



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare e Clinica

Coordinatore: Prof. Antonino Tuttolomondo

**VALUTAZIONE DI ALCUNI BIOMARKERS DI  
STRESS OSSIDATIVO E DELLA FREQUENZA  
DEGLI APLOGRUPPI MITOCONDRIALI IN UNA  
POPOLAZIONE DI PAZIENTI CON MALATTIA  
DI ANDERSON-FABRY**

**Tesi di Dottorato di**  
*Dott.ssa Irene Simonetta*

**Coordinatore:**  
*Ch.mo Prof. Antonino Tuttolomondo*

**Tutor:**  
*Ch.mo Prof. Antonino Tuttolomondo*



## **INDICE**

### **CAPITOLO 1: LA MALATTIA DI ANDERSON-FABRY: UNA MALATTIA RARA DI INTERESSE INTERNISTICO**

#### **1.1 EPIDEMIOLOGIA**

#### **1.2 BIOCHIMICA, GENETICA MOLECOLARE, EREDITARIETÀ**

#### **1.3 MANIFESTAZIONI CLINICHE**

##### **1.3.1 Acroparestesie**

##### **1.3.2 Angiocheratoma e ipoidrosi**

##### **1.3.3 Alterazioni oftalmologiche**

##### **1.3.4 Coinvolgimento dell'apparato respiratorio**

##### **1.3.5 Coinvolgimento dell'apparato gastrointestinale**

##### **1.3.6 Coinvolgimento osteoarticolare**

##### **1.3.7 Cuore**

##### **1.3.8 Sistema nervoso centrale**

##### **1.3.9 Rene**

#### **1.4 MATERIALI E METODI PER LA DIAGNOSI**

##### **1.4.1 Diagnosi**

##### **1.4.2 Genetica molecolare**

###### **1.4.2.1 genetica molecolare addizionale**

## **1.5 TERAPIA**

### **CAPITOLO 2: LA MALATTIA DI ANDERSON-FABRY E LO STRESS OSSIDATIVO: REVISIONE DELLA LETTERATURA**

#### **2.1 Ruolo del GB3 nella “disregolazione” dei sistemi di controllo cellulare dello stato ossidativo**

#### **2.2 Disfunzione endoteliale**

#### **2.3 Alterazioni del DNA**

#### **2.4 Ruolo di una possibile compromissione della funzione mitocondriale nello stress ossidativo**

### **CAPITOLO 3: GLI APLOGRUPPI DEL DNA MITOCONDRIALE POSSONO INFLUENZARE IL FENOTIPO DELLA MALATTIA DI FABRY?**

#### **3.3 Mitocondrio e genoma mitocondriale**

#### **3.3 Aplogruppi del DNA mitocondriale e neurodegenerazione**

#### **3.3 Aplogruppi del mtDNA e malattia di Anderson-Fabry: stato dell’arte**

### **CAPITOLO 4. PROGETTO DI RICERCA: VALUTAZIONE DI ALCUNI BIOMARKERS DI STRESS OSSIDATIVO ED ANALISI DELLA FREQUENZA DEGLI APLOGRUPPI MITOCONDRIALI IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI CON MALATTIA DI ANDERSON-FABRY**

#### **4.5.1 Background**

#### **4.5.1 Obiettivi dello studio**

#### **4.5.1 Pazienti**

#### **4.5.1 Disegno dello studio e metodi**

#### **4.5.1 Aspetti etici**

**4.5.1 Comitato etico**

**4.5.1 Consenso informato**

**4.5.1 Riservatezza**

**4.5.1 Conservazione della documentazione e dei campioni**

**4.5.1 Assicurazione**

**4.5.1 Analisi statistica**

**4.5.1 Risultati**

**4.5.1 Discussione**

**4.5.1 Tabelle**

**BIBLIOGRAFIA**

# 1. LA MALATTIA DI ANDERSON-FABRY: UNA MALATTIA RARA DI INTERESSE INTERNISTICO

La malattia di Anderson-Fabry (mAF) è stata descritta per la prima volta nel 1898 da due dermatologi, Johannes Fabry e William Anderson, indipendentemente l'uno dall'altro, in Germania e Inghilterra. La Malattia di Fabry è la seconda più comune tra le malattie d'accumulo lisosomiale, dopo la malattia di Gaucher.

Si tratta di una malattia lisosomiale sistemica, progressiva ed ereditaria, una sfingolipidosi, in cui l'accumulo di sfingolipidi neutri nelle cellule di diversi apparati e sistemi è responsabile delle manifestazioni cliniche. È causata da una mutazione nel gene  $\alpha$  galattosidasi A (GLA), situato sul cromosoma X, che determina l'assenza o la significativa riduzione dell'attività dell'enzima  $\alpha$  galattosidasi A ( $\alpha$ -GAL A) a valori inferiori al 10% del normale. [1,2]

## 1.1. EPIDEMIOLOGIA

La mAF è stata da sempre considerata una patologia rara ed è inclusa tra le "*orphan diseases*". [1, 2] Ha una prevalenza, verosimilmente sottostimata, che varia da 1 a 5 casi ogni 100.000, precedentemente stimata da uno su 40000 a uno su 117000 nei soggetti di sesso maschile [3]. Questi dati sono stati recentemente rivisti, infatti i programmi di screening sui neonati suggeriscono una frequenza inaspettatamente alta di mutazioni del gene GLA che causano malattia [4]; inoltre il diffuso impiego dei test genetici tra i pazienti con manifestazioni lievi a insorgenza tardiva o sintomatologia dubbia ha permesso di individuare numerose nuove mutazioni nel corso degli ultimi 10 anni [5] tra cui mutazioni introniche e polimorfismi a singolo nucleotide il cui ruolo richiede ancora di essere ben definito, pur apparendo, recentemente, contribuire alla estrema variabilità clinica estrema e alla differente severità della malattia.

Se si valutano, alcuni gruppi selezionati di pazienti, come ad esempio, maschi che sviluppano ipertrofia ventricolare sinistra (IVS), definita come spessore massimo di parete  $\geq 13$  mm, o cardiomiopatia ipertrofica (CMI), con spessore  $\geq 15$  mm, la prevalenza è di circa l'1%, e anche oltre, se si considerano, ad esempio i maschi diagnosticati in età adulta. [6, 7, 8, 9, 10].

Fino ad oggi non è stata descritta alcuna predisposizione etnica, anche se esistono zone ad elevata prevalenza (es. Canada e West Virginia-USA).

Benché l'accumulo di sfingolipidi inizi precocemente, tanto da essere stato descritto in vari organi e tessuti anche durante lo sviluppo fetale, l'esordio dei sintomi, di solito neurologici, avviene generalmente nei maschi, in media a 5-6 anni d'età, e nelle femmine intorno ai 9-10 anni.

In alcuni soggetti la malattia può avere un'insorgenza tardiva o "atipica", con coinvolgimento prevalente di un solo organo.

In entrambi i sessi la mAF viene diagnosticata con un ritardo, in media, di 20 anni, solitamente imputabile alla scarsa conoscenza della malattia e dei percorsi diagnostici al di fuori dei centri specializzati, e all'ampio spettro di manifestazioni cliniche che rende difficile la diagnosi differenziale. Il ritardo diagnostico riduce la qualità di vita dei pazienti, che solitamente consultano diversi specialisti e vengono sottoposti a numerose indagini diagnostiche prima di arrivare ad una diagnosi certa: numerose e diverse sono le diagnosi fatte durante il percorso. [11]

La prognosi nel paziente diagnosticato tardivamente può essere peggiore in relazione alla severità del danno d'organo, in particolare cuore, rene e sistema nervoso centrale, che può essere ormai avanzato e verosimilmente irreversibile.

Dati epidemiologici sulla storia naturale della malattia, rilevati negli anni precedenti l'introduzione della terapia enzimatica sostitutiva, mostrano una ridotta sopravvivenza in entrambi i sessi riportando un'aspettativa di vita intorno ai 58,2 anni nei maschi e ai 75,4 anni nelle femmine [12]

## **1.2. BIOCHIMICA, GENETICA MOLECOLARE, EREDITARIETÀ**

Gli sfingolipidi sono lipidi complessi, distribuiti in tutti i tessuti in quanto parte integrante delle membrane plasmatiche, componenti abbondantemente rappresentati delle membrane del reticolo endoplasmatico e dell'apparato del Golgi. Vengono trasportati nel plasma legati alle lipoproteine a bassa densità (LDL).

Gli sfingolipidi sono formati da una catena polisaccaridica legata al ceramide, sfingosina e acido grasso, unito da una catena di zuccheri legati tra loro con legami glicosidici  $\alpha 1 \rightarrow 4$  o  $\beta 1 \rightarrow 4$ .

Il catabolismo degli sfingolipidi avviene mediante idrolasi lisosomiali specifiche tra cui l' $\alpha$ -galattosidasi A che in condizioni di normalità determina il distacco del galattosio da sfingolipidi complessi e garantisce il riutilizzo di questi prodotti da parte della cellula. (Fig. 1). Nella malattia di Fabry i glicolipidi come il globotriaosylceramide (GB3), si accumulano nell'endotelio vascolare di diversi organi tra cui cute, reni, cuore, sistema nervoso, innescando così l'infiammazione e la fibrosi. Questi processi generalmente risultano in disfunzione d'organo, che rappresenta solitamente la prima evidenza clinica di malattia di Fabry. [13]

Benché il processo patologico primario, quale l'accumulo di GB3, inizi nelle fasi precoci della malattia, il decorso della malattia in particolare il progressivo coinvolgimento di organi vitali, come malattia renale terminale o scompenso cardiaco, può differire ampiamente tra i pazienti perfino in individui con lo stesso genotipo sottostante. Il difetto enzimatico porta all'accumulo di glicosfingolipidi con residui terminali alpha galattosidici nel plasma e nei lisosomi delle cellule endoteliali, periteliali e cellule muscolari lisce, in minor misura nelle cellule reticoloendoteliali miocardiche e tessuto connettivo. Il processo di accumulo di GB3, che inizia fin dalla nascita, può

essere subclinico per molti anni fino a quando i successivi processi patologici causino la disfunzione d'organo portando alla diagnosi di patologie specifiche. L'insorgenza di una disfunzione d'organo clinicamente evidente si verificherebbe ad uno stadio tardivo della malattia. [14]

Il gene che codifica per l'alpha galattosidasi A è localizzato sul cromosoma X, nella regione Xq22, e viene trasmesso come carattere X-linked. Il gene consiste di 7 esoni distribuiti su 12436 coppie di basi, codifica per un precursore di 429 amminoacidi, che include un peptide segnale di 31 residui. Numerosi studi hanno dimostrato l'eterogeneità molecolare della malattia di Fabry riportando, secondo stime più recenti quasi 1000 mutazioni, con alcuni "hot spot" dove si localizzano più frequentemente; una gran parte di queste mutazioni sono mutazioni *private* cioè specifiche per una particolare famiglia. Circa il 75% delle alterazioni geniche determinanti la malattia sono mutazioni puntiformi, nonsense o missenso; il restante 25% è costituito da riarrangiamenti, inserzioni, delezioni, difetti di splicing e del codone di stop, che determinano l'assenza, la riduzione o la severa alterazione funzionale dell'enzima che non è in grado di svolgere efficacemente la sua funzione, comportando l'accumulo, nei lisosomi delle cellule, di diversi tipi di sfingolipidi. Quest'ultimi, nei soggetti con mAF, sono presenti in quantità dalle 30 alle 300 volte maggiori. Nella mAF si accumula prevalentemente il globotriaosilceramide (GB3) e, in misura minore, il galabiosilceramide (Ga). Altri 2 sfingolipidi caratterizzano le membrane degli eritrociti di individui di gruppo sanguigno B e B1 e sono presenti solo in questi soggetti. Ne segue che pazienti affetti da mAF, ma di gruppo B o AB, accumuleranno 4 tipi di sfingolipidi, cioè il GB3, il Ga e quelli di gruppo B e B1.

La mutazione è trasmessa secondo le regole dell'ereditarietà diaginica. Pertanto il carattere si manifesta chiaramente nei maschi che lo ereditano dalle madri portatrici eterozigoti. Le femmine affette hanno il 50% di probabilità di trasmettere la mutazione ai figli, che saranno eterozigoti se femmine, ed emizigoti se maschi.

La penetranza nel maschio è quasi del 100%, mentre nella femmina eterozigote è circa il 70%. Data l'alta penetranza non è corretto definire la donna "portatrice sana".

Il fenomeno del mosaicismo o "Lyonizzazione", proposto dalla genetista M.Lyon (1961,1998), costituisce l'ipotesi più accreditata per spiegare le manifestazioni della malattia nelle donne. Secondo tale ipotesi uno dei 2 cromosomi X delle cellule somatiche delle femmine è inattivato, per un processo che coinvolge le sequenze ripetitive del DNA, mentre l'altro, rimanendo attivo, fornisce tutte le informazioni genetiche (fig.2). L'inattivazione è casuale: ne segue che a seconda del numero di X inattive, quelle con l'allele normale o quelle con il carattere di Fabry, la femmina eterozigote può presentare una grande variabilità nella espressione clinica del fenotipo che può manifestarsi con uno spettro che va dalla normalità ad un quadro sintomatologico grave.

È tuttavia probabile che entrino in gioco anche altri fattori, che modulano l'espressione genica.

La struttura tridimensionale della  $\alpha$  GAL A umana è stata definita con la cristallografia a raggi X. Il sito attivo dell'enzima, formato da 15 residui amminoacidici, ha una configurazione specifica per l'attività di  $\alpha$  galattosidasi; esso è formato dalle catene laterali dei residui W47, D92, D93, Y134, C142, K168, D170, C172, E203, L206, Y207, R227, D231, D266, M267. L'enzima usa un meccanismo di reazione di doppia sostituzione, dove due consecutivi attacchi nucleofili sul carbonio anomero del substrato portano alla rottura del legame glicosidico con mantenimento dell'anomero del prodotto. Nella  $\alpha$  GAL A umana il nucleofilo catalitico è D170 e l'acido/base catalitico è D231. [15, 16, 17, 18, 19].

L'isolamento e il sequenziamento del cDNA e dell'intera sequenza del gene dell' $\alpha$  galattosidasi A umano ha permesso l'individuazione e la caratterizzazione delle mutazioni che causano la mAF.

Una mutazione patogenetica compromette la sintesi, il processamento e la stabilità della proteina  $\alpha$ -galattosidasi A, portando alla perdita o riduzione dell'attività enzimatica; cambiamenti nel core idrofobico della proteina causano difetti nel folding proteico. Altre mutazioni sono raggruppate in una terza categoria che include mutazioni che causano la rottura dei legami disolfidici o la perdita dei siti di glicosilazione N-linked e infine mutazioni che compromettono l'attività enzimatica per meccanismi non del tutto sconosciuti; appare interessante che mutazioni introni che possano agire in tal senso. [20]

In generale mutazioni che causano il fenotipo severo della malattia tendono ad interessare siti nascosti della proteina mentre mutazioni che causano il fenotipo moderato tendono ad essere meno distruttive del core idrofobico.

I residui amminoacidici in cui più frequentemente sono state localizzate le mutazioni, sono i seguenti (figura 3):

**TRIPTOFANO.** Ha la più alta frequenza di mutazioni tra gli amminoacidi dell' $\alpha$  GAL A. I triptofani sono solitamente targets di mutazioni nonsense. Esso contribuisce alla formazione del core idrofobico della proteina, pertanto mutazioni puntiformi di questo residuo possono influenzare in modo negativo il corretto ripiegamento interno del polipeptide.

**CISTEINA.** È il secondo residuo più comunemente mutato. Tutte le cisteine interessate da mutazioni sono coinvolte in legami disolfuro; questi ultimi conferiscono stabilità alla proteina ripiegata. Mutazioni in questo residuo si associano a forme severe piuttosto che moderate.

**GLICINA.** Le mutazioni che interessano tale residuo amminoacidico alterano la stabilità della proteina.

**ARGININA e LISINA.** La catena laterale dell'arginina ha sia una porzione alifatica che un gruppo guanidinico planare carico; l'arginina può fare, pertanto, interazioni idrofobiche e idrofiliche. La preponderanza di mutazioni che interessano l'arginina contrasta con la scarsità di mutazioni a carico

della lisina che è chimicamente simile, sottolineando l'importanza dell'arginina nel folding della proteina.

**RESIDUI CARICHI.** Le mutazioni che interessano i residui carichi sono comuni. Le mutazioni puntiformi che producono una carica spaiata o fuori posto destabilizzano la conformazione della proteina.

**RESIDUI NASCOSTI.** Queste mutazioni creano polipeptidi con folding difettoso, in cui il core idrofobico è distrutto e l'enzima non è in grado di ripiegarsi o di rimanere conformato nell'ambiente acido del lisosoma.

**SITI DI LEGAME DEI CARBOIDRATI.** L'  $\alpha$  GAL A contiene 4 potenziali siti di attacco per i carboidrati N-legati (N139, N192, N215, N408) uno dei quali (N408) non è usato. I 3 siti si trovano nel dominio 1. N215 è il solo sito di attacco interessato da mutazioni che producono una variante moderata della malattia.

**MUTAZIONI VICINO AL SITO ATTIVO.** La più alta frequenza di mutazioni interessa la regione compresa entro 10 angstrom dal sito di legame del galattosio. Il sito attivo è estremamente sensibile alle mutazioni, perfino sostituzioni conservative (D92N) possono dar luogo ad una completa perdita dell'attività enzimatica.

**INTERFACCIA TRA I 2 DOMINI.** L' $\alpha$  GAL A si comporta come un omodimero con un'ampia interfaccia tra i 2 monomeri. L'interfaccia mantiene l'orientamento dei 2 domini. Il dominio 2, pur avendo una funzione non nota, è richiesto per la stabilità dell'enzima, le mutazioni che lo interessano, infatti, possono condurre alla perdita completa dell'attività enzimatica.

**HOT SPOTS.** Nella sequenza amminoacidica lineare 3 segmenti hanno una maggiore frequenza di mutazioni: le porzioni comprese tra gli amminoacidi: 162-172; 215-231; 258-269. Il primo segmento circonda il foglietto  $\beta$ 4, il secondo include l'elica  $\alpha$ 5 e il foglietto  $\beta$ 6, il terzo include il foglietto  $\beta$ 7.

**MUTAZIONI DI STOP.** Esse producono una proteina mal ripiegata con una catena polipeptidica più corta; talvolta non viene prodotta alcuna proteina a causa della precoce degradazione dell'mRNA. Indipendentemente dal dominio interessato ,esse si associano ad un fenotipo severo. [21]

Le mutazioni di splicing sono state trovate nelle regioni fiancheggianti gli esoni, risultando in uno scivolamento di esoni o in un'alterata lettura del sito di splice; quelle fino ad ora riportate sono delle sostituzioni o delezioni a singole basi a livello dei dinucleotidi invarianti di un introne. [22]

Lo studio genetico è importante in ogni famiglia con malattia di Fabry perché l'identificazione di queste mutazioni consente una precisa individuazione dei portatori eterozigoti del gene X-linked recessivo e offre la possibilità di fare una diagnosi prenatale. La scoperta di nuove mutazioni è utile per valutare la correlazione genotipo-fenotipo e fornisce una migliore interpretazione dei rapporti struttura-funzione dell'enzima.

Nonostante la malattia di Fabry sia considerata un disordine recessivo X-linked, le donne affette vengono sempre più riconosciute suggerendo che la malattia sembra seguire una trasmissione X-linked dominante piuttosto che recessiva.

### **1.3. MANIFESTAZIONI CLINICHE**

La malattia di Anderson Fabry colpisce sia maschi che femmine che mostrano l'intero pattern dei segni clinici e dei sintomi che presentano i maschi, benchè con un ritardo nella loro comparsa di circa 10 anni. L'attuale migliore conoscenza del decorso e storia naturale della malattia suggerisce che è più appropriato descrivere la malattia di Fabry come una malattia con un ampio spettro di fenotipi clinici caratterizzati da una progressione eterogenea.

Si distingue una forma classica, con esordio in età giovanile, che presenta un corteo sintomatologico che interessa progressivamente le terminazioni nervose periferiche, la cute, l'occhio, l'apparato cardiovascolare, il sistema nervoso centrale, il rene, il cuore, gli apparati respiratorio, gastrointestinale e locomotore; una variante cardiaca, che si manifesta in alcuni soggetti maschi, per il resto asintomatici, che hanno un'attività enzimatica residua compresa tra l'1% e il 10% dell'attività totale, ma presentano solo le manifestazioni cardiache; una variante renale per i pazienti con un coinvolgimento predominante o esclusivo cardiaco o renale [23, 24, 25] Varianti della malattia sono state anche descritte nelle femmine eterozigoti che diventano sintomatiche in rapporto al grado di inattivazione del cromosoma X; in queste forme sono sempre predominanti il coinvolgimento cardiaco e/o renale. [26]

La forma classica della malattia insorge nei maschi durante l'infanzia o adolescenza con ipoidrosi, intolleranza al caldo e al freddo, acroparestesie, angiocheratomi, cornea verticillata, sintomi gastrointestinali, disturbi uditivi. Il progressivo danno a carico degli organi vitali come rene, cuore, cervello compare dopo la seconda decade, portando ad una compromissione funzionale severa e alla morte attorno all'età di 50 anni. Sono stati riportati anche dei casi di molte forme ad insorgenza tardiva con coinvolgimento tardivo di un solo organo o di due (principalmente cuore e/o rene). Questa seconda condizione si associa generalmente a mutazioni del gene GLA che risultano in una limitata attività residua dell'enzima.

Nel corso dell'ultima decade il Fabry Outcome Survey (FOS) ha raccolto dei dati sulla storia naturale della malattia di Fabry e sull'efficacia a lungo termine e la sicurezza della terapia enzimatica sostitutiva. Un lavoro di Metha e collaboratori [27] ha fornito una prima analisi sui dati del FOS, analizzando le manifestazioni cliniche di base e le cause di morte in una coorte di 1453 pazienti (699 maschi, 754 femmine) da 19 diversi paesi. I segni e i sintomi più frequentemente riportati sono stati

neurologici, cardiaci, oculari, gastrointestinali dermatologici, uditivi; comuni anche le manifestazioni renali. La principale causa di morte riportata tra i 42 pazienti arruolati e deceduti tra il 2001 e il 2007 è stata la cardiopatia sia nei pazienti di sesso maschile (34%) che femminile (57%). Questi dati suggeriscono che la mortalità per malattia renale in pazienti con malattia di Fabry si sta riducendo, mentre è in aumento la mortalità per cardiopatia. Questo andamento riflette probabilmente i miglioramenti nel management della nefropatia nei pazienti con malattia di Fabry. I risultati di questo studio delineano ulteriormente il profilo clinico di una malattia multi organo. Un altro studio condotto da Wilcox e collaboratori ha utilizzato il Fabry Registry per raccogliere i dati longitudinali sulla malattia di Fabry. Il 69,4% delle 1077 femmine arruolate nel registro Fabry presentava segni e sintomi di malattia. L'età media di insorgenza dei sintomi tra le femmine era 13 anni; nonostante l'84% avesse una storia familiare positiva, la diagnosi non veniva posta fino a circa un'età media di 31 anni. Il 20% manifestava eventi cerebrovascolari maggiori, cardiaci o renali ad un'età media di 46 anni. La qualità di vita risultava compromessa ad un'età più tardiva rispetto ai maschi, ma entrambi i sessi lamentavano una significativa alterata qualità di vita dalla terza decade. I risultati di questi studi mostrano che le femmine hanno un significativo rischio di coinvolgimento d'organo e di ridotta qualità di vita. [28]

Numerosi studi di coorte e registri post marketing, pubblicati in letteratura, hanno descritto la storia naturale della malattia di Fabry nei maschi e nelle femmine, dimostrando che, nonostante un'attività enzimatica residua, le femmine possono sviluppare i segni e i sintomi della malattia come ipertrofia ventricolare sinistra, ictus, proteinuria e in minor misura insufficienza renale. La prevalenza delle acro parestesie varia tra il 23% e il 90 % nelle diverse coorti di studi. Questi lavori hanno inoltre riportato un'elevata prevalenza di sintomi aspecifici come faticabilità, palpitazioni, dolore toracico, dolore addominale diarrea nelle femmine con malattia di Fabry (figura 4) [29, 30, 31, 32]

### **1.3.1. Acroparestesie**

Le acroparestesie sono clinicamente evidenti nell'80-90% dei pazienti. Si manifestano come parestesie, solitamente urenti, che interessano più frequentemente il palmo delle mani e la pianta dei piedi con variabile irradiazione prossimale; si ritiene siano secondarie all'accumulo di GB3 nelle cellule dei gangli spinali. Le crisi sono scatenate da febbre, sforzi fisici, esposizione a calore e solo talvolta al freddo. [33, 34, 35]

### **1.3.2. Angiocheratoma e Ippoidrosi**

Sono lesioni puntiformi, rosse, maculose o papulose, talora coperte da ipercheratosi, circondate da eritema, che non scompaiono alla diascopia. Sono causate da venule collettrici intradermiche dilatate

per l'accumulo di GB3 nella parete. Si localizzano solitamente tra ombelico e ginocchia e spesso in modo simmetrico, potendosi comunque presentare anche agli arti superiori, sulle mucose esplorabili e sul padiglione auricolare. In pochi casi, e soprattutto nelle forme atipiche della malattia, l'angiocheratoma può mancare del tutto.

L'accumulo di GB3 nelle pareti delle ghiandole esocrine e nelle pareti dei vasi sanguigni afferenti provoca una riduzione sensibile della produzione di sudore (ipoidrosi) fino all'assenza totale (anidrosi) nella maggior parte dei pazienti affetti (80%). Per tale motivo i pazienti sono particolarmente suscettibili al colpo di calore, mal tollerando le alte temperature e lo sforzo fisico a seguito dei quali compaiono nausea, dispnea fotofobia, cefalea fino a perdita di coscienza. L'ipodrosi contribuisce in tal modo allo sviluppo delle crisi dolorose acroneuropatiche. Visto il meccanismo comune, nei pazienti con ipoidrosi sono concomitanti xerostomia e xeroftalmia. [36, 27, 38]

### 1.3.3. Alterazioni oftalmologiche

Le alterazioni oftalmologiche e in particolare la cornea verticillata si riscontrano nel 70% dei pazienti e delle femmine eterozigoti. La lampada a fessura dimostra opacità flocculari disposte radialmente, di colorito bruno, costituite da depositi di Gb3. La **cornea verticillata** è asintomatica, non comportando alcuna alterazione della vista. Non si tratta di un segno patognomonico in quanto si può riscontrare anche in corso di terapia protratta con amiodarone e cloroquina. Con il progredire degli anni gli accumuli di Gb3 possono causare anche una **cataratta subcapsulare**, distribuendosi sia nel versante anteriore sia in quello posteriore della lente. La cataratta anteriore è osservabile in circa un terzo dei maschi affetti; la posteriore, definita come cataratta di Fabry, può essere evidente anche nella femmina.

L'esame della retina consente frequentemente l'osservazione di una spiccata tortuosità dei vasi. [39, 40]

### 1.3.4. Coinvolgimento dell'apparato respiratorio

I depositi di Gb3 nelle cellule epiteliali respiratorie provocano un'ostruzione che evolve lentamente ma può arrivare ad essere molto grave. Quest'osservazione è stata dimostrata con lo studio delle prove di funzionalità respiratoria e con l'esame istologico tramite broncoscopia. Le alterazioni polmonari predispongono a infezioni respiratorie ricorrenti e alla malattia ostruttiva cronica nei pazienti più anziani. [41]

### 1.3.5. Coinvolgimento dell'apparato gastrointestinale

I pazienti con mAF soffrono spesso di dolori postprandiali, crampi addominali, nausea e vomito. Alcuni studi hanno dimostrato nei pazienti un ritardato svuotamento gastrico. Queste manifestazioni portano spesso a diagnosi errate di coliche renali o appendicite. Anoressia, rigurgiti e vomito sono manifestazioni frequenti. Le perforazioni intestinali sono dovute al precoce riscontro di diverticoli, anche in età pediatrica. Occasionalmente la diarrea, l'anoressia e la perdita di peso sono sintomi estremamente precoci, comparando ancora prima delle acroparestesie. Il peso corporeo e l'indice di massa corporea sono minori rispetto alla popolazione normale per un malassorbimento intestinale dovuto all'accumulo di Gb3 nel piccolo intestino. [42]

### **1.3.6. Coinvolgimento osteoarticolare**

Possono essere presenti alterazioni ossee: è caratteristica la deformazione dell' articolazione distale interfalangea delle dita che si concretizza con una ridotta estensione oltre ad anomalie strutturali delle mani (ossificazioni o inserimento di strutture fibrose). L'osteonecrosi della testa del femore si può osservare nei pazienti anziani, così come l'osteoporosi è frequentemente osservata nei pazienti in trattamento dialitico. [43]

Più tardivamente, in età variabile, ma solitamente dopo la seconda decade, i pazienti, in particolare i maschi, presentano segni e sintomi riferibili al danno d'organo renale, cardiovascolare o del sistema nervoso centrale (*Fig. 16*). L'ipertensione arteriosa è una delle prime manifestazioni cliniche e può complicare sia il danno renale che cardiovascolare.

Le principali manifestazioni debilitanti della malattia di Fabry risultano da un progressivo accumulo di globotriaosilceramide nell'endotelio vascolare causando ischemia e infarto specialmente in rene, cuore, cervello.

### **1.3.7. Cuore**

Le principali manifestazioni cliniche della malattia di Fabry consistono in complicanze vascolari arteriose (come malattie cerebrali e nefropatie) ma la fisiopatologia di questa specifica vasculopatia non è chiara. Diversi studi indicano che specifiche lesioni vascolari si verificano come risultato di una disfunzione vascolare con componenti maggiori rappresentati da disfunzione endoteliale, alterazioni nella perfusione cerebrale e fenotipo protrombotico. Probabilmente altri fattori di rischio cardiovascolari possono contribuire ad incrementare l'aterotrombogenesi e un peggioramento della performance arteriosa. [44]

Le manifestazioni cardiovascolari sono estremamente eterogenee con grande variabilità di alterazioni in rapporto al sesso e all'età dei pazienti. Il danno cardiaco è dovuto al deposito intracellulare e poi anche extracellulare di GB3 nei cardiomiociti, nel tessuto di conduzione, nelle valvole, nelle cellule endoteliali, con conseguente fibrosi progressiva sostitutiva. Il deposito di lipidi e la fibrosi del tessuto

di conduzione sono responsabili di differenti aritmie: aumentata suscettibilità alla tachicardia sopraventricolare, riduzione dell'intervallo PR, extrasistoli ventricolari, blocco atrioventricolare completo, allargamento dei complessi QRS negli stadi avanzati della malattia; tardivamente possono insorgere fibrillazione atriale e aritmie ventricolari.

Il deposito di GB3 nei cardiomiociti provoca disfunzione meccanica cellulare e stimola lo sviluppo di ipertrofia delle fibre muscolari, che si esprime con un progressivo aumento dello spessore parietale, osservabile dalla terza decade. L'ipertrofia interessa il setto interventricolare, coinvolge tutte le pareti del ventricolo sinistro (VS) e spesso anche del ventricolo destro (VD). In gran parte dei casi l'IVS è di grado lieve e concentrica, talvolta può essere anche asimmetrica e coinvolgere solo l'apice ventricolare oppure massiva con spessore massimo fino a 30 mm.

Frequente è anche la sintomatologia anginosa riferibile ad ischemia miocardica da disfunzione microvascolare. Questa è secondaria alla disfunzione endoteliale e all'ipertrofia della media delle arteriole intramurali; può essere responsabile di ischemia focale e fibrosi sostitutiva.

Spesso è presente un grado lieve-moderato di rigurgito mitralico e/o aortico. La morte avviene spesso per scompenso e, più raramente, per morte improvvisa. [45, 46, 47, 48, 49, 50, 51]

Controverso è stabilire se l'accumulo nelle cellule endoteliali e lo stato pro trombotico costituiscano l'origine del danno arterioso o se la proliferazione di cellule muscolari lisce nello stato medio dell'arteria sia lo step iniziale nella cascata che porta alla vasculopatia di Fabry.

Un attento monitoraggio cardiaco è specialmente importante nelle femmine adulte portatrici, che spesso sviluppano disordini urinari e/o ipertrofia ventricolare sinistra come le uniche manifestazioni della loro malattia tardiva. Nei pazienti maschi l'ipertrofia del ventricolo sinistro inizia durante l'adolescenza; essa si accompagna a ridotta funzione longitudinale. L'ipertrofia in questi pazienti maschi progredisce abbastanza velocemente e infine causa una fibrosi. La progressione verso una ipertrofia severa in pazienti femmine avviene più lentamente a causa di un'attività residua dell'alfa galattosidasi A. L'incremento dello spessore di parete miocardica appare essere un marcatore precoce indicando un cambiamento morfologico definitivo come conseguenza dell'accumulo di glicosfingolipidi. La seconda caratteristica morfologica tipica è il *late enhancement* nel ventricolo sinistro che è descritto come un marker di fibrosi miocardica. Uno studio di Weidemann e al. [52] ha mostrato che il 50% dei loro pazienti arruolati presentava un *late enhancement* prevalentemente nella parete inferolaterale del LV; il meccanismo sottostante di questo pattern intramurale non è chiaro. Un'etiologia ischemica appare poco probabile dal momento che precedenti studi escludono la coronaropatia in questo gruppo di pazienti e la necrosi ischemica usualmente inizia nel subendocardio inducendo infine una riduzione nello spessore di parete nella fase cronica. Poiché il carico di lavoro per il ventricolo sinistro è maggiore nella parete inferolaterale, questo potrebbe favorire lo sviluppo

di fibrosi miocardica in questi segmenti perché un elevato carico di lavoro può aumentare lo stress locale di parete. [53]

### **1.3.8. Sistema nervoso centrale**

Le manifestazioni neurologiche della malattia di Fabry includono sia un coinvolgimento del sistema nervoso centrale che periferico con accumulo di globotriaosilceramide osservato nelle cellule di Schwann e nei gangli delle radici dorsali e depositi nei neuroni del SNC. Il principale coinvolgimento è attribuibile ad una cerebrovasculopatia con un incremento dell'incidenza di ictus. Le lesioni neurologiche ischemiche si manifestano in 1/3 dei casi, dalla terza decade di età, in entrambi i sessi. Gli attacchi ischemici sono responsabili di convulsioni e anche di emiparesi, disartria, nistagmo, diplopia o disturbi della capacità di concentrazione. Oltre al quadro classico, sono state descritte forme diverse: manifestazioni aggressive, con prevalenti manifestazioni a carico del SNC in soggetti giovani; infarti lacunari ricorrenti, con buon recupero nei maschi; infarti lacunari multipli, più frequenti nelle donne di 45-50 anni d'età. [54, 55].

La patogenesi della vasculopatia rimane poco chiara ma probabilmente è in parte correlata ad un controllo funzionale anomalo dei vasi secondario alla disfunzione endoteliale come una conseguenza del deficit di alpha-galattosidasi A. La vasculopatia ostruttiva sia primaria dovuta all'accumulo di glicolipidi o secondaria alla conseguente infiammazione e a fattori di rischio vascolari confondenti può svilupparsi in risposta ad un'anomala funzione endoteliale e vascolare di parete simile a quella osservata con l'accumulo di lipidi ricchi in colesterolo durante l'aterosclerosi. Il coinvolgimento del sistema nervoso periferico colpisce principalmente le piccole fibre A e C e si correla ad un'alterata funzione autonoma e al dolore neuropatico trovato nella malattia di Fabry. La diagnosi di malattia di Fabry dovrebbe essere tenuta in considerazione in giovani pazienti che manifestano un ictus ischemico. Nelle donne la prevalenza di eventi cerebrovascolari sembra essere tanto elevata quanto nei maschi.

L'incremento patologico di segnale del pulvinar nella sequenza MR T1 pesate sembra essere causato da calcificazioni come conseguenza di una alterata circolazione locale. In un recente studio le cellule della corteccia cerebrale, talamo, gangli basali, amigdala, nuclei cerebellari e olivari mostravano un marcato accumulo di lipofusina. Gli esami biochimici documentavano un incremento di tre volte dei galattolipidi dovuto ad un deficit specifico di  $\alpha$ -galattosidasi A [53]

### **1.3.9. Rene**

il coinvolgimento renale, dovuto all'accumulo di GB3 nelle cellule del glomerulo e del tubulo, è costante nei pazienti con mAF. Il deposito di GB3 comincia nel glomerulo e successivamente si

localizza anche nei vasi e nelle zone tubulari, con una progressiva espansione delle cellule mesangiali, della matrice e fibrosi. Le caratteristiche clinico-chimiche comprendono inizialmente microalbuminuria e proteinuria, incremento della creatinemia e, poi, riduzione del filtrato glomerulare. I primi sintomi possono comparire prima della pubertà, e l'evoluzione porta a grave insufficienza renale. Un quadro di insufficienza renale progressiva fino al trattamento dialitico e al trapianto si raggiunge tra i 20 e i 40 anni nei maschi, più tardivamente nella maggioranza delle femmine. [56]

I primi segni di danno renale possono evidenziarsi e progredire fin dall'infanzia prima della comparsa di chiari segni di disfunzione renale, documentabili attraverso esami di routine.. Una diagnosi precoce e tempestiva di nefropatia è cruciale al fine di iniziare precocemente la terapia così da rallentare la progressione della disfunzione renale. Si tratta pertanto di una sfida per la difficoltà di diagnosi nei bambini e per l'assenza di biomarcatori sensibili e non invasivi che permettano di identificare una nefropatia precocemente. La biopsia renale assume un valore fondamentale per fornire rilevanti informazioni istologiche sulla funzione renale e la prognosi, costituendo altresì uno strumento per guidare la decisione di intraprendere la terapia in giovani pazienti.

La nefropatia è caratterizzata da un iniziale proteinuria che compare tra la seconda e la terza decade e dallo sviluppo di cambiamenti strutturali inclusi la glomerulosclerosi, l'atrofia tubulare e la fibrosi interstiziale.

Alla luce della crescente evidenza che il danno renale è maggiormente correlato al grado di fibrosi e di tessuto cicatriziale, la prevenzione dello sviluppo di questi cambiamenti irreversibili attraverso l'inizio della ERT può aver un grande impatto sull'outcome renale. L'esame istologico dei campioni bioptici documenta comunemente un diffuso accumulo intracitoplasmatico di glicosfingolipidi principalmente nei podociti e nelle cellule epiteliali distali del tubulo distale che si presentano allargate e vacuolate. Alla microscopia elettronica i depositi appaiono come inclusioni tipiche osmiofile nel citoplasma di tutti i tipi di cellule renali e mostrano un caratteristico aspetto a *onion skin* o *zebra*. [53]

Il Mainz Severity Score Index è un sistema di score per pazienti con malattia di Fabry, può essere utile per monitorare il miglioramento clinico nei pazienti a quali viene somministrata la ERT. L'MSSI dei pazienti con malattia di Fabry è significativamente più alto di quello dei pazienti con altre malattie debilitanti severe. In un recente studio [57] è stato messo in evidenza che nonostante più uomini che donne avessero sintomi severi, nel complesso la media degli scores di severità non era significativamente differente tra i due sessi. Tale studio ha inoltre mostrato che un anno di terapia determinava in tutti i pazienti una significativa riduzione del MSSI score con una media di 9 punti.

## 1.4. MATERIALI E METODI PER DIAGNOSI

### 1.4.1. Diagnosi

Lo spettro clinico della malattia di Fabry può variare in maniera considerevole da paziente a paziente, persino all'interno di una stessa famiglia. Un corretto approccio diagnostico parte dal rilievo dell'anamnesi e dall'esecuzione di test specifici a seconda del quadro clinico. Nei maschi, la diagnosi di mAF viene effettuata quando l'attività dell'enzima  $\alpha$  GAL-A nei leucociti estratti da sangue periferico, risulta inferiore al 10% o è assente. Per conferma, viene poi fatta l'analisi genetica per identificare la mutazione su GLA. Lo studio biochimico effettuato nelle femmine portatrici consente di riscontrare livelli di  $\alpha$  GAL A che variano tra lo zero e la norma: in tal caso è necessario lo studio della mutazione e dell'inattivazione del cromosoma X per confermare la malattia. La diagnosi prenatale nei feti di sesso maschile a rischio di mAF è possibile attraverso la misurazione dell' $\alpha$  GAL A nelle cellule fetali ottenute con amniocentesi o biopsia dei villi coriali oppure attraverso studio genotipico. Recentemente, sia per l'analisi genetica che enzimatica, è possibile utilizzare la metodica Dried Blood Spot (DBS), che consiste nell'uso di un cartoncino sul quale vengono depositate alcune gocce di sangue in appositi spazi, poi fatte essiccare in aria ambiente. Il DBS può essere anche conservato per alcuni mesi e inviato per posta al laboratorio di analisi.

La diagnosi genetica può essere certa, quando la mutazione identificata è sicuramente patogena, oppure dubbia. In questi casi occorre procedere con ulteriori indagini, incluse biopsia cutanea, renale o cardiaca, alla ricerca di depositi di GB3. Un processo diagnostico che si basa infatti su una sintomatologia clinica suggestiva e sulla presenza di mutazione classica non tiene in considerazione tutti i possibili fenotipi e genotipi di un dato paziente e in questo caso una rigorosa e attenta valutazione clinica dovrebbe essere effettuata prima di iniziare il trattamento sostitutivo enzimatico (figura 5). . Soggetti con mutazioni introniche o polimorfismi a singolo nucleotide dovrebbero essere ulteriormente clinicamente valutati prima di iniziare la ERT; escludere a priori l'opportunità di iniziare il trattamento in questi pazienti potrebbe risultare nella progressione dei sintomi nelle donne così come, anche nell'ambito di varianti clinicamente lievi, e in particolar modo in soggetti maschi. un follow up clinico periodico costante e attento potrebbe ridurre la possibilità di imbattersi in problemi causati da una sottovalutazione del fenotipo clinico. [58]

In laboratori specializzati in grado di utilizzare la spettrometria "tandem-massa", possono essere dosati sia il GB3 sierico ed urinario, che il suo metabolita Lyso-GB3, che recenti ricerche mettono in correlazione col danno d'organo, con la sua progressione e la risposta alla terapia. [59, 60, 61, 62].

Per misurare l'attività della alfa galattosidasi A, nel nostro laboratorio di riferimento (CNR di Palermo), si utilizza come substrato il 4-Methylumbelliferil-Galattopiranoside, che una volta

idrolizzato dall'enzima, libera un composto (4-methylumbelliferone), la cui presenza è rilevabile attraverso una lettura spettrofluorimetrica.

Il termine "Dried Blood Spot Test" deriva dall'impiego di dischetti di carta assorbente (6 mm di diametro); si utilizza della carta Whatman 113, taglia 90 mm, sulla quale vengono caricati 5.5 µl di sangue periferico, in grado di imbibire tutto il dischetto, senza però saturarlo; tali dischetti offrono minore fondo per la lettura spettrofluorimetrica. Una volta fatto asciugare il sangue, si procede ad effettuare la reazione chimica: i dischetti imbibiti di sangue vengono posti all'interno dei 96 pozzetti delle piastre specifiche per fluorimetria (totalmente nere, per evitare il propagarsi della luce di emissione). Per ogni dischetto si dispensano 20 µl della soluzione contenente N-acetil D-galattosammina 0,25 M in tampone citrato 0,15 M a pH 4.4. L' N-acetil D-galattosammina è l'inibitore dell'isoforma B dell'  $\alpha$ -galattosidasi, che ha la stessa capacità dell' $\alpha$ -galattosidasi A di processare il substrato sintetico 4-Methylumbelliferil-Galactopiranoside.

L'inibizione dell'isoforma B dell'enzima  $\alpha$ -galattosidasi (che interferirebbe nella reazione) è di fondamentale importanza per un'obiettiva ed accurata analisi dell'attività enzimatica dell'isoforma A. Si aggiungono poi 50 µl della soluzione contenente il substrato 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galattopiranoside 5mM in tampone citrato 0,15 M a pH4.4, preventivamente filtrata (filtro per siringhe Whatman da 0,45 µm, diametro di 25mm); i campioni vengono incubati in un termostato oscillante a 37 °C.

I campioni di sangue periferico, trattati con K, EDTA, sono conservati a basse temperature, dopo essere pervenuti al laboratorio entro 24 h dal prelievo, vengono catalogati e predisposti per gli studi biochimici e genetici. I dischetti di 6 mm di diametro sono preparati utilizzando la carta assorbente Whatman 113, ("fast flow/coarse filter disk paper) usando una comune perforatrice per documenti.

Su questi dischetti vengono caricati 5,5µl di sangue periferico utilizzando una pipetta a pressione positiva di Drummond; essi, così preparati si lasciano asciugare per due ore coperti con una membrana (sigma MW08253).

Dieci dischetti imbibiti dello stesso campione di sangue sono posti all'interno di pozzetti di piastra nera; una lettera su ciascuna micro- piastra identifica un diverso campione.

Per ogni soggetto si realizzano tre reazioni con tempi diversi di incubazione: ad una, due e tre ore, al termine di ciascuna delle quali l'attività enzimatica è stata bloccata con 250 µl del tampone basico Etilendiammina 0,1 M a pH 11.4 .

Si procede quindi alla lettura spettrofluorimetrica, che fornisce un valore d'emissione proporzionale alla quantità di prodotto liberato (4-MU) e dunque dell'attività enzimatica del campione.

L'analisi viene eseguita mediante lettura in piastra allo spettrofluorimetro "Wallac Microtiter Fluorometer (eccitazione 355 nm, emissione 460 nm) dal "Perkin Elmer" usando una curva di calibrazione fino a 20 nmol di 4 metillumbelliferone di sodio (Sigma M1508).

#### 1.4.2 Genetica molecolare

Per l'estrazione di DNA da sangue periferico, trattato con EDTA, solitamente si utilizza un kit commerciale GEN ELUTE BLOOD GENOMIC DNA KIT-SIGMA. Per il sequenziamento si utilizza il seguente protocollo, per un volume finale di 20 µl:

<b>Master Mix 2X(0,2µl)</b>	<b>10 µl</b>
<b>Mg Cl2 (2mM)</b>	3 µl
<b>Primer F+R (2.5µM)</b>	4 µl
<b>DNA (5-30ng)Camp.</b>	1,5 µl
<b>DNA (5-30ng)WT</b>	1,5 µl

I primers al 5' e 3'(purificati in HPLC) della regione da amplificare sono stati disegnati con il software *Light Cycler Probe Design Software 2.0*.

La miscela di reazione, contenente la miscela, i primers specifici per gli esoni da amplificare e il DNA genomico dei campioni in studio è dispensata in una piastra da 96 pozzetti, inserita all'interno del Light Cycler 480. Il programma di amplificazione in PCR Real Time (High Resolution Melting) prevede un ciclo di pre-incubazione a 95°C per 10 minuti con attivazione della FastStart Taq DNA Polimerasi e la denaturazione dello stampo di DNA. Seguono i 50 cicli di amplificazione del DNA target, ognuno dei quali prevede la denaturazione a 95°C per 10 secondi, l'annealing a 62°C per 15 secondi e l'estensione a 72°C per 18 secondi.

La prima amplificazione dei campioni di DNA genomico viene eseguita con Real Time PCR.

Effettuata l'analisi in High Resolution Melting, sui frammenti ottenuti, è stato realizzato il sequenziamento con **LI-COR 4300 DNA Analyzer**.

La reazione di sequenziamento è stata preparata usando:

- i primers marcati con **IRDye™ 700** (assorbe a 681 nm ed emette a 720 nm); e **IRDye™ 800** (assorbe a 787 ed emette a 812);
- la DNA polimerasi;
- la miscela di dNTP e i ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP).

I ddNTP aggiunti dalla polimerasi, durante la reazione causano un blocco della stessa con formazione di una miscela di frammenti a catena terminata che sono successivamente separati su gel di acrilammide in base al loro peso molecolare. Per ogni singolo campione analizzato, si hanno 4 provette contenenti un ddNTP diverso e in ognuna delle quali si ottiene una miscela di frammenti che terminavano a livello di uno specifico nucleotide. Queste vengono inserite all'interno del

termociclatore settando il seguente programma di preriscaldamento, denaturazione, appaiamento, estensione, estensione finale, fasi che prevedono temperature e tempi diversi.

Terminata la seconda amplificazione, i campioni denaturati a 72 °C per 2' sono caricati su gel di acrilamide. Il software utilizzato per lo studio della sequenza è **AlignIR** che ha permesso di allineare la sequenza del gene wild-type con quella in studio.

#### **1.4.2.1 Genetica molecolare addizionale**

Il metodo “*discover mismatch*” conosciuto come “*tilling*” viene utilizzato per identificare polimorfismi umani a singolo nucleotide o mutazioni nel gene GLA. Per la digestione con la nucleasi viene eseguita una tappa di ibridizzazione tra wt e il target di DNA. La digestione nucleasica richiede l'aggiunta di uno specifico enzima di riparazione dei “*mismatch*”, chiamato “*surveyor*” nucleasi.

I saggi eseguiti con l'analisi High Resolution Melting (HRM) sono condotti sul sistema the LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche Diagnostics), analizzati con il software Gene-Scanning Software Version 1.2 (Roche Diagnostics). [63]

## **1.5. TERAPIA**

Per molti anni la terapia della mAF è stata diretta verso l'attenuazione dei sintomi. Oggi, grazie al contributo della biologia molecolare e alle tecniche di ingegneria genetica, è disponibile la terapia enzimatica sostitutiva (ERT) che rappresenta lo strumento potenzialmente efficace e ideale per curare questa condizione. La somministrazione del farmaco viene attuata in ospedale almeno per i primi mesi. Successivamente è possibile effettuare l'infusione a domicilio sotto stretto controllo del personale sanitario specializzato. I prodotti commercializzati in Italia sono: l'agalsidasi  $\alpha$ , sintetizzato da fibroblasti umani, da utilizzare al dosaggio di 0,2 mg/kg ogni 2 settimane in infusione endovenosa di circa 40 minuti; l'agalsidasi  $\beta$ , prodotto in cellule ovariche di criceto cinese, da utilizzare al dosaggio di 1 mg/kg ogni 2 settimane in infusione endovenosa della durata di 2-4 ore.

Accanto alla terapia eziologica vanno considerati altri tre momenti terapeutici: la terapia sintomatica per il controllo del dolore (carbamazepina o gabapentin) e delle aritmie (flecainide ed amiodarone); terapia aggiuntiva per la prevenzione del danno d'organo: ACE-inibitori o inibitori dell'angiotensina (nefro e cardioprotezione), antiaggreganti piastrinici (manifestazioni cardio e cerebrovascolari), statine (prevenzione dell'aterosclerosi), defibrillatore impiantabile (prevenzione della morte improvvisa); infine terapia del danno d'organo terminale quali dialisi e trapianto renale per

insufficienza renale cronica terminale, trapianto cardiaco per scompenso cardiaco refrattario in pazienti con esclusiva o prevalente localizzazione cardiaca. [64, 65, 66, 67]

È opportuno che i pazienti con sospetta o documentata mAF vengano seguiti in centri con provata esperienza di diagnosi e trattamento di malattia lisosomiale, con organizzazione di équipes multidisciplinari. La sfida presente e futura consiste nel migliorare i tempi e l'accuratezza della diagnosi, definire meglio il tempo di inizio e di interruzione della ERT, valutare la sostenibilità del trattamento.

Da quando la terapia enzimatica sostitutiva è stata introdotta, ha mostrato efficacia nel rallentare la progressione della malattia o nello stabilizzare la malattia di Fabry, soprattutto se essa viene iniziata precocemente. La terapia enzimatica sostitutiva ha lo svantaggio di richiedere una infusione per via endovenosa bisettimanalmente per tutta la vita. La ERT non è allo stesso modo efficace una volta che gli organi target sono danneggiati severamente. La ERT ha altri aspetti negativi. Essa solitamente innesca la produzione di anticorpi anti- $\alpha$ -galattosidasi A, rappresentando un limite del trattamento e quindi portando a risultati non soddisfacenti; un altro svantaggio è il costo annuale della terapia. Negli ultimi anni nuovi sistemi di espressione sono stati sviluppati al fine di intensificare la produzione di enzima ricombinante e ridurre i costi della ERT. Recentemente al fine di ovviare agli aspetti negativi della ERT, nuovi approcci hanno lo scopo di aumentare la biodisponibilità e ridurre la risposta immunologica. In modelli murini e in colture di fibroblasti alcuni ricercatori hanno riportato l'efficacia di una molecola che funge da *modifier*, l' $\alpha$ -N acetilgalattosaminidasi con  $\alpha$ -galattosidasi A come substrato. [68]

Una soddisfacente terapia enzimatica sostitutiva può quindi essere ostacolata da reazioni immuni, mancato targeting degli enzimi ricombinanti, livello inadeguato del farmaco in importanti tessuti come encefalo e tessuto osseo. Il sistema nervoso è coinvolto nella maggior parte dei fenotipi, da qui il bisogno di sviluppare strategie terapeutiche per raggiungere il sistema nervoso centrale. Da queste difficoltà e limitazioni nasce il bisogno di ricercare nuove strategie terapeutiche: chaperones, terapia genica e terapia basata su cellule staminali.

Le chaperones farmacologiche sono piccole molecole che si legano al sito attivo dell'enzima in maniera reversibile, in grado di incrementare, in pazienti con specifiche mutazioni genetiche, l'attività enzimatica, ove presente, stabilizzando e migliorando l'efficienza dell'enzima. [69, 70].

La terapia genica, cioè l'introduzione di una copia funzionante del gene codificante l' $\alpha$ -galattosidasi A nelle cellule del paziente (fibroblasti, linfociti b, epatociti, cellule emopoietiche) attraverso retrovirus, adenovirus e virus adeno-associati, ha fatto registrare risultati incoraggianti in alcuni modelli animali sperimentali, osservando un aumento dell'attività enzimatica dopo un periodo di 6

mesi. Pur promettendo di offrire una cura permanente della mAF, la terapia genica è ancora lontana dalla possibilità di entrare a breve termine nella pratica clinica quotidiana. [71, 72]

Tra le molecole chaperon è stato recentemente introdotto il migalastat (1 deossigalactonojirinomicina) che lega il sito attivo di specifiche mutanti risultando nella stabilizzazione della proteina, regolazione del traffico verso il lisosoma e infine permette all'enzima di catabolizzare i suoi substrati. [73]. Numerose mutazioni causano l'espressione di enzimi con attività enzimatica residua ma molto instabile a causa della struttura *misfolded* (mal ripiegata). Il razionale della terapia con chaperone è di evitare che i mutanti enzimatici siano degradati nel reticolo endoplasmatico permettendo così di espletare la attività residua. Il principale limite del trattamento con chaperone è l'indicazione solo per quei pazienti con mutazioni missense che causano la produzione di proteine GLA misfolded. In pazienti responders si è evidenziato un miglioramento dell'attività enzimatica e dei livelli di enzima, ridotti livelli di accumulo di GB3 dimostrati con biopsie renale ed esame delle urine. Questo approccio terapeutico è particolarmente importante nei pazienti con coinvolgimento cerebrale in quanto questi composti possono raggiungere il sistema nervoso centrale attraverso la barriera ematoencefalica. La terapia con chaperones ripristina l'attività enzimatica in cellule somatiche e nei tessuti e ha il vantaggio di una somministrazione non invasiva; da un terzo alla metà dei pazienti con malattia di Fabry può essere candidata a questo trattamento.

L'ampia applicazione e diffusione del sequenziamento genico ha portato alla disponibilità di terapie personalizzate per specifiche mutazioni genetiche. Inoltre la riduzione dei costi per l'analisi genetica ha permesso il suo utilizzo di routine in numerosi contesti. La malattia di Fabry è un buon esempio che dimostra questa notevole evoluzione. Negli ultimi decenni una varietà di differenti vettori virali e sierotipi virali è stata studiata per consentire l'introduzione della terapia genica nel trattamento dei disordini d'accumulo lisosomiale. Risultati soddisfacenti sono stati riportati in modelli animali e anche trials clinici hanno riportato risultati promettenti sulla leucodistrofia metacromatica. Molti vantaggi caratterizzano la terapia genica confrontata con la terapia enzimatica sostitutiva, essa per esempio si associa ad effetti terapeutici a lungo termine, non è rischiosa relativamente alla somministrazione parenterale; essa richiederebbe il transfer del gene GLA nelle cellule mutate del paziente, (fibroblasti, linfociti B, epatociti, cellule ematopoietiche) attraverso retrovirus, adenovirus, virus adeno associati. La terapia genica è ancora lontana dal poter essere introdotta nella pratica clinica giornaliera. Tra i vettori virali ad oggi i vettori adeno associati hanno riportato la migliore applicazione nella malattia di Fabry, numerosi studi hanno riportato risultati promettenti riguardo l'uso di AAVs, comunque il principale limite è la difficoltà di una produzione su larga scala. La terapia genica rappresenta un'alternativa sicura promettente alla ERT. Il più importante obiettivo di

questa strategia emergente è raggiungere un approccio terapeutico più sicuro, clinicamente disponibile, facilmente praticabile per pazienti Fabry.

## **CAPITOLO 2: Malattia di Anderson-Fabry e stress ossidativo: revisione della letteratura**

Nonostante la terapia enzimatica sostitutiva, la malattia di Fabry progredisce con gravi manifestazioni cardiache, cerebrali e renali. L'accumulo di Gb3 può indurre stress ossidativo, produzione di citochine infiammatorie e riduzione dell'ossido nitrico, che possono avere un impatto sulle manifestazioni cliniche della malattia di Fabry.

L'accumulo di Gb3, segno distintivo della malattia di Fabry, non è limitato ai lisosomi ed è, infatti, aumentato anche nelle membrane plasmatiche e nelle caveole delle cellule endoteliali.

### **BIBLIO 4**

Sebbene sia noto che i pazienti affetti da malattia di Fabry di solito muoiono in età adulta per complicanze renali, cardiache e/o cerebrali della malattia vascolare [74], la fisiopatologia della malattia è in gran parte sconosciuta. Ci sono alcune dati in letteratura che dimostrano che lo stress ossidativo può essere coinvolto nella fisiopatologia della FD. Moore et al. [75] hanno scoperto che l'ascorbato, un potente antiossidante, riduce l'iperperfusionione nei pazienti Fabry sottoposti a trattamento con ERT. In questo contesto, Bodary et al. [76] hanno dimostrato, in topi con deficit di apolipoproteina-E (apo-E), che il deficit di  $\alpha$ -galattosidasi A accelera l'aterosclerosi e provoca un aumento della nitrotirosina nella placca. Moore et al. [77] hanno anche riscontrato un eccesso di nitrotirosina vascolare dermica nelle biopsie di pazienti Fabry.

È già noto che le specie reattive sono coinvolte in un gran numero di malattie cronico-infiammatorie e vascolari [78,79]. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che i lisosomi sono piuttosto vulnerabili allo stress ossidativo e il compartimento lisosomiale è, allo stesso tempo, un luogo con molte condizioni favorevoli allo stato pro-ossidante e persino alla reazione di Fenton [80, 81].

Uno studio di Biancini ha valutato e correlato il danno ossidativo a biomolecole, le difese antiossidanti, le citochine pro-infiammatorie e ai livelli di Gb3 in pazienti con malattia di Fabry in trattamento con ERT, riscontrando livelli ridotti di difese antiossidanti (contenuto di GSH, glutatione in forma ridotta, negli eritrociti e attività GPx, glutatione perossidasi) nei pazienti con FD rispetto ai controlli. Il basso contenuto di GSH implica una bassa attività GPx e può portare a una maggiore suscettibilità al danno ossidativo. Il GSH è il più importante antiossidante non enzimatico, essendo preferenzialmente ossidato da specie reattive e quindi preservando biomolecole più importanti [82].

Il contenuto deficitario di GSH *scavenger*, oltre all'aumento del rapporto SOD/CAT descritto in questo studio, indica che probabilmente il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) è maggiormente disponibile per ossidare le molecole biologiche nei pazienti Fabry. Inoltre, la ridotta attività della GPx conferma l'ipotesi di eccesso di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poiché è anche substrato della GPx.

In relazione al danno ossidativo alle biomolecole, in questa analisi sono stati riscontrati livelli aumentati di MDA e carbonile nel plasma dei pazienti Fabry rispetto ai controlli. Questi dati suggeriscono che i pazienti presentano livelli significativamente maggiori di perossidazione lipidica e danno proteico. La continua ossidazione e frammentazione delle catene laterali degli acidi grassi può produrre aldeidi come MDA (formate dalla perossidazione degli acidi linolenico, arachidonico o docosaesaenoico), che possono portare alla rottura della membrana lisosomiale (e di altri organelli) e legarsi avidamente alle proteine di membrana, inattivando enzimi e recettori e persino attaccando il DNA, formando lesioni mutagene [82, 83]. Pertanto, l'aumento dei livelli di MDA che abbiamo osservato nei pazienti Fabry deve essere il risultato della destabilizzazione del lisosoma e può anche agire nel mantenimento delle reazioni a catena con altre molecole. Inoltre, è importante sottolineare che la correlazione positiva tra i livelli di Gb3 e MDA che è stata trilevata in questo studio suggerisce che Gb3 induce la perossidazione lipidica nella malattia di Fabry. Inoltre, è stato verificato un aumento significativo dei livelli di MDA nei pazienti Fabry al momento della diagnosi e in ERT rispetto al gruppo di controllo (dati non mostrati).

Biancini e collaboratori hanno inoltre osservato un aumento significativo dei gruppi carbonilici plasmatici e dei livelli urinari di di-Tyr nei pazienti Fabry. L'alterazione delle proteine mediante la formazione di gruppi carbonilici può essere riconosciuta come “non-self” dal sistema immunitario e portare a una risposta autoimmune [84]. Alcuni studi hanno dimostrato che probabilmente la FD ha una componente autoimmune nella sua fisiopatologia [85, 86, 87, 88]. La correlazione positiva trovata in questo studio tra Gb3 e livelli di carbonile suggerisce che Gb3 possa agire anche come induttore del danno proteico nei pazienti Fabry. Non è stata riscontrata alcuna differenza statistica tra pazienti e controlli per quanto riguarda i gruppi sulfidrilici. Sebbene gli aminoacidi contenenti questi gruppi zolfo (cisteina e metionina) siano prontamente ossidati, la letteratura suggerisce che questo parametro può fornire dati fuorvianti sull'entità dell'ossidazione in caso di stress ossidativo cronico [89]. Gli alti livelli di gruppi carbonilici trovati in questo studio sono indicativi di un grave danno alle proteine poiché le proteine fortemente carbonilate tendono a formare aggregati ad alto peso molecolare che sono resistenti alla degradazione da parte del sistema proteasoma [90]. Inoltre, è importante sottolineare che non è stata verificata alcuna correlazione significativa tra la proteinuria — così come altri parametri della funzionalità renale (urea, creatinina ed eGFR-MDRD) — e i parametri dello stress ossidativo in questi pazienti.

La novità più significativa nel presente studio in vivo è la correlazione tra i parametri dello stress ossidativo, le citochine pro-infiammatorie e i livelli di Gb3. Tuttavia, tali risultati devono essere interpretati con attenzione, poiché sono stati valutati solo i pazienti trattati. È possibile che questi dati possano fornire nuovi bersagli per future strategie terapeutiche al fine di migliorare la qualità della vita dei pazienti Fabry. Sono necessarie ulteriori ricerche e studi clinici per rivelare quanto sicura ed efficace sarebbe l'integrazione di antiossidanti in combinazione con ERT nei pazienti di Fabry.[91] Recentemente è stato suggerito che l'accumulo di Gb3 nell'endotelio è in grado di *disregolare* l'attività della NO sintasi endoteliale (eNOS), compromettere la stabilità caveolare e la trasduzione del segnale a valle delle caveoline come eNOS [92]. L'alterata regolazione di eNOS, che riduce specificamente la produzione di NO, favorirebbe lo stress ossidativo con l'aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno che giocano un ruolo chiave nella patogenesi del danno cardiovascolare della malattia di Fabry. Infatti, uno studio in una linea di cellule endoteliali umane knockdown per  $\alpha$ -GalA, mediante interferenza dell'RNA, ha mostrato una produzione di 3-nitrotirosina (3NT) notevolmente incrementata in aggiunta all'accumulo di Gb3 e a una ridotta attività di eNOS. L'aumento di 3NT è il risultato di una modifica post-traduzionale delle proteine che si verifica in situazioni di aumento di stress ossidativo causato dalla ridotta biodisponibilità di NO [92]. Inoltre, l'eccessiva produzione di superossido e altri ROS riduce la biodisponibilità di NO attraverso una reazione chimica con NO per produrre perossinitriti. Ciò induce stress ossidativo, danno cellulare tramite perossidazione lipidica, inattivazione di enzimi e altre proteine mediante ossidazione e nitrificazione.

Le NADPH ossidasi (NOX) sono un gruppo di enzimi associati alla membrana che svolgono un ruolo importante nella messa a punto dello stato redox nelle cellule. Questi enzimi catalizzano la produzione di ROS mediante l'associazione di diverse subunità di membrana e citosoliche. Nella famiglia NOX, l'isoforma NOX2 richiede l'attivazione dell'associazione di p22phox (componente proteica dell'ossidasi NADPH di membrana dei fagociti) e di altre tre subunità citosoliche: una volta che queste subunità traslocano alla membrana attraverso uno specifico processo regolato, un cambiamento conformazionale del complesso promuove il trasferimento di elettroni dal NADPH all'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) per formare superossido ( $O_2^-$ ) che innesca l'induzione di radicali liberi, perossinitriti e altri ROS [93]. Sulla scorta di quanto riportato Ravarotto et al. hanno esaminato lo stato di stress ossidativo nei pazienti con malattia di Fabry e la sua relazione con i processi proliferativi/rimodellanti a livello cardiovascolare [94]. In dettaglio è stato studiato lo stato ossidativo in 10 pazienti confrontati con 10 soggetti sani attraverso l'analisi dell'espressione proteica di p22phox, delle subunità di NADH /NADPH ossidasi, dei livelli di eme ossigenasi (HO)-1, perossidazione lipidica come la produzione di malondialdeide (MDA), stato di fosforilazione della chinasi regolata dal segnale extracellulare (ERK)1/2 e della proteina target della fosfatasi miosina

(MYPT)-1, marker dell'attivazione della Rho chinasi, entrambi coinvolti nei processi del segnale dello stress ossidativo. È stata valutata anche la massa del ventricolo sinistro cardiaco (LV) mediante ecocardiografia M-mode. I risultati descritti in merito al rimodellamento cardiaco, all'attivazione della segnalazione della chinasi Rho e alla riduzione dell'HO-1 protettivo potrebbero suggerire che, oltre alla terapia enzimatica sostitutiva, l'inibizione dello stress ossidativo mediante misure farmacologiche o nutrizionali, si dimostrerà probabilmente utile per la prevenzione/trattamento del rimodellamento cardiovascolare-renale dei pazienti con malattia di Fabry.[94]

I risultati di questo studio supportano l'attivazione di uno stato di stress ossidativo nei pazienti Fabry e riportano che il rapporto clinico tra i marcatori di stress ossidativo e il rimodellamento cardiaco nei pazienti considerati è stato documentato a livello di associazione. Non è stata riportata una correlazione, infatti, tra la massa del ventricolo sinistro e alcun marcatore di stress ossidativo utilizzato nei pazienti Fabry. La mancata dimostrazione di questa correlazione potrebbe forse essere attribuita al numero limitato di soggetti arruolati trattandosi di una malattia rara. I dati di questo lavoro mostrano un'aumentata espressione di p22phox nei pazienti Fabry rispetto ai soggetti sani, suggerendo che lo stress ossidativo aumenta i ROS e quindi i pathways del segnale correlati allo stress ossidativo.

L'aumentata produzione di ossidanti può avere un impatto sui componenti lipidici delle membrane cellulari e sui mediatori del segnale lipidico. Durante la perossidazione lipidica indotta dai radicali liberi, infatti, l'equilibrio tra disgregazione dei lipidi e la capacità di riparazione viene alterato inducendo infiammazione, apoptosi e aterogenesi. Accanto agli idroperossidi lipidici (LOOH), prodotti primari della perossidazione, si possono formare diverse aldeidi come prodotti secondari come la malondialdeide (MDA), il propanale, l'esanale e il 4-idrossinonenale (4-HNE) [95]. Recentemente, è stato dimostrato che i pazienti Fabry prima della ERT presentavano livelli maggiori di perossidazione lipidica che non ritornavano a valori normali dopo inizio del trattamento [96]. Nello studio di Ravarotto è stata confermata l'aumentata concentrazione di MDA nella malattia di Fabry, suggerendo che nella malattia di Fabry il danno ossidativo impatta sulle strutture lipidiche contribuendo a lungo termine all'insorgenza di processi patologici che portano al rimodellamento cardiovascolare-renale e cerebrovascolare; è stato riportato che la via della chinasi Rho è attivata nei pazienti Fabry attraverso lo stato di fosforilazione significativamente più elevato di MYPT-1 in questi pazienti rispetto ai soggetti sani. I cambiamenti emodinamici e strutturali indotti dall'attivazione della Rho chinasi sono stati documentati nei pazienti con CKD e dialisi [97] e la sua attivazione anche nei pazienti Fabry suggerisce che l'attivazione della via della Rho chinasi possa svolgere un ruolo importante nello stato del rimodellamento cardiovascolare e renale di questi pazienti. [94]

Mentre ci si aspettava un aumento della fosforilazione di ERK1/2 in una popolazione ad alto rischio di rimodellamento cardiovascolare-renale come i pazienti Fabry, sorprendentemente, tale studio ha messo in evidenza che lo stato di fosforilazione di ERK1/2 era ridotto nei nostri pazienti Fabry rispetto a soggetti sani. Tuttavia, è stato recentemente dimostrato che aumentati livelli di LysoGb3 in un modello in vitro si associano a un aumento del cAMP intracellulare. Ciò è importante in quanto nei miociti cardiaci, l'attivazione di ERK1/2 è sotto il controllo del cAMP e cAMP elevato può indurre una riduzione della fosforilazione di ERK1/2 attraverso l'attività PKA [98,99].

Gli induttori a monte della famiglia delle MAPK sono stimoli extracellulari che convergono su proteine GTPasi come Ras e Rap1, che, una volta attivate, innescano una cascata di fosforilazione per accendere ERK1/2. PKA, tramite stimolazione di Rap1, antagonizza Ras catturando Raf1 dal complesso, riducendo quindi ERK1/2 e la sua fosforilazione [100]. L'aumento del livello plasmatico di cAMP descritto nei pazienti Fabry e la sua correlazione positiva con i livelli plasmatici di LysoGb3 spiega la ridotta fosforilazione di ERK1/2 oltre a confermare nell'uomo la relazione tra LysoGb3 e la via del cAMP precedentemente dimostrata in un modello "in vitro".

Tale studio dimostra anche l'alterata reazione allo stress ossidativo in termini di difese antiossidanti come l'attivazione di HO-1. Questa disregolazione può svolgere un ruolo importante attraverso la segnalazione ROCK indotta dallo stress nel rimodellamento cardiovascolare-renale. Una migliore comprensione della specifica risposta del segnale molecolare allo stress ossidativo nella malattia di Fabry potrebbe suggerire ulteriori interventi di tipo farmacologico o nutrizionali volte ad arrestare la progressione della cardiopatia, della malattia cerebrovascolare e nefropatia che si verificano nei pazienti Fabry agendo sulla riduzione dello stress ossidativo. [94]

I pazienti con FD presentano un'aumentata incidenza di trombosi arteriosa, principalmente a causa della progressiva deposizione di Gb3 nell'endotelio vascolare e nelle cellule della muscolatura liscia [101]. L'omocisteina (Hcy) è considerata un fattore di rischio per le malattie vascolari, ma i meccanismi con cui produce danni cardiovascolari sono ancora poco conosciuti. Per quanto riguarda il coinvolgimento vascolare nei pazienti con FD, l'analisi dei fattori legati agli eventi tromboembolici potrebbe essere utile per migliorare la nostra comprensione della malattia.

L'omocisteina (Hcy), un amminoacido contenente zolfo formatosi durante il metabolismo della metionina, è considerata da alcuni autori un fattore di rischio nelle malattie vascolari ([102, 103], l'iperomocistinemia (HHcy), ad una concentrazione plasmatica superiore a 15µmol/L è stata anche associata a disturbi quali trombosi venosa, cardiopatia ischemica, aterotrombosi e ictus ([104, 103, 105].

Sebbene i meccanismi attraverso i quali l'iperomocistinemia induce danno cardiovascolare siano ancora poco conosciuti, quelli noti includono la disfunzione endoteliale e i processi di stress

ossidativo [106, 107, 108] Anche la cisteina (Cys), un altro aminoacido contenente zolfo coinvolto nel metabolismo della metionina, è stata associata a condizioni di stress ossidativo [109].

In uno studio pubblicato nel 2002, un aumento del livello di omocisteina è stato osservato nei pazienti con FD [110] ), tuttavia gli autori non hanno incluso i soggetti con insufficienza renale e non hanno fornito informazioni pertinenti riguardo agli stadi più prematuri del danno renale. L'iperomocistinemia è stata osservata anche quando si confrontavano pazienti con FD rispetto ai controlli, sebbene in questo caso la diminuzione dei livelli di vitamina B6 e di acido folico fosse considerata responsabile dell'alterazione [111]).

Uno studio di Muller et al. ha valutato l'omocisteina plasmatica e altri parametri coinvolti nel ciclo della metionina, così come marcatori di stress ossidativo. Il campione era costituito da un gruppo di 10 pazienti maschi con FD e a gruppo di controllo di 8 individui sani, appaiati per età. Il sangue venoso è stato raccolto per la determinazione di omocisteina attraverso l'analisi molecolare, identificazione delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico, attività del glutatione totale e degli enzimi antiossidanti, così come la quantificazione delle vitamine. Analisi comparativa dei pazienti con FD rispetto al gruppo di controllo mostrava un'iperomocisteinemia in 8 dei 10 pazienti con FD, nonché un aumento significativo dei livelli complessivi di glutatione e attività della catalasi. Si deduce che i pazienti con FD, oltre all'attivazione del sistema antiossidante, presentano livelli aumentati di omocisteina plasmatica, anche se questo non è probabilmente correlato alle alterazioni comuni nel ciclo della metionina.

Un limite di questo studio era la mancanza di informazioni riguardanti la funzione renale nei pazienti, limitando così qualsiasi valutazione della possibile relazione tra iperomocisteinemia e insufficienza renale.

Non c'era alcuna differenza significativa nei livelli plasmatici di TBARS (sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico), un marcatore di perossidazione lipidica, e quindi indicativo di stress ossidativo. Tuttavia, tra i pazienti con FD è stato osservato un aumento dei livelli di tGSH (glutazione totale intracellulare) e dell'attività CAT (catalasi), il che implica l'attivazione del sistema antiossidante.

Una simile attivazione della difesa antiossidante nei pazienti con malattia di Gaucher e Mucopolisaccaridosi di tipo I (MPS I) era già stata dimostrata dal gruppo di Roversi [112], 113]; Inoltre, nei pazienti con malattia di Gaucher sottoposti a terapia enzimatica sostitutiva (ERT) è stato osservato un aumento dell'attività CAT e una diminuzione dell'attività SOD [112] ). Dopo aver valutato i pazienti con MPS I prima di iniziare la ERT e fino a 24 settimane di infusione, è stato osservato che l'aumento dell'attività CAT si verificava dopo l'inizio del trattamento, indicando così che l'attivazione del sistema antiossidante potrebbe essere una diretta conseguenza della ERT [113]

Poiché il 60% del gruppo FD era composto da pazienti sottoposti a ERT, l'attivazione delle difese antiossidanti osservata tra questi potrebbe essere associata al trattamento. A conferma di questa ipotesi, un recente studio [114]) ha dimostrato che l'incubazione di cellule con  $\alpha$ -galattosidasi A ricombinante ha portato ad un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), quindi in accordo con i risultati precedenti del medesimo gruppo (112, 113). Inoltre, è stato dimostrato che Gb3 induce l'aumento della produzione di ROS, quando aggiunto al mezzo di coltura cellulare. Questa eccessiva generazione di ROS apparentemente è collegata al coinvolgimento delle cellule endoteliali vascolari, con conseguente sviluppo di aterosclerosi e altri disturbi cardiovascolari frequentemente riscontrati nei pazienti con FD. [115].

Oltre a reagire con proteine e lipidi, le specie reattive dell'ossigeno possono anche alterare il DNA. Il danno al DNA è stato associato alla progressione di malattia nei tumori, nel diabete, nelle malattie cardiovascolari, nell'artrite e in molte altre malattie croniche [116]. La riparazione del DNA svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità del genoma contro insulti esogeni ed endogeni, evitando l'accumulo di danni genetici e le sue conseguenze dannose sulla sopravvivenza e sulla funzione delle cellule [117]. Molti diversi agenti dannosi, incluso lo stress ossidativo, possono indurre una risposta adattativa [118]. In generale, la risposta adattativa sembra coinvolgere la modulazione dell'espressione di molti geni, compresi quelli coinvolti nella risposta al danno del DNA [119].

Poiché le specie ossidative possono attaccare proteine, lipidi e DNA [120] recentemente Biancini et al. hanno studiato il danno al DNA nei pazienti Fabry. Al fine di chiarire i meccanismi coinvolti, è stato eseguito un saggio di provocazione ossidativa per la valutazione della riparazione del DNA e sono state utilizzate le endonucleasi per studiare il danno ossidativo alle basi del DNA.

I risultati di questo studio mostrano che i pazienti Fabry hanno livelli di danno al DNA basale più elevati rispetto ai controlli e questo danno ha un'origine ossidativa nelle purine ma non nelle pirimidine. Non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa nel danno al DNA basale tra i pazienti Fabry prima e durante il trattamento con ERT (dati non mostrati). Inoltre, la quantità di specie reattive generate nei pazienti con Fabry, era significativamente maggiore rispetto ai controlli, il che conferma i risultati precedenti che mostravano l'induzione dello stress ossidativo nei pazienti con Fabry [121, 122]. L'effetto osservato sulle purine può essere spiegato dal fatto che, tra le quattro basi del DNA, le purine (prima la guanina, seguita dall'adenina) sono preferenzialmente ossidate, a causa dei minori potenziali di riduzione [123].

Le specie reattive, in particolare  $\bullet\text{OH}$ , reagiscono con il DNA aggiungendo un atomo di H ai doppi legami delle basi eterocicliche (purine e pirimidine) o rimuovendo un atomo di H dal gruppo metilico della timina e dai legami CH della porzione di zucchero. Le alterazioni del DNA hanno conseguenze

dannose per il metabolismo cellulare solo se non è sufficientemente riparato. Le lesioni del DNA non riparate possono accumularsi nel genoma [124].

Il gruppo di Biancini ha esaminato il danno al DNA residuo dopo il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, che induce rotture a singolo filamento (SB), valutando la ricongiunzione di SB, in cui le basi ossidate vengono rimosse per riparazione dell'escissione delle basi (BER). L'induzione del danno al DNA da parte di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si verifica a causa della formazione di OH•, che ossida le frazioni di base e di zucchero del DNA [125]. Il perossido di idrogeno potrebbe indurre danni al DNA sia nei controlli che nei pazienti Fabry. Nei controlli, il danno indotto è stato trovato nel saggio semplice (senza endonucleasi) e con FPG (danno riflettente alle purine), mentre nei pazienti Fabry il danno indotto è stato trovato anche nelle pirimidine.

In questo studio, sono stati riscontrati livelli più elevati di specie reattive negli stessi pazienti che presentavano danni al DNA basale più elevati e meccanismi di riparazione efficienti in risposta a un agente ossidante in vitro. I pazienti di Fabry possono presentare un'induzione dei sistemi di riparazione del DNA a causa dell'esposizione cronica allo stress ossidativo. Tuttavia, probabilmente a causa della maggiore formazione di specie reattive (DCFH-DA saggio) e un'insufficiente rimozione, questo sistema di riparazione indotto non è sufficientemente efficace *in vivo*. I risultati di questo lavoro che i pazienti Fabry presentano livelli di specie reattive e danni al DNA più elevati rispetto ai controlli.[126]

Lo studio di Chimenti et al. I nostri risultati hanno mostrato che nei cardiomiociti di pazienti sia maschi che femmine con FD, c'è un aumento significativo dell'espressione di iNOS e nitrotirosina con livelli elevati di nitratura proteica che suggeriscono un aumento dello stress ossidativo. , catena pesante della miosina, proteina C legante la miosina,  $\alpha$ -actinina, desmina, troponina I) e proteine funzionali (ossia, creatina chinasi miofibrillare) con conseguente attività cellulare disfunzionante. L'evidenza di un limitato aumento dell'espressione di iNOS e nitrotirosina nella cardiomiopatia ipertrofica suggerisce che nella FD, l'ipertrofia ventricolare sinistra, innescata dai metaboliti GB3 , è probabilmente un contributo minore dello stress ossidativo.

Infine, il ridotto livello di difese antiossidanti, che è stato dimostrato nel sangue e nelle urine di pazienti con FD, può aumentare ulteriormente la suscettibilità al danno da stress ossidativo. [127]

In particolare, è stato dimostrato che la nitratura della proteina miofibrillare mediata dal perossinitrito diminuisce la forza isometrica massima sviluppata dai cardiomiociti isolati inducendo disfunzione contrattile e aumenta la rigidità del muscolo cardiaco, molto probabilmente attraverso un'elevata ossidazione della proteina elastica gigante titina [128].

Oltre a un meccanismo diretto, i ROS possono modulare indirettamente la funzione miofibrillare attraverso gli effetti sulle chinasi proteiche chiave che inducono la fosforilazione post-traduzionale

di varie proteine del miofilamento. Pertanto, le anomalie cardiache diastoliche e sistoliche nella FD potrebbero essere spiegate da un aumento dello stress ossidativo a livello miofibrillare, portando infine alla degradazione e alla disfunzione del miofilamento. Tra le modificazioni del DNA è inclusa l'ossidazione dei residui di guanina a 8-OHdG, che funge da biomarcatore sensibile dello stress ossidativo intracellulare in vivo [129]. Lo studio di Chimenti et al. ha dimostrato che l'8-OHdG è espresso nei nuclei dei cardiomiociti dei pazienti con FD ma non dei controlli. L'apoptosi dei cardiomiociti FD era 187 volte superiore rispetto ai controlli e tutti i nuclei apoptotici erano positivi per 8-OHdG. Il danno ossidativo al DNA nei cardiomiociti è stato descritto in varie condizioni, tra cui ischemia miocardica, cardiomiopatie e insufficienza cardiaca [130], causando effetti mutageni e innescando la morte cellulare per apoptosi. Lo stress ossidativo può danneggiare il DNA promuovendo la formazione di rotture del DNA a singolo e doppio filamento. Queste forme di lesione del DNA innescano l'attività autoproteolitica di p53, portando alla generazione di frammenti di p50 privi del terminale carbossilico o amminico. frammenti di p53 con scissione ammino-terminale, p50 ( $\Delta$ N), possono interagire con rotture del DNA a doppio filamento, incrementando Bax e portando all'apoptosi [131]. In alternativa, i ROS possono indurre l'apoptosi facilitando il rilascio mitocondriale del citocromo c e attivando la cascata delle caspasi. Infatti, è stato dimostrato che nella FD, l'accumulo di GB3 è associato a uno stato proapoptotico delle cellule mononucleari del sangue periferico che è principalmente mediato dall'attivazione della via intrinseca della caspasi [132].

Pertanto, la morte cellulare per apoptosi dovuta a un danno del DNA mediato da ROS concorre alla cardiomiopatia FD.

Il rilevamento immunistoichimico di iNOS e nitrotirosina limitato alle cellule colpite suggerisce un effetto diretto di GB3 e dei suoi metaboliti sull'induzione dello stress ossidativo intracellulare. In effetti, studi recenti hanno dimostrato che GB3 rilascia direttamente ROS in modo dose-dipendente da una linea di cellule endoteliali vascolari in coltura di lunga durata [133] e che l'accumulo intracellulare di GB3 piuttosto che il deficit di  $\alpha$ -galattosidasi A provoca una aumentata regolazione dell'espressione di iNOS nelle cellule endoteliali cardiache macrovascolari e microvascolari umane [134].

### GB3

È tutt'ora in corso la ricerca di un biomarcatore ideale per diagnosticare e monitorare la malattia di Fabry [135]. Il primo biomarcatore proposto è stato Gb3 e recentemente, la sua forma deacilata - globotriaosilfingosina (lyso-Gb3) è stata studiata [136,137,138,139]. In uno studio di Biancini è stata dimostrata una correlazione tra Gb3 e lo stress ossidativo e l'infiammazione nei pazienti trattati con malattia di Fabry [121]. In questo lavoro sono stati misurati i livelli urinari di Gb3 in pazienti Fabry e notato che ERT era in grado di ridurre Gb3, ma non sufficientemente per controllarne i livelli.

Considerando questi risultati, è possibile suggerire che l'accumulo di Gb3 potrebbe indurre stress nitrosativo e perossidazione lipidica riscontrata in questi pazienti (entrambi più alti prima e dopo l'ERT).[140]

Il meccanismo mediante il quale il GB3 intracellulare elevato induce direttamente il rilascio di ROS non è completamente compreso. Una possibile ipotesi è che GB3 attivi enzimi ossidativi come le nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ossidasi che sono una fonte di produzione di ROS [141]. In alternativa la notevole produzione di ROS può essere correlata all'accumulo di GB3 nel compartimento intracellulare diverso dai lisosomi. È stato dimostrato che GB3, specialmente nella fase avanzata della malattia [142], è ampiamente distribuito in altre strutture tra cui il reticolo endoplasmatico, la membrana cellulare e il nucleo, portando alla disfunzione dei componenti chiave cellulari coinvolti nella regolazione della generazione di ROS. Di conseguenza, nello studio del gruppo di Chimenti, sono stati osservati corpi di glicosfingolipidi extralisosomiali nel citosol e nel nucleo e secreti nello spazio interstiziale.

Una funzione mitocondriale alterata con compromissione della produzione di energia dei cardiomiociti e del rilascio di ROS potrebbe anche essere coinvolta nell'aumento dello stress ossidativo osservato nella cardiomiopatia FD. In un'altra malattia da accumulo lisosomiale, la ceroido lipofuscinosi neuronale, è stata dimostrata una compromissione della funzione mitocondriale [143] che porta a livelli intracellulari ridotti di fosfati ricchi di energia, suggerendo che materiali di accumulo selezionati possono interferire con la fosforilazione ossidativa mitocondriale. Inoltre, è stato dimostrato che i mitocondri isolati possono essere disaccoppiati e la fosforilazione ossidativa può essere inibita dopo incubazione con materiale di accumulo lisosomiale in vitro [144]. Inoltre, prove recenti hanno mostrato una significativa compromissione della funzione mitocondriale e, quindi, del metabolismo energetico, in fibroblasti in coltura ottenuti da pazienti con FD [145].

Il meccanismo attraverso il quale l'accumulo di GB3 può portare ad un ridotto apporto di energia mitocondriale potrebbe essere correlato ad alterazioni della membrana mitocondriale interna causate da un materiale di accumulo lipofilo anomalo [146]. Il materiale di accumulo potrebbe modificare le proprietà biofisiche della membrana mitocondriale interna interagendo direttamente con i complessi della catena respiratoria o alterando le proteine strutturali.[127]

In uno studio condotto da Bincini è stato indagato il metabolismo di uno dei principali antiossidanti intracellulari, il GSH, (glutathione ridotto). Sorprendentemente, la riduzione del GSH, che è il principale antiossidante non enzimatico negli esseri umani [147], è aumentata nei pazienti Fabry al momento della diagnosi rispetto ai pazienti in ERT e ai controlli. La sintesi del GSH dipende dalla

disponibilità del suo aminoacido precursore, la cisteina, e principalmente dall'attività *rate-limiting* dell'enzima, glutammato cisteina ligasi (GCL, EC 6.3.2.2;  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasi), che catalizza la prima fase della biosintesi del GSH [148]. L'attività di GCL è regolata da inibizione competitiva del GSH [149] e dalla disponibilità del suo precursore, L-cisteina [150]. Inoltre, lo stress ossidativo è in grado di indurre l'espressione degli enzimi di sintesi del GSH, l'mRNA della subunità catalitica GCL (GCLC) e la trascrizione del gene GCLC [148, 151]. Quindi, i livelli aumentati di GSH riscontrati nei pazienti Fabry potrebbero essere interpretati come una risposta fisiologica al danno ossidativo. D'altra parte, i pazienti Fabry prima del trattamento con ERT presentavano una minore attività GPx (glutazione perossidasi). Confrontando questo risultato con i dati di un precedente studio del medesimo gruppo [91], si può concludere che la presenza di una minore attività di GPx non costituisce una conseguenza del trattamento enzimatico poiché si evidenzia anche al momento della diagnosi. Quindi, l'aumento dei livelli di GSH prima dell'inizio della terapia potrebbe anche essere una conseguenza della diminuzione dell'attività GPx. Le differenze riscontrate nel gruppo sottoposto ad ERT tra i due studi possono essere spiegate dalla durata della ERT. La maggior parte dei pazienti Fabry in trattamento nel primo studio sono stati anche arruolati in quest'ultimo studio di Biancini arruolato anche nel presente studio, quindi la durata mediana della ERT è maggiore (quasi tre volte – da 2 a 5,5 anni). Questo dato si può spiegare come risposta adattativa al danno ossidativo che si è verificato in un lasso di tempo maggiore. [140]

In questo studio non sono state riscontrate differenze statistiche nell'attività GR. GR è un NADPH:GSSG ossidoreduttasi (EC 1.8.1.7) che catalizza la riduzione di GSSG a GSH. Questo enzima ha un ruolo importante nel metabolismo del glutatione collegando il pool cellulare NADPH con il pool tiolo/disolfuro e mantenendo l'ambiente riducente intracellulare di GSH elevato e basso il livello di GSSG [152]. Poiché i pazienti Fabry livelli statisticamente più elevati di GSH e pari attività GR rispetto ai controlli, gli autori hanno ipotizzato che il GSH fosse probabilmente aumentato a causa dell'elevata attività del GCL e minore attività GPx e non dovuta ad alterazioni GR.

Esiste una relazione ben nota tra il sistema GSH e lo stress nitrosativo. NO• inibisce GPx [153]. Inoltre, il GSH stesso regola l'omeostasi dell'NO• [154] e può reagire con l'NO• portando alla formazione di s-nitrosoglutatione [155]. In questo lavoro del gruppo Brasiliano sono stati osservati livelli più elevati di nitrati/nitriti – che riflettono uno squilibrio di NO• – nei pazienti Fabry prima e durante l'ERT. Questo risultato è in linea con i risultati dello studio precedente [156] e porta a pensare che la bassa attività GPx riscontrata prima e durante il trattamento ERT [91] potrebbe essere una conseguenza di livelli più elevati di NO• trovato in questi pazienti. La GPx si trova nella maggior parte delle cellule dei mammiferi e svolge un ruolo importante nell'omeostasi redox, dal momento che utilizza il GSH come donatore di elettroni per ridurre il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in acqua.

Oltre ad essere un ossidante selettivo, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agisce anche come molecola di segnale che trasporta informazioni sull'ossidazione cellulare in condizioni fisiologiche e durante l'adattamento allo stress, che è particolarmente rilevante nelle cellule endoteliali vascolari [157, 158, 159]. Anche alti livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimolano l'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), con conseguente vasodilatazione endotelio-dipendente tramite NO• [160]. Sulla scorta di questi risultati, nei pazienti Fabry in fase di diagnosi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si riscontra probabilmente a livelli più alti a causa della bassa attività GPx e potrebbe agire come un secondo messaggero in questo contesto di adattamento allo stress.

Quindi, considerando la ben nota funzione cardiovascolare dell'NO [161], le indagini sullo stress ossidativo e sul metabolismo dell'NO• nei pazienti Fabry hanno acquisito importanza [156]. Sebbene Moore e colleghi [156] abbiano riscontrato un'eccessiva colorazione di nitrotyrosine nella cute di Fabry reversibile con ERT, non hanno riscontrato differenze relative ai livelli plasmatici di nitrati e nitriti tra pazienti Fabry e controlli. Questi autori hanno spiegato che ciò potrebbe essersi verificato a causa di una mancanza di potere statistico e/o dall'ipotesi del consumo di NO• da parte di un eccesso di superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) per formare perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>). I prodotti stabili di NO• – nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) - possono essere facilmente misurati nel plasma e nelle urine per quantificare la produzione sistemica di NO in vivo [162]. In questo studio abbiamo riscontrato livelli più elevati di NO<sub>3</sub><sup>-</sup> urinario e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> nei pazienti Fabry prima e dopo ERT, dato che rafforza l'ipotesi di un'eccessiva produzione di NO• e la sua associazione con vasculopatia FD. È interessante notare che ci sono alcune prove che NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> si accumulano nei siti di infiammazione [163, 164], che può verificarsi nella FD poiché ci sono studi che mostrano processi proinfiammatori in questa malattia [91,165].

In questo studio non è stata riportata alcuna differenza statistica nel contenuto di tioli tra i tre gruppi di soggetti studiati. Dati precedenti non hanno evidenziato differenze nei gruppi tiolici tra i pazienti Fabry in trattamento e i controlli. In caso di stress ossidativo la misurazione del contenuto di tioli potrebbe dare risultati fuorvianti sull'estensione del danno perché i meccanismi di riparazione possono competere con la formazione [166]. Inoltre, considerato il riscontro di più alti livelli di GSH nei pazienti Fabry prima della ERT, anche se i gruppi tiolici fossero stati ossigenati, il GSH più alto potrebbe mascherare questo risultato (a causa del contenuto di tioli della molecola GSH). La perossidazione lipidica era considerata la reazione a catena dei radicali liberi biologicamente rilevante più studiata e sembra verificarsi come conseguenza tardiva di un processo di insulto ossidativo, non un primo danno [167]. L'attacco ai lipidi di membrana da parte delle specie reattive è ben descritto nei processi patologici correlati alla malattia di Fabry come l'aterosclerosi [168], l'infiammazione [169] e il danno cerebrale ischemico [170]. I risultati di questi studi forniscono nuovi dati sul profilo di stress ossidativo dei pazienti Fabry, principalmente alla diagnosi integrando precedenti dati sui

pazienti Fabry in trattamento ERT Fabry [9] e dimostrando lo stress nitrosativo prima e durante ERT. Appare pertanto verosimile suggerire che il danno ossidativo riscontrato nei pazienti sottoposti a ERT in entrambi gli studi non rappresenti una conseguenza della stessa ERT, in quanto i pazienti lo presentano prima di intraprendere la terapia. Inoltre, in questo studio è stato descritto un aumento importante nei livelli di GSH al momento della diagnosi che possono essere interpretati come una risposta adattativa al danno ossidativo nei pazienti.

L'efficacia incompleta dell'ERT nel ridurre i livelli di Gb3 è un dato rilevante che rafforza l'ipotesi che Gb3 potrebbe indurre stress ossidativo in questa malattia, dal momento che è stato riportato che Gb3 urinario presenta valori più elevati nei pazienti in trattamento rispetto ai controlli accompagnati da livelli più elevati di danno ossidativo alle biomolecole. Quindi, tenendo presente che la diagnosi di FD di solito si verifica nella vita adulta dopo anni di accumulo di Gb3 (e altri metaboliti) e considerando che un recente metanalisi sull'efficacia dell'ERT nella FD ha concluso che migliori opzioni terapeutiche sono necessarie [171], è possibile suggerire che anche la terapia adiuvante con antiossidanti può probabilmente avere effetti benefici in questi pazienti [140].

## **CAPITOLO 3. GLI APLOGRUPPI DEL DNA MITOCONDRIALE POSSONO INFLUENZARE IL FENOTIPO DELLA MALATTIA DI FABRY?**

### **3.1 Mitocondrio e genoma mitocondriale**

I mitocondri e il loro DNA (DNA mitocondriale [mtDNA]) derivano da un processo di endosimbiosi avvenuta circa 1,5 miliardi di anni fa, quando protobatteri popolavano cellule eucariotiche primordiali e si stabilivano nel nuovo ambiente. MtDNA - una reliquia ma non un fossile - ha perso gran parte della sua indipendenza, ma continua a funzionare sotto il controllo generale del genoma nucleare (nDNA). I mitocondri sono onnipresenti negli eucarioti e sono essenziali per la sopravvivenza. La loro funzione principale è quella di sostenere la respirazione aerobica e fornire energia e calore. I mitocondri svolgono anche altri ruoli importanti, anche nella segnalazione cellulare nei processi di morte cellulare per apoptosi.

La catena respiratoria è l'unica via metabolica nella cellula che è sotto il duplice controllo del mtDNA e nDNA. C'è una lunga storia di indagini sui mitocondri, che hanno avuto lo scopo di identificare marcatori genetici relativi all'invecchiamento, ai disturbi neuromuscolari e alle malattie neurodegenerative e, più recentemente, a malattie comuni come il diabete e i tumori. In un recente lavoro, il Prof. Mancuso e collaboratori hanno revisionato il ruolo degli aplogruppi del mtDNA in selezionati disturbi neurodegenerativi. [172]

Sebbene i mitocondri contengano il proprio genoma e macchinari per la sintesi proteica, la maggior parte dei polipeptidi mitocondriali sono codificati nel genoma nucleare, sintetizzato nel citosol e importato nei mitocondri post-trascrizionali.

Il principale processo che avviene a livello mitocondriale è la sintesi di ATP formato dalla fosforilazione ossidativa. Sono anche coinvolti in altri processi metabolici, compresa la biosintesi di aminoacidi, vitamine, cofattori, acidi grassi, cluster ferro-zolfo, diversi pathways di segnalazione cellulare e di morte cellulare programmata. Le molecole di ATP sono generate tramite glicolisi o per ossidazione di glucosio in etanolo o acido lattico. Gli elettroni dai substrati ossidativi vengono trasferiti all'ossigeno, tramite una serie di reazioni redox, per generare acqua. In questo processo, i protoni vengono estratti dalla matrice attraverso la membrana interna mitocondriale mediante la catena di trasporto degli elettroni (ETC), che consiste di quattro complessi multimerici (da I a IV) più due piccoli vettori di elettroni- coenzima Q (noto anche come ubiquinone) e citocromo c. Questo processo crea un gradiente protonico elettrochimico. Viene prodotto ATP dall'afflusso di questi protoni a ritroso attraverso il complesso V, o ATP sintasi (il "motore rotativo").[174] I mitocondri contengono da due a dieci molecole di mtDNA; è una molecola circolare di 16,5 kilobasi privo di introni e costituito da una catena pesante (H) e una catena leggera (L).[173 ,175] MtDNA contiene 37 geni e codifica 22 RNA di trasferimento (tRNA), due ribosomiali RNA (12S e 16S) e 13 polipeptidi (mRNA). I 13 polipeptidi codificati dal mtDNA fanno parte del sistema della catena respiratoria e sono assemblati insieme a subunità codificate dal DNA nucleare.

Sette di questi appartengono al complesso I o ridotto nicotinammide adenina dinucleotide (NADH) deidrogenasi— NADH, ubichinone ossidoreduttasi (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6).

Uno appartiene al complesso III o ubiquinol — ferricytochrome c ossidoriduttasi. Tre appartengono al complesso IV o citocromo c ossidasi — COX I, COX II e COX III. Gli ultimi due appartengono a complesso V o ATP sintasi — ATPase6 e ATPasi8. Le restanti proteine mitocondriali, comprese tutte le subunità del complesso II, sono codificate da nDNA. Negli esseri umani, il mtDNA viene trasmesso per linea materna.[173, 175]

### **3.2 Gli aplogruppi del DNA mitocondriale e neurodegenerazione**

Il MtDNA è comunemente usato per complementare le informazioni fornite dal cromosoma Y, secondo studi sull'evoluzione dell'uomo moderno. È possibile teoricamente seguire la trasmissione di mtDNA dall'originale "madre antenata" identificando polimorfismi comuni che si sono accumulati nel tempo. Set specifici e unici di quei polimorfismi comuni definiscono gruppi di mtDNA, chiamati

aplogruppi, che si sono evoluti dallo stesso antenato. Studi filogeografici hanno identificato il primo antenato comune, chiamato "Eva mitocondriale", [176], ed ipotizzato che fosse vissuto in Africa circa 200.000 anni fa. Sequenziamento diretto e analisi dei polimorfismi da lunghezza dei frammenti di restrizione hanno permesso l'identificazione l'albero degli aplogruppi del mtDNA e la rotta di migratoria del mtDNA. La struttura di ramificazione basale della variazione del mtDNA in molte parti del mondo è ora ben nota [177]. . Gli aplogruppi africani rientrano in sette principali famiglie (L0, L1, L2, L3, L4, L5 e L6). Circa 85.000 anni fa, probabilmente nel Corno d'Africa, la radice dell'aplogruppo L3 ha dato origine a molti aplogruppi discendenti (probabilmente a causa di alcuni eventi di colonizzazione o crescita della popolazione locale).

Il mtDNA non africano discende da L3 e appartiene alle superclassi M o N (ovviamente esclusi i discendenti delle migrazioni dall'Africa negli ultimi millenni). Nel subcontinente indiano e nel sud-est asiatico, c'è la più ricca variazione basale nell'albero originato dagli aplogruppi M e N, e questo suggerisce la rapida colonizzazione lungo la costa meridionale dell'Asia circa 60.000 anni fa. Le espansioni verso nord avvennero più tardi, circa 45.000 anni fa. Oltre 30 le sottoclassi dell'aplogruppo M sono presenti in Asia. Gli aplogruppi A, B, C, D e X sono stati trovati nelle Americhe, anche se provengono principalmente dall'Asia. Negli Europei e nel Vicino Oriente (che condividono un antenato comune piuttosto recente), nove differenti aplogruppi mitocondriali sono stati identificati (H, I, J, K, T, U, V e X). La variazione degli aplogruppi del mtDNA europeo basale risalgono a circa 45.000 anni fa [177]. Sequenziamento completo del mtDNA e il crescente numero di campioni analizzati consentono di suddividere gli aplogruppi in più piccoli gruppi, individuando rami più giovani sull'albero evolutivo del mtDNA. La classificazione in sottoaplogruppi, quindi è in continua evoluzione [177]. È stato ipotizzato che le mutazioni del mtDNA che si accumulano con l'età potrebbero portare a una diminuzione della produzione di energia e all'aumento del numero di specie reattive di ossigeno (ROS), entrambe risultanti in danno cellulare.

I polimorfismi nel mtDNA possono causare sottili differenze nelle proteine codificate e, quindi, cambiamenti minimi nella attività della catena respiratoria mitocondriale e sovrapproduzione di radicali liberi. Questo potrebbe predisporre un individuo o una popolazione, che condividono lo stesso genotipo del mtDNA, ad una precoce insorgenza di processi apoptotici, come l'accumulo di mutazioni somatiche del mtDNA e compromissione mitocondriale. Il contrario potrebbe valere per differenti polimorfismi, che potrebbero essere vantaggiosi, aumentare e/o ridurre la respirazione mitocondriale e/o ridurre la produzione di ROS [178, 179].

Specifici aplogruppi mitocondriali sono stati associati alla longevità [180, 181]. Ne consegue quindi che lo stesso aplogruppo o altri potrebbero essere coinvolti all'altro capo dell'esistenza, nella neurodegenerazione e, quindi, nella morte. A causa della sensibilità di mtDNA come marker per i

modelli di migrazione umana, tutti gli studi sull'associazione di un aplogruppo del mtDNA con le patologie deve prestare rigorosa attenzione a confrontare le etnie dei casi ai controlli.

Negli ultimi 15 anni, la ricerca è stata diretta a chiarire il coinvolgimento dei mitocondri, e difetti nella fosforilazione ossidativa mitocondriale, nelle malattie neurodegenerative tardive. Un ruolo critico per la disfunzione mitocondriale e il danno ossidativo nelle malattie neurodegenerative è stato fortemente rafforzato dalle recenti scoperte. Nonostante l'evidenza morfologica e biochimica di anomalie dei mitocondri in vari tessuti di pazienti con disturbi neurodegenerativi, tuttavia, il ruolo del genoma mitocondriale e i suoi aplogruppi come fattore di rischio sono ancora controversi. Gli aplogruppi del mtDNA sono stati associati a diverse malattie neurodegenerative, ma, ad oggi, l'unica malattia sistematicamente associata ad una diversa frequenza dell'aplogruppo del mtDNA è la malattia di Parkinson.. Perché sono richieste ampie coorti per rilevare in modo affidabile un'associazione con malattie umane complesse [182], ulteriori analisi, utilizzando campioni più grandi, saranno necessarie per rivelare in modo più definitivo il contributo di mutazioni del mtDNA o aplogruppi, se presenti, nella patogenesi delle malattie neurodegenerative [172].

Nella sclerosi laterale amiotrofica è stata identificata una carenza di enzimi della catena respiratoria, in particolare in pazienti in stato avanzato [183, 184], ma non in quelli con malattia allo stadio iniziale [185]. La diminuzione della citocromo c ossidasi (COX) è stata osservata anche nei motoneuroni in pazienti con SLA [186]. Una differenza significativa nella respirazione mitocondriale è stata osservata tra SLA e ibridi di controllo da un gruppo [187], ma non confermato da un altro [188]. Infine, una mutazione *out-of-frame* del DNA mitocondriale (mtDNA) che codifica per la subunità I di COX è stata riportata in un individuo con manifestazioni tipiche della SLA [189], e aumentati livelli di una delezione comune del mtDNA "delezione comune" e delezioni multiple sono state rilevate nel cervello [190] e nel muscolo scheletrico [191] di pazienti con forme sporadiche SLA. Tutti questi risultati suggeriscono un possibile coinvolgimento dei mitocondri nel processo di degenerazione dei motoneuroni, allo stesso modo di altre malattie neurodegenerative, come il Parkinson (PD), Alzheimer (AD) e malattie di Friedreich, per le quali polimorfismi mitocondriali specifici sono stati precedentemente suggeriti come fattori di suscettibilità genetica [192, 193].

In un recente studio del gruppo di Mancuso è stato quindi ipotizzato che i polimorfismi genetici all'interno del genoma mitocondriale potrebbero fungere da fattori suscettibilità e contribuire all'espressione clinica della SLA sporadica.

Per verificare questa ipotesi, sono stati genotipizzati predefiniti aplogruppi Europei l'europeo del mtDNA [194] in un'ampia coorte di pazienti italiani con SLA e controlli appaiati. Tutti i principali aplogruppi europei sono stati osservati in questa coorte di pazienti e controlli, secondo precedenti

studi sulla popolazione caucasica europea [194, 195], e supportando il fatto che la popolazione di controllo era ben abbinata e confrontata abbinati ai casi di sALS.

L'aplogruppo più comune osservato nelle due popolazioni era l'aplogruppo H (38,3% in sALS e 45% in controlli) [194, 195]. La frequenza degli aplogruppi H, J, K, T, U, V, X non differiva tra i due gruppi. Se confrontato con l'aplogruppo H comune, la frequenza degli aplogruppi I era inferiore nei casi di SLA rispetto a controlli (OR 0,08, CI 0,04–0,4,  $p < 0,01$ ). Un analogo risultato è stato osservato quando è stato analizzato ciascun aplogruppo confrontandolo con tutti gli altri aplogruppi. Studi di regressione multipla per testare l'ipotesi che gli aplogruppi del mtDNA possano influenzare l'età di esordio, la gravità e il sistema neurologico coinvolto la malattia non hanno raggiunto la significatività per l'associazione. L'effetto di un fattore tossico/ambientale “sconosciuto” sulla cascata fisiopatologica che porta alla degenerazione dei motoneuroni potrebbe dipendere dal background genetico del individuale. Questo è stato rilevato in altre patologie neurodegenerative come precedentemente riportato. Van derWalt et al. hanno ipotizzato che gli effetti tossici risultanti da danno ossidativo causato da polimorfismi mtDNA insieme all'esposizione ambientale alle tossine potrebbe agire in sinergia per favorire l'insorgenza della malattia di Parkinson [193]

In questo scenario, il polimorfismo del mtDNA potrebbe giocare a ruolo nella degenerazione dei motoneuroni, possibilmente interagendo con fattori genetici o ambientali sconosciuti. Una falsa associazione tra marcatori genici e malattia è comune bias negli studi di associazione dovuti a errori sulla stratificazione della popolazione stratificazione ed eventi promotori.

La somiglianza della distribuzione degli aplogruppi in questo gruppo controllo con quello di altri studi suggerisce che i due gruppi sono rappresentativi della popolazione italiana bianca generale [196].

L'aplogruppo I è definito dal nucleotide DdeI (nt) 1715 e il sito di perdita HinfI a nt 4529, in associazione con il sito DdeI a 10394, sito AvaII a nt 8249, sito AluI a nt 10028, e sito BamHI/MboI a nt 16389. In un confronto sviluppato per testare ciò che rende diverso questo aplogruppo I dagli altri aplogruppi testati, due nt nelle posizioni 16391 e 10034 sono stati identificati. Inoltre, testando tutti e sei polimorfismi indipendentemente, è emerso scoperto che solo la differenza nella frequenza degli alleli 16391A e 10034C tra pazienti con SLA e soggetti di controllo era altamente significativo ( $p < 0,01$ ).

Il primo nt (10034C) è localizzato una base prima dell'ansa T $\Psi$ C del tRNA della glicina, mentre si trova l'nt 16391A è nel segmento I ipervariabile dell'ansa D. Non è noto come questi due polimorfismi indipendenti possano conferire un' apparente protezione.

Di per sé alcuni polimorfismi sono selettivamente “neutrali” ma in specifiche combinazioni possono

agire in maniera sinergica e deleteria con altri fattori correlati alle patologie correlate fattori, come componenti nucleari, fenomeni epigenetici o fattori ambientali.

In questo scenario, l'allele 10034C allele potrebbe aumentare la stabilità di tRNA<sup>Gly</sup> a parità degli stessi fattori sconosciuti correlati alla malattia, l'opposto dell'allele 10034T. Questo fenomeno potrebbe spiegare il meccanismo di coinvolgimento del background genetico mitocondriale nella degenerazione dei motoneuroni.

Tuttavia, è richiesta cautela nell'interpretazione di questi risultati. Sebbene ci sia una logica biologica per il coinvolgimento dei mitocondri nella patogenesi delle malattie neurodegenerative in generale, e della SLA in particolare, l'effetto protettivo dei mitocondri l'aplogruppo I deve essere confermato studiando altre coorti etnicamente distinte.

Inoltre, secondo l'ipotesi che la disfunzione mitocondriale nelle prime fasi della malattia quasi certamente non è sistemica e può essere ristretto al sistema nervoso centrale [186], futuri esperimenti molecolari sono indispensabili per capire l'effetto dell'aplogruppo I sulla cascata neurodegenerativa. Questi studi dovrebbero essere eseguiti sui tessuti del sistema nervoso centrale e sul motoneurone in particolare, piuttosto che su altri tessuti periferici, incluso muscolo scheletrico. Se confermato, questo reperto rappresenta il primo fattore protettivo genetico associato alla SLA. Inoltre, questo lavoro fornisce la base per lo studio delle interazioni gene-ambiente, che può aiutare a chiarire il meccanismo sottostante la disfunzione mitocondriale rilevabile nella SLA, e può essere di rilevanza nello sviluppo di strategie per il trattamento di questo devastante disordine [196].

### **3.3 Aplogruppi del mtDNA e Malattia di Anderson-Fabry: stato dell'arte**

Ad oggi, non sono stati riportati studi incentrati sulla correlazione tra aplogruppi mitocondriali e fenotipi della malattia di Fabry [197]

Al fine di Indagare se specifici polimorfismi genetici all'interno del genoma mitocondriale (mtDNA) potrebbero agire come fattori di suscettibilità e contribuire all'espressione clinica di FD, Simoncini et al. Hanno genotipizzato gli aplogruppi europei del mtDNA in 77 pazienti italiani con FD e 151 controlli sani. Gli autori hanno quindi analizzato le distribuzioni degli aplogruppi del mtDNA nei pazienti italiani con FD, e di valutare la loro possibile influenza sulla malattia, la progressione e il coinvolgimento di diversi organi . tra pazienti e controlli.

Gli aplogruppi H e I e il cluster di aplogruppi HV erano significativamente più frequenti nei pazienti rispetto a controlli. Tuttavia, non è stata osservata alcuna correlazione con il sesso, l'età di insorgenza, il coinvolgimento degli organi.

Tale studio sembra fornire alcune prove di un contributo della variazione mitocondriale nella patogenesi della FD, almeno in Italia. Il DNA mitocondriale (mtDNA) potrebbe essere considerato un fattore modificatore candidato per i disturbi neurodegenerativi, poiché si ritiene che lo stress ossidativo mitocondriale sia coinvolto nella patogenesi di queste malattie [198, 115].

Si ritiene che la maggior parte degli europei derivi dalla principale radice dell'aplogruppo mitocondriale chiamata R, che ha sottogruppi ramificati di U (U5, U6, U2, U, U8 e K), V e H, T e J e B. Diversi aplogruppi sono stati associati con caratteristiche biologiche polimorfiche in individui sani, e con condizioni patologiche, modulanti l'espressione della malattia [172].

Gli aplogruppi H e I erano più frequenti nei pazienti rispetto ai controlli ( $P < 0,001$  [livelli di significatività dopo la correzione di Bonferroni = 0,005]). Inoltre, il cluster dell'aplogruppo HV era più frequente nei pazienti rispetto ai controlli.

È stata anche esaminata l'associazione tra cluster di aplogruppi e caratteristiche cliniche. Non è stata osservata alcuna associazione tra cardiomiopatia ipertrofica, ictus, insufficienza renale o altre caratteristiche cliniche (come aritmia, ischemia miocardica, acroparestesia, coinvolgimento gastrointestinale) e cluster di aplogruppi. Nessuna associazione è stata infine osservata tra i cluster di aplogruppi e l'età di comparsa del danno d'organo. L'eterogeneità di questa popolazione non consente di valutare un possibile legame tra aplogruppi mitocondriali e disfunzione d'organo.

Il possibile ruolo dei mitocondri nella malattia di Fabry è già stato ipotizzato in studi precedenti.

Nel 2004, Lücke e colleghi hanno esaminato la funzione mitocondriale nei fibroblasti di pazienti con FD e hanno scoperto che le attività degli enzimi della catena respiratoria I, IV e V erano significativamente inferiori nelle cellule FD, così come le concentrazioni di AMP e di ADP. Il meccanismo molecolare di queste anomalie nella fosforilazione ossidativa non è chiaro. Nello studio di Lücke e colleghi, il mtDNA non è stato studiato, e gli autori hanno concluso che il materiale di accumulo lisosomiale potrebbe portare a disfunzione mitocondriale con una compromissione della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e un calo secondario dei livelli cellulari di fosfati ricchi di energia.

La regolazione dell'ATP sintasi svolge un ruolo importante in condizioni fisiologiche e patologiche [199]. L'attività compromessa dell'ATP-sintasi, che può essere osservata quando l'ETC è compromessa, può portare all'inibizione secondaria di altri complessi della catena respiratoria per mancanza di energia o per accumulo di specie reattive dell'ossigeno che potenzialmente possono portare a danni cellulari [200].

Lo studio di Simoncini et al. rivela che due aplogruppi non correlati, H e I, e il cluster di aplogruppi HV sono sovrarappresentati nella popolazione FD. È stata osservata una precedente associazione tra gli aplogruppi H e I e l'insorgenza di retinopatia diabetica [201], ma il loro possibile coinvolgimento

nelle espressioni eterogenee di FD è un nuovo riscontro. Tuttavia, non è stata rilevata alcuna associazione tra aplogruppi e caratteristiche cliniche o progressione, anche se non è possibile escludere che questi dati possano essere dovuti a bias metodologici.

Innanzitutto, questa coorte è relativamente piccola, sarebbe indicato ripetere lo studio coinvolgendo centri più grandi. In secondo luogo, sono stati arruolati pazienti in diversi stadi della malattia (il follow-up mediano era di 6,5 anni); pertanto, poiché la FD è una malattia progressiva, potrebbe essere necessario un follow-up più lungo per confermare -o meno- questo risultato negativo. Infine, i modelli di metilazione di entrambi i DNA mitocondriali e nucleari possono anche svolgere un ruolo all'interno degli organi colpiti dalla FD, ma questo aspetto non è stato studiato in questo protocollo.[197]

## **CAPITOLO 4: PROGETTO DI RICERCA: VALUTAZIONE DI ALCUNI BIOMARKERS DI STRESS OSSIDATIVO E DELLA FREQUENZA DEGLI APLOGRUPPI MITOCONDRIALI IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA DI FABRY**

### **4.1 Background**

La malattia di Fabry comprende una estrema varietà fenotipica in relazione con il grande numero di organi e sistemi coinvolti.

La diagnosi di malattia di Fabry è complessa a causa del numero di organi/sistemi coinvolti e dei fenotipi clinici non specifici e della sua rarità. La progressione clinica della malattia si manifesta tra i 30-40 anni quando per i numerosi organi coinvolti compaiono manifestazioni cliniche quali insufficienza cardiaca, renale ed eventi cerebrovascolari. La morte di solito sopraggiunge durante la quarta/quinta decade di vita ed è secondaria all'interessamento cardiaco, renale o cerebrale anche se l'avvento della dialisi e della terapia enzimatica sostitutiva stanno sensibilmente prolungando la vita media dei pazienti.

Seppur conosciuto in dettaglio il gene che causa la malattia e la sua funzione, ad oggi appare ancora poco chiaro il perché la malattia presenti un'ampia eterogeneità di presentazione clinica, anche all'interno della stessa famiglia. I fattori che potrebbero giocare un ruolo nella modulazione fenotipica della malattia di Fabry sono molteplici e non ancora studiati (fattori ambientali, fattori epigenetici, altri geni modulatori).

I mitocondri rappresentano “la centralina energetica della cellula” [202]. Sono organelli intracellulari che svolgono diverse funzioni, la più importante delle quali è rappresentata dalla produzione di energia sotto forma di ATP mediante la fosforilazione ossidativa. Il mitocondrio è l'unico organello

delle cellule animali dotato di un proprio genoma, il DNA mitocondriale (mtDNA). In ogni mitocondrio si trovano da 2 a 10 copie di mtDNA, ed in ogni cellula più di 1000 copie. Il mtDNA è una molecola circolare di DNA a doppio filamento, costituito da 16569 paia basi, che codifica 37 geni: 13 codificano peptidi della catena respiratoria mitocondriale, 2 RNA ribosomali e 22 RNA transfer (tRNA). Tutte le altre proteine mitocondriali (comprese le 67 subunità che concorrono a formare i cinque complessi della catena respiratoria) sono codificate dal DNA nucleare.

L' mtDNA umano è caratterizzato da un elevato tasso evolutivo che è 10 – 20 volte quello dei geni del nucleo; la sua variazione di sequenza si è perciò generata lungo linee di radiazione materna esclusivamente per l'accumulo sequenziale di nuove mutazioni. Nel tempo questo processo di divergenza molecolare ha dato origine ad entità monofiletiche dette aplogruppi.

Un valido strumento per determinare se eventuali polimorfismi mitocondriali possano agire come fattori di suscettibilità o di protezione nell'insorgenza di malattie neurodegenerative è stato fornito proprio dall'analisi degli aplogruppi mitocondriali, definiti come clusters di genomi mitocondriali continente-specifici correlati all'evoluzione e definiti in base alla presenza di ancestrali e stabili polimorfismi.. La presenza di stabili siti polimorfici all'interno della regione codificante definisce l'aplogruppo, mentre la maggior parte delle mutazioni che si osservano sia nelle sequenze codificanti che nella regione di controllo e che si realizzano all'interno di preesistenti aplogruppi definiscono il tipo individuale di mtDNA, o aplotipo [172]. È stato ipotizzato che variazioni all'interno del mtDNA possano causare sottili differenze nelle proteine codificate ed indurre una modificazione, seppur minima, nelle attività della fosforilazione ossidativa e nella produzione di specie reattive dell'ossigeno, o viceversa agire come fattori protettivi, con effetto benefico sulla catena di trasporto di elettroni e/o per la produzione di radicali liberi.

In questi ultimi anni la ricerca è stata finalizzata alla comprensione di un eventuale ruolo degli aplogruppi nella modulazione dell'espressione dei geni mitocondriali durante l'evoluzione e i processi di adattamento del genere umano; si è iniziato inoltre ad indagare se la variabilità del genoma mitocondriale potesse svolgere un'azione protettiva o, viceversa, agire come fattore di rischio nell'insorgenza di malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (192), la malattia di Friedreich (203), la Sclerosi Laterale Amiotrofica [196]), la malattia di Alzheimer e Corea di Huntington [172].).

Benchè numerose mutazioni del gene GLA siano state associate alle forme classiche e tardive, una definitiva correlazione genoripo-fenotipo non è stata dimostrata e la diagnosi e classificazione della malattia non possono essere effettuate solo su base genetica. Il deposito dei substrati è correlato al danno tissutale nella malattia di Fabry; tuttavia, i meccanismi molecolari sottostanti restano non completamente conosciuti. I pazienti affetti da malattia di Fabry presentano un importante danno

ossidativo proteico e lipidico, ridotte difese antiossidanti e aumentali livelli di citochine e biomarcatori infiammatori [204–205]. L'eccesso di GB3 intracellulare induce stress ossidativo e un up-regulation dell'espressione delle molecole di adesione cellulare nelle cellule endoteliali vascolari [206]. Inoltre è stato ipotizzato che si verifica uno stato proossidante che è correlato e sembra essere indotto dal GB3 nei pazienti con malattia di Fabry [207].

## 4.2 Obiettivi dello studio

Lo scopo del nostro progetto multicentrico è stato quello di valutare il ruolo dello stress ossidativo nella malattia di Fabry. In particolare abbiamo valutato (I) se vi sono segni di stress ossidativo nel sangue; (II) se esiste un'associazione tra biomarcatori di stress ossidativo e manifestazioni cliniche della malattia e/o una differenza tra forma classica e varianti *late onset*; (III) se i parametri dello stress ossidativo nel tempo si correlano con il Lyso-Gb3 e l'insorgenza e progressione della malattia, in un sottogruppo di 8 soggetti/paziente naive al trattamento con normali livelli di Lyso-Gb3, al fine di valutare se i biomarkers di stress ossidativo possano presentare marcatori precoci della malattia. Questo progetto si proponeva inoltre di valutare la frequenza degli aplogruppi mitocondriali, un loro possibile ruolo di suscettibilità genetica nel determinismo della malattia di Fabry, e se essi potessero influenzare lo stato di stress ossidativo plasmatico in tali pazienti; tuttavia l'analisi dei dati, relativi a questo secondo obiettivo, sul gruppo dei pazienti arruolati non ha permesso di ottenere risultati rilevanti, chiari e definitivi pertanto il nostro gruppo si propone di proseguire un ulteriore approfondimento in questo campo di ricerca scientifica, raccogliere più dati estendendo l'analisi su un maggior numero di pazienti e quindi coinvolgendo più centri.

## 4.3 Pazienti

I soggetti ammessi nello studio erano individui adulti di entrambi i sessi seguiti presso le UU.OO. dei centri coinvolti nello studio (vedi elenco allegato) che soddisfavano i seguenti criteri di inclusione:

- ❖ Pazienti di etnia Caucasica e di età compresa tra i 18 e i 75 anni;
- ❖ Pazienti in grado di comprendere e aderire a quanto richiesto dal protocollo dello studio e di fornire consenso informato scritto.
- ❖ Affetti da Malattia di Fabry (sia con diagnosi clinica che genetica)

Criteri di esclusione:

- pazienti con gravi disturbi psichiatrici (Asse 1 o 2 del DSM IV);

- pazienti con ritardo mentale grave o gravissimo (QI alla WAIS < di 45).

Ciascun paziente era libero di uscire dallo studio in qualsiasi momento, senza dover fornire alcuna motivazione e senza alcuna ripercussione sul proprio trattamento medico o sui diritti legali.

#### **4.4 Disegno dello studio e metodi**

Lo studio è una raccolta dati che è stata condotta da Ottobre 2019 fino a Giugno 2022, periodo necessario per reclutare i pazienti ed effettuare lo studio degli aplogruppi mitocondriali e dei marcatori di stress ossidativo.

Durante una visita di routine è stato presentato lo studio ai pazienti che soddisfavano i criteri di inclusione/esclusione sopra riportati. In tale occasione, i pazienti venivano informati in merito a caratteristiche, obiettivi e procedure dello studio. L'assenso alla partecipazione è stato confermato dalla sottoscrizione del modulo di consenso informato. Si procedeva a registrazione dei dati principali del paziente (età, sesso, età alla diagnosi) ed il paziente (e i relativi campioni biologici/DNA) veniva identificato con un codice alfanumerico attribuito durante la visita sulla base del codice del centro partecipante e della sequenza di arruolamento (es., PI-001). Se il paziente acconsentiva alla partecipazione allo studio in oggetto, una aliquota (2 ml) di sangue veniva prelevata nel corso del primo prelievo utile di routine ed inviata al referente dello studio (Prof. M. Mancuso, Clinica Neurologica AOUP) ed infine congelata a -80 °C fino al momento delle analisi sul DNA mitocondriale. Qualora il DNA del paziente fosse stato in precedenza già raccolto presso le UU.OO. dei centri coinvolti nello studio, una aliquota di sangue disponibile (circa 3 ml) veniva inviata al referente dello studio e congelata a -80 °C fino al momento delle analisi sul DNA mitocondriale e al dosaggio dei marcatori di stress ossidativo.

Il luogo dove sono state custodite le provette è il Laboratorio di Neurochimica e Neurobiologia Clinica della Clinica Neurologica dell'AOUP (responsabile Prof. Gabriele Siciliano), ed il Prof. Mancuso responsabile dell'integrità dei campioni e della loro custodia.

Sono stati valutati tutti gli aplogruppi mitocondriali caucasici (H, I, J, K, T, U, V, W, and X) dei pazienti arruolati attraverso metodiche di PCR-RFLP standard ([196]) e i seguenti marcatori di stress ossidativo: AOPP, FRAP, tioli.

In casi selezionati, nel corso della evoluzione della malattia di cui i pazienti risultano affetti, è stato eseguito un controllo dei marcatori di stress ossidativo già compresi nello studio in oggetto (FRAP, AOPP, Tioli); una provetta di sangue (3 ml) è stata quindi prelevata in occasione del primo prelievo utile per monitorare il quadro clinico del paziente stesso.

Il gruppo di pazienti era composto da 60 soggetti caucasici affetti da malattia di Fabry, geneticamente confermata (Tabella 1), reclutati da sette Centri italiani con esperienza in FD.

La diagnosi e la classificazione fenotipica sono state effettuate seguendo le raccomandazioni internazionali [2, 208], tuttavia il gruppo includeva pochi casi di interpretazione incerta come discusso di seguito.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a prelievo di 10 ml di sangue da vena antecubitale, al mattino (a digiuno) per l'analisi di marcatori di stress ossidativo: AOPP (prodotti proteici ad ossidazione avanzata), FRAP (potere antiossidante di riduzione del ferro (FRAP) e gruppi tiolici totali.

I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da una popolazione di 77 controlli sani (32 uomini, età media  $61,5 \pm 18,2$  anni), in assenza di legame di parentela con i pazienti, secondo le normative del centro coordinatore.

I livelli di AOPP, un marcatore di danno ossidativo alle proteine, sono stati valutati secondo quanto riportato nel lavoro di Witko-Sarsat et al. [209]. Gli AOPP sono noti biomarcatori utilizzati per valutare le alterazioni ossidative delle proteine, che avvengono attraverso l'attività mieloperossidasi (MPO) dei neutrofili. MPO catalizza la produzione di acido ipocloroso dall'idrogeno ioni perossido e cloruro; l'acido ipocloroso è capace di ossidare le proteine plasmatiche per generare AOPP. I livelli di AOPP si correlano con le concentrazioni plasmatiche di ditirosina e dei prodotti finali di glicazione avanzata (AGE)-pentosidina come indici di danno proteico mediato dall'ossigeno. AOPP misurano le proteine altamente ossidate, in particolare l'albumina, e riflettono l'ossidazione proteica derivante da neutrofili e monociti [210]. Inoltre, risulta che le AOPP fanno parte integrante del sistema antiossidante non enzimatico del proteoma plasmatico. Il fibrinogeno ossidato, molecola responsabile della positività della reazione chimica AOPP, è legato all'apolipoproteina (a), che potrebbe competere con il plasminogeno per i suoi siti di legame sul fibrinogeno, causando l'inibizione della fibrinolisi e la promozione danno cardiovascolare. Sebbene sia stato proposto che il sistema AOPP funzioni come un'arma a doppio taglio del proteoma plasmatico, tale aspetto non diminuisce in alcun modo il suo valore diagnostico come biomcatore dello stress ossidativo. Per questa ragione e considerando che i prodotti di modificazione ossidativa delle proteine hanno diversi vantaggi come la formazione precoce, una più lunga durata della vita, maggiore stabilità e affidabilità rispetto a altri marcatori ossidativi [211], abbiamo scelto AOPP come biomcatore per testare se cambiamenti proteico-ossidativi si verificano nella FD.

Per misurare le proprietà antiossidanti non enzimatiche, FRAP è stato dosato in campioni di plasma, secondo le indicazioni di Benzie e Strain [212]. FRAP riflette la concentrazione di antiossidanti non enzimatici a basso peso molecolare ed è indipendente dalla concentrazione di proteine [213]. In questo lavoro abbiamo selezionato un test per FRAP affinché fornisca risultati veloci e riproducibili,

consentendo, allo stesso tempo, una migliore valutazione oggettiva dell'attività antiossidante non proteica.

Il contenuto di tioli totali plasmatici (t-SH) è stato calcolato attraverso la valutazione dei gruppi sulfidrilici presenti nelle molecole, seguendo il protocollo descritto da Hu [214]. I gruppi sulfidrilici (-SH) sono responsabili del mantenimento della struttura e della funzione di proteine, enzimi e membrane, inoltre essi possono diminuire il danno causato dallo stress ossidativo. Infine, il liso-Gb3 è stato analizzato su test DBS (dried blood spot) in diversi laboratori e successivamente i dati sono stati acquisiti presso il centro coordinatore per l'analisi.

Non abbiamo eseguito alcuna analisi statistica tra l'attività AGAL-A nei leucociti del sangue periferico e dei parametri di stress ossidativo perché nella nostra coorte la maggior parte dei casi erano rappresentati da pazienti di sesso femminile (66%) e nelle donne l'attività AGAL-A non costituisce un marcatore affidabile di malattia [2].

In un sottogruppo di otto pazienti in cui la diagnosi di FD è stata confermata essendo parenti di casi sintomatici, noi abbiamo monitorato i biomarcatori dello stress ossidativo, i livelli di Lyso-Gb3 e l'eventuale coinvolgimento pre-clinico degli organi nel tempo. Durante questo periodo di osservazione, non è stata intrapresa alcuna terapia aggiuntiva, lo stile di vita non è cambiato e non si sono verificate patologie correlate alla malattia di Fabry.

I Comitati Etici di ciascun centro hanno approvato il progetto e i pazienti hanno fornito il loro consenso informato per partecipare allo studio.

I risultati attesi: screenare un ampio gruppo di pazienti affetti da Malattia di Fabry; Definire il ruolo degli aplogruppi mitocondriali e dei fattori di stress ossidativo come eventuali fattori di modulazione di malattia e come eventuali biomarcatori di malattia stessa.

## **4.5 ASPETTI ETICI**

### **4.5.1 Comitato etico**

Prima dell'inizio, lo studio è stato sottoposto al Comitato Etico per l'approvazione del protocollo, della Scheda Informativa e della Scheda di Consenso Informato.

### **4.5.2 Consenso Informato**

Prima del reclutamento, ciascun paziente è stato informato delle caratteristiche e finalità dello studio ed ha espresso il proprio consenso per iscritto sull'apposito documento e stilato in accordo alla Dichiarazione di Helsinki (nella forma adottata dalla 18a World Medical Assembly, 1964, e rivista dalla 29a World Medical Assembly, Tokyo 1975, dalla 35a World Medical Assembly, Venice 1983, e dalla 41a World Medical Assembly, Hong Kong 1989).

### **4.5.3 Riservatezza**

Il ricercatore ha assicurato il mantenimento dell'anonimato dei soggetti. Sul CRF o su altri documenti del progetto i pazienti non sono stati identificati con il nome ma con le loro iniziali e un numero d'ordine. Sul CRF è stato anche identificato con un codice il centro partecipante (allo) che ha reclutato il paziente in esame. Il ricercatore custodisce le schede separate con i nomi dei pazienti e i documenti con i rispettivi codici. Tutti i documenti (ad es., le schede di consenso informato firmate) sono mantenuti in condizioni di riservatezza dal ricercatore. I ricercatori dei vari centri partecipanti allo studio (vedi elenco allegato) hanno inviato la propria CRF compilata correttamente unitamente al campione di DNA o di sangue per ciascun paziente. Il campione di DNA o di sangue inviato è stato identificato con un codice alfanumerico attribuito durante la visita sulla base del codice del centro partecipante e della sequenza di arruolamento (es., PI-001). In nessun modo i dati sensibili sono stati rivelati ai vari componenti dello studio multicentrico.

In conformità alla legge 196/2003 ("Codice in materia di Protezione dei Dati Personali") e all'Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici n. 8/2014 del 11 dicembre 2014 e successive modifiche e/o integrazioni, i dati personali dei pazienti sono memorizzati ed utilizzati solo per scopi scientifici e solo in forma anonima.

### **4.5.4 Conservazione della documentazione e dei campioni**

Il ricercatore conserverà copie di tutta la documentazione dello studio per un periodo di 15 anni dal completamento dello studio.

Il ricercatore principale sarà il responsabile della gestione dei campioni biologici utilizzati per esami genetici secondo quanto previsto dalla pratica clinica. In particolare, i campioni (aliquota di sangue e/o DNA estratto) saranno conservati per un periodo di due anni presso il Laboratorio di Neurobiologia Clinica e Neurochimica della Clinica Neurologica (sotto la responsabilità del Prof. M Mancuso della Clinica Neurologica AOUP) dopodiché saranno distrutti. Il paziente avrà facoltà in qualsiasi momento di richiedere la distruzione del materiale biologico conservato, come previsto dalla pratica clinica.

### **4.5.5 ASSICURAZIONE**

Non essendo previste indagini invasive che fuoriescano dallo screening diagnostico necessario per il corretto inquadramento eziologico di questi pazienti, l'aspetto assicurativo è stato disciplinato dalle procedure previste per la normale routine clinica.

## 4.6 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando la versione SPSS Statistics (Pacchetto statistico per le scienze sociali, versione 20.0 per Windows). I dati quantitativi sono stati forniti come media  $\pm$  SD. La distribuzione normale è stata determinata utilizzando il test Kolmogorov–Smirnov. Il test t di Student e il test U di Mann-Whitney sono stati ritenuti appropriati per confrontare i due gruppi. È stato eseguito il test di correlazione di Spearman tra le variabili. il valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

In particolare, gli aplogruppi mitocondriali e le relative frequenze verranno comparati ai dati dei controlli usando il test  $\chi^2$  test e analisi di regressione logistica. L'associazione verrà misurata con il test odds ratio (OR) con un intervallo di confidenza del 95%. Il software STATA 9.0 (College Station, TX, USA) verrà utilizzato per le analisi statistiche.

## 4.7 Risultati

La tabella 1 mostra i dati demografici, molecolari e le caratteristiche cliniche dei pazienti. Abbiamo arruolato 60 pazienti italiani con malattia di Fabry geneticamente confermata (20 uomini, età media  $46,3 \pm 17,3$  anni, durata media della malattia 14,9 anni). Per completezza, i casi numero 25 e 30, portatori della mutazione D313Y e i casi 40, 41 con mutazione Arg118Cys, sono considerati di non chiara interpretazione. In questi casi, è stato condotto un esteso *work up* diagnostico (incluso lo screening NGS per i geni coinvolti in cardiomiopatia ipertrofica (HCM) nei casi 41) per ricercare altre patologie che potessero spiegare il danno d'organo risultando comunque negativo.

La storia familiare dei casi 40 e 41 era positiva per insufficienza renale e malattie cardiache nelle generazioni precedenti.

Nessuno dei pazienti arruolati era fumatore o forte bevitore e non sono state segnalate ulteriori malattie. In otto casi (numeri 1, 2, 19, 30, 31, 32, 40, 41, vedi Tabella 1), al momento della conferma genetica, lo screening multiorgano era risultato negativo o documentava una disfunzione sub clinica. La cardiomiopatia ipertrofica e l'aritmia erano significativamente più frequenti nei maschi ( $p = 0,002$  e  $p = 0,043$  rispettivamente) (Tabella 2). L'età dell'insorgenza dell'ictus era più precoce nelle femmine rispetto ai maschi (37,73 anni vs 43,5 anni,  $p = 0,046$ ), mentre il coinvolgimento gastrointestinale si

manifestava più precocemente nei maschi (10 anni) rispetto alle femmine (27,43 anni,  $p = 0,02$ ) (Tabella 3).

La tabella 4 presenta i valori dei parametri dello stress ossidativo tra pazienti e controlli. Come atteso, i valori medi di tutti i parametri dello stress ossidativo nei controlli sani erano nel range normale, mentre i livelli di AOPP erano significativamente superiori ( $p < 0,00001$ , Fig. 7) e FRAP (Fig. 8) e tioli (Fig. 9) significativamente più bassi in FD rispetto ai controlli sani ( $p < 0,00001$ ). Questi parametri non erano significativamente differenti né tra i pazienti in terapia enzimatica sostitutiva (ERT) e i pazienti non-ERT (AOPP:  $p = 0,129$ , FRAP  $p = 0,441$ , tioli  $p = 0,315$ ) né per genere ( $p = 0,799$  per AOPP,  $p = 0,901$  per FRAP,  $p = 0,367$  rispettivamente per i tioli) o per età di insorgenza della malattia.

Non è stata osservata alcuna associazione tra cardiomiopatia ipertrofica, aritmia, ischemia miocardica, proteinuria, insufficienza renale, acroparestesia, dolicoectasia vertebro-basilare, coinvolgimento gastrointestinale e parametri di stress ossidativo.

L'unica associazione osservata era tra i livelli di FRAP e ictus ( $p = 0,02$ ), con livelli patologici di FRAP inversamente associati all'ictus.

Nessuna correlazione è stata evidenziata tra i marcatori di stress ossidativo e la durata complessiva di malattia (AOPP  $p = 0,324$ ; FRAP  $p = 0,192$ ; tioli  $p = 0,581$ ). Inoltre, non è stata documentata alcuna correlazione tra i livelli di Lyso-Gb3 e AOPP ( $p = 0,415$ ), FRAP ( $p = 0,51$ ) o tioli ( $p = 0,827$ ). Confrontando la forma classica (esordio prima dei 50 anni di età) e le varianti tardive di FD, valori significativamente maggiori dei livelli di AOPP sono stati osservati nella forma ad esordio tardivo ( $p = 0,04$ , Tabella 5). Lo stesso è stato osservato nel nostro gruppo di controllo (<50 anni vs > 50 anni, Tabella 6). Confrontando le forma tardive di malattia con il sottogruppo di controllo di età maggiore ai 50 anni, è stata rilevata una significativa differenza dei valori medi di AOPP, FRAP e tioli, come mostrato nella Tabella 7.

Data la differenza di età sopra descritta, abbiamo condotto un'analisi bivariata, includendo l'età e la durata complessiva di malattia (definito come differenza tra l'età attuale e l'età della prima manifestazione della malattia) e la cardiomiopatia come variabili indipendenti; la differenza era significativa nonostante la correzione per età ( $p = 0,047$ ) e durata complessivo della malattia ( $p = 0,045$ ).

La Figura 10 mostra i marcatori di stress ossidativo nel tempo in un sottogruppo di otto pazienti naïve al trattamento, con valori normali di Lyso-Gb3 (valori di riferimento <1,8 ng/mL) al tempo di arruolamento, al follow up e alla relazione con eventi clinici o subclinici significativi. Quattro pazienti (4A, B, C e D) hanno mostrato una significativa alterazione dei parametri di stress ossidativo già

prima della comparsa della compromissione d'organo o segni caratteristici di FD durante l'ultimo follow-up. Altri due i pazienti (4E e 4F) hanno mostrato alterazioni patologiche degli indicatori di stress ossidativo prima della comparsa del danno d'organo, mentre i livelli di Lyso-Gb3 sono rimasti normale. Gli ultimi due casi (4G e 4H) hanno mostrato parametri patologici di stress ossidativo e normali livelli di Lyso-Gb3 al momento della diagnosi, avendo già presentato la compromissione di uno o più organi bersaglio.

## 4.8 Discussione

In questo studio, abbiamo osservato un rilevante squilibrio dello stato di stress ossidativo nei pazienti con FD in diversi stadi della malattia, compresi quei casi in cui Lyso-Gb3 era normale e/o il danno d'organo non si era ancora manifestato.

La terapia enzimatica sostitutiva ha cambiato la storia naturale della malattia nei pazienti con FD. L'inizio del trattamento durante l'infanzia potrebbe rallentare, o anche fermare la progressione del danno d'organo prima che si verificano cambiamenti irreversibili [215]. Sebbene l'esatta patogenesi della malattia di Fabry risulti ancora poco chiara, l'accumulo di Gb3 e liso-Gb3 nell'endotelio vascolare e la successiva infiammazione sembrano svolgere un ruolo cruciale, mentre l'inizio precoce dell'ERT può ridurre la deposizione di liso-Gb3 e mitigare la progressione della malattia [216]. ERT sembra essere meno efficace nei pazienti che presentano sia ritardo diagnostico che di inizio della terapia, e in quelli che presentano una forma classica si osserva la tendenza ad intraprendere la terapia quando i primi sintomi e segni di danno d'organo si manifestano [216]. Inoltre, in un recente documento di raccomandazioni di consenso espresse da un gruppo di esperti [215] è stato suggerito che i ragazzi asintomatici potrebbero beneficiare di un inizio più precoce della ERT sulla base dei seguenti criteri: presenza di una variante patogena di GLA responsabile di il fenotipo classico, storia familiare di severità della malattia in maschi, attività AGAL-A non rilevabile nei leucociti da sangue periferico e livelli plasmatici di liso-Gb3 oltre 20 nmol/L. Pertanto, i biomarcatori potrebbero essere usati come dati affidabili per guidare il giudizio clinico nella gestione terapeutica.

D'altra parte, negli ultimi anni ci sono diverse evidenze che l'accumulo di Lyso-Gb3 non sia l'unico meccanismo alla base della progressione della FD. Numerosi autori hanno avanzato l'ipotesi che lo stress ossidativo giochi un ruolo chiave nella progressione del danno d'organo nella malattia di Fabry. Nel 2012 Biancini e collaboratori hanno dimostrato che nella FD si verificano stati pro-ossidanti e che sembrano essere indotti dal Lyso-Gb3 [91]. In questo loro studio sono stati riportati livelli ridotti delle difese antiossidanti (glutazione ridotto, attività di glutazione perossidasi e aumento del rapporto superossido dismutasi/catalasi in eritrociti) e alti livelli di malondialdeide (MDA) e dei prodotti proteici con gruppi carbonilici proteici (prodotto di proteine e danno lipidico) sono stati osservati

[91]. È interessante notare che i livelli urinari di Gb3 presentavano una correlazione positiva con i livelli plasmatici di IL-6, gruppi carbonilici e MDA, suggerendo un possibile legame tra liso-GB3 e stress ossidativo [91]. Nel 2016, il nostro gruppo ha anche ipotizzato che gli aplogruppi del DNA mitocondriale possano essere coinvolti nella modulazione dello stress ossidativo in FD, spiegando così l'espressione eterogenea del fenotipo della malattia di Fabry [197].

Nel 2015, Chimenti e collaboratori hanno valutato il ruolo dello stress ossidativo nella disfunzione dei cardiomiociti e hanno riportato che la produzione miocardica di ROS indotta da GB3 dava un importante contributo alla disfunzione cardiaca della cardiomiopatia correlata a FD [127].

Recentemente, Ravarotto et al. hanno documentato che l'attivazione dello stress ossidativo e dei pathways di segnale correlati allo stress ossidativo (aumentata espressione di p22phox e dei livelli di MDA), suggerendo un possibile ruolo dello stress ossidativo nella fisiopatologia del rimodellamento cardiovascolare-renale [94]. In questo studio, i pazienti coinvolti erano in terapia enzimatica sostitutiva, suggerendo che lo stress ossidativo si verifici, nonostante l'ERT, nell'ipertrofia ventricolare sinistra correlata alla FD. Conclusioni sovrapponibili sono state riportate da Biancini et al. nel 2016; questi autori hanno mostrato più alti livelli di perossidazione lipidica in FD prima di ERT, che non sono rientrati o comunque ridotti col trattamento [140]. Questi risultati permettono di supporre un ruolo delle terapie mirate allo stress ossidativo in aggiunta alla terapia enzimatica sostitutiva in FD.

È stato dimostrato che l'accumulo di Gb3 non è limitato ai lisosomi ma interessa anche le membrane delle cellule endoteliali, inducendo la disregolazione dell'attività della NO sintasi endoteliale con ridotta produzione di NO che favorisce lo stress ossidativo [217].

I nostri risultati confermano l'attivazione dello stress ossidativo nella FD; in particolare, abbiamo osservato elevati livelli di AOPP e ridotti livelli di antiossidanti (FRAP e tioli) nei pazienti rispetto ai controlli sani; questi parametri sono risultati alterati nonostante ERT, confermando l'osservazione di Biancini [140]. Considerati gli altri studi sullo stress ossidativo finora pubblicati, potremmo ipotizzare un circolo vizioso tra la deposizione di Lyso-Gb3 e stress ossidativo: il deposito di Lyso-Gb3 induce danno d'organo, disfunzione endoteliale, incrementa la formazione vascolare di superossido e di radicali liberi, danno ossidativo al DNA e risposta ossidativa alterata, che a sua volta incrementa il danno d'organo e il rimodellamento.

Non abbiamo osservato un'associazione tra alterazione dei parametri di stress ossidativo e manifestazioni di malattia. L'associazione inversa tra valori patologici di FRAP e l'ictus (l'opposto di quello che ci si aspetterebbe, dato il possibile ruolo dello stress ossidativo nella malattia dei piccoli vasi cerebrali) non è chiaro e richiede ulteriori indagini.

Abbiamo anche riscontrato livelli significativamente più alti di AOPP tra i soggetti con forma *late onset* e forma classica, nonostante la correzione per età e durata complessiva della malattia.

È interessante notare il riscontro di alterazioni patologiche dello stress ossidativo in un gruppo di otto soggetti naïve al trattamento/pazienti con mutazioni correlate a FD e livelli di Lyso-Gb3 normali. I livelli di Lyso-Gb3 non erano correlati ai biomarcatori valutati; possiamo supporre che questi parametri riflettano un'attivazione precoce dello stress ossidativo e del danno d'organo, prima dell'aumento del lyso-GB3, tuttavia sono necessari ulteriori studi. Questo gruppo includeva alcuni casi complessi: due giovani donne pre-sintomatiche con mutazione patogenetica p.Phe113Leu, tradizionalmente correlato a un fenotipo ad insorgenza tardiva, in cui lysoGB3 i livelli potrebbero essere a volte normali [217]; un maschio di 10 anni con un fenotipo classico e livelli normali di LysoGB3; due femmine con la variante D313Y recentemente considerata "probabilmente benigna" ma che manifestano alcune manifestazioni cliniche della malattia [218, 219]; un maschio di 18 anni con HCM, e la madre asintomatica, con la variante Arg118Cys sulla quale si hanno interpretazioni contrastanti relativamente alla patogenicità secondo quanto riportato in Clin Var [220-221]. Questi casi sollevano alcune domande sul valore diagnostico di lyso-GB3 in alcune circostanze e confermano che la diagnosi di FD non può essere effettuata esclusivamente su base genetica.

Gli studi istopatologici sono cruciali nei casi difficili per confermare la diagnosi di FD ma possono richiedere indagini invasive (come la biopsia miocardica) che non sempre sono disponibili in alcuni contesti.

Sfortunatamente, non abbiamo studi istopatologici nei nostri casi. I parametri alterati dello stress ossidativo nei casi descritti appaiono suggerire un coinvolgimento precoce dello squilibrio *redox* nel danno d'organo indotto da FD, nella comparsa della malattia e nella progressione. Sebbene alcuni autori abbiano dimostrato la progressione del danno d'organo nei pazienti sottoposti ad ERT, il trattamento precoce è considerato la chiave per cambiare radicalmente la storia naturale della malattia in questi pazienti [222, 223, 224].

I nostri risultati non sono sufficienti per affermare l'introduzione della terapia enzimatica sostitutiva in soggetti con mutazioni correlate alla malattia di Fabry che non presentano segni o sintomi di malattia ma segni di stress ossidativo, offrono comunque spunti di riflessione aprendo la strada a ulteriori studi. Ad oggi, accanto all'attività enzimatica AGALA nei maschi, l'unico biomarcatore surrogato riconosciuto in FD è Lyso-Gb3. Considerando quanto osservato, specifici marcatori di stress ossidativo potrebbero essere ancora più sensibili rispetto a Lyso-Gb3 nella fase iniziale della malattia, costituendo pertanto nuovi biomarcatori precoci con un ruolo potenziale che contribuisce in fase di diagnosi e per il *timing* del trattamento.

Il nostro studio ha alcune limitazioni. Abbiamo arruolato pazienti in diversi stadi della malattia e la tempistica in cui è stata effettuata l'analisi dei biomarcatori era variabile da paziente a paziente. Inoltre, la maggior parte dei nostri casi sono pazienti di sesso femminile, quindi non è stato possibile correlare l'attività enzimatica dell' $\alpha$  galattosidasi A con gli altri risultati. Inoltre, non era disponibile una valutazione completa di tutti i possibili dati su eventuali comorbidità dei pazienti, sebbene i pazienti arruolati non fossero affetti da patologie significative come tumori o altri disturbi infiammatori.

In conclusione, lo stress ossidativo si verifica in pazienti affetti da malattia di Fabry sia trattati che non, sottolineando la necessità di un'ulteriore ricerca collaborativa nel campo delle terapie mirate allo stress ossidativo in aggiunta alla ERT al fine di rallentare ulteriormente la progressione della malattia.

Inoltre, i biomarcatori di stress ossidativo possono rappresentare indicatori precoci di malattia in pazienti naïve al trattamento che potrebbero potenzialmente aiutare l'interpretazione delle mutazioni correlate alla malattia di Fabry e il momento per decidere il trattamento.

È stato dimostrato che la disfunzione dei cardiomiociti umani indotta dal perossinitrito può essere parzialmente ripristinata dal trattamento con antiossidanti [127, 225]. L'iniezione endovenosa di ascorbato, un potente antiossidante, ha ridotto l'iperperfusionione vertebrobasilare nei pazienti con FD [75] e può anche migliorare la funzione mitocondriale trasferendo direttamente gli elettroni al complesso IV.

Per il trattamento dell'insufficienza cardiaca sono allo studio interventi terapeutici che mirano direttamente all'NO o ai passaggi chiave nei percorsi degli effettori dell'NO [226].

Sono necessari ulteriori studi per rivelare il possibile ruolo terapeutico degli inibitori selettivi della NO sintasi e degli antiossidanti nella cardiomiopatia FD, specialmente nella fase avanzata in cui la terapia enzimatica sostitutiva da sola sembra essere scarsamente efficace [127].

Nella tabella 8 è riportata l'analisi degli aplogruppi mitocondriali relativamente al gruppo di pazienti del centro di Palermo. Non sono ancora disponibili i dati completi relativi alla distribuzione della frequenza degli aplogruppi mitocondriali degli altri centri partecipanti al progetto. Dai risultati disponibili non è possibile definire il ruolo degli aplogruppi mitocondriale nell'espressione fenotipica della malattia di Fabry; questa analisi costituisce il punto di partenza per le prossime ricerche scientifiche estese su un campione più ampio volte a definire in che modo le varianti del DNA mitocondriale influenzano differenzialmente il coinvolgimento d'organo.

Quale sia il ruolo ipotetico degli aplogruppi del mtDNA nella patogenesi della FD rimane poco chiaro. È stato ipotizzato che gli aplogruppi del mtDNA possano essere coinvolti nella modulazione dello stress ossidativo nella FD. I pazienti affetti da malattia di Fabry presentano un elevato danno

ossidativo lipidico e proteico, difese antiossidanti ridotte e biomarcatori infiammatori aumentati. Infatti, la produzione di ROS è anche fisiologicamente legata a diverse varianti del mtDNA, perché vari aplogruppi mitocondriali hanno differenze funzionali legate alla riduzione della produzione di ATP, all'aumento della generazione di ROS e al ridotto buffering del calcio [27].

L'ETC è il principale sito di produzione di ROS nella cellula. A causa della sua vicinanza all'ETC, dell'assenza di istoni protettivi e della mancanza di escissione nucleotidica o riparazione del mismatch, il mtDNA è vulnerabile al danno mediato dai ROS e alla generazione di mutazioni [24]. La incapacità di trasmettere fedelmente le informazioni codificate durante la replicazione del mtDNA porta alla produzione di proteine ETC disfunzionali, portando al rilascio di più elettroni liberi e ROS in un ciclo avizioso [25]. Pertanto, non sorprende che le mutazioni nel mtDNA siano state associate a un declino della produzione di energia e a una maggiore propensione per una serie di condizioni patologiche [26]. Gli Aplogruppi specifici del mtDNA possono quindi portare a una diversa vulnerabilità mitocondriale e del mtDNA allo stress ossidativo, che potrebbe anche essere differentemente rilevante nei vari tessuti, modulando così il fenotipo e il decorso naturale della malattia. . Il possibile ruolo degli aplogruppi H e I e/o del cluster HV nella FD dovrebbe essere confermato in coorti più ampie e il rilevamento dello stress ossidativo richiede ulteriori indagini.

## 4.9 Tabelle e figure

**Tabella 1.** Caratteristiche demografiche, molecolari e cliniche dei pazienti affetti da malattia di Fabry e arruolati nello studio. *HCM* cardiomiopatia ipertrofica, *cSVD* malattia dei piccoli vasi cerebrali, *VBD* dolicoectasia vertebrobasilare, *CKD* malattia renale cronica, *PM* PaceMaker.

N.	Genere	Mutazione	Età insorgenza	diEsordio clinico	Manifestazioni cliniche durante ultimo follow-up
1	F	c.337T>C p.Phe113Leu	33	–	–
2	F	c.337T>C p.Phe113Leu	27	–	–
3	M	c.337T>C p.Phe113Leu	62	Infarto del miocardio	HCM, Aritmia, infarto del miocardio
4	M	deletion exons 3, 4	9	Acroparestesia	Acroparestesia, HCM
5	M	c.337T>C p.Phe113Leu	62	Aritmia	Aritmia, HCM, Proteinuria, VBD
6	F	deletion exons 3, 4	50	Acroparestesia	Acroparestesia
7	M	c.818T>C p.Phe273Ser	22	Acroparestesia	Acroparestesia, HCM, Aritmia, Proteinuria, Stroke, VBD
8	F	c.337 T>C p.Phe113Leu	40	Stroke	Stroke, Proteinuria
9	F	c.550T>A	39	HCM	HCM, Stroke
10	F	IVS2-76_80 del15; IVS 4-16 A>G; IVS 6-22	30	Acroparestesia	Acroparestesia, Stroke
11	F	-.10 G>T, IVS 6-22 C>T; IVS 6-51_54 del14, g.9151 C>T	32	Acroparestesia	Acroparestesia, Proteinuria, Stroke, GI disorders
12	M	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16	4	Disturbi gastrointestinali	Disturbi gastrointestinali, Acroparestesia
13	F	-. 30 G>A	30	Acroparestesia	Acroparestesia, Stroke, disturbi gastrointestinali
14	F	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16	35	Stroke	Stroke, Acroparestesia
15	F	c.547 G>A p.G183S	17	Acroparestesia	Acroparestesia, Proteinuria
16	M	c.614delC	29	HCM	HCM, Acroparestesia
17	F	c.614delC	12	Acroparestesia	Acroparestesia, Stroke, HCM
18	F	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16	30	Acroparestesia	Acroparestesia
19	M	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16	10	Disturbi gastrointestinali	Disturbi gastrointestinali, Acroparestesia, Proteinuria
20	F	c.547 G>A p.G183S	22	–	–
21	M	c.337 T>C p.Phe113Leu	40	Proteinuria	Proteinuria, HCM
22	F	c.1146C>A; p.C382X	12	Proteinuria	Proteinuria
23	F	p.Tyr222Asp	49	Proteinuria	Proteinuria, Aritmia, disturbi gastrointestinali
24	M	c.640-859C>T	32	HCM	HCM, Aritmia, Proteinuria, VBD, disturbi gastrointestinali
25	F	D313Y	31	VBD	VBD, disturbi gastrointestinali
26	F	p.Ala377Asp	32	Acroparestesia	Acroparestesia, Arrhythmia, Proteinuria
27	F	c.1146C>A; p.C382X	30	Acroparestesia	Acroparestesia, TIA, VBD, GI disorders
28	F	c.640-859C>T	52	Proteinuria	Proteinuria, HCM, Arrhythmia, VBD
29	F	p.Tyr222Asp	13	Acroparestesia	Acroparestesia, VBD, disturbi gastrointestinali
30	F	D313Y	36	cSVD	cSVD, VBD, Proteinuria
31	F	p.Ala143Thr	41	–	–
32	F	p.Ala143Thr	41	Stroke	Stroke
33	M	c.818T>C p.Phe273Ser	62	HCM	HCM, Aritmia, Proteinuria, cSVD, disturbi gastrointestinali
34	M	N215S	64	HCM	HCM, Aritmia
35	F	c.334C>T p.Arg112Cys	62	Proteinuria	Proteinuria, HCM, Aritmia, cSVD, VBD
36	F	c.334C>T p.Arg112Cys	70	Arrhythmia	Aritmia, HCM, cSVD, VBD
37	M	c.334C>T p.Arg112Cys	37	Proteinuria	Proteinuria, HCM, cSVD, VBD, Acroparestesia
38	F	c.334C>T p.Arg112Cys	33	Acroparestesia	Acroparestesia

<b>N</b>	<b>Genere.</b>	<b>Mutazione</b>	<b>Età di insorgenza</b>	<b>Esordio clinico</b>	<b>Manifestazioni cliniche durante ultimo followup</b>
39	M	p.Cys63Tyr	46	Acroparestesia	Acroparestesia, HCM, Arrhythmia, CKD, Stroke
40	F	p.Arg118Cys	49	–	–
41	M	p.Arg118Cys	18	HCM	HCM
42	F	c.97G>T p.Asp33Tyr	51	GI disorders	GI disorders, HCM
43	M	c.851T>C p.Met284Thr	34	Proteinuria	Proteinuria, HCM, Arrhythmia, CKD
44	F	c.113delG	6	Acroparestesia	Acroparestesia, Proteinuria, TIA
45	F	c.113delG	8	GI disorders	GI disorders, Proteinuria, Acroparestesia
46	F	c.335G>A Arg112His	22	Proteinuria	Proteinuria
47	F	c.860G>A	8	Acroparestesia	Acroparestesia, HCM, Proteinuria, GI disorders
48	F	c.860G>A	49	GI disorders	GI disorders, HCM, Proteinuria
49	F	c.779G>A	56	Proteinuria	Proteinuria, HCM
50	F	c. 846_847delTC	18	Proteinuria	Proteinuria
51	M	c. 846_847delTC	17	Proteinuria	Proteinuria, HCM
52	F	c. 846_847delTC	15	Proteinuria	Proteinuria, PM, TIA
53	M	C172Y	12	GI disorders	GI disorders, Proteinuria
54	F	C172Y	20	Proteinuria	Proteinuria, HCM
55	M	C172Y	23	Proteinuria	Proteinuria
56	M	c. 846_847delTC	62	Proteinuria	Proteinuria
57	M	C172Y	14	GI disorders	GI disorders, HCM, Proteinuria
58	F	c. 846_847delTC	25	Stroke	Stroke, HCM, PM, Proteinuria, TIA
59	F	c. 846_847delTC	12	Acroparestesia	Acroparestesia, Proteinuria
60	F	C172Y	5	–	–

Tabella 2. Differenti manifestazioni cliniche tra i sessi dei pazienti affetti da FD. I valori in grassetto sono statisticamente significativi

	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>p value</b>
Cardiomiopatia ipertrofica	14 (70%)	11 (28.2%)	<b>0.002</b>
Proteinuria	14 (70%)	20 (50%)	0.141
Insufficienza renale	2 (10%)	2 (5%)	0.595
Stroke	4 (20%)	15 (37.5%)	0.170
Acroparestesie	7 (35%).	17 (43.6%)	0.525
Dolicoectasia vertebrobasilare.	5 (25%)	7 (17.9%)	0.524
Coinvolgimento gastrointestinale	3 (15%)	10 (25.6%)	0.351
Aritmia	8(42,1%)	7(17,5%)	<b>0,043</b>
Ischemia miocardica	1(5,3%)		0,322

Tabella 3. Età di esordio delle manifestazioni cliniche nei maschi e femmine

Età di esordio	anni (deviazione standard)		
	Maschio	Femmina	<i>p</i>
<b>Cardiomiopatia ipertrofica</b>	44,36 (13,62)	52,38 (9,46)	0,17
<b>Aritmia</b>	55,71 (13,27)	58,67 (14,74)	0,762
<b>Ischemia miocardica</b>	62 (solo un caso)		
<b>Proteinuria</b>	41,67 (15,33)	39,13 (14,81)	0,693
<b>Insufficienza renale</b>	47 (solo un caso)		
<b>Stroke</b>	43,5 (0,71)	37,73 (3,49)	0,046
<b>Acroparestesie</b>	18,8 (11,78)	26,2(13,79)	0,298
<b>Dolicoectasia vertebrobasilare</b>	49,5 (17,68)	49,25(21,28)	0,989
<b>Coinvolgimento gastrointestinale</b>	10	27,43 (17,51)	0,02

Tabella 4. Valori di stress ossidativo (AOPP, FRAP, Tioli) tra i pazienti e i controlli. RV valori di riferimento. IQR: range interquartile. I valori in grassetto indicano significatività statistica

	Valore mediano (IQR) Pazienti	Valore mediano (IQR) Controlli	<i>p</i>
<b>AOPP (RV 124.5–190.5 nmol/mL)</b>	342.74 (146.15)	185.32 (43.93)	<b>&lt; 0.000001</b>
<b>FRAP (RV &gt; 0.7 mmol/L)</b>	0.61 (0.18)	0.78 (0.12)	<b>&lt; 0.000001</b>
<b>Thiols (RV 0.4–0.6 mmol/L)</b>	0.28 (0.10)	0.47 (0.12)	<b>&lt; 0.000001</b>

Tabella 5. Valori medi dei parametri di stress ossidativo nella forma classica vs late onset della FD.

	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>P</b>
<b>AOPP</b>				<b>0,040</b>
<b>Late</b>	10	428.5900	187.40270	
<b>Classica</b>	48	324.8558	131.47583	
<b>FRAP</b>				0,903
<b>Late</b>	8	0,62338	0,139265	
<b>Classica</b>	46	0,61476	0,189121	
<b>Tioli</b>				0,227
<b>Tardiva</b>	10	0,24570	0,079635	
<b>Classica</b>	48	0,29217	0,114189	

Tabella 6. Valori medi dei biomarkers di stress ossidativo nei controlli sani (>50 anni vs <50 anni).

	<b>Età</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione Std</b>	<b>Errore std della media</b>	<b>p</b>
<b>AOPP</b>	≥ 50	58	195.7238	33.88970	4.44994	<b>0.007</b>
	< 50	19	164.9105	61.68450	14.15139	
<b>FRAP</b>	≥ 50	58	0.78448	0.133982	0.017593	<b>0.014</b>
	< 50	19	0.69931	0.104409	0.023953	
<b>Tioli</b>	≥ 50	58	0.48364	0.129588	0.017016	0.154
	< 50	19	0.43768	0.086380	0.019817	

Tabella 7. Valori medi dei parametri di stress ossidativo in paziente con forma tardiva vs i controlli sani >50 anni

	N	Media	Deviazione std	Errore std della media	<i>p</i>
<b>AOPP</b>					
<i>Late Form</i>	10	428.5900	187.40270	59.26194	< <b>0.000001</b>
Controlli $\geq$ 50	58	195.7238	33.88970	4.44994	
<b>FRAP</b>					
<i>Late Form</i>	8	0.62338	0.139265	0.049238	<b>0.002309</b>
Controlli $\geq$ 50	58	0.78448	0.133982	0.017593	
<b>Tioli</b>					
<i>Late Form</i>	10	0.24570	0.079635	0.025183	< <b>0.000001</b>
Controlli $\geq$ 50	58	0.48364	0.129588	0.017016	

Tabella 8.

CENTRO	PZ	SESSO	GLA MUTATION	MT HAPLOGROUP
Palermo	1	F	c.337 T>C p.(Phe113Leu)	V
	2	F	c.550T>A	V
	3	F	IVS2-76_80 del15; IVS 4-16 A>G; IVS 6-22 G>T	H
	4	F	-.10 G>T; IVS 6-22 C>T; IVS 6-51_54 del14, g.9151 C>T	H
	5	M	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16 A>G; IVS 6-22 C>T	H
	6	F	-. 30 G>A	U
	7	F	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16 A>G; IVS 6-22 C>T	H
	8	F	c.547 G>A p.G183S	H
	9	M	c.614delC	H
	10	F	c.614delC	-
	11	F	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16 A>G; IVS 6-22 C>T	H
	12	M	-.10 C>T; IVS 2-76_80 del 5; IVS 4-16 A>G; IVS 6-22 C>T	H
	13	F	c.547 G>A p.G183S	H
	14	M	c.337 T>C p.(Phe113Leu)	V

Figura 1.

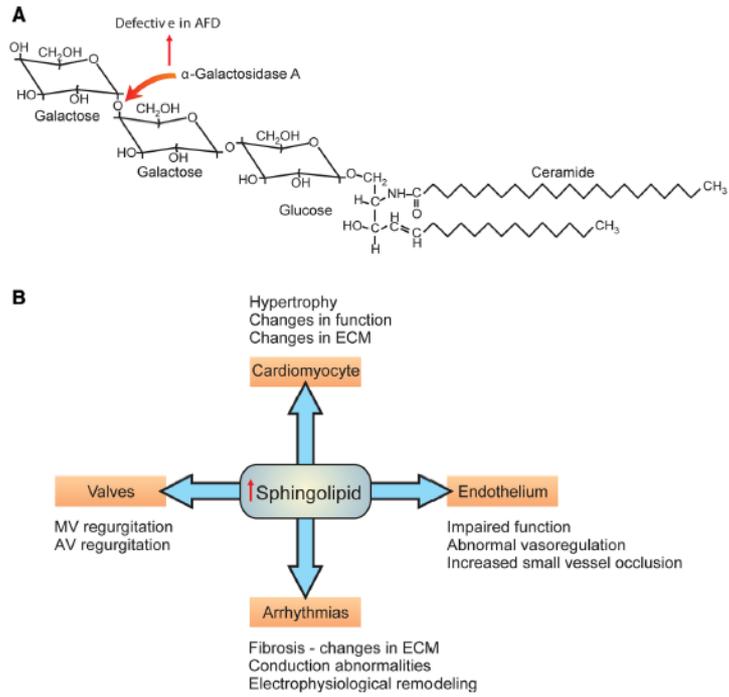


Figura 2.

### Lyonization and Mosaicism

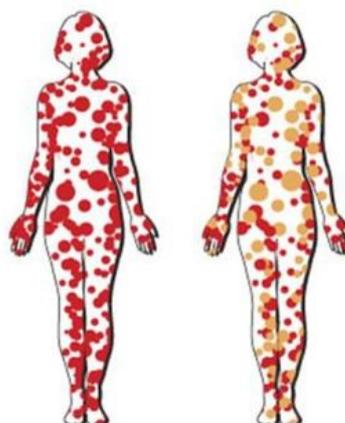


Figura 3. *siti hotspots colorati secondo la frequenza di mutazione; la più alta frequenza di mutazione attorno al sito attivo suggerisce che ogni minima perturbazione attorno a tale sito riduce l'attività catalitica dell'enzima e causa mAF*

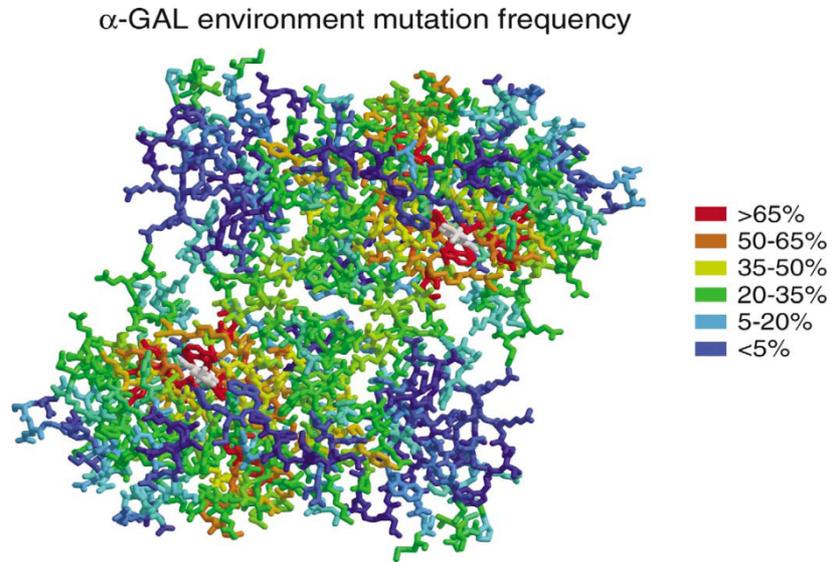


Figura 4

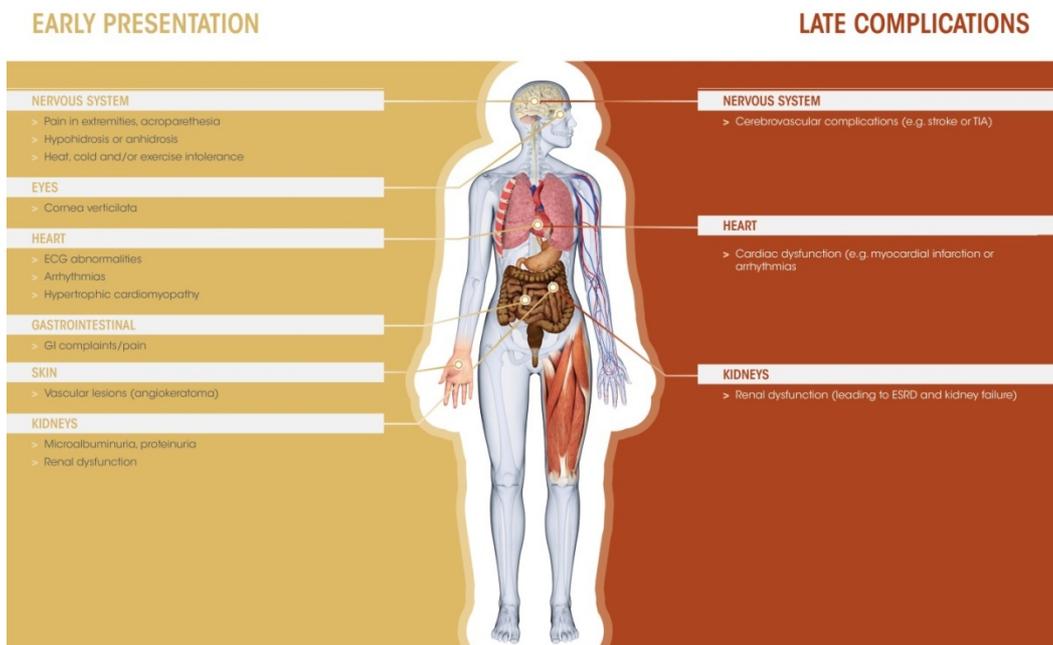


Figura 5

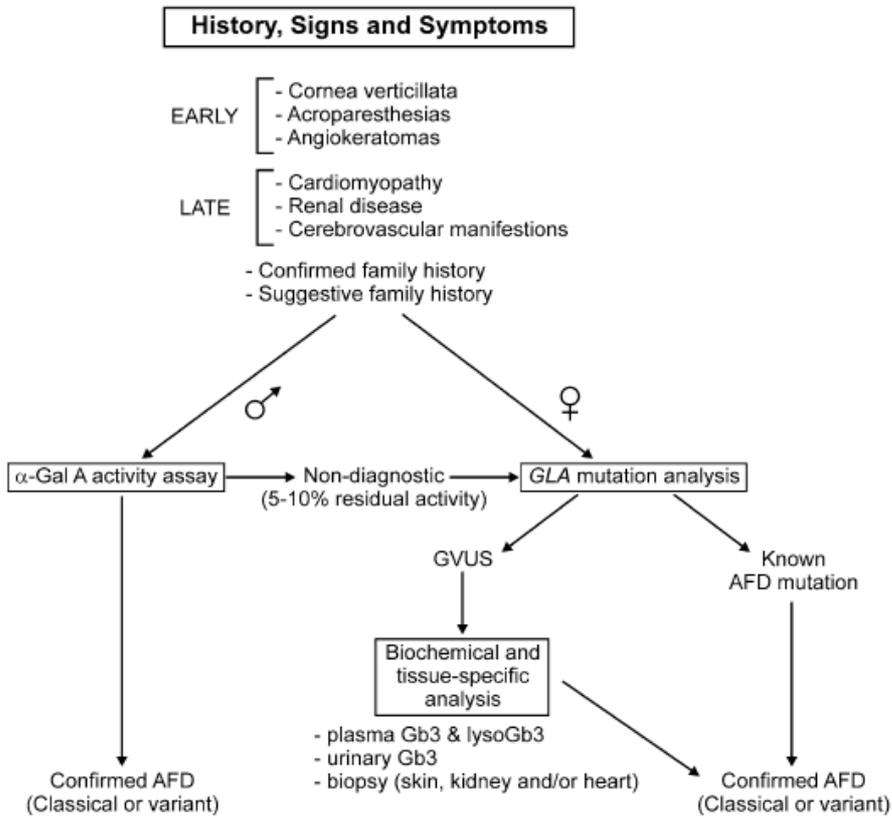


Figura 6

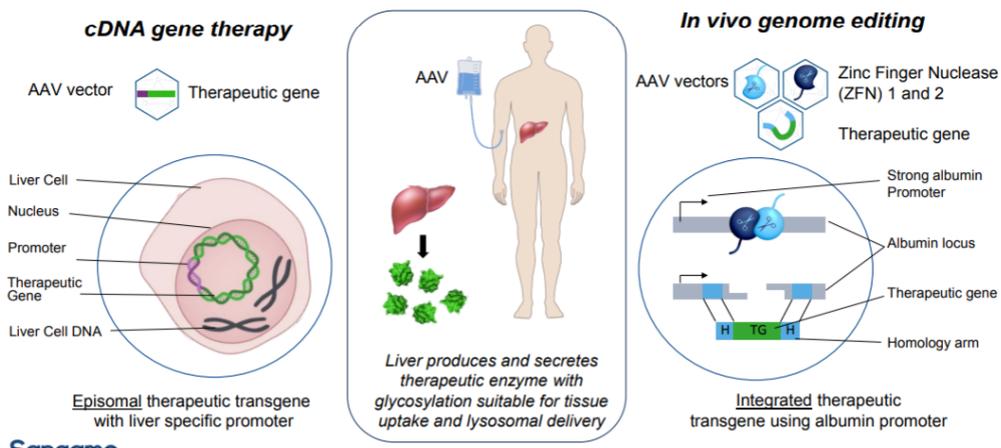


Figura 7. Livelli di AOPP nei pazienti e nei controlli

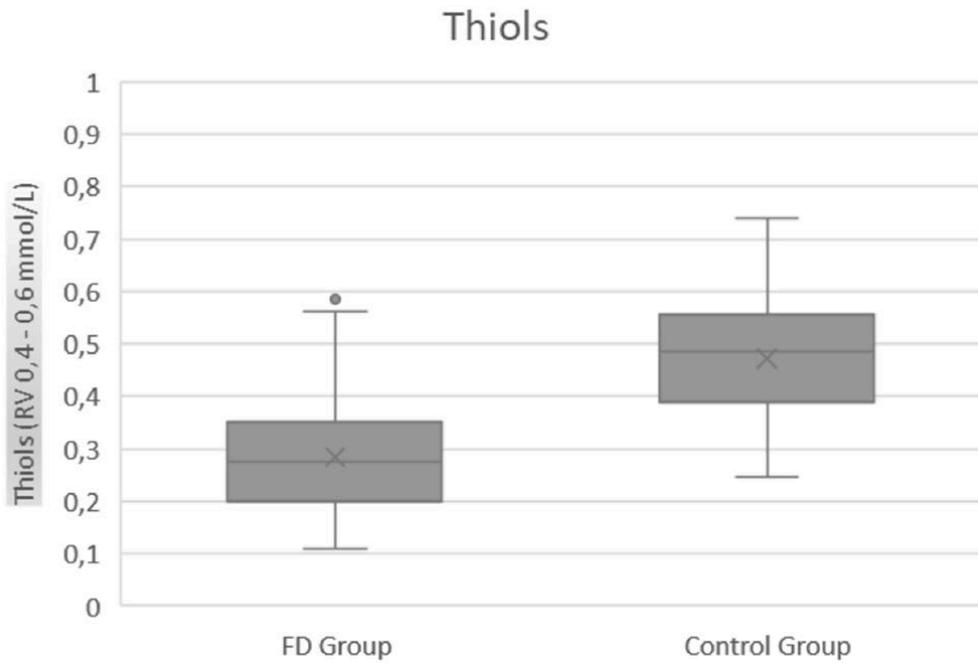


Figura 8. Livelli di FRAP nei pazienti FD e nei controlli

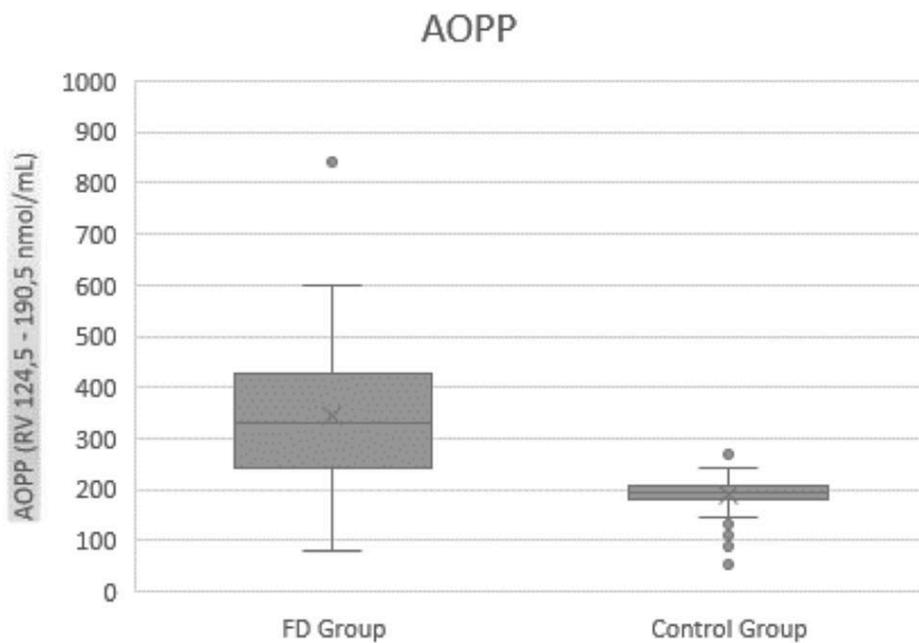


Figura 9 Valori dei tioli nei pazienti FD e nei controlli

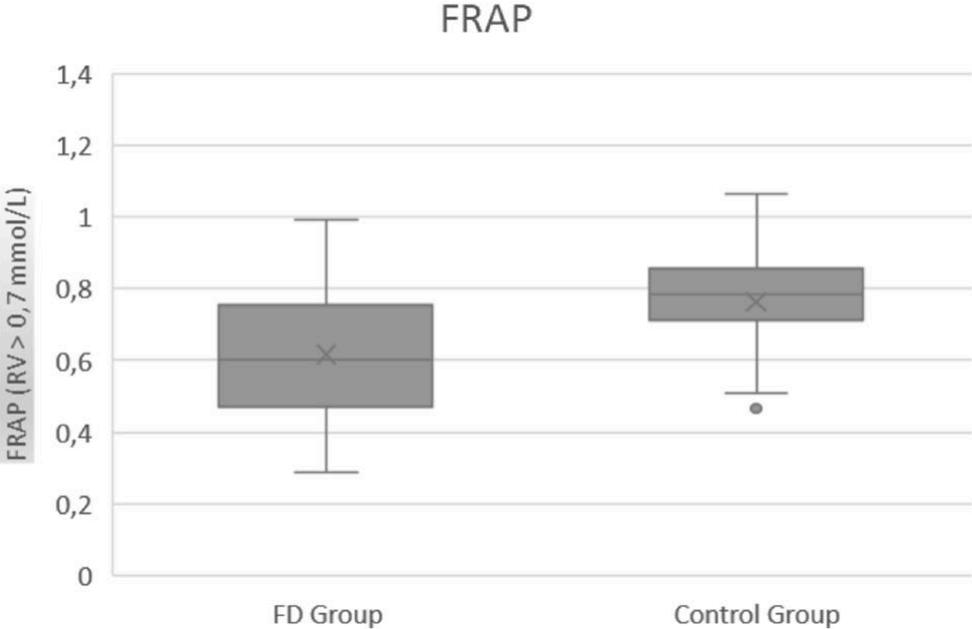
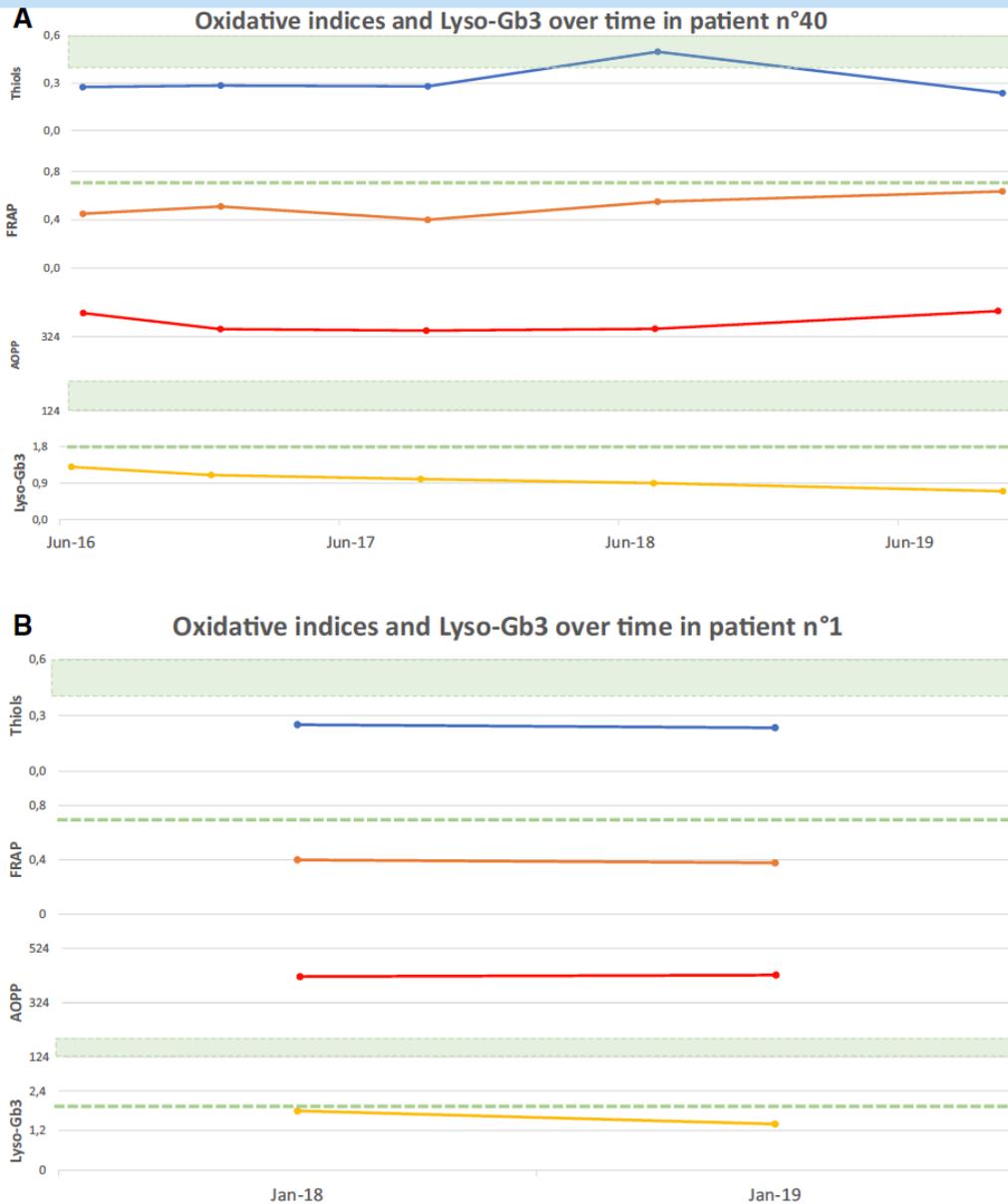
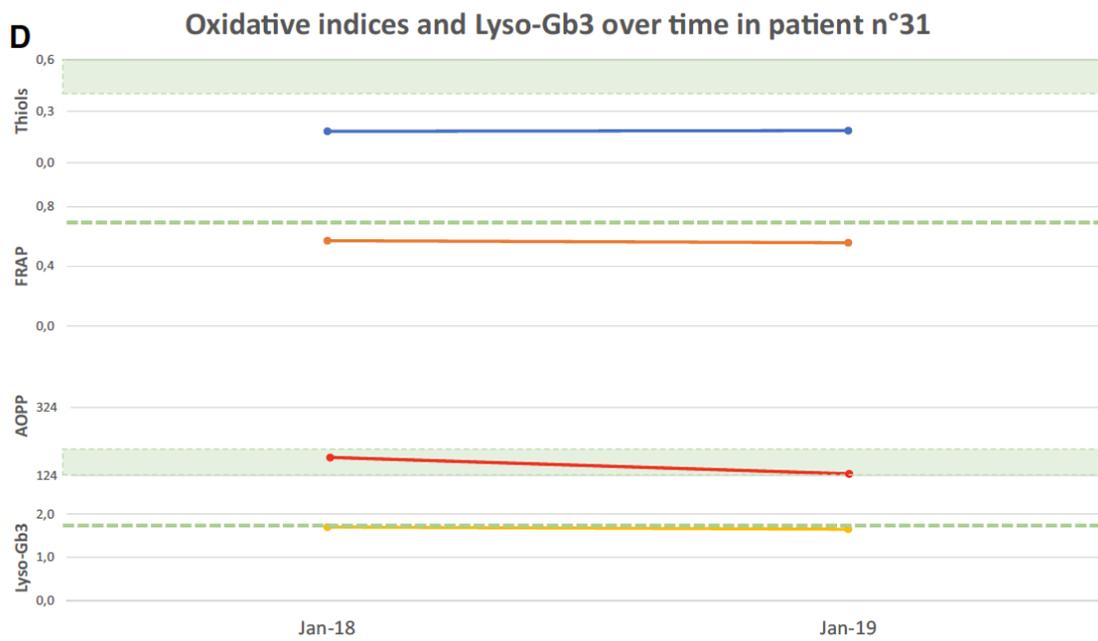
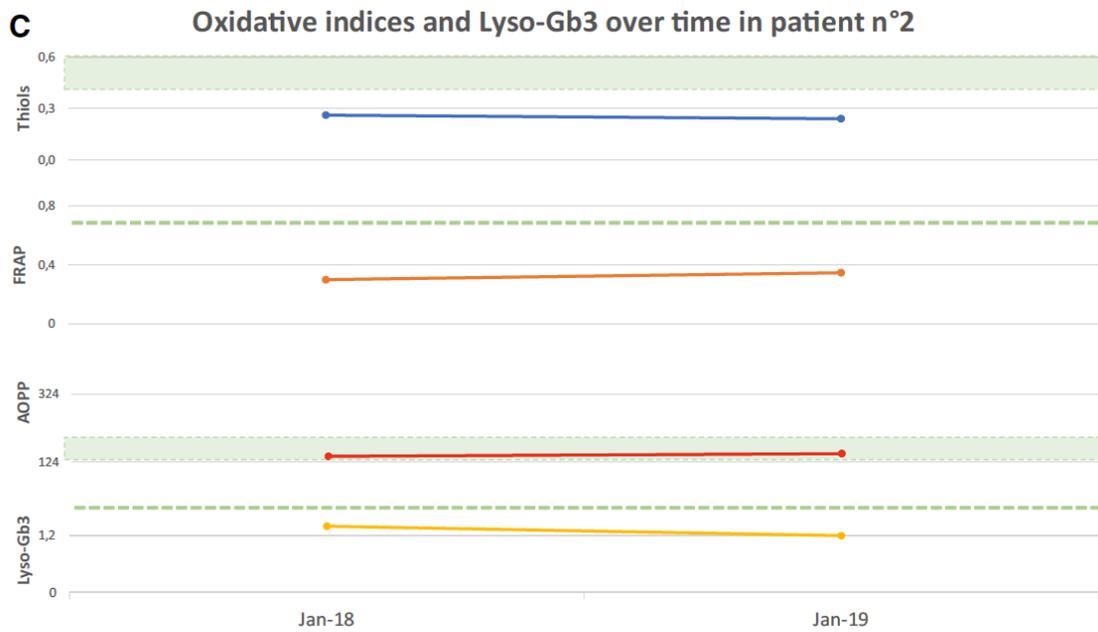
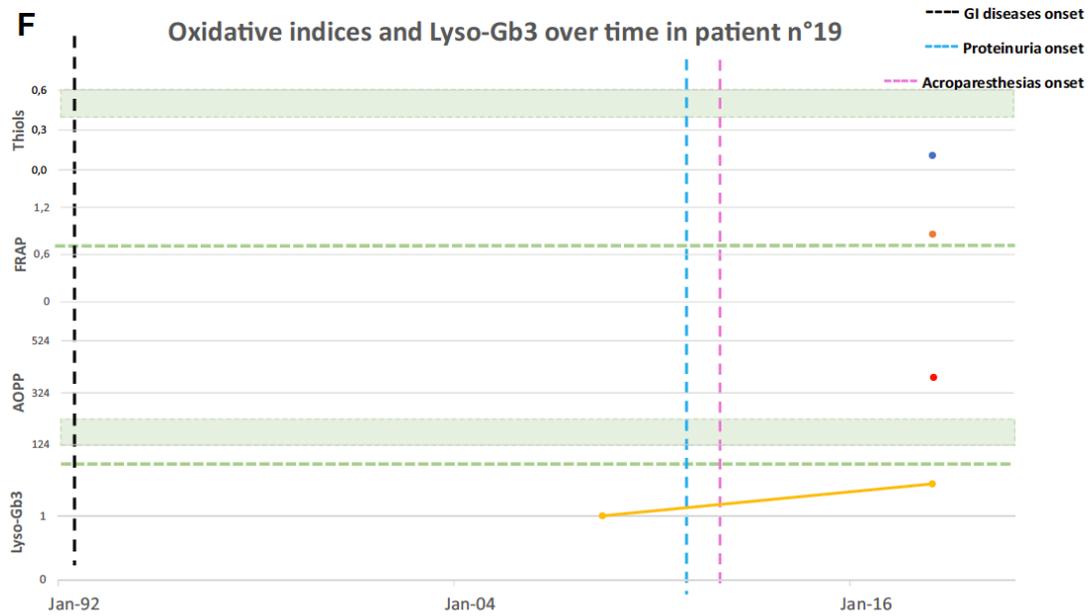
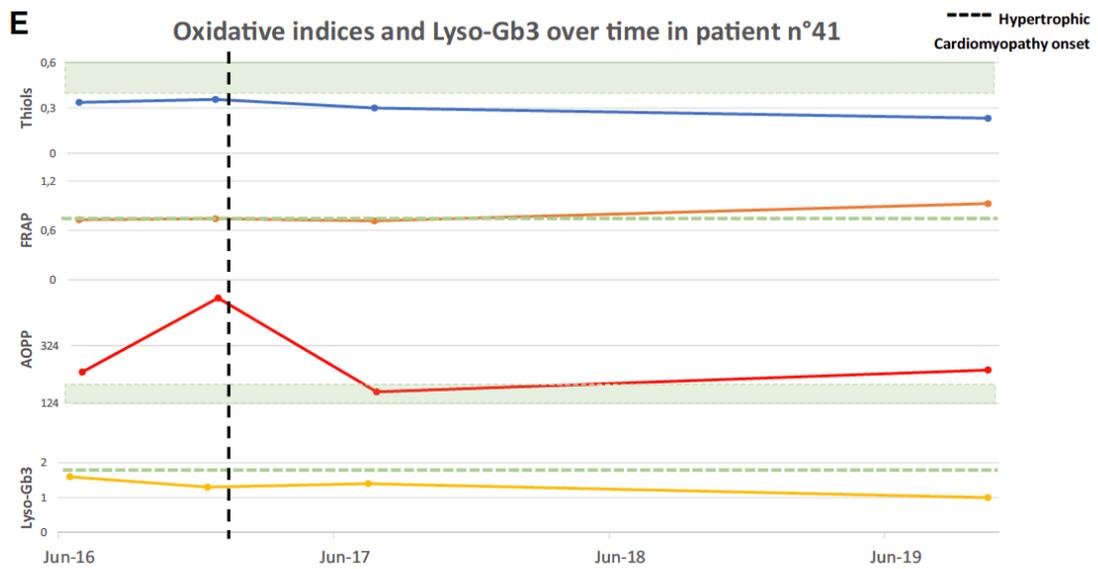
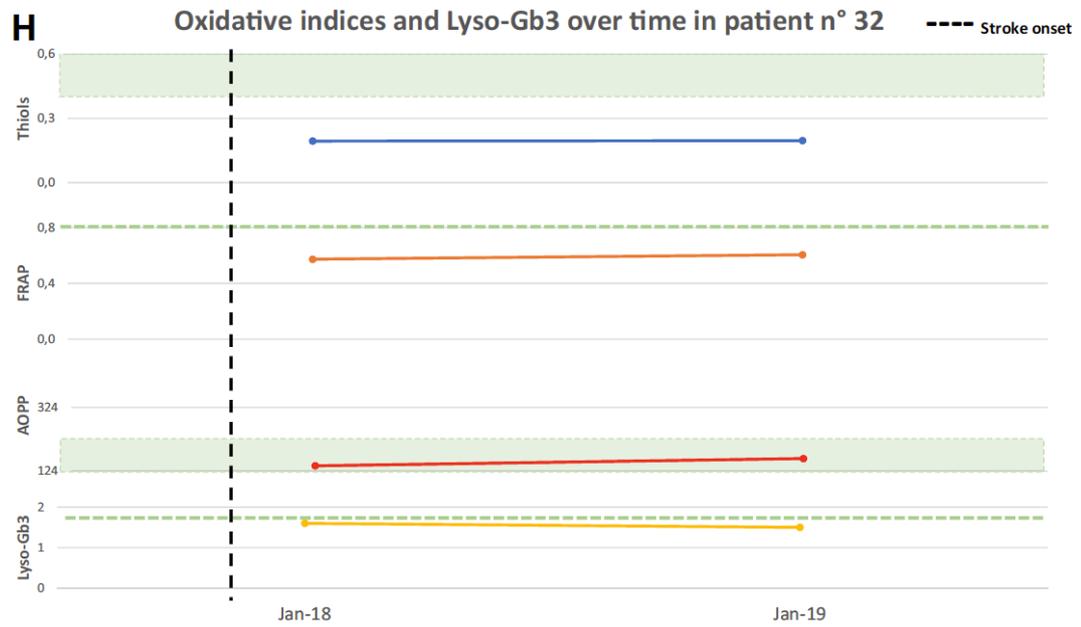
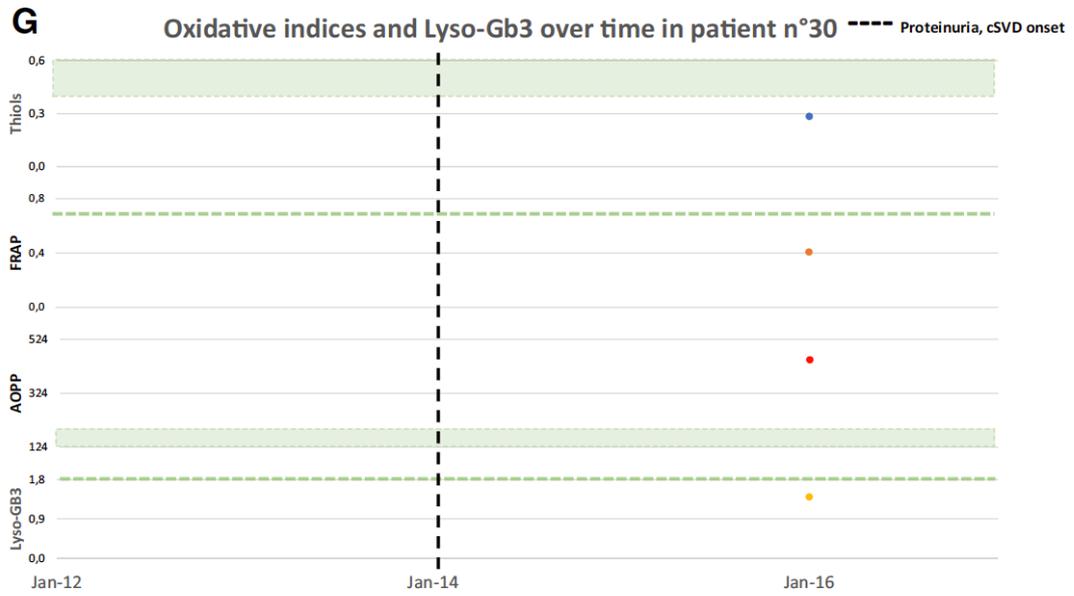


Figura 10. Valori dei Parametri di stress ossidativo nel tempo (blu: tioli, arancione FRAP; rosso: AOPP) e Lyso-Gb3 (giallo). L'area verde e le linee tratteggiate indicano i valori di riferimento (RV) (AOPP<190,5 nmol/mL; Lyso-Gb3<1,8 ng/mL; Tioli> 0,4 mmol/L; FRAP>0,7mmol/L; FRAP>0,7 mmol/L). RV sono ottenuti da una popolazione di 77 controlli sani (32 uomini, età media 61.5±18,2 anni). La linea tratteggiata verticale indica la comparsa dell'evento clinico correlato alla storia naturale della malattia di Fabry.









## Bibliografia

1. Desnick RJ.: Fabry disease, an under recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy *Ann Intern Med* 2003; 338 -346
2. Germain D.: Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5 – 30
3. Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat.* 2009; 30:1397-405
4. Lukas J, Scalia S, Eichler S, Pockrandt AM, Dehn N, Cozma C, Giese AK, Rolfs A. Functional and clinical consequences of novel  $\alpha$ -galactosidase A mutations in Fabry disease. *Hum Mutat.* 2016; 37:43-51
5. Verovnik F, Benko D, Vujkovic B, Linthorst GE. Remarkable variability in renal disease in a large Slovenian family with Fabry disease. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12:678-81
6. Hoffmann B, Mayatepek E.: Fabry disease often seen, rarely diagnosed. *Dtsch arztebl Int* 2009; 440-447
7. Hagège AA, Caudron E, Damy T et al.: Screening patients with hypertrophic cardiomyopathy for Fabry disease using a filter paper test: The FOCUS study. *Heart* 2011; 131 – 136
8. Chimenti C, Pieroni M, Morgante E et al.: Prevalence of Fabry disease in female patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 1047 – 1053
9. 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; 288 – 293
10. Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H et al.: prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002;1407 – 1411
11. Marchesoni CL, Roa N, Pardo AM.: Misdiagnosis in Fabry Disease. *J Pediatr* 2010; 828 – 831
12. Kint JA: Fabry's disease :  $\alpha$ -galactosidase deficiency: *Science* 1970; 1268
13. Zarate YA, Hopkin RJ. Fabry's disease. *Lancet* 2008; 372: 1427 35
14. Anderson-Fabry Disease A Multiorgan Disease; Antonino Tuttolomondo\*, Rosaria Pecoraro, Irene Simonetta, Salvatore Miceì, Antonio Pinto and Giuseppe Licata *Current Pharmaceutical Design* 2013, 19, 000-000
15. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. [<http://www.hgmd.cf.ac.uk>.]
16. Davies JP, Winchester BG, Malcolm S: Sequence variations in the first exon of alpha-galactosidase A. *J Med Genet* 1993; 658-663.
17. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, Mirzaian M, Wijburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkman J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ: Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 2812-2817.

18. Guce AI, Garman SC: The structure of human  $\alpha$ -galactosidase A and implications for Fabry disease. In Fabry disease. Edited by: Elstein D, Altarescu G, Beck M. Dordrecht, Heidelberg, London, New-York: Springer; 2010:21-38.
19. Guce AI, Clark NE, Salgado EN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Brumer H, Garman SC: Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase. *J Biol Chem* 2010; 3625-3632.
20. A family with various symptomatology suggestive of Anderson-Fabry disease and a genetic polymorphism of alpha galactosidase A gene. Tuttolomondo A<sup>1</sup>, Duro G<sup>2</sup>, Pecoraro R<sup>3</sup>, Simonetta I<sup>3</sup>, Miceli S<sup>3</sup>, Colomba P<sup>2</sup>, Zizzo C<sup>2</sup>, Di Chiara T<sup>3</sup>, Scaglione R<sup>3</sup>, Della Corte V<sup>3</sup>, Corpora F<sup>3</sup>, Pinto A<sup>3</sup>. *Clin Biochem.* 2015 Jan;48(1-2):55-62
21. Scott C. Garman\* and David N. Garboczi : Structural basis of Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 77 2002; 3–11
22. Satoshi Ishii, Shoichiro Nakao, Reiko Minamikawa-Tachino, Robert J. Desnick, Jian-Qiang Fan: Alternative Splicing in the a-Galactosidase A Gene: Increased Exon Inclusion Results in the Fabry Cardiac Phenotype *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 994–1002
23. Elleder M, Bradova V, Smid F, et al. Cardiocyte storage and hyper trophy as a sole manifestation of Fabry's disease. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1990, 417: 449-55.29
24. 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: 288-93
25. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype *Kidney Int* 2003, 64: 801-7
26. Pinto L, Vieira TA, Giugliani R, Schwartz IV: Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders a brief review. *Orphaned J Rare Dis* 2010; 5 – 14
27. Mehta A, Clarke JT, Giugliani R, et al. FOS Investigators. Natural course of Fabry disease: changing pattern of causes of death in FOS - Fabry Outcome Survey. *J Med Genet* 2009;46(8): 548-52
28. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. Wilcox WR<sup>1</sup>, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Fabry Registry. *Mol Genet Metab.* 2008 Feb;93(2):112-28
29. Patients affected with Fabry disease have an increased incidence of progressive hearing loss and sudden deafness: an investigation of twenty-two hemizygous male patients. Dominique P Germain,  Paul Avan,<sup>2</sup> Augustin Chassaing,<sup>1</sup> and Pierre Bonfils *BMC Med Genet.* 2002; 3: 10
30. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. MacDermot KD, Holmes A, Miners AH *J Med Genet.* 2001 Nov;38(11):769-75.

31. Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. Deegan PB<sup>1</sup>, Baehner AF, Barba Romero MA, Hughes DA, Kampmann C, Beck M; European FOS Investigators. *J Med Genet.* 2006 Apr;43(4):347-52
32. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. MacDermot KD<sup>1</sup>, Holmes A, Miners AH. *J Med Genet.* 2001 Nov;38(11):750-60.
33. Lidove O, Joly D, Barbey F, Blétry O, Grünfeld JP: la maladie de Fabry chez l'adulte: aspects cliniques et progrès thérapeutiques. *Rev Méd Interne* 200; 384-92
34. Hilz MJ, Stemper B, Kolodny EH.: Lower limb cold exposure induces pain and prolonged small fiber dysfunction in Fabry patients. *Pain* 2000 ; 361 – 365
35. Pagnigni I, Borsini W, Cecchi F, et al.: Distal limb pain as presenting feature of Fabry disease. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010
36. Fimiani M, Mazzatenta C, Rubegni P, Andreassi L.: Idiopathic angiokeratoma corporis diffusum. *Clin Exp Dermatol* 1997; 205 – 206
37. Lao LM, Kumakiri M, Mima H, Kuwahara H, Ishida H, Ishiguro K, Fujita T, Ueda K.: The ultra-structural characteristics of eccrine sweat glands in a Fabry disease patient with hypohidrosis. *J Dermatol Sci* 1998; 109 – 117
38. Yamamoto K, Sobue G, Iwase S, Kumazawa K, Mitsuma T, Mano T.: Possible mechanism of anhidrosis in a symptomatic female carrier of Fabry's disease: an assessment by skin sympathetic nerve activity and sympathetic skin response. *Clin Auton Res* 1996; 107 – 110
39. Hirano K, Murata K, Miyagawa A, Terasaki H, Saigusa J, Nagasaka T, Kobayashi M.: Histopathologic findings of cornea verticillata in a woman heterozygous for Fabry's disease. *Cornea* 2001; 233 – 236
40. Oto S, Kart H, Kadayifcilar S, Ozdemir N, Aydin P.: Retinal vein occlusion in a woman with heterozygous Fabry's disease: *Eur J Ophthalmol* 1998; 265 – 267
41. Rosenberg DM, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR, Barranger JA, Brady RO, Crystal RG.: Chronic airflow obstruction in Fabry's disease. *Am J Med* 1980; 898-905
42. Nelis GF, Jacobs GJ.: Anorexia, weight loss, and diarrhea as presenting symptoms of angiokeratoma corporis diffusum (Fabry-Anderson's disease). *Dig Dis Sci* 1989: 1798 – 1800
43. Shent KJ Bernahard GC: The arthropathy of Fabry disease *Arthritis Rheum* 1979; 781
44. The heart in Anderson Fabry disease. Kampmann C<sup>1</sup>, Wiethoff CM, Perrot A, Beck M, Dietz R, Osterziel KJ *Z Kardiol.* 2002 Oct;91(10):786-95
45. Bathia GS, Leahy JF, Connolly DL, et al.: severe left ventricular hypertrophy in Anderson-Fabry disease. *Heart* 2004; 1136

46. Chimenti C, Morgante E, Tanzilli G et al. Angina in Fabry disease reflects coronary small vessels. *Circ Heart Fail* 2008; 161 – 169
47. Chimenti C, Hamdani N, Boontje NM et al.: Myofilament degradation and dysfunction of human cardiomyocytes in Fabry disease. *Am J Pathol* 2008; 1482 – 1490
48. Elliot PM, Kindler H, Shah J et al.: coronary microvascular dysfunction in male patients with Anderson-Fabry Disease and the effects of treatment with alpha galactosidasi. *Heart* 2006; 357 - 360.
49. Linhart A, Kampmann C, Zamorano JL: Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease: results from the international Fabry outcome survey. *Eur Heart J* 2007, 1228 – 1235
50. O' Mahony C, Elliot PM.: Anderson-Fabry disease and the heart. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 326 - 335.
51. Patel MR, Cecchi F, Cizmarik M et al. Cardiovascular events in patients with Fabry disease natural history: data from the Fabry registry. *J Am Coll Cardiol* 2011;:1093 – 1099
52. The variation of morphological and functional cardiac manifestation in Fabry disease: potential implications for the time course of the disease. Weidemann F<sup>1</sup>, Breunig F, Beer M, Sandstede J, Störk S, Voelker W, Ertl G, Knoll A, Wanner C, Strotmann JM *Eur Heart J*. 2005 Jun;26(12):1221-7
53. Anderson-Fabry disease: a multiorgan disease. Tuttolomondo A<sup>1</sup>, Pecoraro R, Simonetta I, Miceli S, Pinto A, Licata G. *Curr Pharm Des*. 2013;19(33):5974-96
54. Fellgiebell A, Muller MJ , Ginsberg L.: CNS manifestations of Fabry's disease. *Lancet Neurol* 2006; 791 – 795
55. Low M, Nicholls K, Tubridy N.: neurology of Fabry disease. *Internal Med J* 2007; 436 – 447
56. Breunig F, Wanner C. update on Fabry disease: kidney involvement, renal progression and enzyme replacement therapy. *J Nephrol* 2008;.32 – 37
57. The Mainz Severity Score Index: a new instrument for quantifying the Anderson-Fabry disease phenotype, and the response of patients to enzyme replacement therapy. Whybra C<sup>1</sup>, Kampmann C, Krummenauer F, Ries M, Mengel E, Miebach E, Baehner F, Kim K, Bajbouj M, Schwarting A, Gal A, Beck M. *Clin Genet*. 2004 Apr;65(4):299-307
58. A family with various symptomatology suggestive of Anderson-Fabry disease and a genetic polymorphism of alpha galactosidase A gene Antonino Tuttolomondo a.\*, Giovanni Duro , Rosaria Pecoraro a, Irene Simonetta , Salvatore Miceli a, Paolo Colomba 5, Carmela Zizzo 5, Tiziana Di Chiara a, Rosario Scaglione 4, Vittoriano Della Corte a, Francesca Corpora a, Antonio Pinto *Clinical Biochemistry* 48 (2015) 55-62

59. Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001; 195 – 196
60. Rombach SM, Dekker N, Bouwmann MG. plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* 2010; 741 – 748
61. Togawa T , Kodama T, Suzuki T et al: plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Mol Genet Metab* 2010; 257 – 261
62. Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W: Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizigotes and heterozigotes. Alpha galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab ClinMed* 1973; 157 – 171
63. Tuttolomondo A, Duro G, Miceli S, et al. Novel alpha-galactosidase A mutation in a female with recurrent strokes. *Clin Biochem.* 2012;45(16-17):1525-30
64. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 2001; 9 – 16
65. Linthorst GE, Germain DP, Hollak CEM et al.: expert opinion on temporary treatment recommendations for Fabry disease during the shortage of enzyme replacement therapy(ERT). *Mol Genet Metab* 2011; 99 – 102
66. Metha A, Beck M, Elliot PM.: enzyme replacement therapy with agalsidasi alfa in patients with Fabry's disease: an analysis of registry data. *Lancet* 2009; 1986 – 1996
67. Shiffmann R.: Fabry Disease. *Pharmacol ther* 2009; 65 – 77
68. Use of a Modified  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase in the Development of Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease  
 YouichiTajima<sup>13</sup>IkuoKawashima<sup>13</sup>TakahiroTsukimura<sup>23</sup>KanakoSugawara<sup>1</sup>MayukoKuroda<sup>2</sup>ToshihiroSuzuki<sup>2</sup>TadayasuTogawa<sup>4</sup>YasunoriChiba<sup>4</sup>YoshifumiJigami<sup>4</sup>KazukiOhno<sup>5</sup>TomokoFukushige<sup>6</sup>TakuroKanekura<sup>6</sup>KohjiItoh<sup>7</sup>ToyaOhashi<sup>8</sup>HitoshiSakuraba Volume 85, Issue 5, *Am J Hum Genet* 13 November 2009, Pages 569-580
69. Parenti G.: Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med* 2009; 268 – 279
70. Yam GH, Bosshard N, Zuber C, Steinmann B, Roth J.: pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. *American Journal of Physiology. Am J Physiol Cell Physiol* 2006;1076 – 1082
71. Siatskas C, Medin JA: Gene therapy for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2001; 25 – 41
72. Ziegler RJ, Yew NS, Li C, Cherry M, Berthelette P, Romanczuk H, Ioannou YA, Zeidner KM, Desnick RJ, Cheng SH: Correction of enzymatic and lysosomal storage defects in Fabry mice by adenovirus mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 1999; 1667 – 1682

73. The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. Benjamin ER<sup>1</sup>, Della Valle MC<sup>1</sup>, Wu X<sup>1</sup>, Katz E<sup>1</sup>, Pruthi F<sup>1</sup>, Bond S<sup>2</sup>, Bronfin B<sup>2</sup>, Williams H<sup>1</sup>, Yu J<sup>1</sup>, Bichet DG<sup>3</sup>, Germain DP<sup>4</sup>, Giugliani R<sup>5</sup>, Hughes D<sup>6</sup>, Schiffmann R<sup>7</sup>, Wilcox WR<sup>8</sup>, Desnick RJ<sup>9</sup>, Kirk J<sup>1</sup>, Barth J<sup>1</sup>, Barlow C<sup>1,10</sup>, Valenzano KJ<sup>1</sup>, Castelli J<sup>1</sup>, Lockhart DJ<sup>1,11</sup> *Genet Med.* 2017 Apr;19(4):430-438
74. R.J. Desnick, Y.A. Ioannou, C.M. Eng,  $\alpha$ -Galactosidase A deficiency: Fabry disease, in: C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc., New York, 2001, pp. 3733–3774.
75. D.F. Moore, F. Ye, M.L. Brennan, S. Gupta, B.A. Barshop, R.D. Steiner, W.J. Rhead, R.O. Brady, S.L. Hazen, R. Schiffmann, Ascorbate decreases Fabry cerebral hyperperfusion suggesting a reactive oxygen species abnormality: an arterial spin tagging study, *J. Magn. Reson. Imaging* 20 (2004) 674–683.
76. P.F. Bodary, Y. Shen, F.B. Vargas, X. Bi, K.A. Ostenson, S. Gu, J.A. Shayman, D.T. Eitzman, Alpha-galactosidase A deficiency accelerates atherosclerosis in mice with apolipoprotein E deficiency, *Circulation* 111 (2005) 629–632.
77. D.F. Moore, L.T.C. Scott, M.T. Gladwin, G. Altarescu, C. Kaneski, K. Suzuki, M. Pease- Fye, R. Ferri, R.O. Brady, P. Herscovitch, R. Schiffmann, Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy, *Circulation* 104 (2001) 1506–1512.
78. B. Halliwell, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity cause or consequence? *Lancet* 344 (1994) 721–724.
79. M.C. Polidori, B. Frei, A. Cherubini, G. Nelles, G. Rordorf, J.F. Keaney Jr., L. Schwamm, P. Mecocci, W.J. Koroshetz, M.F. Beal, Increased plasma levels of lipid hydroperoxides
80. A. Terman, T. Kurz, B. Gustafsson, U.T. Brunk, Lysosomal labilization, *IUBMB Life* 58 (2006) 531–539.
81. U.T. Brunk, J. Neuzil, J.W. Eaton, Lysosomal involvement in apoptosis, *Redox Rep.* 6 (2001) 91–97.
82. B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312–322.
83. H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4- hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81–128.
84. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York, 2006. S.
85. D.F. Moore, E. Goldin, M.P. Gelderman, C. Robinson, J. Baer, M. Ries, A. Elkahloun, R.O. Brady, R. Schiffmann, Apoptotic abnormalities in differential gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with Fabry disease, *Acta Paediatr.* 97 (2008) 48–52.
86. P. Rahman, D.D. Gladman, J. Wither, M.D. Silver, Coexistence of Fabry's disease and systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Rheumatol.* 16 (1998) 475–478.

87. C. Whybra, A. Schwarting, J. Kriegsmann, A. Gal, E. Mengel, C. Kampmann, F. Baehner, E. Schaefer, M. Beck, IgA nephropathy in two adolescent sisters heterozygous for Fabry disease, *Pediatr. Nephrol.* 21 (2006) 1251–1256.
88. P. Martinez, M. Aggio, P. Rozenfeld, High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 365–369.
89. M.J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T. Dean, Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1151–1163.
90. [41] I. Dalle-Donne, G. Aldini, M. Carini, R. Colombo, R. Rossi, A. Milzani, Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression, *J. Cell. Mol. Med.* 10 (2006) 389–406.
91. Giovana B. Biancini, Camila S. Vanzin, Daiane B. Rodrigues, Marion Deon, Graziela S. Ribas, Alethéa G. Barschak Vanusa Manfredini e, Cristina B.O. Netto b, Laura B. Jardim, Roberto Giugliani a,b, Carmen R. Vargas. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822 (2012) 226–232
92. Shu L, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Smid BE, Aerts JM, Hollak CE et al. Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of fabry disease. *Kidney Int* 2014; 86:58±66 <https://doi.org/10.1038/ki.2013.520> PMID: 24402087
93. Sirker A, Zhang M, Murdoch C, Shah AM. Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. *Am J Nephrol* 2007; 27:649±660 <https://doi.org/10.1159/000109148> PMID: 17901689
94. Verdiana Ravarotto<sup>1</sup>, Gianni Carraro<sup>1</sup>, Elisa Pagnin<sup>1</sup>, Giovanni Bertoldi<sup>1</sup>, Francesca Simioni<sup>1</sup>, Giuseppe Maiolino<sup>2</sup>, Matteo Martinato<sup>3</sup>, Linda Landini<sup>4</sup>, Paul A. Davis<sup>5</sup>, Lorenzo A. Calò. Oxidative stress and the altered reaction to it in Fabry disease: A possible target for cardiovascular-renal remodeling? *PLoS ONE* 13(9): e0204618
95. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39:1529±1542 PMID: 9717713
96. Biancini GB, Jacques CE, Hammerschmidt T, de Souza HM, Donida B, DeonM et al. Biomolecules damage and redox status abnormalities in fabry patients before and during enzyme replacement therapy. *Clinica Chimica Acta* 2016; 461:41±4
97. Calo LA, Vertolli U, Pagnin E, Ravarotto V, Davis PA, Lupia M et al. Increased rho kinase activity in mononuclear cells of dialysis and stage 3±4 chronic kidney disease patients with left ventricular hypertrophy: Cardiovascular risk implications. *Life Sci* 2016; 148:80±85 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.019> P
98. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA et al. Chamber Quantification Writing Group, American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee, European Association of Echocardiography: 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 echocardiography, a branch of the european society of cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:1440±1463 <https://doi.org/10.1016/j.echo.2005.10.005> PMID: 16376782
99. 18. Calo LA, Vertolli U, Davis PA, Dal Maso L, Pagnin E, Ravarotto V et al. Molecular biology based assessment of green tea effects on oxidative stress and cardiac remodelling in dialysis patients. *Clin Nutr* 2014; 33:437±442 <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.06.010>
  100. Stork PJS, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 2002; 12:258±26
  101. Hughes DA and Mehta AB (2005) Vascular complications of Fabry disease: Enzyme replacement and other therapies. *Acta Paediatr* 94(Suppl):28-33 (see also Discussion pp 9-10).
  102. Refsum H, Ueland PM, Nygard O and Vollset, SE (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 49:31-62.
  103. Lentz SR and Haynes WG (2004) Homocysteine: Is it a clinically important cardiovascular risk factor? *Cleve Clin J Med* 71:729-734.
  104. Morelli VM, Lourenco DM, D'Almeida V, Franco RF, Miranda F, Zago MA, Noguti MA, Cruz E and Kerbauy J (2002) Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolatereductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 13:271-275.
  105. EldibanyMM and Caprini JA (2007) Hyperhomocysteinemia and thrombosis: An overview. *Arch Pathol Lab Med* 131:872-884.
  106. Welch GN and Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 338:1042-1050.
  107. Voutilainen S, Morrow JD, Roberts 2nd LJ, Alfthan G, Alho H, Nyssonen K and Salonen JT (1999) Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1263-1266
  108. Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A and Sengupta S (2006) Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis* 5:e1.
  109. Jones DP(2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8:1865-187
  110. Demuth K and Germain DP (2002) Endothelial markers and homocysteine in patients with classic Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 91:57-61.
  111. Fedi S, Gensini F, Gori AM, Abbate R and Borsini W (2005) Homocysteine and tissue factor pathway inhibitor levels in patients with Fabry's disease. *J Thromb Haemost* 3:2117-2119.
  112. Roversi FM, Galdieri LC, Souza FG, Micheletti C, Martins AM and D'Almeida V (2006) Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. *Clin Chim Acta* 364:316-320.

113. Pereira VG, Martins AM, Micheletti C and D'Almeida V (2008) Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta* 387:75-79.
114. Shen JS, Meng XL, Moore DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R and Kaneski CR (2008) Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab* 95:163-168
115. Karen B. Müller<sup>1</sup>, Luciano C. Galdieri<sup>1</sup>, Vanessa G. Pereira<sup>1</sup>, Ana M. Martins<sup>1</sup> and Vânia D'Almeida. Evaluation of oxidative stress markers and cardiovascular risk factors in Fabry Disease patients. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 2, 418-423 (2012)
116. A. Collins, G. Koppen, V. Valdiglesias, et al., The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project, *Mutat. Res.* 759 (2014) 27–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.10.001>.
117. E.C. Friedberg, A. Aguilera, M. Gellert, et al., DNA repair: from molecular mechanism to human disease, *DNA Repair* 5 (2006) 986–996, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.005>.
118. S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature* 461 (2009) 1071–1078, <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>.
119. [33] K.J.A. Davies, A.G. Weise, R.E. Pacifici, J.M.S. Davies, Regulation of gene expression in adaptation to oxidative stress, in: G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani (Eds.), *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhauser-Verlag, Basel, Switz, 1993, pp. 18–30.
120. B. Halliwell, O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett.* 281 (1991) 9–19, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80347-6](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(91)80347-6).
121. Biancini, C.S. Vanzin, D.B. Rodrigues, et al., Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 226–232, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.001>
122. J.S. Shen, X.L. Meng, D.F. Moore, et al., Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 163–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.06.016>.
123. S. Steenken, S.V. Jovanovic, How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 617–618, <http://dx.doi.org/10.1021/ja962255b>.
124. M. Dizdaroglu, Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease, *Cancer Lett.* 327 (2012) 26–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016>.
125. M. Dizdaroglu, G. Rao, B. Halliwell, E. Gajewski, Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions, *Arch. Biochem. Biophys.* 285 (1991) 317–324, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90366-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(91)90366-Q).

126. DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair Giovana Brondani Biancinia,b,\*, Dinara Jaqueline Mourac, Paula Regina Maninic, Jéssica Lamberty Faverzanib, Cristina Brinckmann Olivei. *Mutation Research* 784-785 (2015) 31–36
127. Cristina Chimenti MD, PhDa,b, Fernanda Scopelliti PhDa, Elisabetta Vulpis PhDb, Increased oxidative stress contributes to cardiomyocyte dysfunction and death in patients with Fabry disease cardiomyopathy Marco Tafani PhDc, Lidia Villanova PhDc, Romina Verardo, Ruggero De Paulis, Matteo A. Russo, Andrea Frustaci. *Human Pathology* (2015) 46, 1760–1768
128. borbély A, Tóth A, Edes I, et al. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res* 2005;67:225-33.
129. Kroese LJ, Scheffer PG. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep* 2014;16:452
130. Kono Y, Nakamura K, Kimura H, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circ J* 2006;70:1001-5.
131. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, et al. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2001;89:279-86.
132. De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Higher apoptotic state in Fabry disease peripheral blood mononuclear cells: effect of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab* 2011;104:319-24
133. Shen JS, Meng XL, Moore DF, et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab* 2008;95:163-8.
134. Namdar M, Gebhard C, Studiger R, et al. Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease. *PLoS One* 2012;7:e36373.
135. S. Bekri, O. Lidove, R. Jaussaud, B. Knebelmann, F. Barbey, The role of ceramide trihexoside (globotriaosylceramide) in the diagnosis and follow-up of the efficacy of treatment of Fabry disease: a review of the literature, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 4 (4) (2006) 289–297.
136. C. Auray-Blais, D. Cyr, A. Ntwari, M.L. West, J. Cox-Brinkman, D.G. Bichet, D.P. Germain, R. Laframboise, S.B. Melançon, T. Stockley, J.T.R. Clarke, R. Drouin, Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease, *Mol. Genet. Metab.* 93 (3) (2008) 331–340.
137. J.M. Aerts, J.F. Groener, S. Kuiper, W.E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Ottenhoff, C. Van Roomen, M. Mirzaian, F.A. Wijburg, G.E. Linthorst, A.C. Vedder, S.M. Rombach, J. Cox-Brinkman, P. Somerharju, R.G. Boot, C.E. Hollak, R.O. Brady, B.J. Poorthuis, Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease, *PNAS* 105 (8) (2008) 2812–2817

138. T. Togawa, T. Kodama, T. Suzuki, K. Sugawara, T. Tsukimura, T. Ohashi, N. Ishige, K. Suzuki, T. Kitagawa, H. Sakuraba, Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease, *Mol. Genet. Metab.* 100 (3) (2010) 257–261.
139. [50] S.M. Rombach, N. Dekker, M.G. Bouwman, G.E. Linthorst, A.H. Zwinderman, F.A. Wijburg, S. Kuiper, M.A.v.B. Weerman, J.E.M. Groener, B.J. Poorthuis, C.E.M. Hollak, J.M.F.G. Aerts, Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1802 (9) (2010) 741–748.
140. Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy Giovana Brondani Biancini a,b,\*, Carlos Eduardo Jacques b,c, Tatiane Hammerschmidt b, Heryk Motta de Souza b, Bruna Donida a,b, Marion Deonb, Filippo Pinto Vairo b, Charles Marques Lourenço, Roberto Giugliani a,b,e, Carmen Regla Varga
141. Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 2001;82:674-82.
142. [35] Askari H, Kaneski CR, Semino-Mora C, et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Arch* 2007;451:823-34.
143. [36] Das AM, Kohlschütter A. Decreased activity of the mitochondrial ATP-synthase in fibroblasts from children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Inherit Metab Dis* 1996;19:130-2.
144. Strasberg PM, Callahan JW. Lysosphingolipids and mitochondrial function. II. Deleterious effects of sphingosylphosphorylcholine. *Biochem Cell Biol* 1988;66:1322-32.
145. [38] Lucke T, Höppner W, Schmidt E, Illsinger S, Das AM. Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. *Mol Genet Metab* 2004;82: 93-7.
146. [39] Das AM, Naim HY. Biochemical basis of Fabry disease with emphasis on mitochondrial function and protein trafficking. *Adv Clin Chem* 2009;49:57-71.
147. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York, 2007.
148. S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Mol. Asp. Med.* 30 (1–2) (2009) 42–59.
149. [26] P.G. Richman, A. Meister, Regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1422–1426.
150. [27] A. Meister, M.E. Anderson, Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 711–760.
151. R.T. Mulcahy, M.A. Wartman, H.H. Bailey, J.J. Gipp, Constitutive and  $\alpha$ -naphthoflavone-induced expression of the human  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7445–7454.
152. M. Deponte, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (5) (2013) 3217–3266.

153. M. Asahi, J. Fujii, K. Suzuki, H.G. Seo, T. Kuzuya, M. Hori, M. Tada, S. Fuji, N. Taniguchi, Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: implication for cytotoxicity, *J. Biol. Chem.* 270 (36) (1995) 21035–21039.
154. K.A. Broniowska, A.R. Diers, N Hogg, S-nitrosoglutathione, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (5) (2013) 3173–3181
155. A. Schrammel, A.C.F. Gorren, K. Schmidt, S. Pfeiffer, B. Mayer, S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxyxynitrite, and  $\bullet\text{NO}/\text{O}_2\bullet^-$ , *Free Radic. Biol Med.* 34 (8) (2003) 1078–1088.
156. D.F. Moore, L.T.C. Scott, M.T. Gladwin, G. Altarescu, C. Kaneski, K. Suzuki, M. Pease-Fye, R. Ferri, R.O. Brady, P. Herscovitch, R. Schiffmann, Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy, *Circulation* 104 (13) (2001) 1506–1512.
157. J.R. Burgoyne, S. Oka, N. Ale-Agha, P. Eaton, Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (9) (2013) 1042–1052.
158. E. Panieri, M.M. Santoro, ROS signaling and redox biology in endothelial cells, *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (2015) 3281–3303.
159. [B. D'Autréaux, M.B. Toledano, ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (10) (2007) 813–824.
160. H. Cai, Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences, *Cardiovasc. Res.* 68 (1) (2005) 26–36.
161. A. Dejam, C.J. Hunter, A.N. Schechter, M.T. Gladwin, Emerging role of nitrite in human biology, *Blood Cells Mol. Dis.* 32 (3) (2004) 423–429.
162. N.S. Bryan, M.B. Grisham, Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (5) (2007) 645–657.
163. B.M. Babior, Phagocytes and oxidative stress, *Am. J. Med.* 109 (1) (2000) 33–44.
164. Y. Ueki, S. Miyake, Y. Tominaga, K. Eguchi, Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 23 (2) (1996) 230–236.
165. P.N. De Francesco, J.M. Mucci, R. Ceci, C.A. Fossati, P.A. Rozenfeld, Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide, *Mol. Genet. Metab.* 109 (1) (2013) 93–99.
166. M.J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T. Dean, Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1151–1163.
167. B. Halliwell, S. Chirico, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (Suppl. 5) (1993) 715S–725S.
168. B. Shao, J.W. Heinecke, HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis, *J. Lipid Res.* 50 (4) (2009) 599–601.

169. B. Pang, X. Zhou, H. Yu, M. Dong, K. Taghizadeh, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, P.C. Dedon, Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation, *Carcinogenesis* 28 (8) (2007) 1807–1813.
170. M.C. Polidori, B. Frei, A. Cherubini, G. Nelles, G. Rordorf, J.F. Keaney Jr., L. Schwamm, P. Mecocci, W.J. Koroshetz, M.F. Beal, Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke, *Free Radic. Biol. Med.* 25 (4–5) (1998) 561–567.
171. S.M. Rombach, B.E. Smid, G.E. Linthorst, M.G.W. Dijkgraaf, C.E.M. Hollak, Natural course of Fabry disease and the effectiveness of enzyme replacement therapy: a systematic review and meta-analysis: effectiveness of ERT in different disease stages, *J. Inherit. Metab. Dis.* 37 (3) (2014) 341–352.
172. Mitochondrial DNA sequence variation and neurodegeneration. Michelangelo Mancuso,\* Massimiliano Filosto, Daniele Orsucci and Gabriele Siciliano. *HUMAN GENOMICS. VOL 3. NO 1. 71–78 SEPTEMBER 2008*
173. DiMauro, S. and Schon, E.A. (2003), ‘Mitochondrial respiratory-chain diseases’, *N. Engl. J. Med.* Vol. 348, pp. 2656–2668.
174. 2. Noji, H. and Yoshida, M. (2001), ‘The rotary machine of the cell, ATP synthase’, *J. Biol. Chem.* Vol. 276, pp. 1665–1668.
175. 3. Filosto, M. and Mancuso, M. (2007), ‘Mitochondrial diseases: A nosological update’, *Acta Neurol. Scand.* Vol. 115, pp. 211–221
176. Cann, R.L., Stoneking, M. and Wilson, A.C. (1987), ‘Mitochondrial DNA and human evolution’, *Nature* Vol. 325, pp. 31–36
177. Torroni, A., Achilli, A., Macaulay, V. et al. (2006), ‘Harvesting the fruit of the human mtDNA tree’, *Trends Genet.* Vol. 22, pp. 339–345.
178. Petrozzi, L., Ricci, G., Figlioli, N.J. et al. (2007), ‘Mitochondria and neurodegeneration’, *Biosci. Rep.* Vol. 27, pp. 87–104.
179. 7. Mancuso, M., Coppede, F., Migliore, L. et al. (2006), ‘Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration’, *J. Alzheimers Dis.* Vol. 10, pp. 59–73.
180. 8. Zhang, J., Asin-Cayuela, J., Fish, J. et al. (2003), ‘Strikingly higher frequency in centenarians and twins of mtDNA mutation causing remodeling of replication origin in leukocytes’, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 100, pp. 1116–1121.
181. 9. Niemi, A.K., Moilanen, J.S., Tanaka, M. et al. (2005), ‘A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects’, *Eur. J. Hum. Genet.* Vol. 13, pp. 166–170
182. Samuels, D.C., Carothers, A.D., Horton, R. et al. (2006), ‘The power to detect disease associations with mitochondrial DNA haplogroups’, *Am. J. Hum. Genet.* Vol. 78, pp. 713–720..

183. S. Vielhaber, D. Kunz, K. Winkler, F.R. Wiedemann, E. Kirches, H. Feistner, H.J. Heinze, C.E. Elger, W. Schubert, W.S. Kunz, Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis [see comments], *Brain* 123 (2000) 1339–1348.
184. [33] F.R. Wiedemann, K. Winkler, A.V. Kuznetsov, C. Bartels, S. Vielhaber, H. Feistner, W.S. Kunz, Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *J.Neurol. Sci.* 156 (1998) 65–72.
185. A. Echaniz-Laguna, J. Zoll, F. Ribera, C. Tranchant, J.M. Warter, J. Lonsdorfer, E. Lampert, Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 623–627.
186. G.M. Borthwick, M.A. Johnson, P.G. Ince, P.J. Shaw, D.M. Turnbull, Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis, implications for the role of mitochondria in neuronal cell death, *Ann.Neurol.* 46 (1999) 787–790.
187. R.H. Swerdlow, J.K. Parks, D.S. Cassarino, P.A. Trimmer, S.W. Miller, D.J. Maguire, J.P. Sheehan, R.S. Maguire, G. Pattee, V.C. Juel, L.H. Phillips, J.B. Tuttle, J.P. Bennett Jr., R.E. Davis, W.D. Parker Jr., Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Exp. Neurol.* 153 (1998) 135–142.
188. C.D. Gajewski, M.T. Lin, M.E. Cudkowicz, M.F. Beal, G. Manfredi, Mitochondrial DNA from platelets of sporadic ALS patients restores normal respiratory functions in 0 cells, *Exp. Neurol.* 179 (2003) 229–235.
189. G.P. Comi, A. Bordoni, S. Salani, L. Franceschina, M. Sciacco, A. Prella, F. Fortunato, M. Zeviani, L. Napoli, N. Bresolin, M. Moggio, C.D. Ausenda, J.W. Taanman, G. Scarlato, Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease, *Ann.Neurol.* 43 (1998) 110–116.
190. G.K. Dhaliwal, R.P. Grewal, Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains, *Neuroreport* 11 (2000) 2507–2509.
191. L.S. Ro, S.L. Lai, C.M. Chen, S.T. Chen, Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis, a hospital-based case–control study, *Muscle Nerve* 28 (2003) 737–743.
192. J.M. van Der Walt, Y.A. Dementieva, E.R. Martin, W.K. Scott, K.K. Nicodemus, C.C. Kroner, K.A. Welsh-Bohmer, A.M. Saunders, A.D. Roses, G.W. Small, D.E. Schmechel, P. Murali Doraiswamy, J.R. Gilbert, J.L. Haines, J.M. Vance, M.A. Pericak-Vance, Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk, *Neurosci. Lett.* 365 (2004) 28–32.
193. [31] J.M. van der Walt, K.K. Nicodemus, E.R. Martin, W.K. Scott, M.A. Nance, R.L. Watts, J.P. Hubble, J.L. Haines, W.C. Koller, K. Lyons, R. Pahwa, M.B. Stern, A. Colcher, B.C. Hiner, J. Jankovic, W.G. Ondo, F.H. Allen Jr., C.G. Goetz, G.W. Small, F. Mastaglia, J.M. Stajich, A.C. McLaurin, L.T. Middleton, B.L. Scott, D.E. Schmechel, M.A. Pericak-Vance, J.M. Vance,

- Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease, *Am. J. Hum. Genet.* 72 (2003) 804–811.
194. A. Torroni, K. Huoponen, P. Francalacci, M. Petrozzi, L. Morelli, R. Scozzari, D. Obinu, M.L. Savontaus, D.C. Wallace, Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations, *Genetics* 144 (1996) 1835–1850.
  195. Mitomap: a Human Mitochondrial Genome Database. Available at, <http://www.mitomap.org>. Accessed March 2004.
  196. Could mitochondrial haplogroups play a role in sporadic amyotrophic lateral sclerosis? Michelangelo Mancuso\*, Francesca Luisa Conforti, Anna Rocchia, Alessandro Tessitore, Maria Mugliab, Gioacchino Tedeschic, Daniela Panzac, MariaRosaria Monsurr`oc, Patrizia Solad, Jessica Mandriolid, Anna Chouba, Alberto DelCoronaa, Maria Laura Mancaa, Rosalucia Mazzeib, Teresa Sprovierib, Massimiliano Filostoe, Alessandro Salviatie, Paola Valentinof, Francesco Bonof, Manuela Caracciolob, Isabella Laura Simoneg, Vincenzo La Bella, Giovanni Majoranai, Gabriele Sicilianoa, Luigi Murria, Aldo Quattrone. *Neuroscience Letters* 371 (2004) 158–162
  197. Mitochondrial DNA haplogroups may influence Fabry disease phenotype C. Simoncinia, L. Chicoa, D. Concolinob, S. Sestito b, L. Fancelluc, W. Boaduc, G.P. Sechic, C. Feliciani d, M. Gnarrad, A. Zampettie, A. Salviati f, M. Scarpelli g, D. Orsucci, U. Bonuccellia, G. Siciliano a, M. Mancuso. *Neuroscience Letters* 629 (2016) 58–61
  198. M.F. Beal, Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration, *Ann. Neurol.* 58 (2005) 495–505.
  199. A.M. Das, Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease, *Mol. Genet. Metab.* 79 (2) (2003) 71–82.
  200. T. Lucke, W. Hoppner, E. Schmidt, S. Illsinger, A.M. Das, Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts, *Mol. Genet. Metab.* 82 (1) (2004) 93–97.
  201. A. Achilli, A. Olivieri, M. Pala, B. Hooshiar Kashani, V. Carossa, U.A. Perego, F. Gandini, A. Santoro, V. Battaglia, V. Grugni, H. Lancioni, C. Sirolla, A.R. Bonfigli, A. Cormio, M. Boemi, I. Testa, O. Semino, A. Ceriello, L. Spazzafumo, M.N. Gadaleta, M. Marra, R. Testa, C. Franceschi, A. Torroni, Mitochondrial DNA backgrounds might modulate diabetes complications rather than T2DM as a whole, *PLoS One* 6 (6) (2011) e21029.
  202. Mancuso, C., Curro', D., Scapagnini, G., Giuffrida Stella, A. M., De Marco, C., Butterfield, D. A., & Calabrese, V. (2007). Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Bioscience*, 1107-1123.
  203. Mitochondrial DNA haplogroups influence the Friedreich's ataxia phenotype M Giacchetti, A Monticelli, I De Biase, L Pianese, M Turano, A Filla, G De Michele, S Coccozza. *J Med Genet* 2004;41:293–295. doi: 10.1136/jmg.2003.015289

204. Moore DF, Scott LTC, Gladwin MT, Altarescu G, Kaneski C, Suzuki K et al (2011) Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy. *Circulation* 104(13):1506–1512
205. Ravarotto V, Simioni F, Carraro G, Bertoldi G, Pagnin E, Calò L (2018) Oxidative stress and cardiovascular-renal damage in fabry disease: is there room for a pathophysiological involvement? *J Clin Med* 7(11):409
206. Shen J-S, Meng X-L, Moore DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R et al (2008) Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab* 95(3):163–168
207. Biancini GB, Morás AM, Reinhardt LS, Busatto FF, de Moura Sperotto ND, Saffi J et al (2017) Globotriaosylsphingosine induces oxidative DNA damage in cultured kidney cells. *Nephrology Carlton* 22(6):490–493
208. Arends M, Wanner C, Hughes D, Mehta A, Oder D, Watkinson OT et al (2017) Characterization of classical and nonclassical fabry disease: A multicenter study. *J Am Soc Nephrol* 28(5):1631–1641
209. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère- Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S et al (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161(5):2524–2532
210. Chen YH, Shi W, Liang XL, Liang YZ, Fu X (2011) Effect of blood sample type on the measurement of advanced oxidation protein products as a biomarker of inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients. *Biomarkers* 16(2):129–135
211. Selmeçi L (2011) Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic Res* 45:1115–1123
212. Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of « antioxidant power » : The FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1):70–76
213. Nowak M, Świętochowska E, Wielkoszyński T, Marek B, Karpe J, Górski J et al (2003) Changes in blood antioxidants and several lipid peroxidation products in women with age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol* 13(3):281–286
214. Hu ML (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 233(C):380–385
215. Germain DP, Fouilhoux A, Decramer S, Tardieu M, Pillet P, Fila M et al (2019) Consensus recommendations for diagnosis, management and treatment of Fabry disease in paediatric patients. *Clin Genet* 96(2):107–117
216. Kritzer A, Siddharth A, Leestma K, Bodamer O (2019) Early initiation of enzyme replacement therapy in classical Fabry disease normalizes biomarkers in clinically asymptomatic pediatric patients. *Mol Genet Metab reports* 21:100530

217. Shu L, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Smid BE, Aerts JMFG, Hollak CEM et al (2014) Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of Fabry disease. *Kidney Int* 86(1):58–66
218. Smid BE, Van der Tol L, Biegstraaten M, Linthorst GE, Hollak CEM, Poorthuis BJHM (2015) Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of fabry disease. *J Med Genet* 52(4):262–268
25. Yasuda M, Shabbeer J, Benson SD, Maire I, Burnett RM, Desnick RJ (2003) Fabry disease: characterization of  $\alpha$ -galactosidase a double mutations and the D313Y Plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat* 22(6):486–492
219. 26. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I (2003) Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab* 80(3):307–314
220. Golbus JR, Puckelwartz MJ, Dellefave-Castillo L, Fahrenbach JP, Nelakuditi V, Pesce LL et al (2014) Targeted analysis of whole genome sequence data to diagnose genetic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 7(6):751–759
221. Turaça LT, Pessoa JG, Motta FL, Muñoz Rojas MV, Müller KB, Lourenço CM et al (2012) New mutations in the GLA gene in Brazilian families with Fabry disease. *J Hum Genet* 57:347–351
222. Kritzer A, Siddharth A, Leestma K, Bodamer O (2019) Early initiation of enzyme replacement therapy in classical Fabry disease normalizes biomarkers in clinically asymptomatic pediatric patients. *Mol Genet Metab reports* 21:100530
223. Germain DP, Arad M, Burlina A, Elliott PM, Falissard B, Feldt-Rasmussen U et al (2019) The effect of enzyme replacement therapy on clinical outcomes in female patients with Fabry disease—a systematic literature review by a European panel of experts. *Mol Genet Metab* 126(3):224–235
224. 31. Germain DP, Elliott PM, Falissard B, Fomin VV, Hilz MJ, Jovanovic A et al (2019) 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 Rep* 19:100454
225. Hertelendi Z, Tóth A, Borbély A, et al. The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2009;13:2200-9.
226. Taylor AL. Nitric oxide modulation as a therapeutic strategy in heart failure. *Heart Fail Clin* 2012;8:255-72.