen *GLA*.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	34,65	
Tampón 10x, Bioline®	5,00	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	5,00	200,000 μM
Mg ₂ Cl (50mM), Bioline®	1,50	1,500 mM
Cebador Directo (10 μM)	1,00	200,000 nM
Cebador Reverso (10 μM)	1,00	200,000 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/μL, Bioline®	0,85	0,085 UI/μL
cDNA molde	1,00	

Volumen final de reacción=50 μL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 según el programa térmico indicado en la tabla 4.17. El amplicón resultante se conservó a +4°C hasta que se caracterizó mediante geles PAGE no desnaturizantes; el excedente del amplicón utilizado en esta técnica se conservó a -20°C para usos posteriores.

Tabla 4.17. Programa térmico empleado para la amplificación del cDNA complementario al mRNA del gen *GLA*.

PROGRAMA	REGIÓN	PROGRAMA TÉRMICO
GLA cDNA	Exón 1 – Exón 7	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
		Ciclo: 32 x (94°C 30'' 59,0°C 30'' 72°C 30'')
		Elongación final: 72 °C 7'
		Conservación: 4°C ∞

4.17.3 Caracterización electroforética del cDNA específico del gen *GLA*

Una vez obtuvimos una cantidad suficiente de cDNA específico del mRNA del gen *GLA* (apartado 4.17.2), para identificar los posibles transcritos generados de diversos tamaños como resultado del ajuste del pre-mRNA se eligió la técnica de PAGE no desnaturizante. Para preparar los geles de 55 mL de volumen al 6,0% se añadieron los siguientes reactivos, sin dejar de homogeneizarse y en campana extractora: 34,5 mL de dH₂O, 14,6 mL de una mezcla de acrilamida/bisacrilamida 30,0% en proporción 37,5:1,0 (Bio-Rad), 5,5 mL de TBE 10x (Tris-Borato 0,89 M + EDTA 0,50 M pH=8,0) (Carlo Erba), 0,3 mL de persulfato amónico (APS) 10,0% (m/v) (Bio-Rad) disuelto en dH₂O y 0,03 mL de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) 0,1 % (v/v) (Bio-Rad) diluido en dH₂O. Una vez polimerizado el gel se sumergió en una célula de electroforesis

vertical Protean® II xi Cell (Bio-Rad) con TBE 1x como tampón de electroforesis. Se cargó en cada uno de los pocillos una mezcla de 15 µL del producto de cDNA específico de gen *GLA* (apartado 4.17.2) y 5 µL de tampón de carga (Xylene Cyanol) y se sometió al proceso de electroforesis (3 horas a 46 mA). Finalizado el proceso de electroforesis se sumergió el gel en una mezcla de 500 mL de tampón TBE 1x diluido en dH₂O + 1 mL de solución de Br-Et y se dejó teñir durante 20 minutos con agitación por balanceo. El resultado se documentó con el equipo descrito en el apartado 4.9 y se comparó el patrón de bandas de los sujetos con variantes intrónicas vs el patrón de bandas de individuos control.

4.17.4 Análisis molecular del cDNA del gen *GLA*. Secuenciación capilar.

Para tratar de definir la variación en la secuencia nucleotídica del mRNA del gen *GLA*, como consecuencia de un hipotético ajuste alternativo del pre-mRNA, procedimos a secuenciar el cDNA específico del gen *GLA* obtenido en el apartado 4.17.2.

Se optó por un diseño de PCR anidada del cDNA del gen *GLA*, dividiendo este en dos fragmentos solapantes. Los cebadores fueron diseñados utilizando como referencia la secuencia del transcrito de mRNA maduro del gen *GLA* (NM_000169.2, NCBI) con el programa Oligo v.7 (tabla 4.18).

Tabla 4.18. Cebadores específicos para la amplificación anidada del cDNA complementario al mRNA del gen *GLA*.

CEBADOR	5' - SECUENCIA - 3'	Ta (°C)	AMPLICIÓN (pb)
Exón 1 – Exón 4	TGCAGCTGAGGAACCCAGAACTACA	55,0	616
	GTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCT		
Exón 3 – Exón 7	GAAGCTAGGGATTTATGCAGATGT	55,0	637
	TACCATCGCAGTTGCTCCCT		

La reacción de PCR se llevó a cabo en microtubos de 0,2 mL y las proporciones de cada uno de los reactivos empleados para la reacción se muestran en la tabla 4.19.

Tabla 4.19. Estequiometría para la amplificación anidada del cDNA complementario al mRNA del gen *GLA*.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	5,94	
Tampón 10x, Bioline®	1,00	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	1,00	200,00 μM
Mg ₂ Cl (50mM), Bioline®	0,60	3,00 mM
Cebador Directo (10 μM)	0,20	200,00 nM
Cebador Reverso (10 μM)	0,20	200,00 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/μL, Bioline®	0,06	0,03 UI/μL
cDNA molde diluido 1/1.000 con ddH ₂ O	1,00	

Volumen final de reacción=10 μL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 según el programa térmico indicado en la tabla 4.20. El amplicón resultante se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.13.1) y el restante se conservó a +4°C hasta que se procedió con la purificación y secuenciación capilar según los protocolos descritos en los apartados 4.13.3 y 4.13.4.

Tabla 4.20. Programa térmico empleado para la amplificación anidada del cDNA complementario al mRNA del gen *GLA*.

PROGRAMA	REGIÓN	PROGRAMA TÉRMICO
GLA cDNA Anidado	Exón 1 – Exón 7	Desnaturalización inicial: 94°C 2'
		Ciclo: 32 x (94°C 30'' 55,0°C 30'' 72°C 30'')
		Elongación final: 72 °C 7'
		Conservación: 4°C ∞

4.18 Genotipado poblacional de las variantes en región reguladora y región no codificante.

Para conocer la frecuencia en población control, de los alelos identificados en las zonas no codificantes del gen *GLA* (ver 4.13), se optó por la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o “*RFLP*”.

En primer lugar, se analizaron *in silico* los amplicones que contenían las variantes diferentes del alelo salvaje, con la herramienta RestrictionMapper v.3 (ver enlaces) para evidenciar diferencias en cuanto a patrones de restricción entre la secuencia que contenía el alelo salvaje vs alelo

mutado. Posteriormente se procedió a amplificar las regiones de interés mediante PCR (ver 4.13.1 y 4.13.2), corte según el protocolo de cada enzima de restricción y revelado del patrón de restricción mediante electroforesis. Esto último se realizó utilizando gel de agarosa al 1/2/3% (m/v) o gel de agarosa de alta resolución NuSieve™GTG™ (Lonza) al 3% (m/v), dependiendo de la diferencia de tamaño entre los fragmentos generados, con tinción de Br-Et utilizando como tampón TAE 1X (30/60/90 minutos 90V). El resultado se documentó con el equipo descrito en el apartado 4.9.

4.19 Estudios cuantitativos de la expresión del gen *GLA*

Para determinar el nivel de expresión del gen *GLA*, utilizamos procedimientos de amplificación específica por PCR y cuantificación en tiempo real mediante detección de fluorescencia (qPCR). La diferente química empleada en el diseño de las sondas se muestra en la figura 4.8.

Para nuestros experimentos se decidió emplear sondas de hidrólisis (figura 4.8.A), éstas son complementarias al cDNA, aportando especificidad a la reacción y la cuantificación del molde se realiza combinando la actividad exonucleasa 5'->3' de la DNAP termoestable y del principio de transferencia de energía de resonancia ("*Förster resonance energy transfer*", FRET).

Se emplearon mezclas comerciales de cebadores y sondas de hidrólisis o TaqMan® (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific) marcadas con diferentes fluorocromos para poder preformar reacciones múltiples en el mismo pocillo (tabla 4.21)

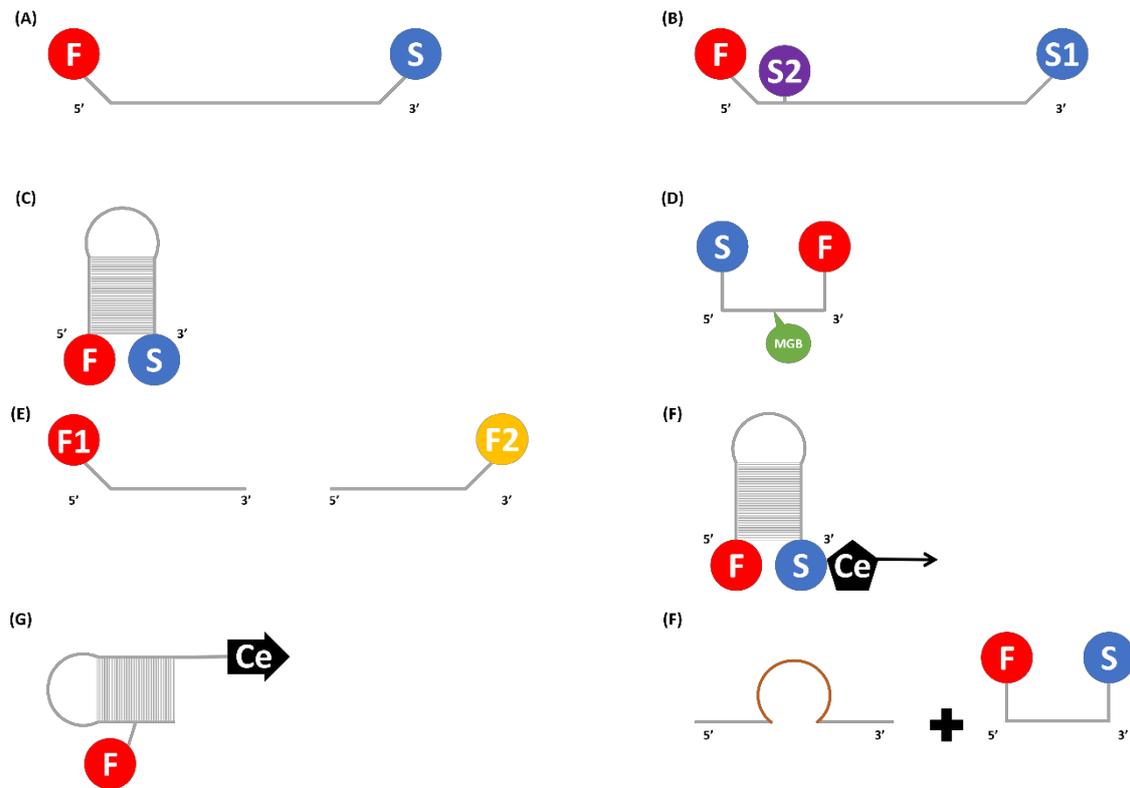
Tabla 4.21. Premezcla de sondas de hidrólisis y cebadores (TaqMan®) empleadas para el estudio de expresión del gen *GLA* y del gen de control endógeno *GAPDH*.

GEN (NCBI) ¹	UNIÓN cDNA	FLUORÓFORO/SUPRESOR ²	REFERENCIA ³	Ta (°C)	AMPLICIÓN (pb)
<i>GLA</i> (<i>NM_000169.2</i>)	Ex 2 – Ex 3	FAM™ / MGB	Hs00609238_m1	60,0	80
<i>GAPDH</i> (<i>NM_002046.3</i>)	Ex 3	VIC® / MGB	Hs99999905_m1	60,0	122

¹Secuencia de referencia recogida en NCBI (ver enlaces).

²Premezcla de cebadores y sondas según Applied Biosystems® (ver enlaces).

Figura 4.8. Representación esquemática de las diferentes aproximaciones químicas empleadas en el estudio cuantitativo de la expresión génica mediante qPCR.



(A) Sondas de hidrólisis o sondas TaqMan™; compuesta por una secuencia de DNA complementaria a la región diana, una molécula fluorescente (F) en 5' y una molécula supresora o "quencher" (S) en 3'; en la fase de síntesis catalizada por la DNAP, se produce hidrólisis de la sonda, liberación de F y FRET. (B) Sondas de hidrólisis con doble molécula supresora o sondas ZEN™; presenta una composición similar a (A) en el que se incluye una molécula supresora extra (S2) situada a 9-10 pb de F en 5'; presenta como ventaja respecto a (A) la reducción del ruido de fondo en las etapas iniciales de la reacción. (C) Balizas moleculares o Molecular Beacons™; compuesta por una secuencia de DNA complementaria a la región diana, una molécula fluorescente (F) en 5' y una supresora (S) en 3'; la sonda antes de la hibridación permanece en forma de horquilla lo que hace que F y S se sitúen próximos en el espacio; en el momento de la hibridación con el DNA complementario de la región diana, la sonda se linealiza haciendo que F y S se distancien lo suficiente como para producirse fluorescencia. (D) Sondas Eclipse; presenta en el extremo 3' de la sonda una molécula fluorescente (F) y en el extremo 5' de la misma una molécula supresora (S) y una molécula de unión al surco menor del DNA ("Minor Groove Binder", MGB); la sonda antes de la hibridación permanece empaquetada en forma de bovina permitiendo que F y S estén próximos espacialmente; el mecanismo de hibridación con el DNA complementario a la región diana y generación de fluorescencia, es muy similar al descrito en (C) pero se encuentra asistido por la interacción no covalente de las bases nitrogenadas del surco menor del DNA con la molécula MGB. (E) Sondas de hibridación dual; compuesta por dos secuencias de DNA complementarias a la región diana y adyacentes entre sí, además de una molécula fluorescente diferente en cada sonda (F1 en 5' de sonda 1 y F2 en 3' de sonda 2); a diferencia de las sondas basadas en hidrólisis, la hibridación adyacente de ambas sondas permite que uno de los fluoróforos emita energía al propiciarse el fenómeno FRET por la proximidad espacial de ambos fluoróforos. (F) Sondas escorpión o Scorpions®; presentan una composición muy similar a (C) uniéndose a S de manera covalente un cebador (Ce) de PCR; Ce hibrida con el DNA complementario de la región diana y comienza la síntesis de la cadena complementaria, una vez esto ocurre la horquilla se linealiza durante la fase de desnaturalización posterior, propiciando la hibridación de ésta con el DNA complementario sintetizado; esta situación favorece el fenómeno FRET al aumentar la distancia espacial entre S y F. (G) Cebador de PCR fluorogénico después de la extensión o Cebadores de PCR LUX®; presenta una composición similar a (F) salvo que carece de molécula supresora ya que el efecto de ésta es suplido por la interacción de F con la estructura secundaria en forma de horquilla del DNA complementario de la sonda; una vez que Ce hibrida con el DNA complementario de la región diana y comienza la síntesis del DNA complementario, F es capaz de generar fluorescencia debido al cambio conformacional de la molécula de DNA. (H) Cebador de PCR Qzyme™; el diseño de este tipo de sondas es más complejo ya que por una parte se compone una secuencia antisentido para un DNA con acción catalítica o deoxiribozima y por otra parte de una sonda de hidrólisis similar a la descrita en (A) que funciona como sustrato del deoxiribozima; el deoxiribozima inactivo hibrida parcialmente con la secuencia de DNA complementaria a la región diana y mediante una reacción de PCR se genera el deoxiribozima sentido activo; a continuación se le suministra el sustrato específico que no es ni más ni menos que la sonda de hidrólisis que contiene F y S; mediante la acción deoxiribozima sobre la sonda, se libera F y se produce FRET.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo utilizando plásticos ópticamente compatibles: placas de 96 pocillos de fondo cónico y volumen de 0,2 mL, selladas con láminas de plástico (Applied Biosystems®); de cada reacción se realizaron réplicas técnicas (triplicados). En cada pocillo se incorporó el cDNA sintetizado (ver apartado 4.17.1) y todos los reactivos necesarios: la mezcla maestra, la mezcla de cebadores y sondas específicas (tabla 4.20) y ddH₂O. Las proporciones de cada uno de los reactivos empleados para la reacción de qPCR se recogen tabla 4.22.

Tabla 4.22. Estequiometría para el estudio de expresión del gen *GLA* y el gen de control endógeno *GAPDH*.

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
Mezcla maestra 2x, Applied Biosystems®	10,0	1x
ddH ₂ O libre DNAasa/RNAasa	6,0	
Premezcla cebadores+sondas <i>GLA</i> -FAM 20x Applied Biosystems®	1,0	1x
Premezcla cebadores+sondas <i>GAPDH</i> -VIC 20x Applied Biosystems®	1,0	1x
cDNA molde 10 ng/μL	2,00	1 ng/μL

Volumen final de reacción=20 μL

La reacción se llevó a cabo en un equipo de PCR a tiempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) según el programa térmico indicado en la tabla 4.23. Los datos de ciclo umbral (C_t , ciclo de PCR en el que la fluorescencia recogida es estadísticamente significativa respecto a la línea base o ruido de fondo) y desviación estándar (DE) de las réplicas técnicas, fueron recogidos mediante el programa StepOnePlus™ Software v2.3 (Applied Biosystems®).

Tabla 4.23. Programa térmico empleado para el estudio de expresión del gen *GLA* y el gen de control endógeno *GAPDH*.

PROGRAMA	PROGRAMA TÉRMICO
	Desnaturalización inicial: 95°C 10'
<i>GLA/GAPDH</i> qPCR	Ciclo: 40 x (96°C 15" 60,0°C 1' )
	Conservación: 4°C ∞

 = Adquisición de fluorescencia.

4.19.1 Determinación de la eficiencia cinética de la reacción de qPCR

De acuerdo con las recomendaciones propuestas²⁰⁴, se determinó la eficiencia cinética de la reacción múltiple de expresión del gen diana (*GLA*) y del gen de control endógeno, realizando para cada gen una curva de calibrado independiente. Para ello, se partió de una mezcla de cDNA de diferentes individuos sanos (proporción de varones y mujeres 1:1) a 50 ng/μL (cantidad final en la reacción=100 ng) y se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta obtener un rango dinámico

100-0,01 ng de cDNA. Se preformó la reacción de cada punto de la curva por triplicado siguiendo las condiciones descritas en las tablas 4.21 y 4.22. Se representó el \log_{10} de la cantidad de cDNA molde en cada dilución vs C_t medio obtenido de las réplicas técnicas de dicha dilución; se realizó un ajuste de los puntos a una línea recta y se obtuvo la ecuación de la misma, así como el coeficiente de determinación (R^2). La eficiencia de la reacción se determinó de acuerdo a la ecuación 4.2.

Ecuación 4.2. Cálculo de la eficiencia cinética de la reacción de qPCR.

$$E=10^{-1/\text{pendiente recta}}$$

E=Eficiencia cinética de la reacción de qPCR.

Se aceptó como criterio de idoneidad cuando la recta obtenida fue lineal ($R^2>0,980$), la variabilidad de las réplicas era baja ($DE<1,60$) y el resultado de la ecuación 4.2 se encontraba en el rango (1,6-2,1).

Se calculó la eficiencia cinética para cada gen dentro de la reacción múltiple y posteriormente, analizamos que las eficiencias de ambos genes fueran similares y no presentasen grandes discordancias; para ello se representó el \log_{10} de la cantidad de cDNA molde en cada dilución vs ($C_t \text{ GLA} - C_t \text{ Gen Control endógeno}$).

Se aceptó como criterio de idoneidad cuando la pendiente de la recta obtenida fue menor que 0,1.

4.19.2 Normalización de los datos de expresión génica determinados mediante qPCR

Para controlar la variabilidad tanto analítica como preanalítica, seguimos las recomendaciones propuestas²⁰⁴ y los datos de expresión del gen *GLA* se normalizaron respecto a la expresión de un gen de control endógeno o constitucional que se consideró estable en sangre periférica; en este caso se eligió el gen codificante para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*; MIM*138400).

La normalización se realizó según lo indicado en la ecuación 4.3.

Ecuación 4.3. Algoritmo empleado en la normalización de los datos de expresión génica determinados por qPCR.

$$E_{GLA}^{Ct_{GLA}} / E_{GAPDH}^{Ct_{GAPDH}}$$

E=Eficiencia de la reacción de qPCR obtenida con la ecuación 4.2 para cada gen.

C_t=Ciclo umbral.

4.19.3 Cuantificación relativa de la expresión génica

Se calculó la expresión génica de eficiencia corregida ²⁰⁴, para cada individuo respecto a un conjunto de individuos control sanos de su mismo género, acorde a la ecuación 4.4.

Ecuación 4.4. Algoritmo empleado en el cálculo de la expresión del gen *GLA* mediante qPCR.

$$CR = (E_{GLA}^{Ct_{GLA}} / E_{GAPDH}^{Ct_{GAPDH}})_{\text{PROBANDOS}} \div (E_{GLA}^{Ct_{GLA}} / E_{GAPDH}^{Ct_{GAPDH}})_{\text{CONTROL GÉNERO DEPENDIENTE}}$$

CR=Cuantificación relativa.

4.20 Determinación del acúmulo intracelular de sustrato

Para la realización de estos experimentos, se utilizó el protocolo previamente publicado por Gervas-Arruga *et al.* 2015 ⁸². Brevemente, para determinar si se estaba produciendo un acúmulo de sustratos de naturaleza galactolipídica, se planteó en primer lugar generar un modelo *in vitro* de acúmulo lisosomal para poder cuantificar el acúmulo de galactoesfingolípidos, y en segundo lugar cuantificar el acúmulo de estos sustratos en los pacientes con variantes genéticas en el gen *GLA* y que presentaron un fenotipo similar al de la EF.

4.20.1 Modelo *in vitro* de acúmulo lisosomal

Para generar un modelo de acúmulo lisosomal, se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos humanos de sujetos voluntarios sanos llevados hasta confluencia. Administramos TNF α durante 16 horas al cultivo para generar un modelo *in vitro* proinflamatorio, similar al que ocurre en la EF; pasado ese tiempo se retira el medio de cultivo y se añade medio nuevo sin TNF α y se deja el cultivo durante 8 horas. A continuación, comprobamos el acúmulo intracelular de galactoesfingolípidos a las 16 y 24 horas postexposición de TNF α , mediante método bioquímico (reacción fluorimétrica de galactósidos acoplada a la acción catalítica de la enzima Galactosa oxidasa) y mediante método inmunocitoquímico:

- Inmunomarcaje doble de LAMP1 (anticuerpo anti-LAMP1) y de Gb₃ (anticuerpo anti-CD77).
- Inmunomarcaje doble de LAMP1 (anticuerpo anti-LAMP1) y de Gb₂ (anticuerpo anti-CD17).
- Cuantificación de la señal de fluorescencia en los puntos de co-localización.

Basándonos en el modelo proinflamatorio anterior, realizamos un co-tratamiento con la chaperona DGJ utilizada a concentraciones inhibitorias de la α -Gal A, y con la enzima recombinante agalsidasa alfa.⁸²

4.20.2 Cuantificación del acúmulo de galactoesfingolípidos en los pacientes

Una vez establecido y validado el modelo de acúmulo *in vitro* descrito en el apartado 5.20.1, se procedió a descongelar líneas primarias de fibroblastos humanos de pacientes con variantes en regiones no codificantes del gen *GLA* y fenotipo compatible con la EF y de individuos control emparejados por género. Las líneas celulares se expandieron y se realizó la cuantificación de los galactósidos acumulados intracelularmente mediante el método bioquímico del apartado 5.20.1. También se determinó el acúmulo intralisosomal de Gb₃ (CD77) y Gb₂ (CD17) mediante el método inmunocitoquímico del apartado 5.20.1. Tanto las líneas control como las líneas de los pacientes fueron cultivadas con/sin TNF α para ver la diferencia del acúmulo en situación de activación proinflamatoria.

4.21 Análisis estadístico y epidemiológico

4.21.1 Análisis estadístico general

El análisis estadístico se realizó con el programa libre R versión 3.6.1²⁰⁵. Las variables cualitativas se describieron según sus frecuencias y porcentajes; las variables cuantitativas se analizó su distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y se describieron bien media \pm desviación estándar si la distribución era normal bien mediana(percentil 25 – percentil 75) si la distribución no era normal. Se emplearon test de contraste de hipótesis de tipo Chi-cuadrado/Fisher para variables categóricas, y test de U de Mann-Whitney para variables cuantitativas. Las variables cuantitativas se correlacionaron mediante el test de Spearman No se realizaron imputaciones para valores perdidos.

Se tomó como nivel de significancia bilateral para todos los test estadísticos $\alpha=0,05$.

4.21.2 Estudio epidemiológico y de la segregación haplotípica de las variantes identificadas en el gen *GLA*

Tras la fase inicial de cribado (ver figura 4.1) se procedió a realizar un análisis de asociación de los alelos o marcadores genéticos identificados en la población de cribado con el resto de variables cuantitativas y cualitativas recogidas de la muestra; también se realizó un estudio de segregación haplotípica de los marcadores.

Los estudios epidemiológicos en la población del estudio se llevaron a cabo mediante el programa SNP & Variation Suite Genetic Analysis Software versión 8.2.1 (2014, Golden Helix, Bozeman, MT, USA). Este programa calcula los parámetros D' y R^2 de desequilibrio de ligamiento²⁰⁶. Las frecuencias haplotípicas se estimaron para cada marcador genético individual mediante la media del algoritmo de expectación-maximización (ExM)²⁰⁷. El test de correlación/tendencia mostró el valor p para el valor de la variable dependiente respecto del logaritmo neperiano de la α -Gal A si existía alguna correlación o "tendencia" que dependía del valor de conteo del genotipo²⁰⁸. Se introdujeron como covariables del modelo el género, el IMC, el EVI y la HTA. Se aplicó corrección posthoc según test de Bonferroni²⁰⁹. Para la variable de predicción del genotipo, sus valores de recuento, basados en el alelo minoritario D; en el modelo recesivo, el recuento es uno para genotipos homocigotos DD o hemizigotos D y cero para todo lo demás. La prueba muestra un valor de correlación que indica la cantidad y la dirección de dependencia del valor de recuento sobre el valor de la variable dependiente.

Los estudios epidemiológicos en la población control vs población HCI se evaluaron mediante test de Chi-cuadrado con corrección de Yates o bien mediante test de los números exactos de Fisher cuando no se pueda aplicar Chi-cuadrado.

Se tomó como nivel de significancia bilateral para todos los test estadísticos $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Descripción de la muestra de estudio

El reclutamiento de los pacientes, según los criterios indicados en la tabla 4.1, comenzó entre julio de 2011 y febrero de 2012 (según centros) y finalizó en mayo del mismo año. Se reclutaron un total de 367 pacientes con MHVI de origen desconocido, constituyendo la muestra (tabla 5.1).

Tabla 5.1. Características demográficas y de exploración ecocardiográfica de la población de estudio

VARIABLE	RESULTADO EN LA MUESTRA		
Edad (años)	n(n perdidos)	367(0)	
	Mediana(P25-P75)	63,0(50,0-73,0)	
Edad Mujeres	n(%)	118(32,2)	
	Mediana(P25-P75)	68,0(57,0-76,0)	
Edad Varones	n(%)	249(67,8)	
	Mediana(P25-P75)	61,0(48,0-70,0)	
IMC (kg m⁻²)	n(n perdidos)	364(3)	
	Mediana(P25-P75)	27,4(24,8-30,8)	
Creatinina sangre (mg/dL)	n(n perdidos)	359(8)	
	Mediana(P25-p75)	0,9(0,8-1,1)	
EVI (mm)	n(n perdidos)	366(1)	
	Mediana(P25-p75)	18,0(16,0-22,0)	
Geometría HVI	n(n perdidos)	236(101)	
	Septal	n(%)	58(24,6)
	Concéntrica	n(%)	135(57,2)
	Apical	n(%)	43(18,2)

EVI=Espesor del septo ventricular y/o pared ventricular izquierda posterior; **IMC**=índice de masa corporal; **HVI**=Hipertrofia de ventrículo izquierdo; **P25-P75**=Percentil 25-Percentil 75.

Este grupo estuvo compuesto por 249 varones (67,8%) y 118 mujeres (32,2%), siendo los primeros más jóvenes que los segundos ($p<0,001$). No se encontraron más diferencias significativas al estratificar por género en dicho grupo de pacientes. Se observó que los

pacientes, independientemente de su género, presentaban sobrepeso, un EVI de 18,0(16,0-22,0) mm y que el patrón geométrico más frecuente en la HVI fue el concéntrico (57,2%).

Analizando las características de las submuestras estratificadas por centro reclutador (tabla 5.2), observamos que no hay diferencias significativas entre los diferentes centros al valorar edad, IMC y EVI entre los centros.

Tabla 5.2. Características demográficas y de exploración ecocardiográfica de la población de estudio, estratificada por centro reclutador.

CENTRO	MUJERES*	VARONES*	TOTAL*
H. G.U. de Alicante			
Edad (años)	68,0(62,0-79,2) ‡	61,0(44,8-71,4)	63,5(45,8-71,4)
IMC (kg m ⁻²)	28,5(25,8-36,4)	27,6(25,6-31,2)	27,9(26,1-31,2)
EVI (mm)	18,0(17,0-19,0)	19,0(25,0-22,4)	18,0(15,8-20,8)
n	22	54	76
H. U. Puerta de Hierro			
Edad (años)	57,5(43,8-74,3)	56,5(45,0-68,2)	56,0(42,5-67,0)
IMC (Kg/m ²)	25,0(23,2-30,5)	27,1(25,3-29,4) #	27,5(24,4-30,1)
EVI (mm)	20,0(15,8-23,0)	21,4(18,8-27,0)	20,0(16,8-26,0)
n	26	45	71
H. C. U. de Santiago de Compostela			
Edad (años)	57	65	-
IMC (Kg/m ²)	ND	24,5	-
EVI (mm)	ND	17,0	-
n	1	1	2
Universidad de Murcia			
Edad (años)	66,5(60,0-76,8) ‡	63,5(51,8-74,0)	67,0(58,5-74,8)
IMC (Kg/m ²)	29,4(24,9-32,4)	27,2(25,1-30,0)	27,4(24,2-31,2)
EVI (mm)	18,0(16,0-24,0)	19,5(16,0-23,4)	18,0(16,0-22,0)
n	31	60	91
H. U. Virgen de la Arrixaca			
Edad (años)	68,0(55,0-73,2)	55,0(45,0-68,3)	62,0(49,5-70,4)

IMC (Kg/m ²)	26,6(24,2-29,0)	27,4(24,8-31,7)	27,9(25,3-31,6)
EVI (mm)	18,0(15,0-20,0)	16,0(15,0-22,6)	18,5(15,0-21,0)
n	11	25	36

H. Son Llätzer

Edad (años)	67,0(63,0-74,6) [‡]	62,0(47,5-69,6)	62,5(47,8-73,0)
IMC (Kg/m ²)	26,0(23,2-30,9)	28,4(26,0-30,9)	28,3(24,5-31,1)
EVI (mm)	19,0(16,8-22,0)	19,0(17,0-21,0)	20,0(16,0-22,0)
n	15	27	42

H. U. G. de Elche

Edad (años)	69,5(59,3-78,3)	67,0(38,0-71,8)	67,0(52,3-72,7)
IMC (Kg/m ²)	29,2(27,2-31,7)	25,6(24,5-31,2)	27,7(24,5-31,0)
EVI (mm)	18,0(15,8-20,0)	20,0(16,8-24,0)	19,0(16,3-20,0)
n	6	14	20

H. U. de Donostia

Edad (años)	76,0(72,0-83,2)	67,0(50,0-78,0)	74,0(50,0-80,0)
IMC (Kg/m ²)	25,4(23,8-29,3)	26,2(24,2-29,0)	25,9(24,0-29,1)
EVI (mm)	16,5(15,0-19,4)	17,0(15,0-19,1)	16,5(15,0-19,4)
n	12	24	36

*Edad, IMC y EVI expresados como mediana(Percentil 25-Percentil75)

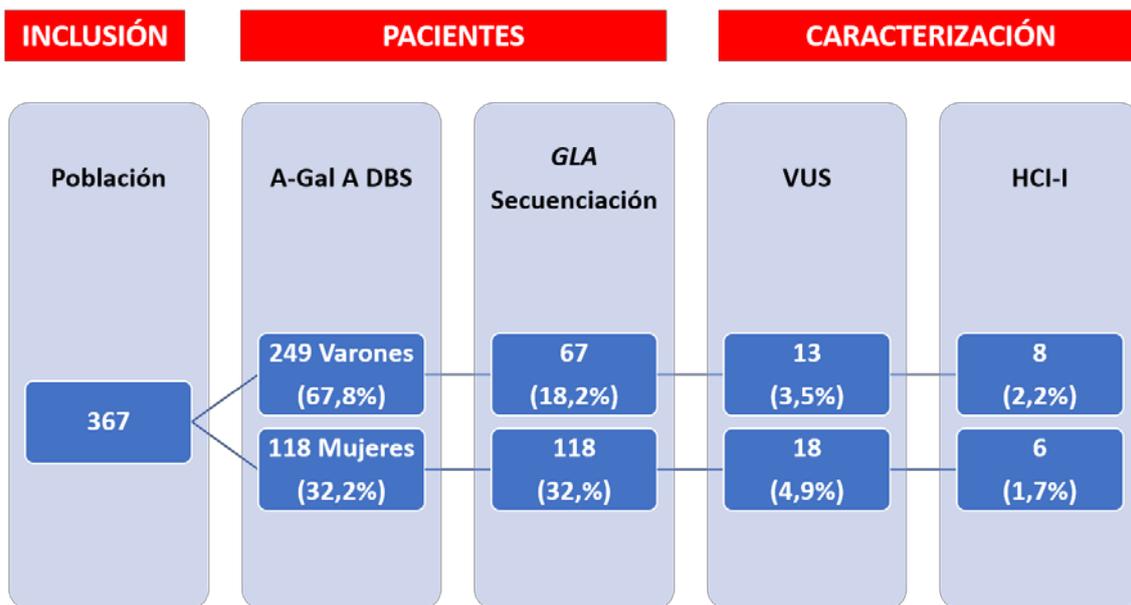
p grado de significación estadística para la prueba de U de Mann-Whitney. [‡]*p*<0,05 [#]*p*<0,01[‡]

5.2 Actividad de α -Gal A en DBS y estudio molecular del gen *GLA*

Se analizó la actividad α -Gal A en DBS en todos los individuos de la muestra independientemente de su género según el protocolo descrito en el apartado 4.12.1, y resultó que la actividad mediana en la muestra fue de 5,90(4,35-7,92) μ mol/spot/h. Cuando se estratificó por género, los varones presentaron una actividad enzimática significativamente menor (*p*=0,014) que las mujeres [5,51(4,12-8,51) vs 7,28(4,83-8,70)].

El resultado global de la segunda fase del estudio, o fase de pacientes, se muestra en la figura 5.1.

Figura 5.1. Esquema de las fases y resultados del estudio.



De acuerdo con el diseño del estudio (figura 4.1), los varones cuya actividad de α -Gal A en DBS fue $\leq 70\%$ se les secuenció las regiones 5'-UTR y codificantes del gen *GLA*; en el caso de las mujeres, independientemente de su actividad enzimática, fueron sometidas a la misma estrategia de secuenciación (Grupo de secuenciación).

Se amplificó la región 5'-UTR y los exones del gen *GLA* de acuerdo al diseño y el protocolo del apartado 4.13.1. Una vez se obtuvieron los amplicones de las regiones anteriores, se llevó a cabo el proceso de secuenciación del gen según el procedimiento indicado en los apartados 4.13.3 y 4.13.4. El resultado de este proceso fue que en 118 mujeres (32,2%) y 67 varones (18,2%) se secuenciaron las regiones indicadas, obteniéndose los resultados indicados en la tabla 5.4.

No se identificó ninguna variante patogénica o probablemente patogénica para la EF en el grupo de secuenciación. Se identificaron variantes genéticas diferentes de sus alelos silvestres en 60 pacientes, incluso algunas de las variantes cosegregaban en el mismo paciente. Ciertas variantes en región no codificante (5'-UTR e intrones) tienden a segregar en forma haplotípica, denominándose haplotipos complejos intrónicos (HCI) (tabla 5.3).

Tabla 5.3. Variantes genéticas en el gen *GLA* identificadas en el Grupo de secuenciación

	NM_000169.2 ¹	SNP ²	GRch38.p12 ³	SILVESTRE/MUTADO	n
	c.-125T>G	rs185255090	101408028	A/C	1
	c.-34C>T	NUEVO	101407947	G/A	1
	c.-30G>A	rs3027584	100662921	C/T	4
	c.192C>T	NUEVO	101407712	G/A	1
	c.194+17A>G	rs2071226	101407693	T/C	1
	c.640-25A>G	NUEVO	101398972	T/C	1
	c.937G>T	rs28935490	101398432	C/A	2
HCI-I⁴	c.-10C>T	rs2071225	101407913	G/A	14
	c.370-81_370-77delCAGCC	rs5903184	101401886	GGCTG/-	
	c.640-16A>G	rs2071397	101398962	T/C	
	c.1000-22C>T	rs2071228	101398121	G/A	
HCI-II⁵	c.370-81_370-77delCAGCC	rs5903184	101401886	GGCTG/-	19
	c.640-16A>G	rs2071397	101398962	T/C	
	c.1000-22C>T	rs2071228	101398121	G/A	
HCI-III	c.-12G>A	rs3027585	101407915	C/T	14
	c.548-125C>G	rs2071396	101400882	G/C	
	c.639+68A>G	rs3027589	101400882	T/C	
	c.1000-22C>T	rs2071228	101398121	G/A	
HCI-I + HCI-III					1
HCI-II + HCI-III					1

HCI=Haplotipo complejo intrónico; **SNP**=Variaciones de un nucleótido (dbSNP, ver enlace).

¹Secuencia de referencia (ver enlace NCBI)

²Identificador de SNP (ver enlace dbSNP)

³Posición respecto a la versión del genoma de referencia (ver enlace NCBI)

⁴HCI-I incluye combinaciones con NM_000169.2:c.376A>G (n=1), NM_000169.2:c.937G>T (n=1), NM_000169.2:c.945C>T (n=1).

⁵HCI-II incluye combinaciones con NM_000169.2:c.937G>T (n=1).

Tras buscar las variantes de la tabla 5.3 en las bases de datos HGMD, ClinVar, LOVD y dbSNP obtuvimos el siguiente análisis:

1. NM_000169.2:c.-125T>G -> ClinVar clasifica esta variante como probablemente benigna, además en HGMD y LOVD no se encuentran publicaciones relacionadas con esta variante. En nuestra población, se identificó en una mujer en heterocigosidad (0,3%).
2. NM_000169.2:c.-34C>T -> No se encuentran entradas en ClinVar, HGMD ni LOVD para esta variante. En nuestra población, se identificó en una mujer en heterocigosidad (0,3%).
3. NM_000169.2:c.-30G>A -> ClinVar recoge 1 estudio en el que se interpreta como probablemente benigna y 2 estudios como benigna. HGMD y LOVD recogen varias publicaciones en las que se categoriza como benigna. En nuestra población, se identificó en 4 mujeres en heterocigosidad (1,1%).
4. NM_000169.2:c.-12G>A -> ClinVar recoge 5 estudios en el que se interpreta como probablemente benigna y 2 estudios como benigna. Ni HGMD ni LOVD recogen publicaciones respecto a esta variante. En nuestra población, se identificó en 16 sujetos (4,3%).
5. NM_000169.2:c.-10C>T -> ClinVar recoge 10 estudios en el que se interpreta como probablemente benigna y 2 estudios como benigna. HGMD y LOVD recogen publicaciones respecto a esta variante en los que se observa una reducción de la actividad enzimática. En nuestra población, se identificó en 14 sujetos (3,8%).
6. NM_000169.2:c.192C>T (NP_000160.1:p.Ile64=) -> No se encuentran entradas en ClinVar, HGMD ni LOVD para esta variante. En nuestra población, se identificó en una mujer en heterocigosidad (0,3%).
7. NM_000169.2:c.194+17A>G -> ClinVar recoge 2 estudios en el que se interpreta como benigna. Ni HGMD ni LOVD recogen publicaciones respecto a esta variante. En nuestra población, se identificó en una mujer en heterocigosidad (0,3%).
8. NM_000169.2:c. c.370-81_370-77delCAGCC -> -> ClinVar recoge 1 estudio en el que se interpreta como benigna. Ni HGMD ni LOVD recogen publicaciones respecto a esta variante. En nuestra población, se identificó en 35 sujetos (9,5%).
9. NM_000169.2:c.376A>G (NP_000160.1:p.Ser126Gly) -> existe conflicto respecto a la interpretación de esta variante ya que ClinVar recoge 5 estudios en los que se interpreta como probablemente benigna y 2 estudios como VUS. HGMD y LOVD recogen varias

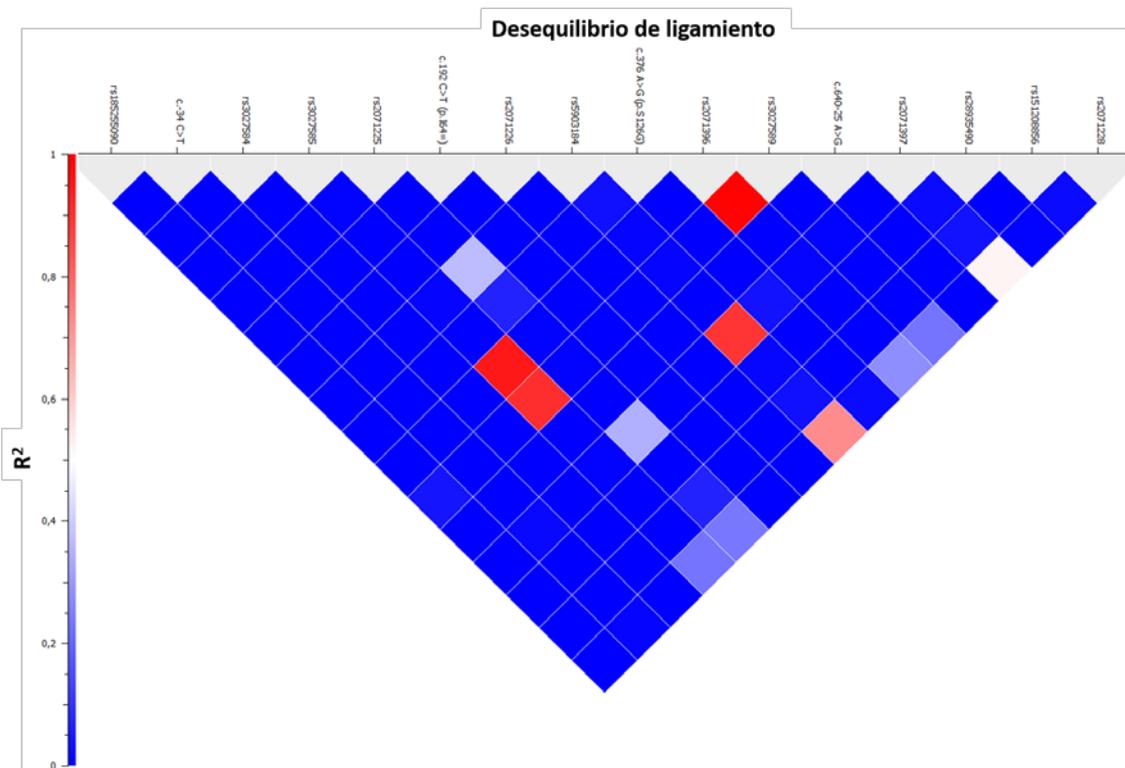
- publicaciones en las que se categoriza como benigna. En nuestra población, se identificó en un varón cosegregando con HCl-I (0,3%).
10. NM_000169.2:c.548-125C>G -> No se recoge información en ninguna base de datos consultada. En nuestra población, se identificó en 17 sujetos (4,6%).
 11. NM_000169.2:c.639+68A>G -> No se recoge información en ninguna base de datos consultada. En nuestra población, se identificó en 17 sujetos (4,6%).
 12. NM_000169.2:c.640-16A>G -> No se recoge información en ninguna base de datos consultada. En nuestra población, se identificó en 35 sujetos (9,5%).
 13. NM_000169.2:c.640-25A>G -> No se recoge información en ninguna base de datos consultada. En nuestra población, se identificó en 1 sujeto (0,3%).
 14. NM_000169.2:c.937G>T (NP_000160.1p.Asp313Tyr) -> existe conflicto respecto a la interpretación de esta variante ya que ClinVar recoge 2 estudios en los que se interpreta como benigna, 10 estudios como probablemente patogénica y 2 estudios como VUS. HGMD y LOVD recogen varias publicaciones en las que se categoriza como benigna o polimorfismo de pseudo-deficiencia. En nuestra población, se identificó en 4 mujeres en heterocigosidad o cosegregando con HCl-I y II (1,1%).
 15. NM_000169.2:c.945C>T (NP_000160.1p.Asp315=) -> existe conflicto respecto a la interpretación de esta variante ya que ClinVar recoge 1 estudio en el que se interpreta como benigna, 4 estudios como probablemente patogénica y 1 estudio como VUS. En HGMD y LOVD no se encuentran publicaciones asociadas a esta variante recoge varias publicaciones en las que se categoriza como benigna o polimorfismo de pseudo-deficiencia. En nuestra población, se identificó en 4 mujeres en heterocigosidad o cosegregando con HCl-I y II (1,1%).
 16. NM_000169.2:c.1000-22C>T -> ClinVar recoge 3 estudios en el que se interpreta como benigna. Ni HGMD ni LOVD recogen publicaciones respecto a esta variante. En nuestra población, se identificó en 35 sujetos (9,5%).

Aquellas variantes identificadas de *novo* en esta fase del estudio que se pueden considerar VUS (Paciente 1 NM_000169.2:c.-34C>T, Paciente 2 NM_000169.2:c.192C>T y Paciente 3 NM_000169.2:c.640-25A>C) continuaron la fase de caracterización del estudio. Debido a la elevada frecuencia en nuestra muestra las variantes que conforman los diferentes HCl (NM_000169.2:c.-12G>A, NM_000169.2:c.-10C>T, NM_000169.2:c.c.370-81_370-77delCAGCC, NM_000169.2:c.548-125C>G, NM_000169.2:c.639+68A>G, NM_000169.2:c.640-16A>G y NM_000169.2:c.1000-22G>A), continuamos el estudio de éstas en la la fase de caracterización.

5.3 Estudio epidemiológico de las variantes identificadas en el Grupo de secuenciación

Se realizó un estudio de ligamiento de los 17 marcadores o variantes genéticas (tabla 5.3) en el Grupo de secuenciación de la fase de pacientes del estudio (figura 5.1) para darnos idea de la independencia de la segregación y de la evolución de esos caracteres en nuestra muestra. Se observó una elevada tendencia a la cosegregación de diversas variantes como se aprecia en la figura 5.2, donde un mayor desequilibrio entre dos marcadores hace que el color vire del azul al rojo.

Figura 5.2. Gráfico de desequilibrio de ligamiento de los 17 marcadores identificados en el Grupo de secuenciación.



Analizando la figura observamos que el grado de ligamiento entre algunos marcadores, que componen el HCl-I, II y III, fue elevado (tabla 5.4).

Tabla 5.4. Resultado del análisis de desequilibrio de ligamiento en el Grupo de secuenciación

MARCADORES/VARIANTE GENÉTICAS	D'	R ²
NM_000169.2:c.-30G>A (rs3027584) vs NM_000169.2:c.548-125C>G (rs2071396)	1,000	0,955
NM_000169.2:c.-30G>A (rs3027584) vs NM_000169.2:c.639+68A>G (rs3027589)	0,955	0,913
NM_000169.2:c.370-81_370-77delCAGCC (rs5903184) vs NM_000169.2:c.640-16A>G (rs2071397)	1,000	0,902
NM_000169.2:c.370-81_370-77delCAGCC (rs5903184) vs NM_000169.2:c.1000-22G>A (rs2071228)	1,000	0,728
NM_000169.2:c.548-125C>G (rs2071396) vs NM_000169.2:c.639+68A>G (rs3027589)	1,000	1,000

D'=medida de la heredabilidad de dos marcadores genéticos; R²=nivel de redundancia estadística entre dos marcadores

Para conocer el nivel de asociación de las 17 variantes genéticas identificadas, planteamos un modelo de regresión en el que analizó como variable dependiente la actividad α -Gal A en DBS, como variables independientes el conteo de los alelos para cada marcador genético, y se intentó realizar un ajuste utilizando como covariables el género, el IMC, el EVI y la presencia/ausencia de HTA. El estudio de asociación para las 17 variantes identificadas, indicó que existía una asociación estadísticamente significativa de la actividad α -Gal A en DBS con 4 de las 17 variantes identificadas, bajo el modelo de herencia recesiva, para los genotipos hemizigoto y homocigoto mutado (tabla 5.5). Las 4 variantes forman parte de los HCl-I y II.

Tabla 5.5. Resultados del test de correlación/tendencia para la actividad de α -Gal A en DBS y los genotipos de los alelos identificados en el Grupo de secuenciación, bajo el modelo de herencia recesiva.

MARCADOR/VARIANTE GENÉTICA	ALELO ¹	COEF. β	p^2	p AJUSTADA ³
NM_000169.2:c.-10C>T (rs2071225)	T	-0,5857	0,00005	0,0005
NM_000169.2:c.370-81_370-77delCAGCC (rs5903184)	del	-0,3767	0,00246	0,0222
NM_000169.2:c.640-16A>G (rs2071397)	G	-0,4328	0,00117	0,0106
NM_000169.2:c.1000-22G>A (rs2071228)	T	-0,2882	0,00249	0,0224

Variable dependiente del modelo: L(α -Gal A); Covariables ajustadas: género, IMC, EVI, HTA.

¹Alelo minoritario

² p grado de significación estadística para el test de correlación tendencia

³ p ajustada mediante corrección posthoc de Bonferroni

El análisis de segregación haplotípica de las 4 variante participantes del HCl-I y II, indicó 16 haplotipos posibles. Cuatro de esos haplotipos estaban presentes con una frecuencia del 96,6% en nuestra muestra. El haplotipo que comprende las variantes NM_000169.2:c.-10C>T (rs2071225), NM_000169.2:c. c.370-81_370-77delCAGCC (rs5903184), NM_000169.2:c.640-16A>G (rs2071397) y NM_000169.2:c.1000-22G>A (rs2071228), y se corresponde con HCl-I, presentaba una frecuencia de 7,41%, mientras que el que comprende las variantes NM_000169.2:c. c.370-81_370-77delCAGCC (rs5903184), NM_000169.2:c.640-16A>G

(rs2071397) y NM_000169.2:c.1000-22G>A (rs2071228), y se corresponde con HCl-II, presentaba una frecuencia de 8,63%. (tabla 5.6).

Tabla 5.6. Frecuencias haplotípicas estimadas para las cuatro variantes genéticas relacionadas con la reducción de la actividad de α -Gal A en DBS en el Grupo de secuenciación.

HAPLOTIPO ¹	PROBABILIDAD ²
C / (No del) / A / C	75,68
C / (del) / G / T	8,63
T / (del) / G / T	7,41
C / (No del) / A / T	4,87
Otros	3,41

¹Orden alelos en haplotipo: rs2071225 (C>T) / rs5903184 (delCCGAC) / rs2071397 (A>G) / rs2071228 (C>T)

²Probabilidad según algoritmo de expectación-maximización

5.4 Estudio de caracterización de NM_000169.2:c.-34C>T; NM_000169.2:c.192C>T; NM:000169.2:c.640-25A>G

De acuerdo con el resultado de las variantes genéticas identificadas en el Grupo de secuenciación (tabla 5.3), estudiamos en profundidad 3 VUS (NM_000169.2:c.-34C>T; NM_000169.2:c.192C>T; NM:000169.2:c.640-25A>G) identificadas en 3 mujeres del estudio.

5.4.1 Estudio Bioinformático

EL análisis de MutationTaster indicó que NM_000169.2:c.192C>T presentaba una probabilidad elevada de tener significado patológico en la EF (Probabilidad=1,0000/1,0000 patogenicidad); Las variantes NM:000169.2:c.-34C>T y NM:000169.2:c.640-25A>G indicaron probabilidades compatibles con significado benigno (Probabilidad=0,9999/1,0000 benigna).

La variante NM_000169.2:c.192C>T presenta indicios de ser patogénica. Esta variante es de tipo silente, ya que no hay cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína a priori, sin embargo, la variante forma parte de la secuencia canónica donora en el ajuste del mRNA pudiendo producirse un evento de ajuste alternativo en el caso de que se hubiera segregado el alelo mutado en hemi/homocigosidad. Se analizó el posible efecto de la variante a nivel de ajuste del mRNA y se identificó una posible modificación de éste en la región exón 1-intrón 1, reflejada por el cambio en la fortaleza de las puntuaciones de los predictores (apartado 4.15) al comparar la secuencia silvestre vs mutada (SSPPNN silvestre=0,94 vs mutada=0; HSF silvestre=7,3 vs mutada=3,8).

Debido al rol que puede desempeñar la variante NM:000169.2:c.-34C>T en la regulación de la expresión génica de *GLA*, se procedió a realizar el análisis *in silico* de los predictores relacionados con este tipo de alteración. El análisis realizado con PROMO y MatInspector (apartado 4.15) de la región circundante a la variante c NM:000169.2:c.-34C>T, comparando la variante silvestre con la variante alternativa, indicó la creación de un sitio potencial de unión al factor de transcripción E2F-myc cuando la región promotora contiene la variante alternativa (tabla 5.7).

Tabla 5.7. Factores de transcripción que potencialmente se unen a la secuencia consenso circundante a la variante NM_000169.2:c.-34C>T.

FAMILIA	DESCRIPCIÓN	SEC. CONSENSO
E2F-myc	Activador/regulador del ciclo celular	tactcGCGGaaatttat

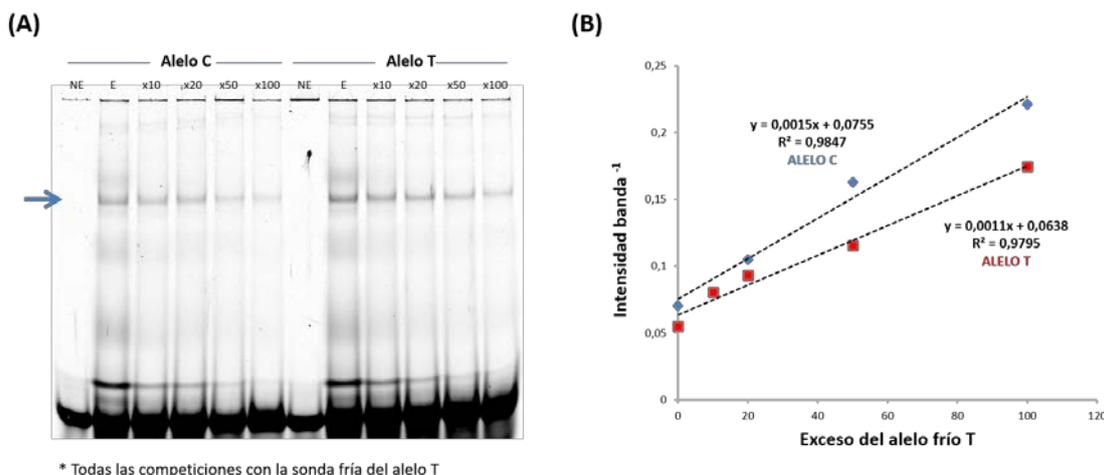
El nucleótido indicado en rojo se corresponde con el alelo mutado; los nucleótidos en mayúscula indican región de unión del factor de transcripción.

5.4.2 Estudio en gel de retardo. “Electrophoretic Mobility Shift Assay”

Para comprobar la interacción diferencial de las proteínas nucleares con la variante NM_000169.2:c.-34C>T, se llevó a cabo experimentos de EMSA en el laboratorio del profesor José Carlos Rodríguez.

El resultado de la técnica permite apreciar diferencias respecto a la afinidad de las proteínas de los extractos nucleares para ambos alelos. El alelo mutado T presenta una mayor afinidad por las proteínas nucleares que el alelo silvestre C (figura 5.3A). El estudio de cuantificación de esas diferencias, en el que se realizó un experimento de competición utilizando cantidades crecientes de oligonucleótido no marcado “sonda fría”, mostraron que el alelo silvestre C era más fácilmente desplazable (pendiente=0,0015) que el alelo T (pendiente=0,0011) del complejo de unión proteína-DNA (figura 5.3B). La segregación del alelo mutado T resulta en una interacción más estable con las proteínas nucleares.

Figura 5.3. Resultados del EMSA de la variante NM_000169.2:c.-34C>T. (A) Estudio de competición de las proteínas nucleares vs sondas que contienen alelos C y T de la variante. (B) Representación gráfica del estudio de competición.



5.4.3 Análisis enzimático en muestra de plasma y leucocitos de los pacientes 1,2 y 3

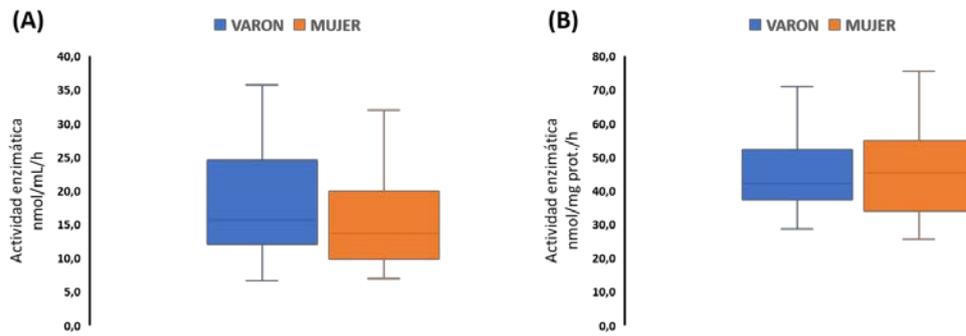
Teniendo en cuenta que los individuos en los que se identificaron las variantes eran mujeres heterocigotas (pacientes 1, 2 y 3) y la limitación publicada por Linthorst *et al*¹⁰³ respecto a la utilidad del ensayo *in vitro* de actividad enzimática a partir de muestras de sangre, se analizó la actividad enzimática en muestras de plasma K₂EDTA y extracto leucocitario según el protocolo especificado en el apartado 4.12.2 y 4.12.3. Se analizó una población control en la que se utilizaron 100 muestras de plasma y 75 de extracto leucocitario de sujetos sanos. Los valores obtenidos para la población control se muestran en la tabla 5.8. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos los controles varones vs controles mujeres para la determinación de la actividad enzimática en plasma ($p=0,529$) y en extracto leucocitario ($p=0,968$) (figura 5.4).

Tabla 5.8. Actividad de α-Gal A en plasma K₂EDTA y extracto leucocitario en la población control.

GÉNERO	α-Gal A PLASMA		α-Gal A LEUCOCITOS	
	nmol/mL/h*	n	nmol/mg prot./h*	n
Varones	15,7(12,1-24,5)	41	42,0(33,4-52,0)	40
Mujeres	13,6(9,8-19,9)	49	45,3(34,1-54,8)	35
Total	15,0(10,7-22,5)	100	43,8(34,8-53,0)	75

*Rango de referencia control expresado como mediana(Percentil 25-Percentil75)

Figura 5.4. Gráfico de la actividad de α -Gal A en plasma K₂EDTA (A) y extracto leucocitario (B) en la población control



Todos los valores obtenidos para ambas determinaciones, se encontraban dentro del rango de referencia de la población control del laboratorio, e incluso en algún caso siendo superior a éste. Los resultados se muestran en la tabla 5.9.

Tabla 5.9. Actividad de α -Gal A en plasma K₂EDTA y extracto leucocitario medidas en los pacientes 1, 2 y 3.

PACIENTE/CONTROL	α -Gal A PLASMA		α -Gal A LEUCOCITOS	
	nmol/mL/h	% ²	nmol/mg prot./h	% ²
Paciente 1	27,0	189	72,0	150
Paciente 2	18,3	128	55,2	115
Paciente 3	12,4	87	42,3	88

¹Rango de referencia control expresado como mediana(Percentil 25-Percentil75)

²Actividad relativa a la mediana correspondiente a cada género de la población control

5.4.4 Determinación de Gb₃ en orina y Liso-Gb₃ en plasma de los pacientes 1, 2 y 3.

Los niveles de biomarcadores relacionados con la EF se midieron en muestra de orina y en muestra de plasma y se interpretaron según los puntos de corte establecidos (apartados 4.11.1 y 4.11.2). Los pacientes 1, 2 y 3 presentaron niveles de Gb₃ en orina y de Liso-Gb₃ en plasma por debajo del límite establecido por el laboratorio de referencia (tabla 5.10).

Tabla 5.10. Niveles de Gb₃ en orina y de Liso-Gb₃ medidas en los pacientes 1, 2 y 3.

PACIENTE	Gb ₃ ORINA ¹	Liso-Gb ₃ PLASMA ²
Paciente 1	ND	0,26
Paciente 2	0,015	0,65
Paciente 3	ND	ND

¹mg Gb₃/mmol creatinina; rango normal <0,300 mg Gb₃/mmol

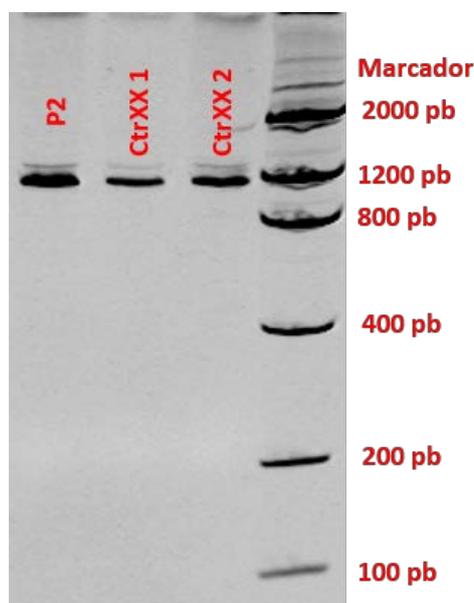
²nmol Liso-Gb₃/L; rango normal <1,00 nmol Liso-Gb₃/L

ND=No detectable

5.4.5 Caracterización electroforética en gel de poliacrilamida al 6% del paciente 2

Puesto que el resultado del estudio *in silico* de predictores de patogenicidad para las variantes NM_000169.2:c.-34C>T, NM_000169.2:c.192C>T y NM:000169.2:c.640-25A>G (apartado 5.3.1), solo mostró claros indicios de significado patogénico para la variante presente en el paciente 2 (NM_000169.2:c.192C>T), se trató de caracterizar mediante separación electroforética PAGE la presencia de transcritos en el mRNA debido al ajuste alternativo. Para llevar a cabo este estudio se aisló el RNA de la muestra de sangre del paciente (apartado 4.9), se cuantificó y purificó (apartados 4.10.3 y 4.10.4) para después obtener por retrotranscripción la molécula de cDNA del gen *GLA* (apartado 4.17.1). Esta molécula de cDNA se sometió a electroforesis PAGE 6% (m/v) (apartado 4.17.3) y los diferentes fragmentos obtenidos se compararon con muestras de cDNA del gen *GLA* de individuos control de su mismo género. Podemos apreciar en la figura 5.5 como no se identifica ningún fragmento de diferente tamaño al de los controles.

Figura 5.5. Electroforesis PAGE 6% (m/v) de la muestra de cDNA del paciente 2 y dos controles emparejados por género (CtrXX 1 y CtrXX 2).



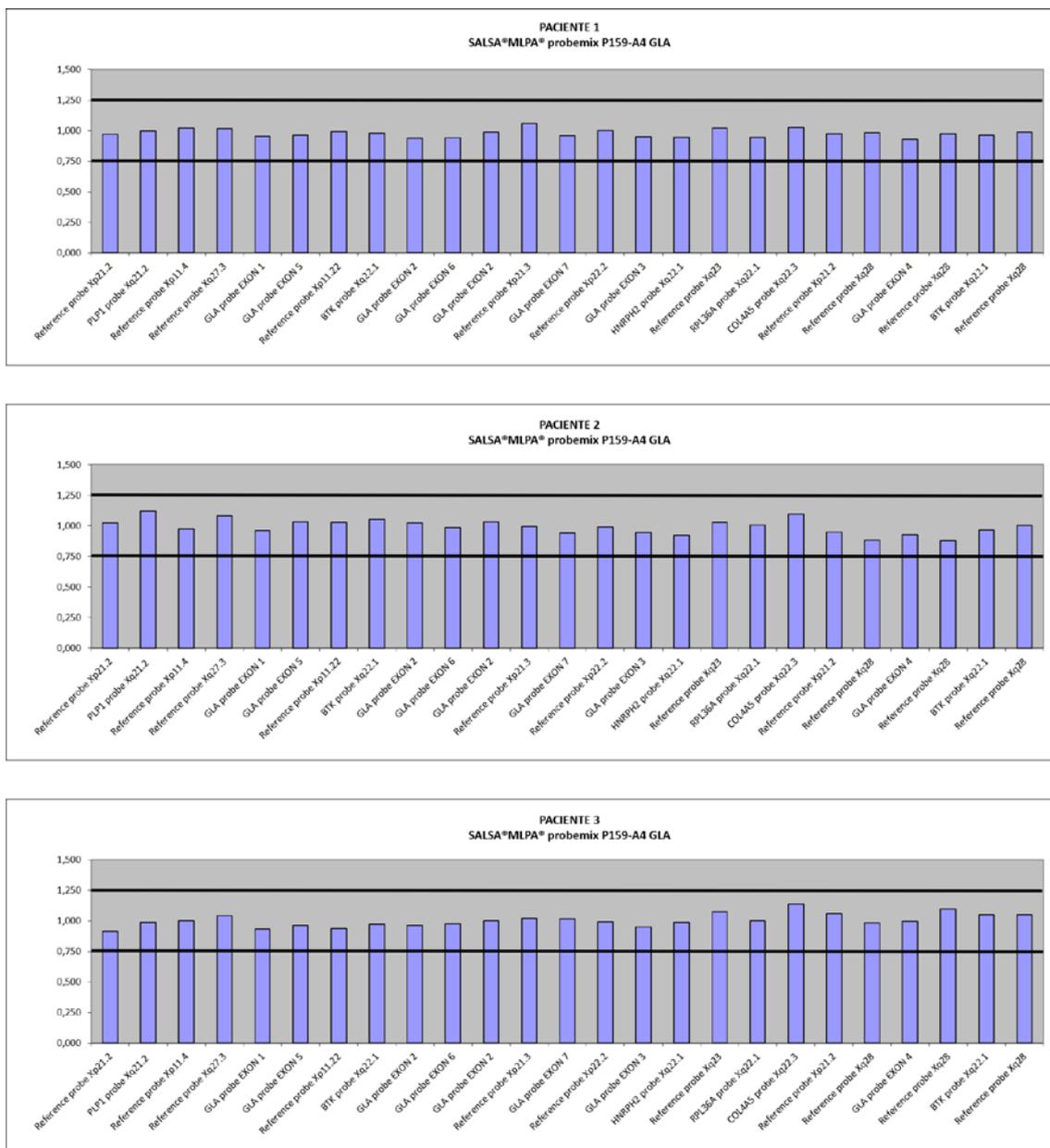
5.4.6 Identificación de transcritos alternativos mediante secuenciación del cDNA completo del gen *GLA* en los pacientes 1, 2 y 3

Para identificar las posibles variantes de ajuste (a partir del cDNA obtenido para realizar los experimentos del apartado 4.17.1) se diseñó una PCR anidada para obtener fragmentos con un tamaño inferior a las 700 pb, que nos permitiesen analizarlos mediante secuenciación capilar y de tal manera que quedasen solapados para evitar la pérdida de información (apartado 4.17.4). No se encontraron diferencias entre la secuencia de referencia y las secuencias obtenidas de la muestra de la paciente 2. Pudimos confirmar la variante NM_000169.2_c.192C>T en la secuencia del cDNA de la paciente 2.

5.4.7 Perfil de reordenamientos en el gen *GLA* de los pacientes 1, 2 y 3

Aproximadamente un 5% de las variantes patogénicas en el gen *GLA* son reordenamientos, pudiendo implicar desde unos pocos nucleótidos hasta el gen entero. Estas variantes en el caso de las mujeres, pueden escapar de la identificación por las técnicas de secuenciación capilar cuando se presentan en heterocigosidad, por lo que es necesario investigar la presencia de reordenamientos de acuerdo a la técnica de MLPA descrita en el apartado 4.14. Para asegurarnos que el genotipo observado en las pacientes 1, 2 y 3 es solo debido a las variantes puntuales identificadas en la secuenciación capilar, las sometemos a técnica de MLPA. El resultado para las 3 pacientes se puede apreciar en la figura 5.6. Ninguna de las tres pacientes presenta reordenamientos anómalos para las regiones cubiertas por la mezcla de sondas utilizadas.

Figura 5.6. Histogramas del número de copias de las regiones codificantes del gen *GLA* en los pacientes 1, 2 y 3. En el eje de abscisas se representan todas las sondas que cubren tanto los exones del gen *GLA*, así como los genes control constitutivos. En el eje de ordenadas se representa la dosis relativa normalizada de cada una de las sondas del eje de abscisas. Las barras horizontales se encuentran ubicadas en los puntos de corte de la delección (0,75) y la duplicación (1,25).



5.5 Estudio de caracterización de variantes que segregan en forma de haplotipos complejos

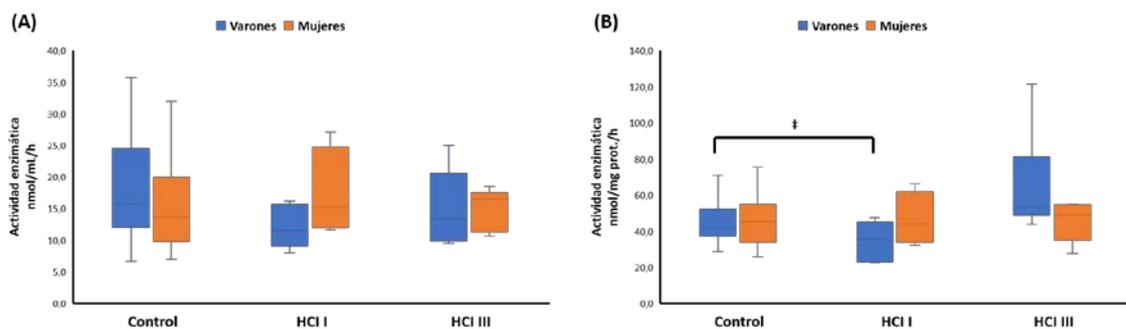
De acuerdo con el resultado de las variantes genéticas identificadas en el Grupo de secuenciación (tabla 5.3) y con los resultados del estudio epidemiológico (tabla 5.5 y tabla 5.6), tratamos de caracterizar los individuos que presentaban los haplotipos complejos sin cosegregación de ninguna variante clasificada como VUS, potencialmente benigna. Atendiendo a este criterio, en el grupo de pacientes con HCl I (n=14) excluimos a 3 de ellos al existir cosegregación con las variante NM_000169.2:c.376A>G, NM_000169.2:c.937G>T y NM_000169.2:c.945C>T por lo que caracterizamos finalmente n=11 pacientes con HCl I (6 varones y 5 mujeres); respecto al grupo de pacientes con HCl III (n=14) los caracterizamos a todos (6 varones y 8 mujeres).

Los varones con HCl I eran más jóvenes [(61,5(47,5-75,3)] que las mujeres [(66,0(59,3-72,8)], observación que se replica en los pacientes con HCl III 68,0(47,8-76,0) vs 70,0(60,3-81,5).

5.5.1 Análisis enzimático en muestra de plasma y leucocitos de los pacientes con haplotipos complejos

EL análisis enzimático se realizó en muestras de plasma K₂EDTA y extracto leucocitario según el protocolo especificado en el apartado 4.12.2 y 4.12.3. Se utilizó la misma población control que la descrita en el apartado 5.4.3, para contrastar los datos de actividad enzimática en plasma y extracto leucocitario de los pacientes con HCl I y III. El resultado de esta determinación indica que existe una reducción significativa en los varones que presentan el HCl I ($p=0,030$); esta reducción fue de un 15% de media respecto al valor mediano de la población control emparejada por género (figura 5.7)

Figura 5.7. Gráfico de la actividad de α -Gal A en plasma K₂EDTA (A) y extracto leucocitario (B) en la población control vs Grupo HCl vs Grupo HCl III. mediana(Percentil25-Percentil75). ‡ $p<0,05$



5.5.2 Determinación de Gb₃ en orina y Liso-Gb₃ en plasma de los pacientes con haplotipos complejos

Los niveles de biomarcadores relacionados con la EF se midieron en muestra de orina y en muestra de plasma de los 11 pacientes con HCl I y los 14 pacientes con HCl III; se interpretaron según los puntos de corte establecidos (apartados 4.11.1 y 4.11.2). Todos los pacientes independientemente de su género y el haplotipo que presentan, mostraron niveles de Gb₃ en orina y Liso-Gb₃ en plasma por debajo de los puntos de corte establecidos en los laboratorios de referencia. En el caso de la concentración de Gb₃ en orina en los pacientes con HCl III se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica (tabla 5.11). La comparación de los niveles de cada biomarcador estratificando por género y/o haplotipo, no resultaron ser significativas.

Tabla 5.11. Niveles de Gb₃ en orina y de Liso-Gb₃ medidas en el Grupo HCl I y HCl III.

PACIENTE	Gb ₃ ORINA ^{1,*}		Liso-Gb ₃ PLASMA ^{2,*}	
	Varones	Mujeres	Varones	Mujeres
HCl I	0,105(0,010-0,014)	0,020(0,011-0,030)	0,04(ND-0,27)	0,14(0,03-0,19)
HCl III	ND	ND	0,05(0,03-0,14)	0,07(ND-0,17)

¹mg Gb₃/mmol creatinina; rango normal <0,300 mg Gb₃/mmol

²nmol Liso-Gb₃/L; rango normal <1,00 nmol Liso-Gb₃/L

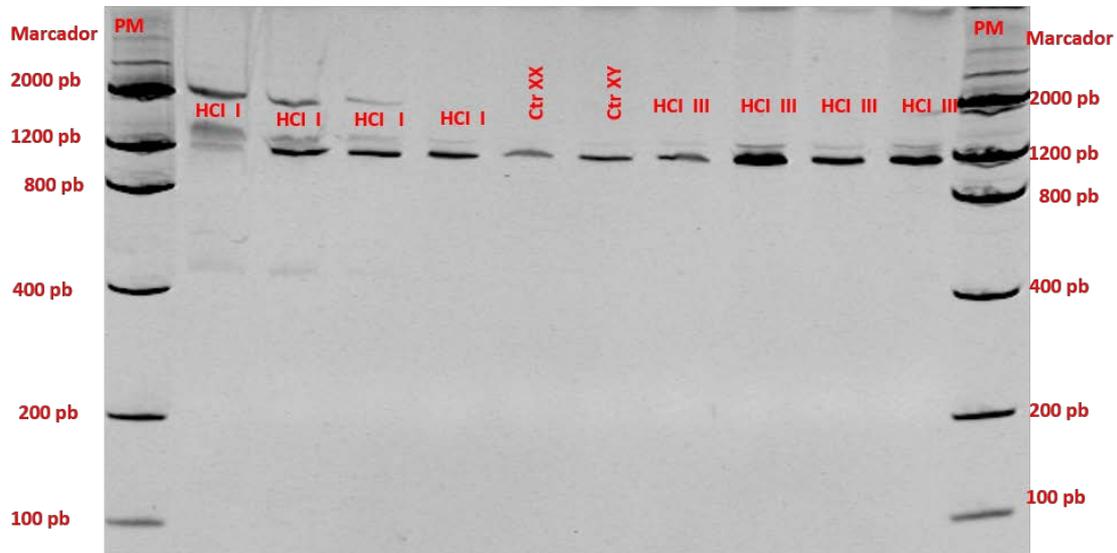
*mediana(Percentil 25-Percentil 75)

ND=No detectable

5.5.3 Caracterización electroforética en gel de poliacrilamida al 6% de los pacientes con haplotipos complejos

La cosegregación de diversas variantes en regiones intrónicas podría desregular el ajuste fisiológico del mRNA y generar transcritos alternativos con implicación patogénica. Mediante separación electroforética PAGE (apartado 4.17.3), a partir de la molécula de cDNA del gen *GLA* (apartado 4.17.1), se comparó el patrón de fragmentos obtenidos de los pacientes con HCl con el de las muestras de cDNA de individuos control de género masculino y femenino. No se identifican fragmentos de diferente tamaño que los visualizados en los controles (figura 5.9).

Figura 5.8. Electroforesis PAGE 6% (m/v) de la muestra de cDNA pacientes hemi y heterocigotos para los HCl I y III. Se incluye un control varón (CtrXY) y un control mujer (CtrXX). HCl=haplotipo complejo intrónico; PM=marcador de pesos moleculares.



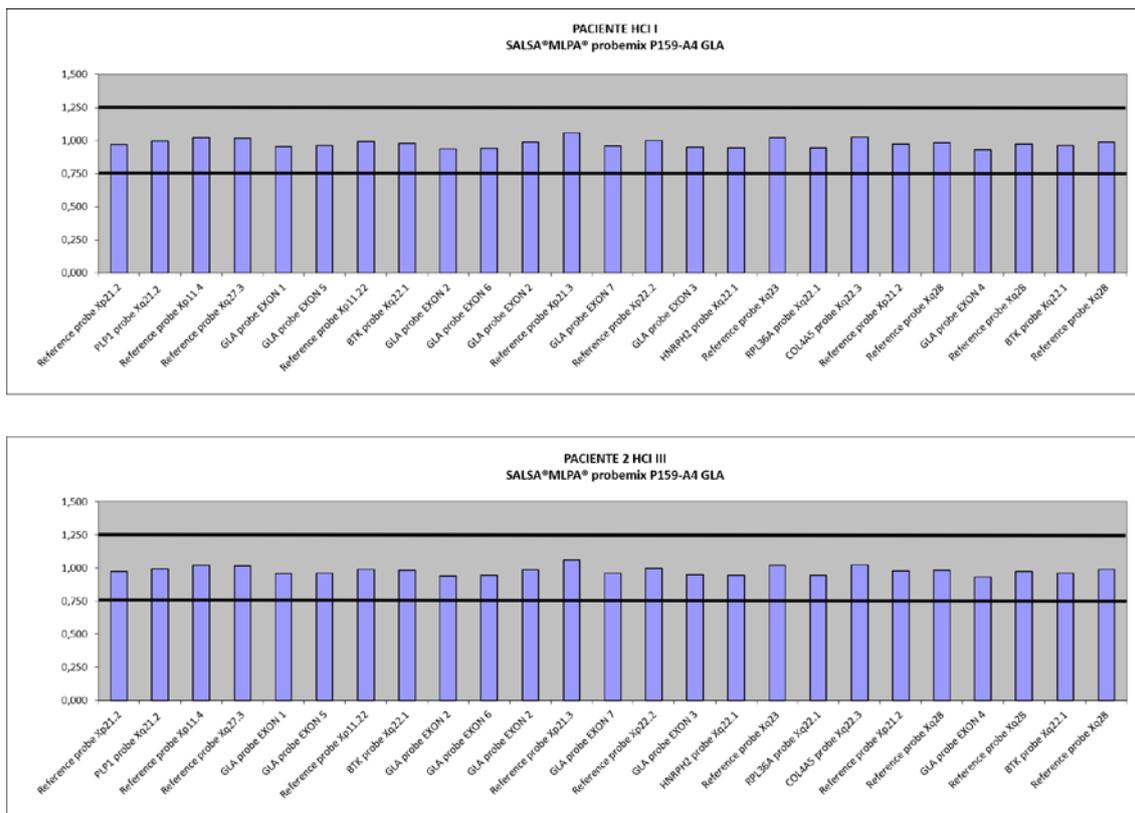
5.5.4 Identificación de transcritos alternativos mediante secuenciación del cDNA completo del gen *GLA* en los pacientes con haplotipos complejos

La secuenciación del cDNA de los pacientes con haplotipos complejos, utilizando la técnica de PCR anidada descrita en el apartado 4.17.4, no permitió identificar transcritos alternativos debidos a ajuste alternativo del mRNA.

5.5.5 Perfil de reordenamientos en el gen *GLA* de los pacientes con haplotipos complejos

El análisis de las 5 mujeres con HCl I y de las 8 mujeres con HCl III, mediante técnica de MLPA (apartado 4.14), no identificó reordenamientos patogénicos en el gen *GLA*. En la figura 5.9 se ilustra el histograma correspondiente, a la dosis relativa de las sondas presentes en la mezcla de reacción, de una mujer con HCl tipo I y otra con HC tipo III.

Figura 5.9. Histogramas del número de copias de las regiones codificantes del gen GLA en los pacientes con haplotipos complejos. HCl=haplotipo complejo intrónico



5.5.6 Análisis de la expresión génica de los pacientes mediante qPCR

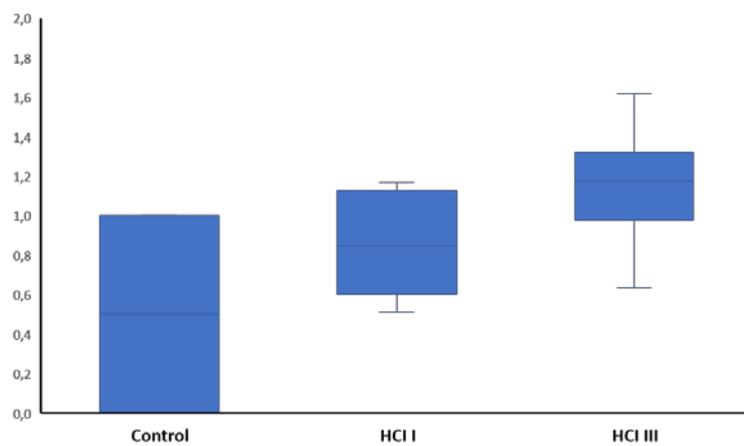
Los haplotipos complejos se componen de una serie de variantes genéticas, casi todas de ellas en regiones intrónicas, pero además cuentan cada uno de los haplotipos con una variante en región 5'UTR. La segregación del alelo mutado en estas variantes, podría modificar la interacción de los elementos tipo Trans y causar una desregulación de la expresión del gen *GLA*. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron sondas de hidrólisis o TaqMan para el gen diana, así como para el gen constitutivo *GAPDH* de acuerdo con el protocolo descrito en 4.19. A partir de una muestra de cDNA control, realizamos las rectas estándar para calcular la eficiencia de las premezclas de los cebadores y sondas (ver apartado 4.19.1). Las rectas para las dos sondas mostraron un coeficiente de determinación $R^2 > 0,99$. Los valores de las eficiencias para las sondas fueron: $E_{GLA} = 1,99$ y $E_{GAPDH} = 1,86$.

Una vez tuvimos optimizadas las condiciones de reacción se llevó a cabo una qPCR de las muestras de los pacientes con haplotipo complejo y 30 sujetos control (15 varones y 15 mujeres), por triplicado y siguiendo el protocolo detallado en el apartado 4.19. Se calculó la CR

de la expresión de los dos transcritos a partir de los valores de C_t registrados para cada individuo; comparándolos con los controles emparejados por género.

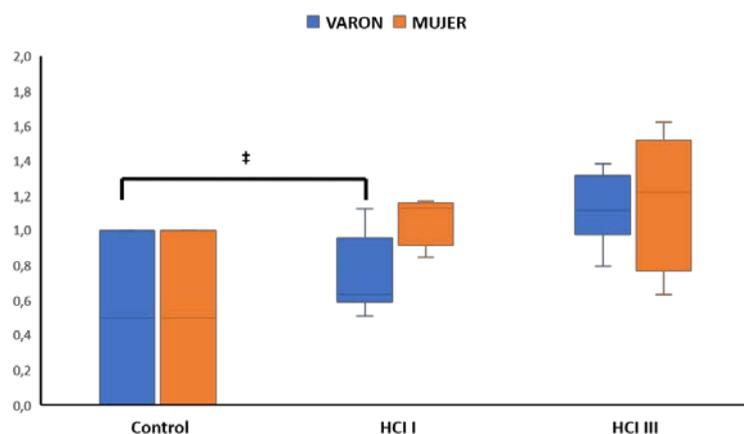
Cuando analizamos todos los individuos que presentan haplotipos complejos, independientemente de su género, observamos una cierta reducción de la expresión del gen en la submuestra de los HCl I que no fue estadísticamente significativa ($p=0,089$); por otro lado, la submuestra de los HCl III mantienen unos niveles de expresión prácticamente iguales a los de los controles (figura 5.10).

Figura 5.10. Cuantificación relativa del gen *GLA* en los pacientes con haplotipos complejos. No se estratificó por género a los pacientes. mediana(Percentil25-Percentil75).



Al realizar la estratificación de las submuestras por género, constatamos que el componente principal de la reducción de la expresión del gen *GLA* en pacientes con HCl I son los varones (figura 5.11). La reducción de la expresión es significativa en términos estadísticos ($p=0,038$).

Figura 5.11. Cuantificación relativa del gen *GLA* en los pacientes con haplotipos complejos estratificados por género. HCl=haplotipo complejo intrónico. mediana(Percentil25-Percentil75). ‡ $p<0,05$



5.5.7 Identificación de nuevas variantes en la región 5'-UTR y en los intrones del gen *GLA* en pacientes con haplotipos complejos.

La región codificante del gen *GLA* apenas supone un 10% de la secuencia de éste. Para comprobar la presencia o ausencia de más variantes en las regiones no codificantes del gen, se planteó una amplificación de éstas utilizando un diseño de cebadores que generan fragmentos solapantes (*"primer walking"*) según el protocolo indicado en el apartado 4.13.2. Los amplicones generados se secuenciaron de acuerdo a los procedimientos descritos en 4.13.3 y 4.13.4. Con una cobertura del 96%, se secuenciaron todos los individuos con HCl I y III, identificándose en todos ellos 8 nuevos polimorfismos (1 asociado a HCl I y 7 asociados a HCl III) en regiones no codificantes bien en hemizigosidad bien en heterozigosidad bien en homozigosidad. En la tabla 5.12 se recogen las variantes que conforman el haplotipo completo para los pacientes con HCl I y en la tabla 5.13 se recogen las que conforman el haplotipo completo para los pacientes con HCl III.

Tabla 5.12. Variantes genéticas que conforman el HCl I.

NM_00169.2 ¹	IVS	SNP ²	GRch38.p12 ³	SILVESTRE/MUTADO
c.-769G>C	5'-UTR	rs3027580	101408672	C/G
c.10C>T	5'-UTR	rs2071225	101407913	G/A
c.369+990C>A	2	rs1023431	101402821	T/G
c.370-81_370-77delCAGCC	2	rs5903184	101401886	GGCTG/-
c.640-16A>G	4	rs2071397	101398962	T/C
c.1000-22C>T	6	rs2071228	101398121	G/A

SNP=Variaciones de un nucleótido (dbSNP, ver enlace); IVS=Región intrónica dónde se detecta.

En rojo se indica las nuevas variantes intrónicas identificadas asociadas a este haplotipo.

¹Secuencia de referencia (ver enlace NCBI)

²Identificador de SNP (ver enlace dbSNP)

³Posición respecto a la versión del genoma de referencia (ver enlace NCBI)

Tabla 5.13. Variantes genéticas que conforman el HCl III.

NM_00169.2 ¹	IVS	SNP ²	GRch38.p12 ³	SILVESTRE/MUTADO
c.-12G>A	5'-UTR	rs3027585	101407915	C/T
c.194+377C>T	1	rs57788389	101407333	T/C
c.194+1287T>A	1	rs3027587	101406423	A/T
c.195-1663G>A	1	rs28452934	101405648	C/T
c.195-807G>T	1	rs12394005	101404792	C/A
c.547+190C>T	3	rs41311559	101401442	G/A
c.548-125C>G	3	rs2071396	101400882	G/C
c.639+68A>G	4	rs3027589	101400598	T/C
c.640-386G>A	4	rs111232330	101399332	C/T
c.640-136T>C	4	rs3027592	101399082	A/T
c.1000-22C>T	6	rs2071228	101398121	G/A

SNP=Variaciones de un nucleótido (dbSNP, ver enlace); IVS=Región intrónica dónde se detecta.

En rojo se indica las nuevas variantes intrónicas identificadas asociadas a este haplotipo.

¹Secuencia de referencia (ver enlace NCBI)

²Identificador de SNP (ver enlace dbSNP)

³Posición respecto a la versión del genoma de referencia (ver enlace NCBI)

Una vez que se identificaron nuevas variantes asociadas a los HCl I y III, se procedió a genotipar de las nuevas variantes asociadas a los HCl (tablas 5.12 y 5.13) y las variantes previamente asociadas a éstos (apartado 5.2) en una población control. A su vez, se genotipó las nuevas variantes asociadas a los HCl (tablas 5.12 y 5.13) en la población del Grupo de Secuenciación. La población que se va tomar como control son individuos sanos, compuesto por 50 varones y 50 mujeres. El genotipado se realizó mediante *RFLP* y la visualización mediante electroforesis en gel de agarosa. Mediante el uso del programa Restriction Mapper, se analizó la secuencia resultante de la amplificación utilizando el diseño de cebadores contemplado en los apartados 4.13.1 y 4.13.2. Cuando no se pudiese encontrar una enzima de restricción adecuada para que cortase los amplicones anteriores, se planteó un diseño de cebadores degenerados. Estos cebadores presentan como características que: se diseñan 5' corriente arriba del nucleótido que queremos genotipar, presenta una o varias bases nitrogenadas diferente a las que le correspondería en la hebra molde cerca de la secuencia 3' del cebador directo o reverso etc. Al introducir esta/as base/s junto el nucleótido donde se localiza la variante, estaremos generando un sitio de restricción que antes no existía y así facilitar que alguna enzima reconozca esa secuencia "forzada" y la corte generando un patrón de restricción alternativo al obtenido con la variante silvestre. La información del diseño del genotipado mediante *RFLPs* se encuentra en la tabla 5.14.

Tabla 5.14. Resumen del protocolo de genotipado de las variantes asociadas a HCl I y III, mediante técnica de RFLPs.

NM_00169.2 ¹	HCl	SNP ²	CEBADORES ³	ENZIMA ⁴	POLÍMERO ⁵
c.-769G>C	I	rs3027580	Promotor	Hinfl	Agarosa 3%
c.10C>T	I	rs2071225	Exón 1	HphI	NuSieve™ 3%
c.369+990C>A	I	rs1023431	Intrón 2 frag. B	Mbo	Agarosa 1%
c.370-81_370-77delCAGCC	I	rs5903184	Exón 3	BsaJI	NuSieve™ 3%
c.640-16A>G	I	rs2071397	GATGTTAGTAGAAAGTAAACAGAAGAGT G TTATACTTTCCAGGAATCATCAAT	EcoRV	NuSieve™ 3%
c.-12G>A	III	rs3027585	Exón 1	MspI	Agarosa 1%
c.194+377C>T	III	rs57788389	Intrón 1 frag. A	MspI	NuSieve™ 3%
c.194+1287T>A	III	rs3027587	Intrón 1 frag. B	DraI	Agarosa 1%
c.195-1663G>A	III	rs28452934	Intrón 1 frag. C	AcI	NuSieve™ 3%
c.195-807G>T	III	rs12394005	GGCCTCCCAAATGCTGTTAT CATTTTGGCTAGGCTAGTCTTGAT T	DpnI	NuSieve™ 3%
c.547+190C>T	III	rs41311559	GCTTCCTGGGAGTTTTGGAT CACAATATTAGCTATGGTTAGGTATGCC C	MvaI	NuSieve™ 3%
c.548-125C>G	III	rs2071396	Exón 4	BsaJI	Agarosa 3%
c.639+68A>G	III	rs3027589	Exón 4	StyI	Agarosa 3%
c.640-386G>A	III	rs111232330	Intrón 4 frag. B	HaeIII	Agarosa 3%
c.640-136T>C	III	rs3027592	Intrón 4 frag. B	PsiI	Agarosa 1%
c.1000-22C>T	I/III	rs2071228	TAACCTTGAAGTCCATTCCATAGAAC CCACTTATCACTAGTTGCTAAGCAG G	TseI	NuSieve™ 3%

HCl=haplotipo complejo intrónico; SNP=Variaciones de un nucleótido (dbSNP, ver enlace).

¹Secuencia de referencia (ver enlace NCBI)

²Identificador de SNP (ver enlace dbSNP)

³Información de la secuencia nucleotídica disponible en las tablas 4.3 y 4.4. En el caso de cebadores degenerados, la secuencia se especifica en la celda en sentido 5' -> 3' y el nucleótido que discorda se indica en tojo.

⁴Enzima de restricción. Protocolo térmico de corte según fabricante (ThermoFisher Scientific o New England BioLabs® Inc)

⁵Polímero empleado para realizar la caracterización electroforética del producto de restricción

Se estudió una la población control (50 varones y 50 mujeres sanos) mediante análisis de restricción indicado en el protocolo de la tabla 5.14. Se calculó la frecuencia alélica y genotípica para cada uno de ellos. En el caso de los varones, al ser hemizigotos y presentar marcadores genéticos monomórficos, la frecuencia alélica coincide con la genotípica. Los resultados se resumen en la tabla 5.15.

Tabla 5.15. Resultados de la estimación de la frecuencia alélica y genotípica en nuestra población control.

NM_00169.2 ¹	HCI	SNP ²	FRECUENCIA ALÉLICA ³	FRECUENCIA GENOTÍPICA ⁴
c.-769G>C	I	rs3027580	0,99 / 0,01	0,96 / 0,04 / 0,00
c.10C>T	I	rs2071225	0,98 / 0,02	0,98 / 0,02 / 0,00
c.369+990C>A	I	rs1023431	0,90 / 0,10	0,81 / 0,19 / 0,00
c.370-81_370-77delCAGCC	I	rs5903184	0,96 / 0,04	0,98 / 0,02 / 0,00
c.640-16A>G	I	rs2071397	0,93 / 0,07	0,81 / 0,19 / 0,00
c.-12G>A	III	rs3027585	0,96 / 0,04	0,94 / 0,06 / 0,00
c.194+377C>T	III	rs57788389	0,98 / 0,02	0,94 / 0,06 / 0,00
c.194+1287T>A	III	rs3027587	0,98 / 0,02	0,94 / 0,06 / 0,00
c.195-1663G>A	III	rs28452934	0,98 / 0,02	0,94 / 0,06 / 0,00
c.195-807G>T	III	rs12394005	0,99 / 0,01	0,96 / 0,04 / 0,00
c.547+190C>T	III	rs41311559	1,00 / 0,00	1,00 / 0,00 / 0,00
c.548-125C>G	III	rs2071396	0,98 / 0,02	0,94 / 0,06 / 0,00
c.639+68A>G	III	rs3027589	0,98 / 0,02	0,92 / 0,08 / 0,00
c.640-386G>A	III	rs111232330	0,99 / 0,01	0,96 / 0,04 / 0,00
c.640-136T>C	III	rs3027592	0,98 / 0,02	0,88 / 0,12 / 0,00
c.1000-22C>T	I/III	rs2071228	0,88 / 0,12	0,75 / 0,25 / 0,00

HCI=haplotipo complejo intrónico; SNP=Variaciones de un nucleótido (dbSNP, ver enlace).

¹Secuencia de referencia (ver enlace NCBI)

²Identificador de SNP (ver enlace dbSNP)

³Alelo silvestre / Alelo mutado. Valorada en varones y mujeres.

⁴Genotipo homocigoto silvestre / Genotipo heterocigoto / Genotipo homocigoto mutado. Valorada en mujeres.

El estudio de desequilibrio de ligamiento no mostró diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas de la población control y las esperadas en una población en equilibrio, por tanto, todos nuestros marcadores genéticos asociados a los HCI se encuentran en equilibrio en la población control.

Cuando contrastamos las frecuencias alélicas de la población control vs la población de nuestro estudio con HCI I y III, sin estratificar por género, obtenemos que la frecuencia de muchos marcadores es significativa en la los pacientes con HCI I y III (tabla 5.16) y por lo tanto esos marcadores están diferencialmente representados en nuestra población respecto a una población control.

Tabla 5.16. Análisis comparativo de las frecuencias alélicas de los marcadores asociados a HCI en la población de estudio y en la población control.

NM_00169.2 ¹	HCI	SNP ²	p ³
c.-769G>C	I	rs3027580	0,009 [‡]
c.10C>T	I	rs2071225	0,002 [‡]
c.369+990C>A	I	rs1023431	0,669
c.370-81_370-77delCAGCC	I	rs5903184	<0,001 [#]
c.640-16A>G	I	rs2071397	<0,001 [#]
c.-12G>A	III	rs3027585	<0,001 [#]
c.194+377C>T	III	rs57788389	<0,001 [#]
c.194+1287T>A	III	rs3027587	<0,001 [#]
c.195-1663G>A	III	rs28452934	<0,001 [#]
c.195-807G>T	III	rs12394005	<0,001 [#]
c.547+190C>T	III	rs41311559	<0,001 [#]
c.548-125C>G	III	rs2071396	<0,001 [#]
c.639+68A>G	III	rs3027589	<0,001 [#]
c.640-386G>A	III	rs111232330	<0,001 [#]
c.640-136T>C	III	rs3027592	<0,001 [#]
c.1000-22C>T	I/III	rs2071228	<0,001 [#]

HCI=haplotipo complejo intrónico; SNP=Variaciones de un nucleótido (dbSNP, ver enlace).

¹Secuencia de referencia (ver enlace NCBI)

²Identificador de SNP (ver enlace dbSNP)

³p grado de significación estadística para la prueba de Chi-cuadrado. [‡]p<0,05 [#]p<0,01

5.6 Cuantificación del acúmulo de sustrato en cultivos celulares de pacientes con HCI I

Los resultados correspondientes a este bloque se encuentran publicados en Gervas-Arruga *et al.* 2015 ⁸².

5.6.1 Confirmación de la validez del modelo *in vitro* de acúmulo lisosomal

En primer lugar, se generó un modelo celular *in vitro* de acúmulo intracelular de sustratos glucolipídicos. Para ello se empleó una línea celular primaria de fibroblastos control a la que se le suministró una concentración de la citoquina TNF α adecuada para replicar la situación proinflamatoria que muestran las células en la EF. Posteriormente, se expuso la línea celular a una concentración elevada de la chaperona DGJ para causar inhibición de la α -Gal A endógena y así exacerbar el acúmulo glucolipídico que se había iniciado con el establecimiento de la inflamación. Por último, las células se trataron con α -Gal A exógena con el fin de que ésta se

internalizará en la célula y aclarase el depósito de glucoesfingolípidos generado por el co-tratamiento de TNF α y DGJ.

El resultado de este proceso se puede visualizar en la figura 4 de la publicación de Gervas-Arruga et al. 2015⁸². En la figura 4A se comprueba mediante el ensayo fluorimétrico con Galactosa oxidasa, como el tratamiento con TNF α provoca un acúmulo de material galactolípido a las 16 horas, que continúa incrementándose hasta las 24 horas. Cuando se le administra la chaperona a concentración inhibitoria, el acúmulo de los galactolípidos se exagera, y cuando se le administra la enzima exógena se reduce el acúmulo hasta prácticamente desaparecer. El resultado se corrobora mediante técnicas inmunocitoquímicas marcando el lisosoma con anti-LAMP1 y la Gb₃ y la Gb₂ con anti-CD77 y anti-CD-17 respectivamente (figuras 4B y 4C). Se correlaciona el acúmulo de galactolípidos medidos por método bioquímico con el acúmulo determinado por método inmunocitoquímico, al igual que se correlaciona el aclaramiento tanto de Gb₃ como de Gb₂ en el lisosoma cuando las células se tratan con la enzima exógena.

5.6.2 Determinación del acúmulo lisosomal de galactolípidos en las células de los pacientes con HCl I

Una vez confirmado la validez del modelo *in vitro*, constatamos el acúmulo de galactolípidos en las células de los pacientes sintomáticos de la EF y que presentan la herencia del HCl I. Se midió por el método bioquímico, los niveles de galactolípidos en los leucocitos aislado de la sangre venosa, y se observó un acúmulo no significativo de éstos en los pacientes con HCl I vs controles (0,42 \pm 0,63 vs 0,33 \pm 0,30 nmol/mg prot.). Este acúmulo se constató también en el extracto celular del cultivo de los fibroblastos de los pacientes, llegando a ser incluso significativo en determinados pacientes (figura 5A de Gervas-Arruga et al. 2015)⁸². En esta misma línea, se analizaron los cultivos de fibroblastos de un paciente varón con HIC I y afectación de la función renal y constatación de depósito glucolípido en biopsia renal, y un varón con HCl I y HVI como única manifestación de la EF. En estos cultivos se observó un acúmulo de Gb₃ respecto a los controles, que en algún caso llegó a ser significativo ($p < 0,05$) cuando se trató con TNF α (figura 5B de Gervas-Arruga et al. 2015)⁸². El resultado bioquímico observado en los pacientes también se evidenció al cuantificar la señal del anticuerpo anti-CD77 y que se constató sorprendentemente que el acúmulo de Gb₃ o CD77 se encontró deslocalizado en el citosol y los compartimentos membranosos (figura 5B de Gervas-Arruga et al. 2015)⁸².

Los resultados correspondientes al apartado 5.6 se encuentran publicados en Gervas-Arruga *et al.* 2015 ⁸².

DISCUSIÓN

6 Discusión

La afectación cardíaca debida a la EF es una de las principales causas de muerte en estos pacientes suponiendo entorno a un 40 % según el estudio consultado ^{105,210}. El tratamiento específico de la enfermedad cardíaca en la EF, mediante la administración de enzimas exógenas (TES) presenta gran eficacia como se ha constatado en los diversos ensayos realizados produciendo aclaramiento de depósitos de Gb₃, reducción de la hipertrofia ventricular etc. ^{138,211,212}. Uno de los puntos clave es el inicio temprano de la TES, ya que cuanto más tarde se comience la terapia mayores probabilidades presenta el paciente de haber desarrollado un grado de fibrosis cardíaca irreversible y por tanto mayor tasa de eventos cardíacos y más graves puede sufrir el paciente. En este sentido se ha demostrado que un inicio temprano de la TES conlleva mayores beneficios a nivel cardíaco, para los pacientes Fabry ²¹³.

Los programas de búsqueda de pacientes de la EF en el ámbito cardiológico han resultado de gran rentabilidad diagnóstica como así se ve reflejada en el resumen realizado en la tabla 1.2. Puesto que la HVI de origen desconocido presenta una elevada frecuencia en la EF ¹¹⁸, es por tanto un buen criterio para incluir pacientes en los estudios de búsqueda de pacientes en el ámbito cardiológico. El resultado de la prevalencia en nuestro estudio fue nulo (apartado 5.2), sin embargo, si analizamos los resultados de los estudios en este ámbito se observa una discrepancia de la prevalencia entre ellos (0,5-12 %). Esta discrepancia pudo estar motivada por la población de estudio, la metodología empleada para la determinación de la HVI y la metodología para el diagnóstico de laboratorio ³⁴⁻⁴⁴.

Desde el punto de vista de la determinación de la HVI, las diferentes metodologías empleadas pueden aportar variabilidad a la búsqueda de pacientes de la EF. El diagnóstico de ésta viene orientado por alteraciones electrocardiográficas que hacen sospechar al cardiólogo de una posible HVI; posteriormente la hipertrofia se explora mediante el método más utilizado que es la ecocardiografía. Otros métodos empleados para valorar la HVI son: el Doppler tisular y el análisis de deformación tisular pudiendo identificar alteración cardíaca sin haberse desarrollado la HVI ^{172,120}, la resonancia magnética pudiendo valorar el grado de fibrosis ¹²¹ e incluso una técnica derivada de ésta como es el T1 *mapping* ¹²². La técnica para determinar la HVI más habitual en las publicaciones analizadas, es la ecocardiografía ³⁴⁻⁴⁴. En nuestro estudio la determinación de la HVI se hace por el mismo procedimiento que los anteriores estudios, por lo que solo vamos a encontrar variabilidad del en cuanto al instrumento y el operador.

Las diferencias de prevalencia de las series recogidas pudieron ser debidas también a los criterios de inclusión de los pacientes. Algunos solo estudiaban varones^{34,35,40,41,44}, o solo mujeres³⁶ o incluían pacientes de ambos géneros^{37-39,42,43}. Desde el punto de vista de la prevalencia, los estudios en los que solo se incluían varones obtuvieron mejor rendimiento (1 de cada 25 a 1 de cada 141) y, por el contrario, en los que se incluyeron pacientes de ambos géneros obtuvieron rendimientos menores (1 de cada 54 a 1 de cada 293). En nuestro estudio decidimos incluir sujetos de ambos géneros a pesar de resultar en un potencial peor rendimiento diagnóstico.

Como última fuente de variabilidad en la prevalencia, analizamos la metodología de laboratorio empleada para el cribado de la población diana. En muchos de los estudios se empleó la determinación de la actividad enzimática en plasma como primer punto de cribado^{34,35,37,41,44}. Normalmente este tipo de determinación es costosa e implica cierta infraestructura logística por lo que no la hace como la técnica de elección para el cribado de poblaciones de un tamaño considerable. Por otra parte, esta determinación se aplica sobre todo a estudios en los que la población a cribar son varones^{34,35,41,44}, ya que la interpretación del resultado es más sencilla, siendo el punto de corte una fuente de variabilidad importante entre estudios. Es necesario destacar el estudio de Monserrat *et al.*, ya que es el único que emplea este tipo de técnica tanto para el cribado de varones como de mujeres. Es conocido el estudio de Linthorst *et al.* en el que se indica que una tercera parte de las mujeres pueden ser portadoras sintomáticas de la enfermedad y mantener niveles normales de actividad enzimática¹⁰³, por lo que el cribado enzimático en mujeres no es recomendable. El resto de estudios analizados emplean por sistemática el análisis enzimático en DBS como primer punto de cribado tanto en varones como en mujeres^{39,40,42,43}. Esta técnica resulta atractiva debido a su bajo coste y sus ventajas logísticas, por lo que la mayor fuente de variabilidad entre los estudios lo constituye el punto de corte, la determinación enzimática en mujeres y la estandarización preanalítica de la toma de muestra^{189,190}. Como un caso especial en cuanto a técnicas aplicadas al cribado encontramos el estudio de Elliott *et al.* en el que utilizan técnicas moleculares para el cribado de variantes genéticas en el gen *GLA*³⁸. En nuestro estudio planteamos el uso de DBS para el estudio enzimático y genético, lo que conlleva una variabilidad importante a la hora de la estandarización preanalítica de la toma de muestras. Esta limitación la intentamos compensar solicitando una población control a cada centro participante, para minimizarla. Por otra parte, en nuestro estudio, la determinación de actividad enzimática en mujeres se utiliza como un apoyo a la secuenciación del gen *GLA* y no como criterio de corte. Por último, tratamos de no ser restrictivos con el punto de corte de la actividad enzimática en varones ($\leq 70\%$) para evitar

perder potenciales pacientes que portasen variantes genéticas relacionadas con elevada actividad enzimática residual y pudieran ser causa de la aparición de fenotipos tardíos como es el cardíaco en población adulta.

A pesar de no identificarse en nuestra población de estudio ninguna variante genética considerada como patogénica responsable de los signos y síntomas que mostraban los pacientes, encontramos 3 variantes no descritas hasta la fecha: NM_000169.2:c.-34C>T, NM_000169.2:c.192C>T y NM_000169.2:640-25A>G. Estas 3 variantes no presentaban datos de frecuencias poblacionales en las bases de datos consultadas y los predictores de patogenicidad consultados indicaban para NM_000169.2:c.-34C>T y NM_000169.2:640-25A>G que probablemente no eran causantes de la patología, no así con la variante NM_000169.2:c.192C>T en la que SSPNN indicaba claramente un posible desajuste del patrón de ajuste fisiológico. Por tanto, 2/3 variantes no descritas cumplían criterios para ser consideradas como VUS según la ACMG⁷²:

- NM_000169.2:c.-34C>T -> cumplía con los criterios PM2 (ausencia en bases de datos de población control) y BP4 (la predicción *in silico* indicaba que no había efecto sobre el gen o productos de él).
- NM_000169.2:c.192C>T -> cumplía con los criterios PM1 (se localiza en un sitio crítico para el buen procesamiento de la proteína ya que se localiza en la secuencia canónica donora de ajuste del exón 1-Intrón 1) y PM2 (ausencia en bases de datos de población control).

Se realizaron una serie de experimentos, con el fin de caracterizar las variantes desde un punto de vista funcional y así obtener algún tipo de evidencia para poder reclasificarlas en patogénicas o probablemente patogénicas. El resultado de la determinación enzimática (apartado 5.4.3) no mostró ninguna reducción de la actividad, pero era un resultado más que esperable debido a la condición quimérica de las mujeres por la inactivación aleatoria del cromosoma X ¹⁰² y a los resultados previamente publicados en los que se evidencia que hasta 1/3 de las mujeres sintomáticas presentan actividades enzimáticas en el rango de la normalidad ¹⁰³. La determinación de marcadores subrogados (apartado 5.4.4) tampoco mostró niveles elevados de Gb₃ y Liso-Gb₃ pero esta observación tampoco nos aporta información relevante para la toma de decisiones ya que hay autores que han señalado un aumento mínimo o incluso mostrarse aumento de los niveles de Liso-Gb₃ en plasma de pacientes con fenotipo tardío e incluso mujeres ^{146,214}. En el caso de la variante NM_000169.2:c.-34C>T, la caracterización mediante análisis *in*

silico mostró que el alelo mutado remodelaba las interacciones de los factores de transcripción que interaccionaban con el promotor ya que se crea un sitio de unión para el factor E2F-myc. El factor E2F se encuentra implicado en procesos de activación y/o regulación del oncogen *MYC*, siendo necesaria la unión de E2F al promotor de *MYC* para que éste se exprese bajo un estímulo mitógeno²¹⁵. El ensayo EMSA (apartado 5.4.2) realizado para caracterizar esta unión diferencial mostró que el extracto nuclear era más fácilmente desplazado de la sonda que contiene el alelo mayoritario C. Teniendo en cuenta las características de este factor de transcripción, consideramos su posible implicación en la EF como poco probable. En el caso de la variante NM_000169.2:c.192C>T no se consiguió caracterizar el patrón de ajuste anómalo determinado *in silico* mediante ninguna técnica empleada (5.4.5 y 5.4.6) muy probablemente debido al efecto de inactivación del cromosoma X¹⁰²

La caracterización funcional realizada a las variantes NM_000169.2:c.-34C>T, NM_000169.2:c.192C>T no aporta suficiente evidencia como para reconsiderar los criterios de clasificación de patogenicidad. En el caso de NM_000169.2:c.192C>T, que cuenta con una evidencia mayor de implicación patogénica que NM_000169.2:c.-34C>T al verse afectado un “*hot spot*”, hubiese sido recomendable realizar una biopsia del órgano afectado^{165,216} para haber podido realizar sobre esa muestra estos y otros estudios de caracterización pertinentes. También hubiera sido deseable haber podido realizar el estudio familiar para poder identificar descendientes varones que pudieran tener fenotipo compatible con la EF debido a esta mutación.

En el estudio se identificaron otras variantes cuya implicación en el desarrollo de la EF está en entredicho (NM_000169.2:c.376A>G y NM_000169.2:c.937G>T) ya que generan actividades enzimáticas residuales elevadas, con niveles de Liso-Gb₃ en plasma normales, pero se identifican en pacientes con signos y síntomas de la EF. En este caso los autores no se ponen de acuerdo a la hora de asignarles las etiquetas de patogénico o no patogénico^{89,217,218}

Finalmente, se identificaron en el estudio una serie de variantes en la región 5'-UTR del gen y en las regiones intrónicas de éste que tras un análisis de asociación con las variables clínico-analíticas, se observó que 4 de ellas (NM_000169.2:c.-10C>T, NM_000169.2:c. c.370-81_370-77delCAGCC, NM_000169.2:c.640-16A>G y NM_000169.2:c.1000-22G>A) se encontraban asociadas a una reducción de la actividad enzimática y se segregaban en forma de haplotipo “HCl I” con una frecuencia del 7,41% (apartado 5.3). El resultado de la reducción de actividad enzimática viene a confirmar lo previamente publicado por diversos autores que identifican este

haplotipo en pacientes con signos y síntomas de la EF y en algunos casos lo relacionan con biopsias de tejido cardíaco o renal que presentan cuerpos de inclusión compatibles con los encontrados en la EF ⁷³⁻⁸³. Los datos de frecuencia haplotípica de nuestro estudio (7,41%) se encuentran muy próximos a los previamente publicados por Bono C *et al.* (8,63%) en una cohorte de pacientes con signos y síntomas de la EF ⁷⁴. El análisis de ligamiento de los marcadores genéticos identificados en nuestro estudio indica que de las 4 variantes que componen el HCl I, 3 de ellas (NM_000169.2:c. c.370-81_370-77delCAGCC, NM_000169.2:c.640-16A>G y NM_000169.2:c.1000-22G>A) se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento (apartado 5.3) y segregan juntas, contradiciendo lo publicado por Schelleckes *et al.* que afirma que las variantes localizadas en los intrones no cosegregaban juntas ⁸⁰. La secuenciación del gen entero permitió identificar que el HCl I no solo estaba formado por 4 variantes si no por 5 (NM_000169.2_c.-10C>T, NM_000169.2_c.369+990C>A, NM_000169.2: c. c.370-81_370-77delCAGCC, NM_000169.2:c.640-16A>G y NM_000169.2:c.1000-22G>A), dato que no había sido publicado anteriormente en ninguno de los trabajos en los que se describe el HCl I. Tras analizar los marcadores genéticos que componen el HCl I en una población control y contrastar su frecuencia con la frecuencia de los mismos en nuestra población de estudio, se observa que el HCl I está representado de manera significativa en nuestra población afecta de MHVI.

Nuestros resultados vienen a refrendar que la reducción de la actividad enzimática es debida a una regulación a la baja de la expresión del gen *GLA* por efecto de la variante NM_000169.2:c.-10C>T^{75,80,82}. Como era esperable, los marcadores de la enfermedad resultaron negativos en estos pacientes, pero sin embargo los datos de expresión génica y actividad enzimática junto con la clínica de los pacientes indican que todo puede estar relacionado. Para poder aclarar esta situación, se generó un modelo de *in vitro* de la EF con el objetivo de poder determinar si los métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos propuestos eran fiables a la hora de cuantificar el acúmulo celular en los pacientes con HCl I; se demostró que los pacientes con HCl I acumulan intracelularmente más Gb₃ que los individuos sanos pero al contrario de lo esperado, este acúmulo no solo se confina e le lisosoma si no que se distribuye por el citosol y los compartimentos membranosos ⁸². Este resultado es contrastable con el obtenido por Vieitez *et al.* ⁷⁵, comunicando un acúmulo de Gb₃ en biopsias cutáneas. Los pacientes con un fenotipo “*Fabry-like*” tienen signos y síntomas de la EF, tienen reducida la expresión del gen *GLA* y a su vez la actividad enzimática y muestran un acúmulo de material glucolipídico sin degradar, el cual se ha demostrado *in vitro* que es susceptible de ser degradado por enzimas exógenas como las suministradas a los pacientes Fabry en TES.

Por último se identificó otro haplotipo “HCI III” (NM_000169.2:c.-12G>A, NM_000169.2:c.548-125C>G, NM_000169.2:c.639+68A>G, NM_000169.2:c.1000-22G>A), que resultó no presentar asociación estadística con la disminución de la actividad enzimática, que no presentó reducción de la expresión del gen *GLA* y que tras la secuenciación del gen completo el HCI III lo integraban 11 variantes (NM_000169.2:c.-12G>A, NM_000169.2:c.194+377C>T, NM_000169.2:c.194+1287T>A, NM_000169.2:c.195-1663G>A, NM_000169.2:c.195-807G>T, NM_000169.2:c.547+190C>T, NM_000169.2:c.548-125C>G, NM_000169.2:c.639+68A>G, NM_000169.2:c.640-386G>A, NM_000169.2:c.640-136T>C y NM_000169.2:c.1000-22C>T). Tras analizar los marcadores genéticos que componen el HCI III en una población control y contrastar su frecuencia con la frecuencia de los mismos en nuestra población de estudio, se observa que el HCI III está representado de manera significativa en nuestra población afectada de MHVI.

CONCLUSIONES

7 Conclusiones

El análisis de nuestros estudios nos permite concluir que:

1. La incidencia de la enfermedad de enfermedad de Fabry en nuestra población de estudio de pacientes con miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo de origen desconocido es nula.
2. Los criterios de laboratorio establecidos en el diseño de nuestro estudio no obtuvieron un rendimiento de cribado de poblaciones de riesgo cardíaco para la enfermedad de Fabry, superior a los estudios anteriormente publicados.
3. Se identifican tres variantes genéticas nuevas: NM_000169.2:c.-34C>T, NM_000169.2:c.192C>T y NM_000169.2:640-25A>G, consideradas como variantes de significado incierto para la enfermedad de Fabry.
4. Las variantes NM_000169.2:c.-34C>T, NM_000169.2:c.192C>T y NM_000169.2:640-25A>G fueron caracterizadas. La variante NM_000169.2:c.192C>T que era la más patogénica de las tres en los estudios *in silico* y no pudo demostrarse el mecanismo patogénico teórico que planteamos.
5. El estudio epidemiológico de nuestra muestra nos permitió establecer tres haplotipos diferentes, compuestos por cinco, cuatro y once marcadores genéticos cada uno de ellos.
6. El haplotipo intrónico complejo I identificado en nuestra muestra presenta una asociación significativa con la reducción de la actividad de la enzima α -galactosidasa A, con una menor tasa de expresión del gen *GLA* y con un mayor acúmulo intracelular de globotriaosilceramida *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 Referencias Bibliográficas

1. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng ME. Fabry Disease: A-Galactosidase a Deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly D, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol 3. 8th ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill; 2001:3733-3774.
2. Anderson W. A case of "Angeio-Keratoma." *Br J Dermatol*. 1898;10(4):113-117. doi:10.1111/j.1365-2133.1898.tb16317.x
3. Fabry J. Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Arch Dermatol Syph*. 1898;43(1):187-200. doi:10.1007/BF01986897
4. Pompen AWM, Ruiters M, Wyers HJG. Angiokeratoma corporis diffusum (universale) Fabry, as a sign of an unknown internal disease; two autopsy reports. *Acta Med Scand*. 1947;128(3):234-255. doi:10.1111/j.0954-6820.1947.tb06596.x
5. Duve C, Pressma B, Gianetro T, Wattiaus D, Appelmans F. Tissue fractionation studies. *Biochem J*. 1955;60(1951):604-617.
6. C SC, Klionsky B. Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J Biol Chem*. 1963;238:3148-3150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14081947>. Accessed September 23, 2019.
7. Hers HG. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J*. 1963;86(1959):11-16. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
8. Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic Defect in Fabry's Disease. *N Engl J Med*. 1967;276(21):1163-1167. doi:10.1056/NEJM196705252762101
9. Brady RO, Tallman JF, Johnson WG, et al. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency. *N Engl J Med*. 1973;289(1):9-14. doi:10.1056/NEJM197307052890103

10. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
11. Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(8):3301-3302. doi:10.1093/nar/17.8.3301
12. Ioannou YA, Zeidner KM, Gordon RE, Desnick RJ. Fabry Disease: Preclinical Studies Demonstrate the Effectiveness of α -Galactosidase A Replacement in Enzyme-Deficient Mice. *Am J Hum Genet.* 2001;68(1):14-25. doi:10.1086/316953
13. European Medicines Agency. European Public Assessment Report (EPAR): Replagal (agalsidase alfa). https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/replagal-epar-summary-public_en.pdf. Published 2001.
14. European Medicines Agency. European Public Assessment Report: Deferiprone. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/fabrazyme-epar-summary-public_en.pdf. Published 2005.
15. Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, et al. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(5):1323-1329. doi:10.1097/01.asn.0000124671.61963.1e
16. Ishii S, Chang H-H, Kawasaki K, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J.* 2007;406(2):285-295. doi:10.1042/BJ20070479
17. European Medicines Agency. European Public Assessment Report (EPAR): Galafold (migalastat).
18. Guérard N, Oder D, Nordbeck P, et al. Lucerastat, an Iminosugar for Substrate Reduction Therapy: Tolerability, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics in Patients With Fabry Disease on Enzyme Replacement. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(4):703-711. doi:10.1002/cpt.790

19. Huang J, Khan A, Au BC, et al. Lentivector Iterations and Pre-Clinical Scale-Up/Toxicity Testing: Targeting Mobilized CD34 + Cells for Correction of Fabry Disease. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2017;5:241-258. doi:10.1016/j.omtm.2017.05.003
20. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999;281(3):249-254.
21. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet.* 1999;105(1-2):151-156. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480370>. Accessed June 12, 2017.
22. 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(1):31-40. doi:10.1086/504601
23. Hwu W-LL, Chien Y-HH, Lee N-CC, 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(10):1397-1405. doi:10.1002/humu.21074
24. Mechtler TP, Stary S, Metz TF, et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: Feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet.* 2012;379(9813):335-341. doi:10.1016/S0140-6736(11)61266-X
25. Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S. Newborn screening for Fabry disease in Japan: prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J Hum Genet.* 2013;58(8):548-552. doi:10.1038/jhg.2013.48 [doi]
26. Hopkins P V, Campbell C, Klug T, Rogers S, Raburn-Miller J, Kiesling J. Lysosomal storage disorder screening implementation: findings from the first six months of full population pilot testing in Missouri. *J Pediatr.* 2015;166(1):172-177. doi:10.1016/j.jpeds.2014.09.023
27. Colon C, Ortolano S, Melcon-Crespo C, et al. Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain. *Eur J Pediatr.* 2017. doi:10.1007/s00431-017-2950-8
28. Tsakiris D, Simpson HKL, Jones EHP, et al. Rare diseases in renal replacement therapy in the ERA-EDTA Registry. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11(supp7):4-20. doi:10.1093/ndt/11.supp7.4

29. Thadhani R, Wolf M, West ML, et al. Patients with Fabry disease on dialysis in the United States. *Kidney Int.* 2002;61(1):249-255. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00097.x
30. Moiseev S, Fomin V, Savostyanov K, et al. The Prevalence and Clinical Features of Fabry Disease in Hemodialysis Patients: Russian Nationwide Fabry Dialysis Screening Program. *Nephron.* 2019;141(4):249-255. doi:10.1159/000495886
31. Frabasil J, Durand C, Sokn S, et al. Prevalence of Fabry disease in male dialysis patients: Argentinean screening study. *JIMD Rep.* 2019;48(1):45-52. doi:10.1002/jmd2.12035
32. Herrera J, Miranda CS. Prevalence of Fabry's disease within hemodialysis patients in Spain. *Clin Nephrol.* 2014;81(02):112-120. doi:10.5414/CN108053
33. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1995;333(5):288-293. doi:10.1056/NEJM199508033330504
34. Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, et al. Prevalence of Anderson-Fabry Disease in Male Patients With Late Onset Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2002;105(12):1407-1411. doi:10.1161/01.CIR.0000012626.81324.38
35. Kim W-S, Kim HS, Shin J, et al. Prevalence of Fabry Disease in Korean Men with Left Ventricular Hypertrophy. *J Korean Med Sci.* 2019;34(7). doi:10.3346/jkms.2019.34.e63
36. Chimenti C, Pieroni M, Morgante E, et al. Prevalence of Fabry disease in female patients with late-onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;110(9):1047-1053. doi:10.1161/01.CIR.0000139847.74101.03
37. Monserrat L, Gimeno-Blanes JR, Marín F, et al. Prevalence of fabry disease in a cohort of 508 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(25):2399-2403. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.062
38. Elliott P, Baker R, Pasquale F, et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson-Fabry Disease survey. *Heart.* 2011;97(23):1957-1960. doi:10.1136/heartjnl-2011-300364
39. Hagège A a., Caudron E, Damy T, et al. Screening patients with hypertrophic

- cardiomyopathy for Fabry disease using a filter-paper test: the FOCUS study. *Heart*. 2011;97(2):131-136. doi:10.1136/hrt.2010.200188
40. Palecek T, Honzikova J, Poupetova H, et al. Prevalence of Fabry disease in male patients with unexplained left ventricular hypertrophy in primary cardiology practice: Prospective Fabry cardiomyopathy screening study (FACSS). *J Inherit Metab Dis*. 2014;37(3):455-460. doi:10.1007/s10545-013-9659-2
 41. Kubo T, Ochi Y, Baba Y, et al. Prevalence and clinical features of Fabry disease in Japanese male patients with diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol*. 2017;69(1):302-307. doi:10.1016/j.jjcc.2016.05.014
 42. Maron MS, Xin W, Sims KB, et al. Identification of Fabry Disease in a Tertiary Referral Cohort of Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Am J Med*. 2018;131(2):200.e1-200.e8. doi:10.1016/j.amjmed.2017.09.010
 43. Newman DB, Miranda WR, Matern D, et al. Cost Efficacy of α -Galactosidase A Enzyme Screening for Fabry Disease. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(1):84-88. doi:10.1016/j.mayocp.2018.08.009
 44. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*. 1995;333(5):288-293. doi:10.1056/NEJM199508033330504
 45. Rolfs A, Böttcher T, Zschiesche M, et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet (London, England)*. 2005;366(9499):1794-1796. doi:10.1016/S0140-6736(05)67635-0
 46. Dubuc V, Moore DF, Gioia LC, Saposnik G, Selchen D, Lanthier S. Prevalence of Fabry disease in young patients with cryptogenic ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013;22(8):1288-1292. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.10.005
 47. Shi Q, Chen J, Pongmoragot J, Lanthier S, Saposnik G. Prevalence of Fabry disease in stroke patients--a systematic review and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(5):985-992. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.08.010
 48. Romani I, Borsini W, Nencini P, et al. De novo Diagnosis of Fabry Disease among Italian

- Adults with Acute Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015;24(11):2588-2595. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.07.012
49. Fazekas F, Enzinger C, Schmidt R, et al. Brain Magnetic Resonance Imaging Findings Fail to Suspect Fabry Disease in Young Patients With an Acute Cerebrovascular Event. *Stroke.* 2015;46(6):1548-1553. doi:10.1161/STROKEAHA.114.008548
50. Bersano A, Markus HS, Quaglini S, et al. Clinical Pre-genetic Screening for Stroke Monogenic Diseases. *Stroke.* 2016;47(7):1702-1709. doi:10.1161/STROKEAHA.115.012281
51. Reisin RC, Mazziotti J, Cejas LL, et al. Prevalence of Fabry Disease in Young Patients with Stroke in Argentina. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2018;27(3):575-582. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.045
52. Lee T -H., Yang J -T., Lee J -D., et al. Genomic screening of Fabry disease in young stroke patients: the Taiwan experience and a review of the literature. *Eur J Neurol.* 2019;26(3):553-555. doi:10.1111/ene.13775
53. Schenkel-Brunner H. *Human Blood Groups.* Vienna: Springer Vienna; 2000. doi:10.1007/978-3-7091-6294-1
54. Katagiri YU, Mori T, Nakajima H, et al. Activation of Src Family Kinase Yes Induced by Shiga Toxin Binding to Globotriaosyl Ceramide (Gb3/CD77) in Low Density, Detergent-insoluble Microdomains. *J Biol Chem.* 1999;274(49):35278-35282. doi:10.1074/jbc.274.49.35278
55. Okuda T, Tokuda N, Numata S, et al. Targeted Disruption of Gb3/CD77 Synthase Gene Resulted in the Complete Deletion of Globo-series Glycosphingolipids and Loss of Sensitivity to Verotoxins. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10230-10235. doi:10.1074/jbc.M600057200
56. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2812-2817. doi:10.1073/pnas.0712309105
57. Boutin M, Auray-Blais C. Metabolomic discovery of novel urinary galabiosylceramide analogs as Fabry disease biomarkers. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2015;26(3):499-510.

doi:10.1007/s13361-014-1060-3

58. Olivera-González S, Josa-Laorden C, Torralba-Cabeza MA. The pathophysiology of Fabry disease. *Rev Clin Esp*. 2018;218(1):22-28. doi:10.1016/j.rce.2017.06.007
59. Ohshima T, Murray GJ, Swaim WD, et al. α -Galactosidase A deficient mice: A model of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(6):2540-2544. doi:10.1073/pnas.94.6.2540
60. Barbey F, Brakch N, Linhart A, et al. Increased carotid intima-media thickness in the absence of atherosclerotic plaques in an adult population with Fabry disease. *Acta Paediatr*. 2006;95(0):63-68. doi:10.1080/08035320600618924
61. Rombach SM, Twickler TB, Aerts JMFG, Linthorst GE, Wijburg FA, Hollak CEM. Vasculopathy in patients with Fabry disease: Current controversies and research directions. *Mol Genet Metab*. 2010;99(2):99-108. doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.004
62. Mauhin W, Lidove O, Masat E, et al. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. *JIMD Rep*. 2015;22:1-10. doi:10.1007/8904_2014_371
63. Shen J-S, Meng X-L, Moore DF, et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab*. 2008;95(3):163-168. doi:10.1016/j.ymgme.2008.06.016
64. Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to fabry disease: Structure of human α -galactosidase. *J Mol Biol*. 2004;337(2):319-335. doi:10.1016/j.jmb.2004.01.035
65. Guce AI, Garman SC. The Structure of Human α -Galactosidase A and Implications for Fabry Disease. In: Elstein D, Altarescu G, Beck M, eds. *Fabry Disease*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010:21-38. doi:10.1007/978-90-481-9033-1_2
66. Guce AI, Clark NE, Salgado EN, et al. Catalytic Mechanism of Human α -Galactosidase. *J Biol Chem*. 2010;285(6):3625-3632. doi:10.1074/jbc.M109.060145
67. Bishop DF, Kornreich R, Desnick RJ. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(11):3903-3907.

68. Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, et al. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet.* 2004;129A(2):136-143. doi:10.1002/ajmg.a.30123
69. Stenson PD, Ball E V., Mort M, Phillips AD, Shaw K, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database (HGMD) and Its Exploitation in the Fields of Personalized Genomics and Molecular Evolution. In: *Current Protocols in Bioinformatics.* Vol Chapter 1. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012:Unit1.13. doi:10.1002/0471250953.bi0113s39
70. Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5(1):30. doi:10.1186/1750-1172-5-30
71. Thomas AS, Hughes DA. Fabry disease. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014;12 Suppl 1:88-101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25345090>. Accessed September 23, 2019.
72. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
73. Valbuena C, Carvalho E, Bustorff M, et al. Kidney biopsy findings in heterozygous Fabry disease females with early nephropathy. *Virchows Arch.* 2008;453(4):329-338. doi:10.1007/s00428-008-0653-2
74. Bono C, Nuzzo D, Albeggiani G, et al. Genetic screening of Fabry patients with EcoTILLING and HRM technology. *BMC Res Notes.* 2011;4(1):323. doi:10.1186/1756-0500-4-323
75. Vieitez I, Souto-Rodriguez O, Fernandez-Mosquera L, et al. Fabry disease in the Spanish population: observational study with detection of 77 patients. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):1-13. doi:10.1186/s13023-018-0792-8
76. Tanislav C, Kaps M, Rolfs A, et al. Frequency of Fabry disease in patients with small-fibre neuropathy of unknown aetiology: a pilot study. *Eur J Neurol.* 2011;18(4):631-636. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03227.x
77. Ferri L, Guido C, la Marca G, et al. Fabry disease: polymorphic haplotypes and a novel missense mutation in the GLA gene. *Clin Genet.* 2012;81(3):224-233. doi:10.1111/j.1399-

0004.2011.01689.x

78. Pisani A, Imbriaco M, Zizzo C, et al. A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the GLA gene: a case report. *BMC Cardiovasc Disord.* 2012;12(1):39. doi:10.1186/1471-2261-12-39
79. Apelland T, Gude E, Strøm EH, et al. Familial globotriaosylceramide-associated cardiomyopathy mimicking Fabry disease. *Heart.* 2014;100(22):1793-1798. doi:10.1136/heartjnl-2014-305616
80. Schelleckes M, Lenders M, Guske K, et al. Cryptogenic stroke and small fiber neuropathy of unknown etiology in patients with alpha-galactosidase A -10T genotype. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9(1):178. doi:10.1186/s13023-014-0178-5
81. Zeevi DA, Hakam-Spector E, Herskovitz Y, Beerl R, Elstein D, Altarescu G. An intronic haplotype in α galactosidase A is associated with reduced mRNA expression in males with cryptogenic stroke. *Gene.* 2014;549(2):275-279. doi:10.1016/j.gene.2014.08.004
82. Gervas-Arruga J, Cebolla JJ, Irun P, et al. Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the alpha-galactosidase A (GLA) gene. *BMC Genet.* 2015;16(1):109-015-0267-z. doi:10.1186/s12863-015-0267-z [doi]
83. Tuttolomondo A, Duro G, Pecoraro R, et al. A family with various symptomatology suggestive of Anderson-Fabry disease and a genetic polymorphism of alpha galactosidase A gene. *Clin Biochem.* 2015;48(1-2):55-62. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.09.018
84. Ortiz A, Germain DP, Desnick RJ, et al. Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Mol Genet Metab.* 2018;123(4):416-427. doi:10.1016/j.ymgme.2018.02.014
85. 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(6):395-399. doi:10.1056/NEJM199102073240607
86. Saifudeen Z, Desnick RJ, Ehrlich M. A mutation in the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase A gene in high-activity variants inhibits specific protein binding. *FEBS Lett.* 1995;371(2):181-184.

- <https://drive.google.com/file/d/0BxbeFj2xRhOZZ1hDemxkdjNEOVU/view%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7672123>.
87. 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(3):801-807. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00160.x
 88. Togawa T, Tsukimura T, Kodama T, et al. Fabry disease: biochemical, pathological and structural studies of the α -galactosidase A with E66Q amino acid substitution. *Mol Genet Metab.* 2012;105(4):615-620. doi:10.1016/j.ymgme.2012.01.010
 89. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab.* 2003;80(3):307-314. doi:10.1016/S1096-7192(03)00136-7
 90. Lukas J, Scalia S, Eichler S, et al. Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease. *Hum Mutat.* 2016;37(1):43-51. doi:10.1002/humu.22910
 91. Koulousios K, Stylianou K, Pateinakis P, et al. Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ Open.* 2017;7(10):e017098. doi:10.1136/bmjopen-2017-017098
 92. Lai L-W, Whitehair O, Wu M-J, O'Meara M, Lien Y-HH. Analysis of splice-site mutations of the alpha-galactosidase A gene in Fabry disease. *Clin Genet.* 2003;63(6):476-482. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12786754>. Accessed October 9, 2018.
 93. Ishii S, Nakao S, Minamikawa-Tachino R, Desnick RJ, Fan J-Q. Alternative splicing in the alpha-galactosidase A gene: increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype. *Am J Hum Genet.* 2002;70(4):994-1002. doi:10.1086/339431
 94. Filoni C, Caciotti A, Carraresi L, et al. Unbalanced GLA mRNAs ratio quantified by real-time PCR in Fabry patients' fibroblasts results in Fabry disease. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(11):1311-1317. doi:10.1038/ejhg.2008.109
 95. Schäfer E, Baron K, Widmer U, et al. Thirty-four novel mutations of the GLA gene in 121 patients with Fabry disease. *Hum Mutat.* 2005;25(4):412-412. doi:10.1002/humu.9327

96. Ries M, Gal A. *Genotype–Phenotype Correlation in Fabry Disease*. Oxford PharmaGenesis; 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290681>. Accessed September 27, 2019.
97. Altarescu G, Moore DF, Schiffmann R. Effect of genetic modifiers on cerebral lesions in Fabry disease. *Neurology*. 2005;64(12):2148-2150. doi:10.1212/01.WNL.0000166000.24321.4F
98. Handa Y, Yotsumoto S, Isobe E, et al. A case of symptomatic heterozygous female Fabry's disease without detectable mutation in the alpha-galactosidase gene. *Dermatology*. 2000;200(3):262-265. doi:10.1159/000018372
99. Kampmann C, Baehner F, Whybra C, et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(9):1668-1674. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427421>. Accessed June 12, 2017.
100. Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WR. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet Med*. 2007;9(1):34-45. doi:10.1097/GIM.0b013e31802d8321
101. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, et al. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*. 2008;93(2):112-128. doi:10.1016/j.ymgme.2007.09.013
102. Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet*. 1962;14:135-148. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14467629>. Accessed September 24, 2019.
103. Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JMFG, Hollak CEM. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta*. 2005;353(1-2):201-203. doi:10.1016/j.cccn.2004.10.019
104. Hopkin RJ, Bissler J, Banikazemi M, et al. Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatr Res*. 2008;64(5):550-555. doi:10.1203/PDR.0b013e318183f132
105. Mehta A, Widmer U. *Natural History of Fabry Disease*.; 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290671>. Accessed September 27, 2019.

106. Hoffmann B, Beck M, Sunder-Plassmann G, et al. Nature and prevalence of pain in Fabry disease and its response to enzyme replacement therapy--a retrospective analysis from the Fabry Outcome Survey. *Clin J Pain*. 2007;23(6):535-542. doi:10.1097/AJP.0b013e318074c986
107. Charrow J. A 14-Year-Old Boy with Pain in Hands and Feet. *Pediatr Ann*. 2009;38(4):190-192. doi:10.3928/00904481-20090401-01
108. Hilz MJ, Stemper B, Kolodny EH. Lower limb cold exposure induces pain and prolonged small fiber dysfunction in Fabry patients. *Pain*. 2000;84(2):361-365. doi:10.1016/S0304-3959(99)00236-5
109. Sheth KJ, Werlin SL, Freeman ME, Hodach AE. Gastrointestinal structure and function in Fabry's disease. *Am J Gastroenterol*. 1981;76(3):246-251. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6274188>. Accessed September 24, 2019.
110. Kang WH, Chun S Il, Lee S. Generalized anhidrosis associated with Fabry's disease. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(5):883-887. doi:10.1016/S0190-9622(87)70274-6
111. 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(2):331-337. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08002.x
112. Eng CM, Germain DP, Banikazemi M, et al. Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. *Genet Med*. 2006;8(9):539-548. doi:10.109701.gim.0000237866.70357.c6
113. Hegemann S, Hajioff D, Conti G, et al. Hearing loss in Fabry disease: data from the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest*. 2006;36(9):654-662. doi:10.1111/j.1365-2362.2006.01702.x
114. Keilmann A, Hajioff D, Ramaswami U, FOS Investigators. Ear symptoms in children with Fabry disease: data from the Fabry Outcome Survey. *J Inherit Metab Dis*. 2009;32(6):739. doi:10.1007/s10545-009-1290-x
115. Gubler M-C, Lenoir G, Grünfeld J-P, et al. Early renal changes in hemizygous and heterozygous patients with Fabry's disease. *Kidney Int*. 1978;13(3):223-235.

doi:10.1038/ki.1978.32

116. Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, et al. Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int.* 2002;62(6):1933-1946. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00675.x
117. Froissart M, Benistan K, Germain DP. [Functional renal investigation in Fabry disease]. *Presse Med.* 2007;36 Spec No:1S36-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546766>. Accessed September 24, 2019.
118. Linhart A, Kampmann C, Zamorano JL, et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease: results from the international Fabry outcome survey. *Eur Heart J.* 2007;28(10):1228-1235. doi:10.1093/eurheartj/ehm153
119. Sheth KJ, Thomas JP. Electrocardiograms in Fabry's disease. *J Electrocardiol.* 1982;15(2):153-156. doi:10.1016/S0022-0736(82)80010-1
120. Pieroni M, Chimenti C, Ricci R, Sale P, Russo MA, Frustaci A. Early Detection of Fabry Cardiomyopathy by Tissue Doppler Imaging. *Circulation.* 2003;107(15):1978-1984. doi:10.1161/01.CIR.0000061952.27445.A0
121. Niemann M, Herrmann S, Hu K, et al. Differences in Fabry cardiomyopathy between female and male patients: consequences for diagnostic assessment. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4(6):592-601. doi:10.1016/j.jcmg.2011.01.020
122. Sado DM, White SK, Piechnik SK, et al. Identification and Assessment of Anderson-Fabry Disease by Cardiovascular Magnetic Resonance Noncontrast Myocardial T1 Mapping. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2013;6(3):392-398. doi:10.1161/CIRCIMAGING.112.000070
123. 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(3):357-360. doi:10.1136/hrt.2004.054015
124. Hasegawa H, Takano H, Shindo S, et al. Transition from left ventricular hypertrophy to massive fibrosis in the cardiac variant of Fabry disease. *Circulation.* 2006;113(16):720-722. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.584292

125. Takenaka T, Teraguchi H, Yoshida A, et al. Terminal stage cardiac findings in patients with cardiac Fabry disease: An electrocardiographic, echocardiographic, and autopsy study. *J Cardiol*. 2008;51(1):50-59. doi:10.1016/j.jjcc.2007.12.001
126. Fellgiebel A, Müller MJ, Ginsberg L. CNS manifestations of Fabry's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5(9):791-795. doi:10.1016/S1474-4422(06)70548-8
127. Sims K, Politei J, Banikazemi M, Lee P. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. *Stroke*. 2009;40(3):788-794. doi:10.1161/STROKEAHA.108.526293
128. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med*. 2003;138(4):338-346. doi:10.7326/0003-4819-138-4-200302180-00014
129. Ries M, Kim HJ, Zalewski CK, et al. Neuropathic and cerebrovascular correlates of hearing loss in Fabry disease. *Brain*. 2007;130(Pt 1):143-150. doi:10.1093/brain/awl310
130. Palla A, Hegemann S, Widmer U, Straumann D. Vestibular and auditory deficits in Fabry disease and their response to enzyme replacement therapy. *J Neurol*. 2007;254(10):1433-1442. doi:10.1007/s00415-007-0575-y
131. Rosenberg DM, Ferrans VJ, Fulmer JD, et al. Chronic airflow obstruction in Fabry's disease. *Am J Med*. 1980;68(6):898-905. doi:10.1016/0002-9343(80)90224-7
132. Beck M. *Demographics of FOS – the Fabry Outcome Survey*; 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290679>. Accessed September 24, 2019.
133. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*. 2001;308(1-2):195-196. doi:10.1080/13518040701205365
134. Winchester B, Young E. *Biochemical and Genetic Diagnosis of Fabry Disease*; 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290697>. Accessed September 24, 2019.
135. Mills K, Johnson A, Winchester B. Synthesis of novel internal standards for the

- quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry. *FEBS Lett.* 2002;515(1-3):171-176. doi:10.1016/S0014-5793(02)02491-2
136. Boscaro F, Pieraccini G, la Marca G, et al. Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(16):1507-1514. doi:10.1002/rcm.728
137. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2812-2817. doi:10.1073/pnas.0712309105
138. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med.* 2001;345(1):9-16. doi:10.1056/NEJM200107053450102
139. Schiffmann R, Kopp JB, Austin III HA, et al. Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease. *JAMA.* 2001;285(21):2743. doi:10.1001/jama.285.21.2743
140. Auray-Blais C, Lavoie P, Boutin M, Abaoui M. High-Risk Screening for Fabry Disease: Analysis by Tandem Mass Spectrometry of Globotriaosylceramide (Gb₃) in Urine Collected on Filter Paper. In: *Current Protocols in Human Genetics*. Vol 93. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2017:17.26.1-17.26.12. doi:10.1002/cphg.34
141. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
142. Desnick RJ, Dawson G, Desnick SJ, Sweeley CC, Krivit W. Diagnosis of Glycosphingolipidoses by Urinary-Sediment Analysis. *N Engl J Med.* 1971;284(14):739-744. doi:10.1056/NEJM197104082841401
143. Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, et al. The Dutch Fabry cohort: Diversity of clinical manifestations and Gb₃ levels. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30(1):68-78. doi:10.1007/s10545-006-0484-8

144. Nelson BC, Roddy T, Araghi S, et al. Globotriaosylceramide isoform profiles in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2004;805(1):127-134. doi:10.1016/j.jchromb.2004.02.032
145. Auray-Blais C, Cyr D, Ntwari A, et al. Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. *Mol Genet Metab*. 2008;93(3):331-340. doi:10.1016/j.ymgme.2007.10.001
146. Smid BE, van der Tol L, Biegstraaten M, Linthorst GE, Hollak CEM, Poorthuis BJHM. Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease. *J Med Genet*. 2015;52(4):262-268. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102872
147. Rombach SM, Dekker N, Bouwman MG, et al. Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010;1802(9):741-748. doi:10.1016/j.bbadis.2010.05.003
148. 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 - Mol Basis Dis*. 2011;1812(1):70-76. doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.007
149. Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, et al. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N Engl J Med*. 2016;375(6):545-555. doi:10.1056/NEJMoa1510198
150. Talbot A, Nicholls K, Fletcher JM, Fuller M. A simple method for quantification of plasma globotriaosylsphingosine: Utility for Fabry disease. *Mol Genet Metab*. 2017;122(1-2):121-125. doi:10.1016/j.ymgme.2017.08.004
151. Kanetski CR, Moore DF, Ries M, Zirzow GC, Schiffmann R. Myeloperoxidase predicts risk of vasculopathic events in hemizygous males with Fabry disease. *Neurology*. 2006;67(11):2045-2047. doi:10.1212/01.wnl.0000247278.88077.09
152. Shah JS, Hughes DA, Tayebjee MH, MacFadyen RJ, Mehta AB, Elliott PM. Extracellular matrix turnover and disease severity in Anderson-Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(1):88-95. doi:10.1007/s10545-006-0360-6

153. Vedder AC, Cox-Brinkman J, Hollak CEM, et al. Plasma chitotriosidase in male Fabry patients: A marker for monitoring lipid-laden macrophages and their correction by enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab.* 2006;89(3):239-244. doi:10.1016/j.ymgme.2006.04.013
154. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994;93(3):1288-1292. doi:10.1172/JCI117084
155. Torralba-Cabeza MÁ, Olivera S, Hughes DA, Pastores GM, Mateo RN, Pérez-Calvo JI. Cystatin C and NT-proBNP as prognostic biomarkers in Fabry disease. *Mol Genet Metab.* 2011;104(3):301-307. doi:10.1016/j.ymgme.2011.06.021
156. Matafora V, Cuccurullo M, Beneduci A, et al. Early markers of Fabry disease revealed by proteomics. *Mol BioSyst.* 2015;11(6):1543-1551. doi:10.1039/C4MB00707G
157. Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta.* 1981;112(2):247-251. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6263521>. Accessed June 12, 2017.
158. Dobrovolný R, Dvorková L, Ledvinová J, et al. Recurrence of Fabry disease as a result of paternal germline mosaicism for α -galactosidase A gene mutation. *Am J Med Genet.* 2005;134 A(1):84-87. doi:10.1002/ajmg.a.30533
159. Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet.* 1993;53(6):1186-1197. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682507&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
160. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(2):219-240. doi:10.1586/erm.09.84
161. Málaga DR, Brusius-Facchin AC, Siebert M, et al. Sensitivity, advantages, limitations, and

- clinical utility of targeted next-generation sequencing panels for the diagnosis of selected lysosomal storage disorders. *Genet Mol Biol.* 2019;42(1 suppl 1):197-206. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2018-0092
162. Ren X-T, Wang X-H, Ding C-H, et al. Next-Generation Sequencing Analysis Reveals Novel Pathogenic Variants in Four Chinese Siblings With Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Front Genet.* 2019;10:370. doi:10.3389/fgene.2019.00370
163. Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, et al. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. *J Clin Invest.* 1989;83(4):1390-1399. doi:10.1172/JCI114027
164. Schirinzi A, Centra M, Prattichizzo C, et al. Identification of GLA gene deletions in Fabry patients by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Mol Genet Metab.* 2008;94(3):382-385. doi:10.1016/j.ymgme.2008.03.017
165. Schiffmann R, Fuller M, Clarke LA, Aerts JMFG. Is it Fabry disease? *Genet Med.* 2016;18(12):1181-1185. doi:10.1038/gim.2016.55
166. Navarro C, Teijeira S, Dominguez C, et al. Fabry disease: an ultrastructural comparative study of skin in hemizygous and heterozygous patients. *Acta Neuropathol.* 2006;111(2):178-185. doi:10.1007/s00401-005-0026-8
167. Schiffmann R, Fuller M, Clarke LA, Aerts JMFG. Is it Fabry disease? *Genet Med.* 2016;18(12):1181-1185. doi:10.1038/gim.2016.55
168. Brady RO, Pentchev PG, Gal AE, Hibbert SR, Dekaban AS. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency. *N Engl J Med.* 1974;291(19):989-993. doi:10.1056/NEJM197411072911901
169. EMA. Anexo I: Ficha técnica o resumen de las características del producto Replagal (agalsidasa alfa). *Agencia Eur Medicam.* 2001:1-33. doi:10.1158/0008-5472.SABCS12-S5-3
170. EMA. Anexo I: Ficha técnica o resumen de las características del producto FABRAZYME (agalsidasa beta). *Agencia Eur Medicam.* 2001:1-50. doi:10.1158/0008-5472.SABCS12-S5-3

171. Lee K, Jin X, Zhang K, et al. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology*. 2003;13(4):305-313. doi:10.1093/glycob/cwg034
172. Germain DP, Elliott PM, Falissard B, et al. The effect of enzyme replacement therapy on clinical outcomes in male patients with Fabry disease: A systematic literature review by a European panel of experts. *Mol Genet Metab Reports*. 2019;19:100454. doi:10.1016/j.ymgmr.2019.100454
173. Wang J, Lozier J, Johnson G, et al. Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment. *Nat Biotechnol*. 2008;26(8):901-908. doi:10.1038/nbt.1484
174. Schiffmann R, Ries M, Timmons M, Flaherty JT, Brady RO. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(2):345-354. doi:10.1093/ndt/gfi152
175. Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med*. 1999;5(1):112-115. doi:10.1038/4801
176. Sugawara K, Tajima Y, Kawashima I, et al. Molecular interaction of imino sugars with human α -galactosidase: Insight into the mechanism of complex formation and pharmacological chaperone action in Fabry disease. *Mol Genet Metab*. 2009;96(4):233-238. doi:10.1016/j.ymgme.2008.12.017
177. Benjamin ER, Della Valle MC, Wu X, et al. The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. *Genet Med*. 2017;19(4):430-438. doi:10.1038/gim.2016.122
178. Hughes DA, Nicholls K, Shankar SP, et al. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J Med Genet*. 2017;54(4):288-296. doi:10.1136/jmedgenet-2016-104178
179. Gast A, Mathes T. Medication adherence influencing factors—an (updated) overview of

- systematic reviews. *Syst Rev*. 2019;8(1):112. doi:10.1186/s13643-019-1014-8
180. Oommen S, Zhou Y, Meiyappan M, Gurevich A, Qiu Y. Inter-assay variability influences migalastat amenability assessments among Fabry disease variants. *Mol Genet Metab*. 2019;127(1):74-85. doi:10.1016/j.ymgme.2019.04.005
181. Cox T, Lachmann R, Hollak C, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet (London, England)*. 2000;355(9214):1481-1485. doi:10.1016/S0140-6736(00)02161-9
182. Guérard N, Oder D, Nordbeck P, et al. Lucerastat, an Iminosugar for Substrate Reduction Therapy: Tolerability, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics in Patients With Fabry Disease on Enzyme Replacement. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(4):703-711. doi:10.1002/cpt.790
183. Welford RWD, Mühlemann A, Garzotti M, et al. Glucosylceramide synthase inhibition with lucerastat lowers globotriaosylceramide and lysosome staining in cultured fibroblasts from Fabry patients with different mutation types. *Hum Mol Genet*. 2018;27(19):3392-3403. doi:10.1093/hmg/ddy248
184. Schiffmann R, Goker-Alpan O, Holida M, et al. Pegunigalsidase alfa, a novel PEGylated enzyme replacement therapy for Fabry disease, provides sustained plasma concentrations and favorable pharmacodynamics: A 1-year Phase 1/2 clinical trial. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42(3):jimd.12080. doi:10.1002/jimd.12080
185. Benjamin ER, Khanna R, Schilling A, et al. Co-administration With the Pharmacological Chaperone AT1001 Increases Recombinant Human α -Galactosidase A Tissue Uptake and Improves Substrate Reduction in Fabry Mice. *Mol Ther*. 2012;20(4):717-726. doi:10.1038/MT.2011.271
186. Warnock DG, Bichet DG, Holida M, et al. Oral Migalastat HCl Leads to Greater Systemic Exposure and Tissue Levels of Active α -Galactosidase A in Fabry Patients when Co-Administered with Infused Agalsidase. Bigger BW, ed. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134341. doi:10.1371/journal.pone.0134341
187. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA*.

- 2013;310(20):2191. doi:10.1001/jama.2013.281053
188. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiograph. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18(12):1440-1463. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2005.10.005
189. Olivova P, der Veen K van, Cullen E, et al. Effect of sample collection on α -galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta.* 2009;403(1-2):159-162. doi:10.1016/j.cca.2009.02.008
190. Elbin CS, Olivova P, Marashio CA, et al. The effect of preparation, storage and shipping of dried blood spots on the activity of five lysosomal enzymes. *Clin Chim Acta.* 2011;412(13-14):1207-1212. doi:10.1016/j.cca.2011.03.012
191. Krüger R, Bruns K, Grünhage S, et al. Determination of globotriaosylceramide in plasma and urine by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(2):189-198. doi:10.1515/CCLM.2010.048
192. Boutin M, Gagnon R, Lavoie P, Auray-Blais C. LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease. *Clin Chim Acta.* 2012;414:273-280. doi:10.1016/j.cca.2012.09.026
193. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta.* 2001;308(1-2):195-196. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432396>. Accessed June 12, 2017.
194. Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. Differential assay for lysosomal α -galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta.* 1981;112(2):247-251.
195. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-569. doi:10.1002/humu.22981
196. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe

- amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):57e - 57. doi:10.1093/nar/gnf056
197. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-362. doi:10.1038/nmeth.2890
 198. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067. doi:10.1093/nar/gkx1153
 199. Fokkema IFAC, Taschner PEM, Schaafsma GCP, Celli J, Laros JFJ, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat.* 2011;32(5):557-563. doi:10.1002/humu.21438
 200. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol.* 1997;4(3):311-323. doi:10.1089/cmb.1997.4.311
 201. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67. doi:10.1093/nar/gkp215
 202. Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* 2002;18(2):333-334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847087>. Accessed May 3, 2017.
 203. Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 2005;21(13):2933-2942. doi:10.1093/bioinformatics/bti473
 204. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, ed. *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla: International University Line (IUL); 2004:87-112. <https://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>.
 205. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2017. <https://www.r-project.org/>.

206. Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics*. 1964;49(1):49-67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17248194>. Accessed June 7, 2016.
207. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *J R Stat Soc B*. 1977;39(1):1.
208. Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform*. 2002;3(2):146-153.
209. Hochberg Y. A Sharper Bonferroni Procedure for Multiple Tests of Significance. *Biometrika*. 1988;75(4):800.
210. Waldek S, Patel MR, Banikazemi M, Lemay R, Lee P. Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease: findings from the Fabry Registry. *Genet Med*. 2009;11(11):790-796. doi:10.1097/GIM.0b013e3181bb05bb
211. Weidemann F, Breunig F, Beer M, et al. Improvement of Cardiac Function During Enzyme Replacement Therapy in Patients With Fabry Disease. *Circulation*. 2003;108(11):1299-1301. doi:10.1161/01.CIR.0000091253.71282.04
212. Caballero L, Climent V, Hernández-Romero D, Quintanilla MA, de la Morena G, Marín F. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: influence on cardiac manifestations. *Curr Med Chem*. 2010;17(16):1679-1689. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20345350>. Accessed June 12, 2017.
213. Weidemann F, Niemann M, Breunig F, et al. Long-Term Effects of Enzyme Replacement Therapy on Fabry Cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;119(4):524-529. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.794529
214. Aerts JMFG, Kallemeijn WW, Wegdam W, et al. Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inihobodies. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(3):605-619. doi:10.1007/s10545-011-9308-6
215. Oswald F, Lovec H, Möröy T, Lipp M. E2F-dependent regulation of human MYC: trans-activation by cyclins D1 and A overrides tumour suppressor protein functions. *Oncogene*. 1994;9(7):2029-2036. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8208548>. Accessed

October 1, 2019.

216. van der Tol L, Smid BE, Poorthuis BJHM, et al. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. *J Med Genet.* 2014;51(1):1-9. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101857
217. Yasuda M, Shabbeer J, Benson SD, Maire I, Burnett RM, Desnick RJ. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat.* 2003;22(6):486-492. doi:10.1002/humu.10275
218. Lukas J, Giese A-K, Markoff A, et al. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. Mehta A, ed. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003632. doi:10.1371/journal.pgen.1003632

ANEXOS

Anexo A: Publicaciones realizadas durante la tesis en la enfermedad de Fabry

“Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the α -galactosidase A (GLA) gene”

Gervas-Arruga J, Cebolla JJ, Irun P, Perez-Lopez J, Plaza L, Roche JC, Capablo JL, Rodriguez-Rey JC, Pocovi M, Giraldo P

BMC Genetics 2015;16:109.

Publicado “online” 2015 Sep 03

doi: 10.1186/s12863-015-0267-z

Anexo B: Publicaciones realizadas durante la tesis en otras enfermedades de depósito lisosomal

AUTORES	PUBLICACIÓN	ÁREA
Gervas-Arruga J, Cebolla JJ , de Blas I, Roca M, Pocovi M, Giraldo P.	The influence of genetic variability and proinflammatory status on the development of bone disease in patients with Gaucher disease. PLoS One. 2015 May 15;10(5):e0126153. doi: 10.1371/journal.pone.0126153. eCollection 2015.	Enfermedad de Gaucher
Oliván-Viguera A, Lozano-Gerona J, López de Frutos L, Cebolla JJ , Irún P, Abarca-Lachen E, García-Malínis AJ, García-Otín ÁL, Gilaberte Y, Giraldo P, Köhler R.	Inhibition of Intermediate-Conductance Calcium-Activated K Channel (KCa3.1) and Fibroblast Mitogenesis by α -Linolenic Acid and Alterations of Channel Expression in the Lysosomal Storage Disorders, Fabry Disease, and Niemann Pick C. Front Physiol. 2017 Jan 31;8:39. doi: 10.3389/fphys.2017.00039. eCollection 2017.	Enfermedad de Gaucher Enfermedad de Fabry Enfermedad de Niemann-Pick tipo C
De Castro-Orós I, Irún P, Cebolla JJ , Rodríguez-Sureda V, Mallén M, Pueyo MJ, Mozas P, Dominguez C, Pocoví M; Spanish NP-C Group.	Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study. J Transl Med. 2017 Feb 21;15(1):43. doi: 10.1186/s12967-017-1146-3.	Enfermedad de Niemann-Pick tipo C

AUTORES	PUBLICACIÓN	ÁREA
Camarena C, Aldamiz-Echevarria LJ, Polo B, Barba Romero MA, García I, <u>Cebolla JJ</u> , Ros E.	Update on lysosomal acid lipase deficiency: Diagnosis, treatment and patient management. Med Clin (Barc). 2017 May 10;148(9):429.e1-429.e10. doi: 10.1016/j.medcli.2016.12.044. Epub 2017 Mar 9	Déficit de lipasa ácida lisosomal
López de Frutos L, <u>Cebolla JJ</u> , Irún P, Köhler R, Giraldo P.	The erythrocyte osmotic resistance test as screening tool for cholesterol-related lysosomal storage diseases. Clin Chim Acta. 2018 May;480:161-165. doi: 10.1016/j.cca.2018.02.010. Epub 2018 Feb 13.	Déficit de esfingomielinasa ácida Déficit de lipasa ácida lisosomal Enfermedad de Niemann-Pick tipo C
Giraldo P, López de Frutos L, <u>Cebolla JJ</u> .	Biomarker combination is necessary for the assessment of Gaucher disease? Ann Transl Med. 2018 Nov;6(Suppl 1):S81. doi: 10.21037/atm.2018.10.69	Enfermedad de Gaucher
Consuelo-Sánchez A, Vázquez-Frias R, Reyes-De La Rosa A, Acosta-Rodríguez-Bueno CP, Ortal-Vite MP, <u>Cebolla JJ</u> .	Mutations identified in a cohort of Mexican patients with lysosomal acid lipase deficiency. Ann Hepatol. 2019 Jul - Aug;18(4):646-650. doi: 10.1016/j.aohep.2018.07.005	Déficit de lipasa ácida lisosomal

AUTORES	PUBLICACIÓN	ÁREA
Castro Narro GE, Gamboa Domínguez A, Consuelo Sánchez A, Salazar Martínez A, Agramonte Hevia J, Cebolla JJ , Cuellar Mendoza ME, Díaz Hernández HA.	Combined Hepatocellular- Cholangiocarcinoma in a Patient With Cirrhosis Due to Cholesteryl Ester Storage Disease. Hepatology. 2019 Apr;69(4):1838- 1841. doi: 10.1002/hep.30331	Déficit de lipasa ácida lisosomal
López de Frutos L, Cebolla JJ , Irún P, Köhler R, Giraldo P.	Web-Based Bioinformatics Predictors: Recommendations to Assess Lysosomal Cholesterol Trafficking Diseases-Related Genes. Methods Inf Med. 2019 Jun;58(1):50- 59. doi: 10.1055/s-0039-1692463.	Déficit de esfingomielinasa ácida Déficit de lipasa ácida lisosomal Enfermedad de Niemann-Pick tipo C
Cebolla JJ , Irún P, Mozas P, Giraldo P.	Evaluation of two approaches to lysosomal acid lipase deficiency patient identification: An observational retrospective study. Atherosclerosis. 2019 Jun;285:49-54. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.03.013	Déficit de lipasa ácida lisosomal

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the α -galactosidase A (*GLA*) gene

Javier Gervas-Arruga^{1,2,3,4*}, Jorge J. Cebolla^{2,3,4}, Pilar Irun^{1,2,3,4}, Javier Perez-Lopez⁵, Luis Plaza⁶, Jose C. Roche⁷, Jose L. Capablo⁷, Jose C. Rodriguez-Rey⁵, Miguel Pocovi^{3,4} and Pilar Giraldo^{1,2,3}

Abstract

Background: Accumulation of galactosphingolipids is a general characteristic of Fabry disease, a lysosomal storage disorder caused by the deficient activity of α -galactosidase A encoded by the *GLA* gene. Although many polymorphic *GLA* haplotypes have been described, it is still unclear whether some of these variants are causative of disease symptoms. We report the study of an inheritance of a complex intronic haplotype (CIH) (c.-10C > T, c.369 + 990C > A, c.370-81_370-77delCAGCC, c.640-16A > G, c.1000-22C > T) within the *GLA* gene associated with Fabry-like symptoms and galactosphingolipid accumulation.

We analysed α -Gal A activity in plasma, leukocytes and skin fibroblasts in patients, and measured accumulation of galactosphingolipids by enzymatic methods and immunofluorescence techniques. Additionally, we evaluated *GLA* expression using quantitative PCR, EMSA, and cDNA cloning.

Results: CIH carriers had an altered *GLA* expression pattern, although most of the carriers had high residual enzyme activity in plasma, leukocytes and in skin fibroblasts. Nonetheless, CIH carriers had significant galactosphingolipid accumulation in fibroblasts in comparison with controls, and also glycolipid deposits in renal tubules and glomeruli. EMSA assays indicated that the c.-10C > T variant in the promoter affected a nuclear protein binding site.

Conclusions: Thus, inheritance of the CIH caused an mRNA deregulation altering the *GLA* expression pattern, producing a tissue glycolipid storage.

Keywords: *GLA*, Fabry disease, Haplotypes, Galactosphingolipids, α -galactosidase A

Background

α -galactosidase A (α -Gal A, EC3.2.1.22) is a lysosomal enzyme that hydrolyses the terminal α -galactosyl moieties from glycolipids. α -Gal A is encoded by the *GLA* gene and mutations in this gene causes deficiency or absence of the enzyme, resulting in Fabry disease (FD) (OMIM 301500), an X-linked inherited lysosomal storage disorder. This disease leads to accumulation of globotriaosylceramide (Gb₃), globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃), galabiosylceramide

(Ga₂) and neutral glycosphingolipids in lysosomes of several tissues, mainly in the endothelium of the vascular tree [1]. Depending on the *GLA* mutation and when manifestations initially occur, FD is classified as late-onset or classic phenotype. In males with no, or reduced, α -Gal A enzyme activity, clinical manifestations of the classic form include acroparesthesias, angiokeratomas, hypohidrosis, corneal and lenticular opacities, cardiac dysfunction and brain and renal involvement with proteinuria [2]. Heterozygous females can either be asymptomatic, due to random X-chromosomal inactivation [3], or can develop the classic phenotype [1]. Because of the nonspecific nature of its clinical manifestations, FD often remains

* Correspondence: gervas.j@gmail.com

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Zaragoza, Spain

²Translational Research Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

undiagnosed in concordance with the prevalence calculated in some studies [4, 5]; however, early treatment is essential to avoid significant disease progression [6, 7].

Over 700 *GLA* mutations, including missense and non-sense mutations, rearrangements, and splicing defects, have been identified as causing FD [8] (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). *GLA* [ENSG:00000102393] has seven splice variants (<http://www.ensembl.org>) and aberrant splicing accounts for ~5 % of mutations in FD (reported to the Human Gene Mutation Database; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>), but information on pre-mRNA splicing is only available for a limited number of patients. Exonic mutations may also alter splicing, but are not easily recognized [9]. Many polymorphic *GLA* variants have been described, but it is unclear if haplotypes formed by combinations of these variants correlate with FD. A complex intronic haplotype (CIH) within the *GLA* gene (c.-10C > T, c.640-16A > G, c.1000-22C > T) is associated with early occurrence of small-fibre neuropathy [10]. A screening study found a second CIH (c.-10C > T, c.370-81_370-77delCAGCC, c.640-16A > G, c.1000-22C > T) in 8.9 % of subjects with FD symptoms [11]; associated with hypertrophic heart disease [12] and, additionally, an analysis of the male control population of a suspected FD female index case permitted the identification of seven different *GLA* haplotypes [13]. Finally, a recent study described a large family with four male/female carriers of a CIH who developed a classical phenotype with a mild renal and neurological involvement [14]. Some of these intronic variants have been reported as polymorphic variants in general population [15–17].

We performed a functional characterization of a large family with a CIH in the *GLA* gene and investigated the molecular pathological mechanisms associated with different FD-related clinical manifestations. We demonstrate that the inheritance of this CIH causes *GLA* gene deregulation and glycolipid storage.

Methods

Patients

We studied a family with different FD-related clinical manifestations. This family carried a CIH (c.-10C > T [rs2071225], c.369 + 990C > A [rs1023431], c.370-81_370-77delCAGCC [rs5903184], c.640-16A > G [rs2071397], c.1000-22C > T [rs2071228]). The family consisted of 15 individuals (6 heterozygous and 4 hemizygous for CIH) aged between 7 and 72 years. Written informed consent was obtained from all patients including those from the parents on the behalf of the minors involved in our study. The study was approved by the Ethics Committee of Aragon (CEICA) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2008.

Reagents

The recombinant enzyme used was agalsidase alfa (REPLAGAL) from Shire pharmaceuticals. As a source of enzyme, we used the residual amounts of the reconstituted recombinant enzyme prepared for the treatment of FD patients. TNF α was purchased from Miltenyi Biotec. The pharmacological chaperone, DGJ (1-deoxygalactonojirimycin hydrochloride), was purchased from Santa Cruz Biotechnology. The anti-human CD77 (Gb₃) primary rat monoclonal antibody used for immunofluorescence analysis was purchased from Biorbyt; the anti-human CD17 (lactosylceramide) mouse monoclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnology and the anti-human LAMP1 rabbit monoclonal antibody was from Sigma-Aldrich. Secondary conjugated antibodies were Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, all from Life Technologies.

α -Gal A activity assay

The activity of α -Gal A was determined in plasma, lysed leukocytes and lysed fibroblasts (in triplicate) with a fluorometric assay using the artificial substrate 4-methylumbelliferyl (MU)- α -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich); for the assay of cell extracts, N-acetyl-D-galactosamine (Sigma-Aldrich) was used to inhibit α -galactosidase B (α -Gal B) [18]. The fluorescence of released 4-MU was measured in two replicates at an excitation wavelength of 366 nm and emission wavelength of 445 nm in a fluorometer (Perkin Elmer LS-45).

Fibroblast culture

Human skin fibroblasts were cultured in 175 cm² flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with GlutaMAX, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 0.5 % β -amphotericin (250 μ g/mL) and the antibiotics streptomycin (100 mg/L) and penicillin (100 U/L). Cells were maintained at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere and the medium was replenished every 72 h. After reaching confluence, cells were kept quiescent for 5 days, washed with PBS and harvested by trypsin (0.05 % trypsin/EDTA for 5 min). All reagents were provided by Gibco-Invitrogen. Cell suspensions were pelleted by centrifugation at 290 \times g for 5 min. After removing the supernatant, cells were washed twice with PBS and stored at -20 °C for further analysis.

Cell culture model of lysosomal storage dysregulation

Fibroblasts were cultured in DMEM with 1 % inactivated FBS in 6-well culture plates (160, 000 cells/ 9.5 cm²). Twenty-four hours before experimentation, cells were activated with 0.1 nM TNF α for 16 h. After activation, the medium was renewed and, where indicated, cells were

additionally incubated with DGJ (500 μM) for 24 h to inhibit endogenous α -galactosidase activity [19] or with agalsidase alfa, by adding 3 ml of the enzyme solution (1.32 μg of enzyme per ml; final activity 3.8 $\mu\text{mol MU mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) [20], to analyze galactolipid degradation as an endogenous control. Cell cultures were incubated for different periods of time (0, 16 and 24 h) and at least two 9.5 cm^2 wells were analyzed for each treatment combination.

Quantification of galactosphingolipids

Determination of galactosphingolipids using galactose oxidase was carried out in cell pellets from lysed leukocytes and fibroblasts previously suspended in 1 % sodium taurocholate (Sigma-Aldrich) and disrupted by combination of ultrasound short pulse (VibraCell) and timing-out on ice. Samples were kept on ice during the procedure. The lysate was centrifuged at 112 \times g for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ to eliminate cell debris and 50 μl of supernatant was used for quantification. Measurement of galactosphingolipids was performed using the Amplex Red Galactose/Galactose Oxidase Assay Kit (Invitrogen).

Immunofluorescence analysis

Immunocytochemistry was performed to examine the distribution of CD77, CD17 and LAMP1. Fibroblasts grown on coverslips were fixed with 4 % paraformaldehyde for CD77/LAMP1 analysis and with methanol for CD17/LAMP1 localization, permeabilized with 0.1 % saponin and blocked with 0.1 % saponin 5 % BSA diluted in PBS. Cells were incubated with primary antibodies (CD77 diluted to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CD17 diluted to 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and LAMP1 diluted to 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ and then conjugated secondary antibodies diluted to 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were added and were incubated for 20 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. Coverslips were mounted on slides and covered with 5 μl of DAPI-Mowiol medium (Life Technologies/Calbiochem). All samples were examined with an Olympus FluoView FV10i confocal microscope under identical conditions. We used 405 nm, 473 nm and 635 nm excitation lasers, which were switched on separately to reduce crosstalk of the two fluorochromes. A threshold was applied to the images to exclude ~ 99 % of the signal found in control images. Pixel and cell surface fluorescence quantification was done using FV10-ASW 3.1 software from Olympus.

Molecular *GLA* analysis

Genomic DNA was isolated from whole blood by standard procedures. The entire *GLA* gene (g.101409127-g.101397726) including promoter, exons and introns, was amplified by PCR using the primers described in Additional file 1. Amplicons were purified and sequenced in an automated DNA sequencer (3500XL

genetic analyser, Applied Biosystems). Sequences were compared with the genomic *GLA* reference sequence [ENSG:00000102393].

Multiplex Ligand Probe Amplification (MLPA) *GLA* analysis
Patients F1.1, F1.4 and F1.10 were analysed by MLPA technique in order to find any pathological rearrangement in *GLA* gene. The details of the MLPA probe target regions and test methodology are described by MRC Holland (<http://www.mlpa.com>). SALSA MLPA P159 *GLA* probemix, version A2 (MRC Holland, Netherlands) was used and data were normalized using 3 healthy controls matched by age and sex.

RNA isolation, cDNA synthesis, small RNA cloning, and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from patients and control peripheral blood samples using the PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX). RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis and concentration was determined in a NanoVue 4282 V1.7.3 Spectrophotometer (GE Healthcare). Total RNA (1 μg) was reverse transcribed in triplicate 20 μL reactions using the SuperScript II reverse transcriptase Kit (200 units) and Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen). The RT-PCR profile was: 10 min at 42 $^{\circ}\text{C}$, 45 min at 60 $^{\circ}\text{C}$, and 5 min at 95 $^{\circ}\text{C}$.

To identify splicing variants, the entire *GLA* mRNA was amplified by PCR using 1 μL cDNA and the primers described in Additional file 1. The amplification conditions were: 2 min at 94 $^{\circ}\text{C}$ followed by 40 cycles of 20 s at 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s at 57 $^{\circ}\text{C}$, and 30 s at 72 $^{\circ}\text{C}$, and a final extension of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 4 min. Amplicons were diluted and nested PCR was performed to amplify the *GLA* mRNA in two parts. Both amplicons were purified with ExoSap-IT (GE Healthcare) and sequenced.

A fragment of the 3' region of intron 6 (g.101398149-g.101398099) was amplified from cDNA of CIH carriers by nested PCR using miScript PCR system and miScript Primer Assays (Qiagen) trying to identify small RNA fragments. The product was cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) and purified with the PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Inserts were amplified by PCR with T7 and SP6 universal primers, and products were sequenced in forward and reverse directions.

Quantification of *GLA* mRNA was performed in triplicate samples from each patient using a quantitative real-time PCR (qPCR) method based on TaqMan technology (Applied Biosystems). Probe and primers for wild-type *GLA* (ENST00000218516) and *GLA*-M (cloned fragment) are listed in Additional file 1. qPCR

was performed with the ABI Prism 7000 Sequence Detector (PE Applied Biosystems) using 20 ng of cDNA in a reaction mixture containing 10 μ l Universal Master Mix without amperase, 300 nmol of each primer and 200 nmol of probe (Additional file 1). Conditions for qPCR were: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. We used efficiency-corrected gene expression measurements [21].

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

IRDye680-labelled double-stranded oligonucleotides with the sequence GCTGTCCGGT[C/T]ACCGTGACAA were purchased from LICOR Biosciences (Lincoln, NE, USA). The preparation of nuclear extracts and the electrophoresis procedures have been described previously [22]. EMSA results were analysed and quantified using the Odyssey Infrared Imaging System (LICOR Biosciences). For competition assays, an excess of unlabelled T-allele oligonucleotide was added to the mix prior to the addition of the labelled oligonucleotides. The inverse of band intensity was plotted against the excess of unlabelled oligonucleotide and the slope of the resulting straight line indicated the affinity of each allele for the proteins in the nuclear extract.

Splice-site score (SSS)

Splice mutations were analysed using the SSPNN program (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) and a splice-site score (SSS) was obtained.

Statistical analysis

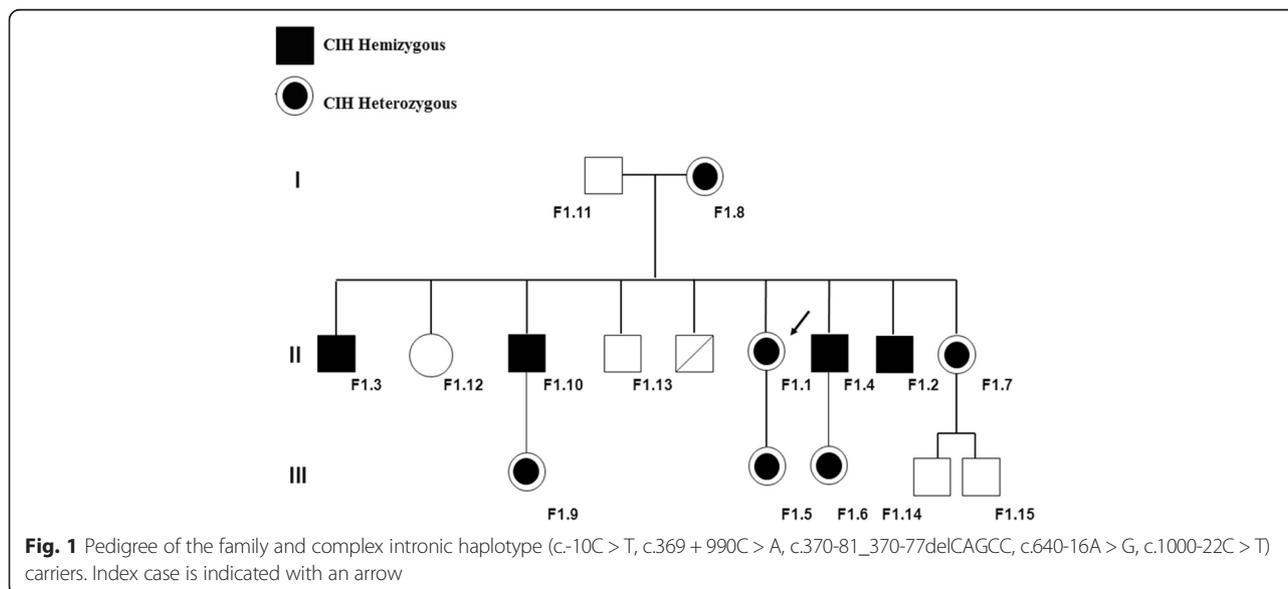
Statistical analysis was carried out using the SPSS software package (IBM). Normality of the distribution

of variables was analysed by the Kolmogorov-Smirnov test, and mean comparison by the parametric *t*-test and one way ANOVA. Differences with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Patients

The family pedigree is shown in Fig. 1. The index case (F1.1) was a 43-year-old female, with clinical records of acroparesthesias from adolescence, hypohidrosis, and reiterated episodes of abdominal pain with alternating phases of diarrhoea with constipation. At 40 years of age was referring several episodes of pain chest that requiring emergency care. At 41 years of age she was hospitalized by a new episode of chest pain and was diagnosed with anteroseptal myocardial infarction, requiring the implantation of three stents. The evaluation of hearth function by MRI showed residual fibrous scar by myocardial infarction in the territory of the anterior and apex segments. LV slightly dilated with decreased LVEF (48.4 %) and generalized hypokinesia. Valvular function with MI moderate to severe and moderate AI. The cardiologic diagnosis suspicion was valvular and ischemic hearth variant secondary to Fabry disease. Complete haematological, neurological, and ophthalmological examinations were performed, and renal function was measured and determined to be normal. It discard associate factors of hypercoagulability status. Peripheral nervous conduction was evaluated by quantitative sensory test (QST) [23], which revealed abnormalities in the small fiber conduction compared with normal population. Physical examination indicated that the patient had absence of hemangiokeratomas, nodes or visceral enlargement, and no cardiovascular risks such as high plasmatic cholesterol, low c-HDL levels



or hypertension. Genetic analysis revealed a CIH in the *GLA* gene: IVSO-10C>T (c.-10C>T) within the promoter region, intron 2 IVS2+990C>A (c.369+990 C>A); IVS2-76_80del 5 (c.370-77_81 del CAGCC), intron 4 IVS4-16A>G (c.640-16A>G) and intron 6 IVS6-22C>T (c.1000-22C>T). The same haplotype was identified in the patient's mother (F1.8) and daughter (F1.5), in four of her brothers (F1.2, F1.3, F1.4, and F1.10) and one of her two sisters (F1.7), as well as in the daughters (F1.6, F1.9) of two of the affected brothers. MLPA assays did not reveal any copy number differences in patients F1.1, F1.4 and F1.10.

At age 52 years, the first brother (F1.3) was referred for examination to exclude malignant monoclonal gammopathy IgG-kappa. At age 40 years, he underwent vertebral fixation surgery because of severe back pain. He reported acroparesthesia, heat intolerance, and hypohidrosis since childhood, as well as shortness of breath and inability to perform any physical activity. This patient was hemizygous for the CIH.

The second brother (F1.10), hemizygous for the CIH, was 49 years old. His main symptoms were related to left ventricular hypertrophy and valvular aortic stenosis associated with severe acral pain that demanded continuous intake of analgesic drugs.

The third brother (F1.13) did not accept to be a part of the study and the fourth brother was deceased.

The fifth brother (F1.4) was referred for hearing loss and mild acroparesthesia at 41 years of age. Renal involvement was characterised by microalbuminuria (34 mg/24 h) and glycolipid deposits in renal tubules and glomeruli (Fig. 2). It is important to note that this patient did not use chloroquine or amiodarone-like drugs. His 7-year-old daughter (F1.6) had microalbuminuria (29 mg/24 h), and was heterozygous for the CIH.

The sixth brother (F1.2) was 39 years old, hemizygous for the CIH, and was referred for acroparesthesias,

bilateral hearing loss, heat intolerance and hypohidrosis, but no cardiac abnormalities were observed.

One sister (F1.7) was 37 years old and a carrier of the CIH. She had a previous history of tachyarrhythmias, and since childhood she had acroparesthesias, hypohidrosis and heat intolerance. Her mother (F1.8) presented no clinical manifestations.

α -Gal A activity in plasma, leukocytes and fibroblasts

Enzymatic activity was measured in plasma, lysed leukocytes and fibroblasts from CIH carriers and normal healthy controls. The individual values from leukocytes and plasma are presented in Table 1. The mean value of lysed leukocyte activity in the control group ($n = 27$) was (mean \pm SD) 58.1 ± 26.6 nmol/mg protein/h. Significantly lower levels were found in the CIH group ($n = 8$), 46.25 ± 9.66 nmol/mg protein/h (Fig. 3a; $p \leq 0.05$). The mean value of plasma activity in the control group ($n = 33$) was (mean \pm SD) 20.8 ± 12.5 nmol/mL/h, whereas the mean value for the CIH group ($n = 9$) was 19.5 ± 10.3 nmol/mL/h. There was no significant difference between the plasma activity in control and CIH group (Fig. 3a). Enzymatic activity was also measured in cultured skin fibroblasts from controls and from patients F1.1, F1.3, F1.4 and F1.10. The activity measurements in the patients' fibroblasts were not significantly different to controls, although there was a trend for reduction in patient F1.10 and fibroblasts from patient F1.3 had significantly higher levels of α -Gal A (Fig. 3b).

***In vitro* model of lysosomal storage disease**

In order to accurately determine galactosphingolipid levels, we first used wild-type fibroblasts to establish a model of lysosomal storage dysregulation. Fibroblasts were treated or not with TNF α (16 h) to activate a proinflammatory response, followed by a medium change without TNF α , and culturing was then continued

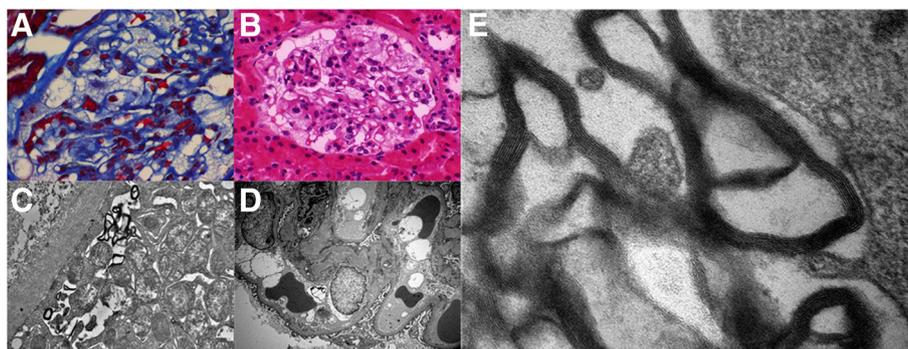
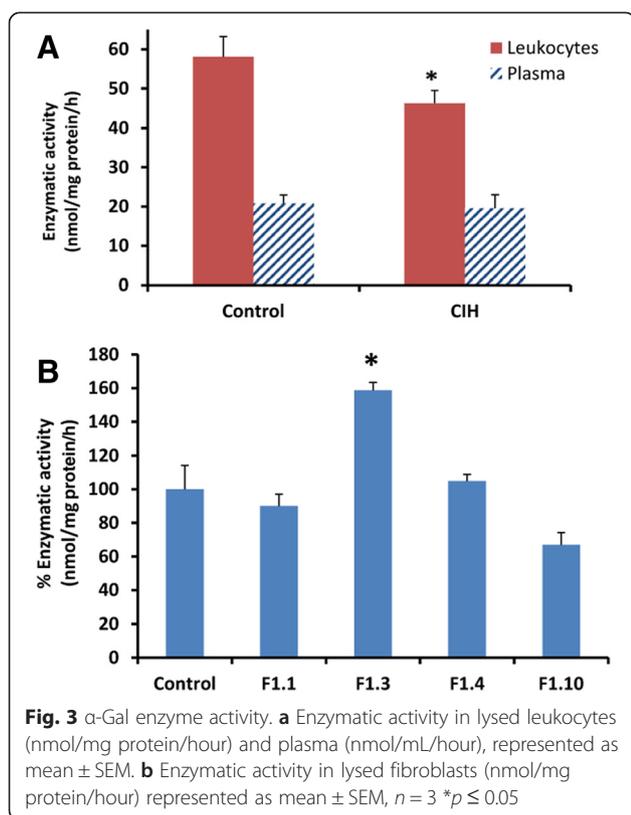


Fig. 2 Cytoplasmic vacuolation observed in a podocyte by light microscopy with **a** Masson's trichrome and **b** Haematoxylin and eosin staining. **c** Myelin-like structures in a podocyte, with concentric lamellated ultra-structural appearance. (Electron Microscopy). **d** Focal areas of podocyte effacement; amorphous myelin-like structures are visible in glomerular parietal epithelial cells and in endothelial cells (Electron Microscopy). **e** Myelin-like structures parallel with zebra-like body appearance (Electron Microscopy)

Table 1 Clinical manifestations; α -Gal A activity in plasma and leukocytes, galactosphingolipid concentrations and *GLA* mRNA expression

ID	SEX	Age	Variants CIH	Clinical Manifestations	galactosphingolipids	galactosphingolipids	α -Gal A	α -Gal A	mRNA	mRNA
					Leukocytes (nmol/mg protein)	Fibroblasts (nmol/mg protein)	Leukocytes (nmol/mg protein/h)	Plasma (nmol/mL/h)	GLA RQ	GLA-M RQ
F1.1	f	43	Het	Ischemic heart disease, Gastro- intestinal, Fine fiber alterations	0.62	0.83	63	23	0.48*	0.85
F1.2	m	39	Hemi	Acroparesthasias, Heat intolerance, Hypohidrosis, Hearing loss	0.13	N/A	57	19	0.41	5.47
F1.3	m	53	Hemi	Acroparesthasias, Heat intolerance, Hypohidrosis	0.11	0.80	38	14	0.36*	0.84
F1.4	m	41	Hemi	Hearing loss, Microalbuminuria, Renal deposits	0.11	1.12	37	15	0.88	2.56
F1.5	f	20	Het	N/A	0.13	N/A	42	37	N/A	N/A
F1.6	f	7	Het	Microalbuminuria	N/A	N/A	N/A	9	N/A	N/A
F1.7	f	37	Het	Acropaesthasias, Microalbuminuria, Hypohidrosis, Tachyarrhythmias	0.06	N/A	43	15	1.06	1.51
F1.8	f	72	Het	N/A	0.27	N/A	51	35	1.12	0.90
F1.10	m	49	Hemi	Left Ventricular Hypertrophy	1.93	0.93	39	9	0.02**	117.76**

CIH = c.-10C > T [rs2071225], c.369 + 990C > A [rs1023431], c.370-81_370-77delCAGCC [rs5903184], c.640-16A > G [rs2071397], c.1000-22C > T [rs2071228]. The mean \pm SD normal concentration of leukocytes galactosphingolipids is ($n = 17$) 0.33 ± 0.3 (nmol/mg protein). The mean \pm SD normal concentration of fibroblasts galactosphingolipids is ($n = 5$) 0.63 ± 0.12 (nmol/mg protein). The normal mean \pm SD of α -Gal A leukocyte activity in our assay is ($n = 27$) 58.1 ± 26.6 (nmol/mg protein/hour) and normal mean \pm SD of α -Gal A plasma activity is ($n = 33$) 20.8 ± 22.03 (nmol/mL/ hour). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$. N/A = Not applicable



for a further 8 h. Accumulation of galactosphingolipids was measured by galactose oxidase assay at 16 h and 24 h as described. TNF α treatment resulted in an increase in galactosphingolipids in wild-type fibroblasts compared with control samples (without TNF α treatment) (Fig. 4a). Notably, this increase was accentuated by co-treatment of fibroblasts with TNF α and DGJ, used at a concentration which inhibits endogenous α -Gal A activity [19] (Fig. 4a). Moreover, addition of recombinant agalsidase alfa significantly decreased the level of endogenous galactosphingolipids in TNF α -treated fibroblasts with respect to control cells (Fig. 4a). To corroborate these results, immunofluorescence microscopy was performed to evaluate the presence of Gb₃ (CD77) using an antibody to CD77 (Fig. 4b). In good agreement with the biochemical assay, immunofluorescence staining of fibroblasts exposed to TNF α demonstrated an increase in CD77, which colocalized with the lysosomal membrane marker LAMP1. Additionally, Gb₃ signal intensity was increased upon exposure of fibroblasts to TNF α and DGJ (Fig. 4b). Superimposition of CD77/LAMP1 images revealed a significant degree of overlap (Fig. 4b). As anticipated, agalsidase alfa treatment reduced Gb₃ accumulation as demonstrated by decreased CD77 fluorescence, without affecting LAMP1 staining (Fig. 4b). Quantification of overlapped pixels of confocal images revealed that TNF α treatment resulted in a 50 fold increase in CD77 staining in fibroblasts, which

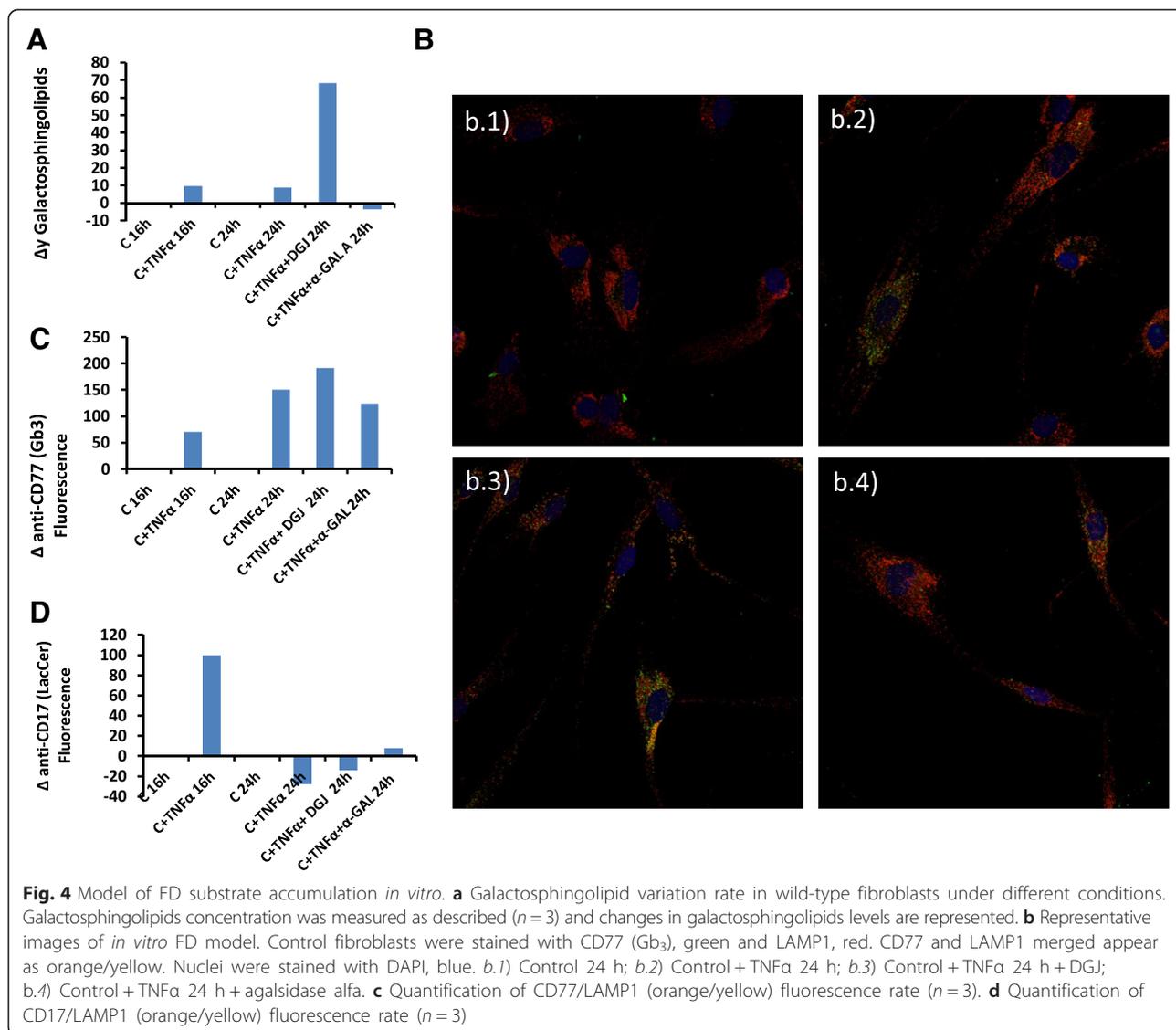
further increased to 150 fold after 24 h (Fig. 4c). Co-treatment with DGJ further increased CD77 staining and this was dramatically reduced upon exposure to agalsidase alfa (Fig. 4c). A similar analysis was performed with an antibody to lactosylceramide (CD17). α -Gal A catalyzes the hydrolysis of Gb₃ to lactosylceramide and α -galactose. Lactosylceramide accumulation was decreased upon exposure of fibroblasts to TNF α and DGJ. Agalsidase alfa treatment increased lactosylceramide accumulation as demonstrated by increased CD17 fluorescence, corroborating the CD77 results (Fig. 4c). Collectively, these results show that galactosphingolipids can be precisely measured in cell cultures using this assay and immunocytochemistry is a useful technique to assess lipid storage.

Quantification of galactosphingolipids in leukocytes and human fibroblasts

Quantification of galactosphingolipids was performed in leukocytes and fibroblasts from CIH carriers and controls. The individual values of leukocyte galactosphingolipids are presented in Table 1. The mean value for the control group ($n = 17$) was (mean \pm SD) 0.33 ± 0.30 nmol/mg protein and in the CIH group ($n = 8$) 0.42 ± 0.63 nmol/mg protein. Galactosphingolipids were also measured in cultured fibroblasts from CIH patients. After 5 days of quiescence, in all cases galactosphingolipid levels in patient fibroblasts were greater than in equivalent control cell lines, which was significant for patients F1.1, F1.4 and F1.10 (Fig. 5a). Interestingly, in patients F1.3 and F1.4, leukocyte levels were lower than controls, whereas in equivalent fibroblasts the levels were higher. The origin of these differences may reflect distinct *GLA* expression states of different cells. Ferreira et al., suggest that the *GLA* 5'UTR polymorphisms are a possible modulators of *GLA* expression varying among different cell types [24]. Atypical FD variants are often not associated with increased lyso-Gb₃ levels, although biopsies of affected organs revealed lamellar inclusion bodies characteristic for FD [25]. Consistent with the increase in galactosphingolipids, immunostaining of fibroblasts from patient F1.4 and F1.10 revealed elevated levels of Gb₃, which were further increased after exposure to TNF α (Fig. 5b). Additionally, immunofluorescence revealed that galactolipids were mostly confined to cytosolic and membrane compartments (Fig. 5b). Quantification of CD77/LAMP1 lysosomal co-localization revealed an increase in CD77 staining in fibroblasts from patients F1.4 and F1.10, which was significant for patient F1.10 relative to control values (Fig. 5c).

cDNA analysis

No sequence changes were discovered after sequencing nested PCR products of the two *GLA*



amplicons in comparison with the reference sequence (data not shown).

Small RNA cloning

Sequencing of the 3' region of intron 6 insert in all CIH carriers revealed the presence of one cDNA fragment formed by a 49-bp portion of intron 6 and exon 7 cloned only in patient F1.4. The genomic coordinates of this exon 7 extension are: ChrX(GRCh38): g.101398050-g.101397803 :-1.

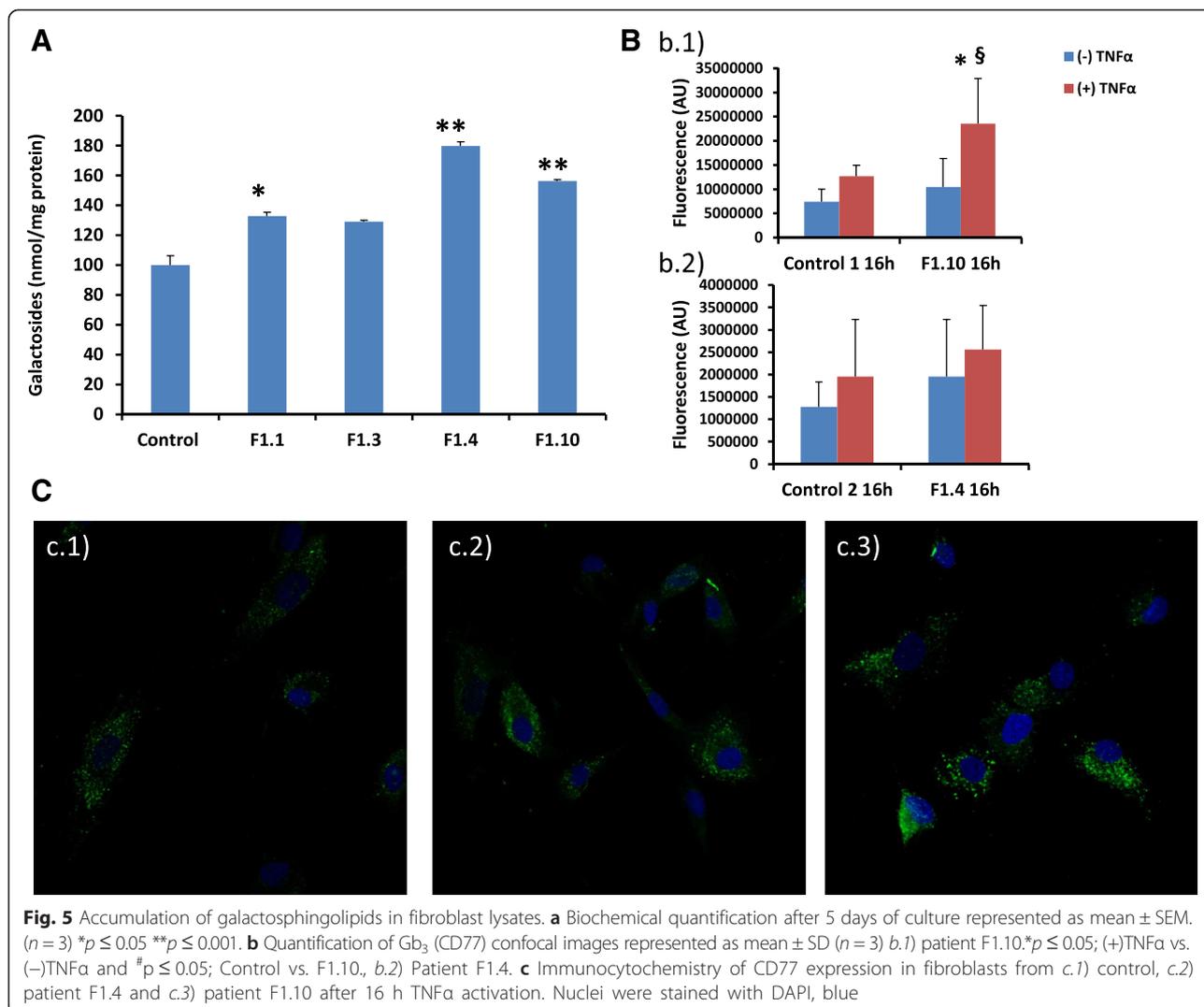
Quantitative PCR of the GLA transcripts

Relative quantification (RQ) of wild-type (wt) *GLA* and *GLA-M* mRNA (3' region of intron 6 cloned fragment) from all carriers and controls ($n = 8$; 50 % females) was performed by real-time PCR and the *GLA/GLA-M* expression profiles were compared between control group and carriers. Reduced wt *GLA* expression was found in

all hemizygous carriers and in the heterozygous proband F1.1, and was significant in carriers F1.3, F1.10 and F1.1 (Table 1). The relative expression of *GLA-M* was increased in carriers F1.2, F1.4 and F1.7, and significantly in patient F1.10 compared with controls (Table 1). The heterozygous group for CIH presented higher RQ values for *GLA* wt expression in comparison with the hemizygous group (0.89 vs 0.41).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

To investigate whether the C>T change in the *GLA* gene promoter variant c.-10C>T impacted the binding capacity of possible transcription factors, EMSA was performed with specific primers for each variant. The results demonstrated marked differences in the affinity of nuclear proteins between the two alleles, with allele C having a greater ability to bind nuclear proteins (Fig. 6a). To confirm this difference, we performed a competitive



binding EMSA using increasing amounts of an unlabelled oligonucleotide corresponding to the T allele. The results indicated that the T allele was more easily displaced from the protein-DNA complex (0.003 vs 0.001) (Fig. 6b). Therefore, the C > T substitution resulted in decreased protein binding capacity of the fragment. In an attempt to identify the transcription factors present in the complex, we scanned sequences surrounding the SNP c.-10C > T with MatInspector (Genomatix) [26]. The results of this analysis indicated that the mutation could affect the binding sites for small nuclear RNA (snRNA)-activating protein complex (SNAP-C), doublesex/mab-3 related (DMRT), and X box-binding factors.

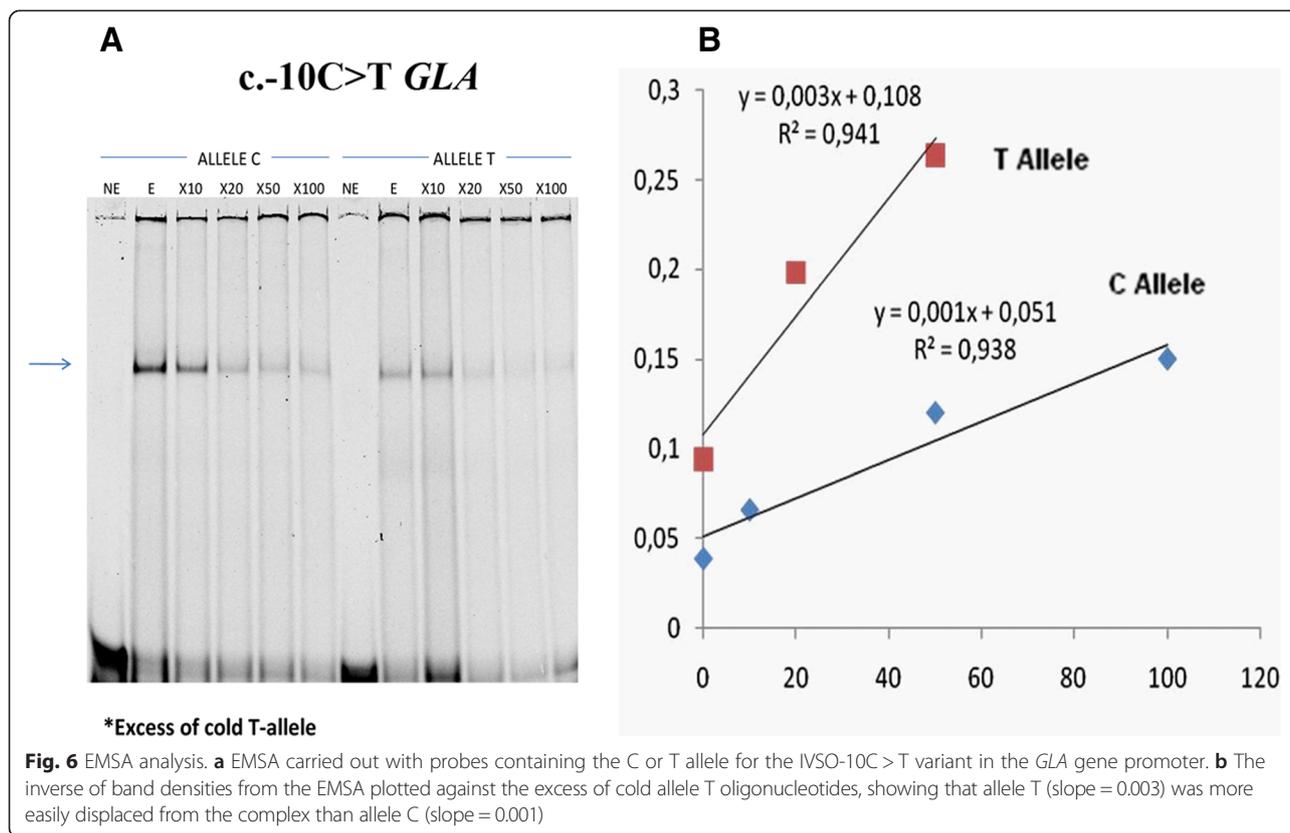
Splice-site score (SSS)

We analysed the variants of the CIH using SSPNN software. Changes in *GLA* splicing with CIH were observed only in c.370-81_370-77delCAGCC and c.640-16A > G

variants. The c.370-81_370-77delCAGCC variant resulted in the disappearance of a possible acceptor site in IVS2-78, with a SSS of 0.80. The SSS for a normal acceptor site in intron 4 (IVS4-1) was raised from 0.58 to 0.62 with the c.640-16A > G variant. Although the SSS were minimal, the results indicated that the co-segregation of CIH variants may cause an abnormal splice pattern.

Discussion

Detection of mutations in the *GLA* gene is essential to support clinical diagnosis of FD. Mutations in intronic regions can alter the *GLA* gene expression pattern in a manner related to different disease phenotypes and clinical manifestations [4, 5]. Intronic *GLA* variants often remain unidentified because these regions are not routinely evaluated by gene sequencing; consequently, the prevalence of FD may be underestimated [27, 28].



In the present study, we sequenced the entire *GLA* gene from genomic DNA of the family members and we used MLPA in an attempt to find alterations that could explain the FD-like characteristics observed. We identified a complex haplotype consisting of five intronic variants (c.-10C > T, c.369 + 990C > A, c.370-81_370-77delCAGCC, c.640-16A > G, c.1000-22C > T). In one study, 12 % of 740 subjects with clinically suspected FD showed polymorphisms in the *GLA* promoter region; of these, 99 % had simultaneous polymorphisms throughout the gene, and CIH formed by four of five variants observed in our study occurred in 9 % of these cases [11]. In a second study, Ferri and colleagues [13] identified five *GLA* haplotypes in non-coding regions in 67 female probands with FD manifestations. The most frequent of these was the CIH formed by four variants (13.4 %). Previous reports have found c.-10C > T, c.370-81_370-77delCAGCC, c.640-16A > G and c.1000-22C > T variants to be associated with different clinical manifestations including mild renal, neurological [10] and cardiac disorders [12]. It is important to know that depending on the sequencing design, these haplotypes might be the same type. We found FD-like symptoms (renal, cardiac and neurological involvement) associated with the family in our study (Table 1). In accordance with our results Apeland et al., described two unrelated families, one of them carrier of c.640-16A > G and c.1000-22C > T intronic variants,

presenting a cardiomyopathy mimicking FD with normal enzymatic activity values and renal and cardiac deposits without accumulation of glycolipids in urine or plasma. In two patients, a 100-fold increase in Gb3 was observed in cardiac biopsies. Exon sequencing failed to detect heterozygosity in potential candidate genes [29].

We examined the c.-10C > T variant located in the *GLA* gene promoter region, which may be co-dominantly associated with a relatively decreased *GLA* expression at the level of transcription and/or translation [30]. By EMSA, we found that the T allele reduced the affinity of the nuclear protein binding site. A computer analysis using MatInspector showed that this region is a possible binding site for three families of transcription factors: SNAP-C, X box-binding factors (XBBF) and DMRT. SNAP-C binds to Oct-1 and TATA binding proteins (TBP), which are activators of snRNA and RNA polymerases, respectively [31]. X box-Protein 1 (XBP1) becomes initiated during the endoplasmic reticulum (ER) stress response [32]. In humans, the DMRT gene family encodes transcription factors that are related to the *Drosophila* double sex proteins [33]. Unfortunately, no tested antibodies are currently available to perform a supershift assay.

The c.-10 C > T variant is situated in a CpG island region (<http://www.urogene.org/methprimer/>). DNA methylation

is a well-recognized epigenetic modifier in the control of gene expression. This reversible DNA modification takes place almost exclusively at cytosine residues that are associated with guanosine in CpG doublets, and mediates control of transcription through chromatin remodelling. This modification is widely implicated in various biological processes including X-inactivation, the regulation of tissue- and development-specific gene expression, foreign DNA inactivation and genomic imprinting [34]. FD symptoms exhibited by females carrying the T allele could partially depend on the methylation state of the C allele. Indeed, Bono and co-workers [11] reported a relationship between FD symptoms and polymorphisms in the promoter region. Future studies on the methylation states of the promoter region may provide more clues on these epigenetic effects in relation to phenotype.

We found low levels of wild-type transcript in some patients in agreement with previous reports [28, 35]. *GLA*-M transcript levels (3' region of the intron 6 cloned fragment) were also altered with respect to their controls in most cases. The index case of this family (F1.1), a female heterozygous for CIH, presented significantly lower levels of wild-type transcript, whereas *GLA*-M expression was slightly reduced but not significantly different to control. Although she presented a cardiac phenotype, her leukocyte and plasma enzyme activities were not decreased. Higher residual activity is often found in atypical male patients who do not show the classic phenotype and have later onset of symptoms [36, 37], including cardiac [35] and renal variants [38]. It is possible that *GLA* expression in other tissues may be different. The ratio of the alternatively spliced transcript produced by another intronic variant, IVS4 + 919G > A mutation, to total α -Gal A mRNA, is higher in human muscle and lung tissues [27]. In the case of this studied family, the CIH only produced an altered *GLA* expression profile, presumably resulting in a late-onset FD-like phenotype. The differences observed in the qPCR assay may coincide with the SSS data variations for c.370-81_370-77delCAGCC and c.640-16A > G variants, the EMSA assay results for c.-10 C > T and also with the cDNA cloned fragment formed by a 49-bp segment of 3' intron 6 and exon 7 in patient F1.4. However, PCR and sequencing did not reveal any products of splicing variants due to c.370-81_370-77delCAGCC or c.640-16A > G. It is possible that these transcripts are degraded by nonsense-mediated mRNA decay. In accord with the EMSA results, the expression levels of heterozygous CIH patients were approximately 50 % higher than in hemizygous carriers. Enzymatic activity was measured in plasma, lysed leukocytes and fibroblasts from CIH carriers and normal healthy controls. The mean value of lysed leukocyte activity in the CIH group was significantly lower (~20 %) but there was no significant difference between the plasma and fibroblast activity

in control and CIH group. The expression is reduced in leukocytes reducing the enzyme activity but not the enzyme activity in other tissues like plasma supporting previous studies [30]. This effect may contribute to the glycolipid alteration and therefore may develop the clinical findings.

The levels of storage products in urine and plasma are elevated in most, but not all, FD patients. The demonstration of increased storage product levels is very useful in making a diagnosis in many cases and also for treatment monitoring. The predominant storage product in FD is Gb₃, but other storage products such as Ga₂ or lyso- Gb₃ may also accumulate. Consequently, significant differences in the Gb₃ and Ga₂ isoform profiles in urinary sediment were found amongst young, adult and atypical hemizygotes and heterozygotes using a combination of MALDI-TOF MS and tandem MS [39]. Additionally, increased sphingolipid storage in skin fibroblasts from patients has been described previously [40]. Therefore, we used an enzymatic fluorometric technique to quantify all galactosphingolipids in samples obtained from controls and CIH carriers in lysed leukocytes and skin fibroblasts. Galactose is a component of the headgroup of many glycolipids. Galactose oxidase specifically oxidizes the C-6 hydroxymethyl group of free galactose as well as all galactosyl derivatives, such as Gb₃, lyso- Gb₃ and Ga₂, carrying a galactose residue in the terminal position. Bile acids, for example sodium taurocholate, do not alter the kinetics of galactose oxidase [41]. The enzymatic method to detect urinary Gb₃, showed a good recovery and comparability with a previously validated HPLC method [42]. Importantly, we validated this assay using a synthetic model of lysosomal storage in fibroblasts activated with TNF α and corroborated these findings with confocal microscopy quantification of CD77 (Gb₃)/CD17(Lactosylceramide)/LAMP1. Confocal microscopy revealed that galactolipids were mostly confined to cytosolic and membrane compartments (Fig. 5b) in concordance with several studies that demonstrated that Gb₃ in FD is not only present in lysosomes, but rather widely distributed in other cellular structures [43]. *In vitro* studies in skin fibroblasts showed that CIH carriers accumulated galactosphingolipids significantly after 5 days culture, in the range between 30 and 80 % in comparison with control samples. Fibroblasts from a male patient (F1.4) with a renal phenotype and glycolipid deposits demonstrated by renal biopsy, accumulated approximately 50 % more substrate compared with the F1.1 patient, a heterozygous female with a cardiac phenotype. In concordance with our results is important to remark that Namdar et al. demonstrated that vasculopathy in FD is directly caused by intracellular Gb₃ accumulation while deficiency of *GLA* alone does not cause any deregulation of key vasoactive mediators [44].

Most of the carriers had high *in vitro* residual enzyme activity in plasma, leukocytes and cultured fibroblasts; however, CIH carriers had significant galactosphingolipid accumulation in fibroblasts in comparison with controls. Presumably, because the enzyme structure is not altered, only the *GLA* structural regulatory mechanism was affected by inheritance of the CIH, leading to *GLA* activation-dependent accumulation of substrates, influenced perhaps by environmental factors such as the proinflammatory state of the patient.

Conclusions

CIH carriers showed a wide variation in residual enzymatic activities in leukocytes, plasma, and fibroblasts, but generally activity was normal. In contrast, galactosphingolipid accumulation was in the main significantly greater in fibroblasts compared with controls. Position -10 in the *GLA* promoter is a putative nuclear protein binding site situated in the CpG island region, acting as a gene regulatory zone. The inheritance of the co-segregated CIH variants alters the *GLA* expression pattern, producing a tissue glycolipid storage disorder.

The genetic analysis of the entire *GLA* gene sequence and MLPA, the study of *GLA* expression and glycolipid quantification in relation to FD clinical manifestations can be extremely helpful as tools for FD-related diagnosis.

Further studies are needed to elucidate how the inheritance of complex intronic haplotypes are implicated in the *GLA* regulatory mechanisms and therefore, the glycolipid metabolism alteration.

Additional file

Additional file 1: Table S- Sequences of primers and probes.
(DOCX 21 kb)

Abbreviations

GLA: Alfa galactosidase gene; FD: Fabry disease; Gb₃: Globotriaosylceramide; Lyso-Gb₃: Globotriaosylsphingosine; Ga₂: Galabiosylceramide; α-Gal A: α-galactosidase A; CIH: Complex intronic haplotype; TNFα: Tumor necrosis factor alpha; LAMP1: Lysosomal-associated membrane protein 1; DGJ: 1-deoxygalactonojirimycin hydrochloride; MU: Methylumbelliferyl; PCR: Polymerase chain reaction; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; MLPA: Multiplex ligand probe amplification; FBS: Fetal bovine serum; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; qPCR: Quantitative real-time PCR; EMSA: Electrophoretic mobility shift assay; SSS: Splice-site score; MRI: Magnetic resonance image; LV: Left ventricle; LVEF: Left ventricular ejection fraction; MI: Mitral insufficiency; AI: Aortic insufficiency; QST: Quantitative sensory test; RQ: Relative quantification; Wt: Wild type; SNP: Single nucleotide polymorphism; snRNA: Small nuclear RNA; SNAP-C: Small nuclear RNA activating protein complex; XBBF: X box-binding factors; DMRT: Doublesex/mab-3 related; TBP: TATA binding proteins.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JGA, JCRR and MP conceived and designed the experiments. JGA, JJC, PI and JPL performed the experiments. JGA carried out statistical analysis. LP carried out the renal biopsy analyzes. JLC, JCR and PG carried out the clinical

evaluation. JLC, JCR, JCRR, MP and PG contributed reagents/materials/analysis tools. JGA drafted the manuscript. JGA, JJC, JCRR, MP and PG carried out the interpretation of data. JGA, MP and PG participated in the design and coordination of the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors gratefully thank Cesar Vallejo for technical support; Dr. Erika Fernandez-Vizarra for critical revision of the manuscript and Dr. Gracia Mendoza for immunofluorescence support. This study was supported by grant FIS (PI 09/02556) and by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), an initiative of the ISCIII.

Author details

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Zaragoza, Spain. ²Translational Research Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain. ³Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Zaragoza, Spain. ⁴Biochemistry and Molecular and Cellular Biology Department, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain. ⁵Molecular Biology Department, Cantabria University and IFIMAV, Santander, Spain. ⁶Anatomic Pathology Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain. ⁷Neurology Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain.

Received: 9 April 2015 Accepted: 25 August 2015

Published online: 03 September 2015

References

- Desnick R, Ioannou Y, Eng C. Fabry disease: α-galactosidase A deficiency. In: Scriver C, editor. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3733–74.
- Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C, et al. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(3):236–42.
- Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*. 1961;190:372–3.
- Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet*. 2006;79(1):31–40.
- Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolsky R, Huang AC, 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(10):1397–405.
- Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M, et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med*. 2003;138(4):338–46.
- Eng CM, Germain DP, Banikazemi M, Warnock DG, Wanner C, Hopkin RJ, et al. Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. *Genet Med*. 2006;8(9):539–48.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003;21(6):577–81.
- Lai LW, Whitehair O, Wu MJ, O'Meara M, Lien YH. Analysis of splice-site mutations of the alpha-galactosidase A gene in Fabry disease. *Clin Genet*. 2003;63(6):476–82.
- Tanislav C, Kaps M, Rolfs A, Bottcher T, Lackner K, Paschke E, et al. Frequency of Fabry disease in patients with small-fibre neuropathy of unknown aetiology: a pilot study. *Eur J Neurol*. 2011;18(4):631–6.
- Bono C, Nuzzo D, Albegghiani G, Zizzo C, Francofonte D, Iemolo F, et al. Genetic screening of Fabry patients with EcoTILLING and HRM technology. *BMC Res Notes*. 2011;4:323.
- Pisani A, Imbriaco M, Zizzo C, Albegghiani G, Colomba P, Alessandro R, et al. A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the *GLA* gene: a case report. *BMC Cardiovasc Disord*. 2012;12:39.
- Ferri L, Guido C, la Marca G, Malvagia S, Cavicchi C, Fiumara A, et al. Fabry disease: polymorphic haplotypes and a novel missense mutation in the *GLA* gene. *Clin Genet*. 2012;81(3):224–33.
- Tuttolomondo A, Duro G, Pecoraro R, Simonetta I, Miceli S, Colomba P, et al. A family with various symptomatology suggestive of Anderson-Fabry disease and a genetic polymorphism of alpha galactosidase A gene. *Clin Biochem*. 2015;48(1–2):55–62.

15. Oliveira JP, Ferreira S, Barcelo J, Gaspar P, Carvalho F, Sa Miranda MC, et al. Effect of single-nucleotide polymorphisms of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene on enzyme activity, and their frequencies in Portuguese caucasians. *J Inher Metab Dis*. 2008;31 Suppl 2:S247-53.
16. Davies JP, Winchester BG, Malcolm S. Sequence variations in the first exon of alpha-galactosidase A. *J Med Genet*. 1993;30(8):658-63.
17. Bekri S, Enica A, Ghafari T, Plaza G, Champenois I, Choukroun G, et al. Fabry disease in patients with end-stage renal failure: the potential benefits of screening. *Nephron Clin Pract*. 2005;101(1):c33-8.
18. Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta*. 1981;112(2):247-51.
19. Hsu J, Serrano D, Bhowmick T, Kumar K, Shen Y, Kuo YC, et al. Enhanced endothelial delivery and biochemical effects of alpha-galactosidase by ICAM-1-targeted nanocarriers for Fabry disease. *J Control Release*. 149. Netherlands: 2010 Elsevier B.V; 2011. p. 323-31.
20. Keslová-Veselíková J, Hůlková H, Dobrovolný R, Asfaw B, Poupetová H, Berná L, et al. Replacement of alpha-galactosidase A in Fabry disease: effect on fibroblast cultures compared with biopsied tissues of treated patients. *Virchows Arch*. 2008;452(6):651-65.
21. Pfaffl M. Relative quantification. In: Dorak T, editor. *Real-time PCR*. La Jolla, CA: International University Line; 2006. p. 63-82.
22. Riancho JA, Vazquez L, Garcia-Perez MA, Sainz J, Olmos JM, Hernandez JL, et al. Association of ACACB polymorphisms with obesity and diabetes. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):670-6.
23. Rolke R, Baron R, Maier C, Tolle TR, Treede RD, Beyer A, et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain*. 2006;123(3):231-43.
24. Ferreira, S., C. Reguenga, and J.P. Oliveira, The Modulatory Effects of the Polymorphisms in GLA 5'-Untranslated Region Upon Gene Expression Are Cell-Type Specific. *JIMD Rep*, 2015.
25. Mitobe S, Togawa T, Tsukimura T, Kodama T, Tanaka T, Doi K, et al. Mutant alpha-galactosidase A with M296I does not cause elevation of the plasma globotriaosylsphingosine level. *Mol Genet Metab*. 2012;107(3):623-6.
26. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(23):4878-84.
27. Ishii S, Nakao S, Minamikawa-Tachino R, Desnick RJ, Fan JQ. Alternative splicing in the alpha-galactosidase A gene: increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype. *Am J Hum Genet*. 2002;70(4):994-1002.
28. Filoni C, Caciotti A, Carrarese L, Donati MA, Mignani R, Parini R, et al. Unbalanced GLA mRNAs ratio quantified by real-time PCR in Fabry patients' fibroblasts results in Fabry disease. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(11):1311-7.
29. Apelland T, Gude E, Strøm EH, Gullestad L, Eiklid KL, Månsson JE, et al. Familial globotriaosylceramide-associated cardiomyopathy mimicking Fabry disease. *Heart*. 2014;100(22):1793-8.
30. Oliveira JP, Ferreira S, Reguenga C, Carvalho F, Mansson JE. The g.1170C>T polymorphism of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene is associated with decreased enzyme expression—evidence from a family study. *J Inher Metab Dis*. 2008;31 Suppl 2:S405-13.
31. Sadowski CL, Henry RW, Kobayashi R, Hernandez N. The SNAP45 subunit of the small nuclear RNA (snRNA) activating protein complex is required for RNA polymerase II and III snRNA gene transcription and interacts with the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4289-93.
32. Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev*. 2003;194:29-38.
33. Hong CS, Park BY, Saint-Jeannet JP. The function of Dmrt genes in vertebrate development: it is not just about sex. *Dev Biol*. 2007;310(1):1-9.
34. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*. 2000;1(1):11-9.
35. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*. 1995;333(5):288-93.
36. Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J*. 2007;406. England2007. p. 285-95.
37. Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Pharmagenesis; 2006. p. 169-81.
38. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A, et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int*. 64. United States2003. p. 801-7.
39. Touboul D, Roy S, Germain DP, Baillet A, Brion F, Prognon P, et al. Fast fingerprinting by MALDI-TOF mass spectrometry of urinary sediment glycosphingolipids in Fabry disease. *Anal Bioanal Chem*. 2005;382(5):1209-16.
40. Kanekura T, Fukushige T, Kanda A, Tsuyama S, Murata F, Sakuraba H, et al. Immunoelectron-microscopic detection of globotriaosylceramide accumulated in the skin of patients with Fabry disease. *Br J Dermatol*. 2005;153(3):544-8.
41. Fortelius M, Mattjus P. Galactose oxidase action on galactose containing glycolipids—a fluorescence method. *Chem Phys Lipids*. 2006;142(1-2):103-10.
42. Rozenfeld PA, De Francesco NP, Borrajo GJ, Ceci R, Fossati CA. An easy and sensitive method for determination of globotriaosylceramide (Gb3) from urinary sediment: utility for Fabry disease diagnosis and treatment monitoring. *Clin Chim Acta*. 403. Netherlands2009. p. 194-7.
43. Askari H, Kaneski CR, Semino-Mora C, Desai P, Ang A, Kleiner DE, et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Arch*. 2007;451(4):823-34.
44. Namdar M, Gebhard C, Studiger R, Shi Y, Mocharla P, Schmied C, et al. Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease. *PLoS One*. 7. United States2012. p. e36373.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

