

**HALLAZGOS MOLECULARES EN MUJERES COLOMBIANAS CON SOSPECHA DE
ENFERMEDAD DE FABRY ENTRE ENERO DEL 2016 Y DICIEMBRE DEL 2018**



ALISSON GERALDINE POVEDA GUTIERREZ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS - ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, COLOMBIA

2019

**HALLAZGOS MOLECULARES EN MUJERES COLOMBIANAS CON SOSPECHA DE
ENFERMEDAD DE FABRY ENTRE ENERO DEL 2016 Y DICIEMBRE DEL 2018**

ALISSON GERALDINE POVEDA GUTIERREZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar el título de Magistra en Ciencias Biológicas
con énfasis en Genética Humana**

REGGIE GARCIA ROBLES, MD, PhD

Director

PAOLA ANDREA AYALA RAMÍREZ, Bac, Msc, PhDc

Codirectora

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS - ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTA, COLOMBIA

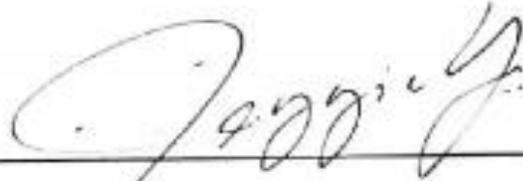
2019

"La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia"

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946

HALLAZGOS MOLECULARES EN MUJERES COLOMBIANAS CON SOSPECHA DE
ENFERMEDAD DE FABRY ENTRE ENERO DEL 2016 Y DICIEMBRE DEL 2018

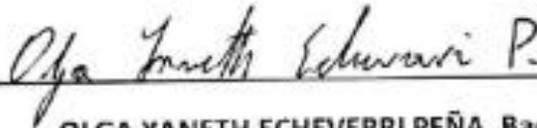
Nota de Aceptación:



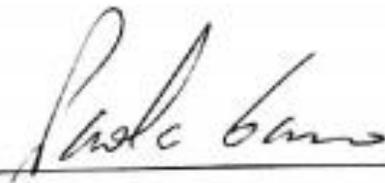
REGGIE GARCIA ROBLES. MD, PhD
DIRECTOR



PAOLA ANDREA AYALA RAMÍREZ, Bac, Msc, PhDc
CODIRECTORA



OLGA YANETH ECHEVERRI PEÑA. Bac, PhD.
JURADO



PAOLA KARINA GARCÍA PADILLA. MD, ESP.
JURADO



HARRY MAURICIO PACHAJOA LONDOÑO, MD, PhD
JURADO

**HALLAZGOS MOLECULARES EN MUJERES COLOMBIANAS CON SOSPECHA DE
ENFERMEDAD DE FABRY ENTRE ENERO DEL 2016 Y DICIEMBRE DEL 2018**

Nota de Aceptación:




ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL. MSc, PhD
DIRECTORA DE POSGRADOS




CONCEPCIÓN JUDITH PUERTA BULA
DECANA FACULTAD DE CIENCIAS. PhD

FACULTAD DE CIENCIAS
2019

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, quienes con su esfuerzo, dedicación, apoyo, pero sobre todo AMOR han hecho de mi lo que este trabajo representa.

Al laboratorio de diagnóstico genético molecular MolecuLab por darme la oportunidad de crecer allí y permitir la difusión del conocimiento como parte de nuestro pequeño aporte con la ciencia y la investigación.

Al Dr. Reggie García y la Dra. Paola Ayala quienes desde siempre han depositado su confianza en mis capacidades y me han orientado en este camino

Al Dr. Alfredo Uribe director del Centro de Investigaciones Bioquímicas de la Universidad de los Andes por su contribución con el estudio.

A la Dra. Janeth González del departamento de Biología Computacional de la PUJ por su transferencia de conocimiento.

Al Dr. Fernando Suárez y al Dr. Juan Carlos Prieto del IGH-PUJ por sus valiosos aportes al trabajo y a mi conocimiento.

A mi compañero de vida desde siempre, quien me ha visto alcanzar cada uno de mis logros y con su amor me recuerda que todo es posible.

GLOSARIO

Sitio activo: En una enzima, también llamado centro activo, es la zona a la cual se une el sustrato, para que la reacción se produzca.

Sustrato: Molécula sobre la que actúa una enzima.

Esfingolípidos: Lípidos de membrana complejos.

Gen: Es una unidad de información en el ADN que codifica un producto funcional, como por ejemplo proteínas.

Monogénico: Que involucra un solo gen.

GLA: Gen que codifica para la enzima lisosomal alfa galactosidasa A (α -Gal-A).

Trastorno genético ligado al cromosoma X: Cuando un gen está presente en el cromosoma X, pero no en el cromosoma Y, se dice que está ligado a X.

Mutación: Se define como un cambio permanente en la secuencia de nucleótidos.

Polimorfismo: Se define como una variante con una frecuencia superior al 1%.

Variante: Término utilizado para definir un cambio en la secuencia de nucleótidos sin definir su consecuencia.

Exón: Es la región codificante de un gen.

Intrón: Regiones que no codifican para proteínas.

Aminoácido: Son la base estructural de las proteínas.

Inactivación aleatoria del cromosoma X: Proceso durante el cual en las mujeres un cromosoma X se inactiva, lo que significa que no se transcriben los genes asociados a este.

ABREVIATURAS

EIM: Errores innatos del metabolismo

LSD's: Enfermedades de almacenamiento lisosomal

EF: Enfermedad de Fabry

pb: Pares de bases

Xq22: Brazo largo del cromosoma X banda 2 región 2.

Kb: Kilobases

kDA: Kilodalton

α -Gal A: Enzima lisosomal α -galactosidasa A

Gb3: Globotriaosilceramida

Liso Gb3: Globotriaosilesfingosina

ERSD: Enfermedad renal terminal

VUS: Variante de significado incierto

TRE: Terapia de reemplazo enzimático

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

XCI: Inactivación del cromosoma X

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	16
SUMMARY	17
1- INTRODUCCIÓN	18
2- MARCO TEÓRICO	19
2.1 ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO (EIM)	19
2.2 ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LISOSOMAL (LSD's)	21
2.2 ENFERMEDAD DE FABRY (EF)	23
2.2.1 Generalidades	23
2.2.2 Historia de la enfermedad de Fabry	24
2.2.3 Epidemiología	24
2.2.4 Fisiopatología de la enfermedad de Fabry	25
2.2.4.1 Disfunción vascular	25
2.2.4.1.1 Depósito de Globotriaosilceramida (Gb3)	25
2.2.4.1.2 Alteraciones estructurales vasculares	26
2.2.4.1.3 Disfunción endotelial	26
2.2.4.1.4 Estado protrombótico	26
2.2.5 Mecanismos fisiopatológicos	26
2.2.5.1 Enfermedad renal en la enfermedad de Fabry (EF)	26
2.2.5.2 Enfermedad cardiaca en la enfermedad de Fabry (EF)	27
2.2.5.3 Enfermedad cerebrovascular en la enfermedad de Fabry (EF)	28
2.2.6 Mecanismo de herencia	28
2.2.7 Signos y síntomas	29
2.2.8 Esperanza de vida y causa de muerte	31
2.2.9 Diagnóstico	31
2.2.9.1 Pruebas bioquímicas	32
2.2.9.2 Pruebas moleculares	32
2.2.10 Tratamiento	33
2.2.10.1 Específico	33
Terapia de reemplazo enzimática (TRE)	33
Chaperona farmacológica	33
2.2.10.2 No Específico	34
2.2.10.3 Perspectivas terapéuticas	34

Terapia génica	34
Terapia enzimática alternativa.....	35
Terapia de reducción de sustrato	35
3- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	35
4- OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5- MATERIAL Y MÉTODOS	37
5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	37
5.2 POBLACIÓN EN ESTUDIO	37
5.3 ANÁLISIS DE ADN GENÓMICO	37
5.4 CLASIFICACIÓN DE HALLAZGOS MOLECULARES.....	38
5.4.1 Frecuencias poblacionales	39
5.4.2. Tipo de variante	40
5.4.3. Bases de datos de enfermedades	40
5.4.4. Reportes de casos, análisis funcionales y reportes de correlación genotipo-fenotipo en población afectada.....	41
5.4.5 Algoritmos de predicción de patogenicidad	42
5.5 ANÁLISIS ADICIONAL <i>IN SILICO</i> DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (<i>VUS</i>) TIPO MISSENSE.	44
5.6 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO BIOQUÍMICO	44
5.7 DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES REPORTADAS EN MUJERES COLOMBIANAS CON SOSPECHA DE EF	45
5.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	45
6- RESULTADOS	46
6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO	46
6.1.1 Características de la población.....	46
6.1.2 Características geográficas de la población en estudio	46
6.1.3 Evidencia clínica	47
6.1.4 Hallazgos moleculares.....	49
6.1.5 Hallazgos moleculares con relevancia clínica.....	50
Variantes clasificadas como: Probablemente patogénica, patogénica y de significado incierto (<i>VUS</i>).....	50
6.1.5.1 Variantes probablemente patogénicas	52

6.1.5.2 Variantes patogénicas	53
6.1.5.3 Variantes de significado incierto (VUS)	54
6.1.5.3.1 Análisis <i>in silico</i> variantes VUS	57
6.2 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO BIOQUÍMICO EF.....	57
6.3 FRECUENCIAS EN MUJERES DE LAS VARIANTES ALELICAS Y GENOTÍPICAS REPORTADAS EN LA POBLACIÓN CON SOSPECHA DE EF.	60
7- DISCUSIÓN.....	66
8- CONCLUSIONES	77
9- PERSPECTIVAS	77
10- LIMITACIONES	78
11- BIBLIOGRAFÍA.....	78
12- ANEXOS	89
.....	89
.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de primers y temperatura de anillamiento para la amplificación de exones del gen GLA.	38
Tabla 2. Herramientas para la clasificación de variantes.	38
Tabla 3. Principales manifestaciones clínicas observadas en las mujeres con sospecha de EF desde diferentes especialidades médicas.	48
Tabla 4. Resultado análisis in silico variantes VUS.	57
Tabla 5. Correlación genotipo con el fenotipo bioquímico descrito para la enfermedad de EF.	58
Tabla 6. Resumen variantes relevantes descritas en el estudio.	59
Tabla 7. Análisis de frecuencias poblacionales de las variantes reportadas en las mujeres colombianas con sospecha de EF.	60
Tabla 8. Resultado análisis estadístico de frecuencias poblacionales reportadas en el estudio vs. frecuencias reportadas en la base de datos 1000 Genomes en mujeres de la población general.	65

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje (%) de individuos remitidos por diferentes especialidades médicas.	48
Gráfica 2. Total de hallazgos moleculares identificados en las mujeres colombianas con sospecha de EF.	50
Gráfica 3. Mujeres con hallazgos moleculares relevantes. a) Distribución geográfica. b) Especialidades de remisión.	51
Gráfica 4. Hallazgos moleculares clasificados como probablemente patogénicos, patogénicos o de significado incierto (VUS) evidenciados en las mujeres colombianas con sospecha de EF.	52
Gráfica 5. Frecuencia de las variantes clasificadas como probablemente patogénicas en las mujeres colombianas con sospecha de EF.	53
Gráfica 6. Frecuencia de las variantes clasificadas como patogénicas en las mujeres colombianas con sospecha de EF.	54
Gráfica 7. Frecuencia de las variantes clasificadas como variantes de significado incierto (VUS) en las mujeres colombianas con sospecha de EF.	55
Gráfica 8. Frecuencia de las variantes clasificadas como probablemente patogénica, patogénica y VUS según la especialidad de remisión.	56

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de degradación de los esfingolípidos.....	21
Figura 2. Reacción enzimática catalizada por la α -Galactosidasa A. Tomada de Barrera et. al 2014 (6).....	23
Figura 3. Signos y síntomas característicos en la EF. Elaboración propia. “Creada con BioRender.com”.....	30
Figura 4. Distribución geográfica de la población incluida en el análisis.....	47
Figura 5. a) Mapa del gen GLA con las variantes de relevancia clínica reportadas en las mujeres colombianas con sospecha de EF. b) Representación de la proteína AGAL-HUMANA (ID: P06280-Pfam) con sus respectivos dominios y sitios activos (azul).....	60

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado estudios de investigación	89
Anexo 2. Carta autorización para el manejo de información proveniente del laboratorio MolecuLab con fines investigativos	90
Anexo 3. Protocolo de extracción DNA-MolecuLab.....	91
Anexo 4. Protocolo amplificación exones gen GLA PCR-TOUCHDOWN	92
ANEXO 5. ARTÍCULO EN PROCESO DE PUBLICACIÓN DERIVADO DE LOS RESULTADOS DE LA TESIS	93

RESUMEN

La enfermedad de Fabry (EF) también conocida como enfermedad de Anderson-Fabry, es un raro trastorno genético de almacenamiento lisosomal con herencia ligada a X clínicamente heterogéneo. Su prevalencia se ha incrementado dramáticamente en el mundo occidental en los últimos años como resultado de un examen selectivo intensivo; sin embargo, en Colombia se desconoce la prevalencia real de la enfermedad. A pesar de ser un trastorno ligado a X, en las últimas décadas se ha podido observar que las mujeres también se ven afectadas por la enfermedad. Las manifestaciones clínicas en mujeres heterocigotas van desde asintomáticas a lo largo de una vida normal hasta tan severas como los hombres afectados. La variación en las manifestaciones clínicas se atribuye a la inactivación aleatoria del cromosoma X (XCI). Este trastorno genético es causado por defectos en la enzima lisosomal α -galactosidasa A (α -Gal A) como resultado de variantes en el gen *GLA* que codifica para esta enzima. El déficit o ausencia de esta enzima conduce a la acumulación intracelular de glicosfingolípidos con un resto α -galactosilo terminal a nivel multiorgánico, en particular globotriaosilceramida (Gb3) y globotriaosilesfingosina (liso Gb3). No obstante, no existe una relación directa de causa y efecto entre el defecto genético, la actividad enzimática residual, los niveles plasmáticos de Gb3 y liso Gb3 y los efectos clínicos. Por ejemplo, las mujeres heterocigotas pueden tener una actividad residual significativa de α -Gal A, pero presentan un daño orgánico grave. Por otro lado, los hemocigotas que carecen de actividad α -Gal A pueden tener evidencia de acumulación de Gb3 al nacer o incluso *en el útero*, pero no hay consecuencias clínicas hasta la edad adulta temprana. El objetivo general de este trabajo fue realizar la caracterización molecular de las variantes genéticas presentes en las mujeres colombianas con sospecha de EF. En el estudio se incluyeron un total de 1821 mujeres remitidas principalmente de las áreas de nefrología, neurología y rehabilitación física de diferentes centros asistenciales del país que presentaban signos y/o síntomas sugestivos de la enfermedad. La frecuencia de mujeres con EF en nuestra población en estudio fue de 1.37% (25 mujeres). Se identificaron tres nuevas variantes, c.205delT ubicada en el exón 2 clasificada como patogénica, c.632T>C ubicada en el exón 4 clasificada como VUS y c.1079G>C clasificada como probablemente patogénica ubicada en el exón 7. Este es el primer estudio de hallazgos moleculares en mujeres colombianas para la EF. Nuestro estudio permitió evidenciar que las mujeres son una población de estudio importante para la EF tal y como se ha reportado en otros estudios poblacionales globales y que existe una población de alto riesgo relacionada con la enfermedad en la que se debe prestar especial atención para la detección temprana de casos.

SUMMARY

Fabry disease (EF), also known as Anderson-Fabry disease, is a rare genetic disorder of lysosomal storage with clinically heterogeneous X-linked inheritance. Its prevalence has increased dramatically in the Western world in recent years as a result of intensive screening; however, in Colombia the true prevalence of the disease is unknown. Despite being a disorder linked to X, in recent decades it has been observed that women are also affected by the disease. Clinical manifestations in heterozygous women range from asymptomatic throughout a normal life to as severe as affected men. The variation in clinical manifestations is attributed to the random inactivation of the X chromosome. This genetic disorder is caused by defects in the lysosomal enzyme α -galactosidase A (α -Gal A) as a result of variants in the *GLA* gene that codes for this enzyme. The deficiency or absence of this enzyme leads to the intracellular accumulation of glycosphingolipids a multi-organ level, globotriaosylceramide (Gb3) and globotriaosylsphingosine (Lyso-Gb3). However, there is not direct cause and effect relationship between the genetic defect, the residual enzymatic activity, the plasma levels of Gb3 and Lyso-Gb3 and the clinical effects. For example, heterozygous women may have a significant residual activity of α -Gal A but exhibit severe organ damage. On the other hand, hemizygotes that lack α -Gal A activity may have evidence of Gb3 accumulation at birth or even in the uterus, but there are no clinical consequences until early adulthood. The general objective of this study was to perform the molecular characterization of the genetic variants present in Colombian women with suspected EF. The study included a total of 1821 women referred mainly from the areas of nephrology, neurology and physical rehabilitation of different health care centers in the country that presented signs and / or symptoms suggestive of the disease. The frequency of women with EF in our study population was 1.37% (25 women). Three new variants were identified, c.205delT located in exon 2 classified as pathogenic, c.632T> C located in exon 4 classified as VUS and c.1079G> C classified as probably pathogenic located in exon 7. This is the first study of molecular findings in Colombian women for EF. Our study made it possible to show that women are an important study population for EF as reported in other global population studies and that there is a high-risk population related to the disease in which special attention must be paid to detection early cases.

1- INTRODUCCIÓN

Con una función de reciclaje constitutivo y la capacidad de digerir material exógeno y orgánulos endógenos en el proceso de autofagia, los lisosomas se encuentran en el eje central de la célula viva. Las interacciones dinámicas con otros componentes celulares aseguran que el compartimento lisosomal es un punto central de convergencia en innumerables enfermedades diversas. Las enfermedades lisosomales (de almacenamiento) innatas representan más de 50 condiciones genéticamente distintas, con una frecuencia de nacimiento combinada de aproximadamente 1 en 7500. Muchas están asociadas con el almacenamiento macromolecular, causando la interrupción física de los organelos y las estructuras análogas; en las neuronas, se observan dendritogénesis ectópica e hinchazón axonal debida a la distensión con túbulos membranosos y vacuolas autofágicas. La autofagia desordenada es casi universal en las enfermedades lisosomales, pero las lesiones bioquímicas debidas a los metabolitos tóxicos derivadas de macromoléculas como los esfingolípidos, la homeostasis anormal del calcio y las respuestas al estrés del retículo endoplásmico y los procesos inmune-inflamatorios son heterogéneos, por consiguiente, en ningún caso se han definido con precisión los vínculos mecánicos entre las manifestaciones clínico-patológicas individuales y el defecto molecular subyacente (1).

La enfermedad de Fabry (EF) es un trastorno de almacenamiento lisosomal hereditario ligado a X causado por variantes en el gen que codifica la α -galactosidasa A (*GLA*). Una vez se pensó que afecta sólo los varones hemicigotos, sin embargo, durante los últimos quince años, las investigaciones han demostrado que la mayoría de las mujeres portadoras de alelos mutados también desarrollan síntomas, lo que demuestra un amplio rango de gravedad de la enfermedad, desde un perfil prácticamente asintomático hasta un perfil más clásico, con manifestaciones cardíacas, renales y cerebrovasculares. Se piensa que esta expresión variable en las mujeres está influenciada por el proceso de inactivación del cromosoma X (XCI) (2).

2- MARCO TEÓRICO

2.1 ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO (EIM)

Los errores innatos del metabolismo (IEM, por sus siglas en inglés) son una clase diversa de aproximadamente 1126 trastornos monogénicos que involucran anomalías en los procesos bioquímicos en las células (3); son individualmente raros pero colectivamente numerosos (4). Anteriormente era relativamente fácil de definir los EIM: los EIM se heredaban en su mayoría, en el 90% de forma autosómica recesiva y en un 10% ligados al cromosoma X (5), y ocasionalmente eran de *novo* e implicaban trastornos genéticos de la biosíntesis o descomposición de sustancias dentro de vías específicas que fueron reconocidas por pruebas bioquímicas específicas y a veces tratables por intervención metabólica; sin embargo en la actualidad, los nuevos trastornos emergentes se discuten e ilustran con ejemplos de EIM "clásicos" y de *novo* (6).

La mayoría de los IEM son causados por enzimas defectuosas, que dan lugar a una conversión insuficiente o ausente de sustratos en productos (7); sin embargo, la molécula afectada también podría ser una hormona, un receptor, una bomba de membrana o un elemento estructural, un compartimento celular y la remodelación continua de membranas y en todos los casos su capacidad funcional puede quedar comprometida (8, 9). En la actualidad se reconocen condiciones dentro del grupo de los EIM donde puede fallar un transportador o modificadores post transcripcionales de la expresión génica, dejando atrás la creencia de que la falla de un gen produce el defecto de una enzima y esta a su vez un solo fenotipo clínico (10).

El impacto del defecto en la proteína dependerá del sitio de la molécula donde se localiza la mutación y de la importancia que tiene para el metabolismo. Si la proteína solo afecta un órgano o tejido (hígado, músculo o glóbulo rojo), el defecto será localizado; pero si la enzima involucrada está presente en todas las células del organismo, el problema será generalizado. Existen mutaciones que afectan el sitio activo y, por lo tanto, alteran esencialmente la estructura y función de la proteína. Otras mutaciones solo afectan muy levemente la función. Las células pueden trabajar normalmente con actividades de enzima superiores al 20-30 % y, en consecuencia, muchas de las mutaciones no tienen efectos clínicos aparentes en los individuos portadores (5).

Los EIM se manifiestan en cualquier etapa de la vida, siendo más frecuente en la edad pediátrica con síntomas y signos similares a otras patologías. No reconocerlos conduce a secuelas como desnutrición, convulsiones, retardo mental e incluso la muerte. La prevención de estas secuelas con un diagnóstico oportuno es el desafío al que se enfrentan los especialistas. La relevancia de este grupo de condiciones en el contexto de las enfermedades raras, se ha marcado en el transcurso de las últimas décadas con el desarrollo de terapias específicas, con efectividad y seguridad probadas por estudios clínicos, que han posicionado a estas patologías como "enfermedades raras tratables" (10).

Desde una perspectiva fisiopatológica, los EIM se pueden dividir en las siguientes 2 grandes categorías clínicas:

La categoría 1 incluye trastornos que involucran solo un sistema funcional (como el sistema endocrino, el sistema inmune o los factores de coagulación) o afectan solo 1 órgano o sistema anatómico (como el intestino, los túbulos renales, los eritrocitos o el tejido conectivo). Los síntomas de presentación son uniformes (p. Ej., Una tendencia al sangrado en los defectos del factor de coagulación o anemia hemolítica en los defectos de la glucólisis), y el diagnóstico correcto suele ser fácil de predecir.

La categoría 2 incluye enfermedades en las que la lesión bioquímica básica afecta a 1 vía metabólica común a un gran número de células u órganos (p. Ej., Enfermedades de almacenamiento debido a trastornos catabólicos lisosómicos, deficiencia de energía en trastornos mitocondriales) o está restringida a un órgano, pero da lugar a consecuencias humorales y sistémicas (p. ej., hiperamonemia en defectos del ciclo de la urea, hipoglucemia en glucogenosis hepática). Las enfermedades en esta categoría tienen una gran diversidad de síntomas de presentación, pero se pueden dividir en 3 grupos útiles para el diagnóstico: *1) trastornos del metabolismo intermediario que afectan a las moléculas pequeñas* como las aminoacidopatías, defectos congénitos del ciclo de la urea, trastornos que causan intolerancia a los azúcares como la galactosemia y la intolerancia hereditaria a la fructosa, la intoxicación por metales como la enfermedad de Wilson, Menkes, hemocromatosis y porfirias; *2) trastornos que involucran el metabolismo energético* como los defectos mitocondriales y citoplasmáticos; *3) trastornos que involucran moléculas complejas*, en este grupo se incluyen todas las alteraciones que implican diversos organelos celulares como lisosomas, peroxisomas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (4, 11).

Los trastornos de almacenamiento lisosómico (principalmente defectos de los esfingolípidos, mucopolisacáridos y catabolismo de oligosacáridos) son responsables de la acumulación intracelular de material soluble en células reticuloendoteliales (4). Dentro de las esfingolipidosis, un grupo de enfermedades causada por defectos en el metabolismo de los esfingolípidos se encuentran las enfermedades de Gaucher, Färber, Krabbe, leucodistrofia metacromática, Niemann Pick, Fabry, Gangliosidosis GMI, Tay Sachs y Sandhoff (Figura 1). Los esfingolípidos son lípidos de membrana complejos, están compuestos por un amino alcohol de 18 carbonos, una molécula de ácido graso de cadena larga unida al grupo amino C2 de la esfingosina y varios grupos polares unidos al carbono 1 por un enlace glicosídico. Las esfingolipidosis son un subgrupo de las enfermedades lisosomales caracterizadas por una acumulación de esos materiales en los órganos afectados lo cual conlleva a un deterioro progresivo de los mismos (12).

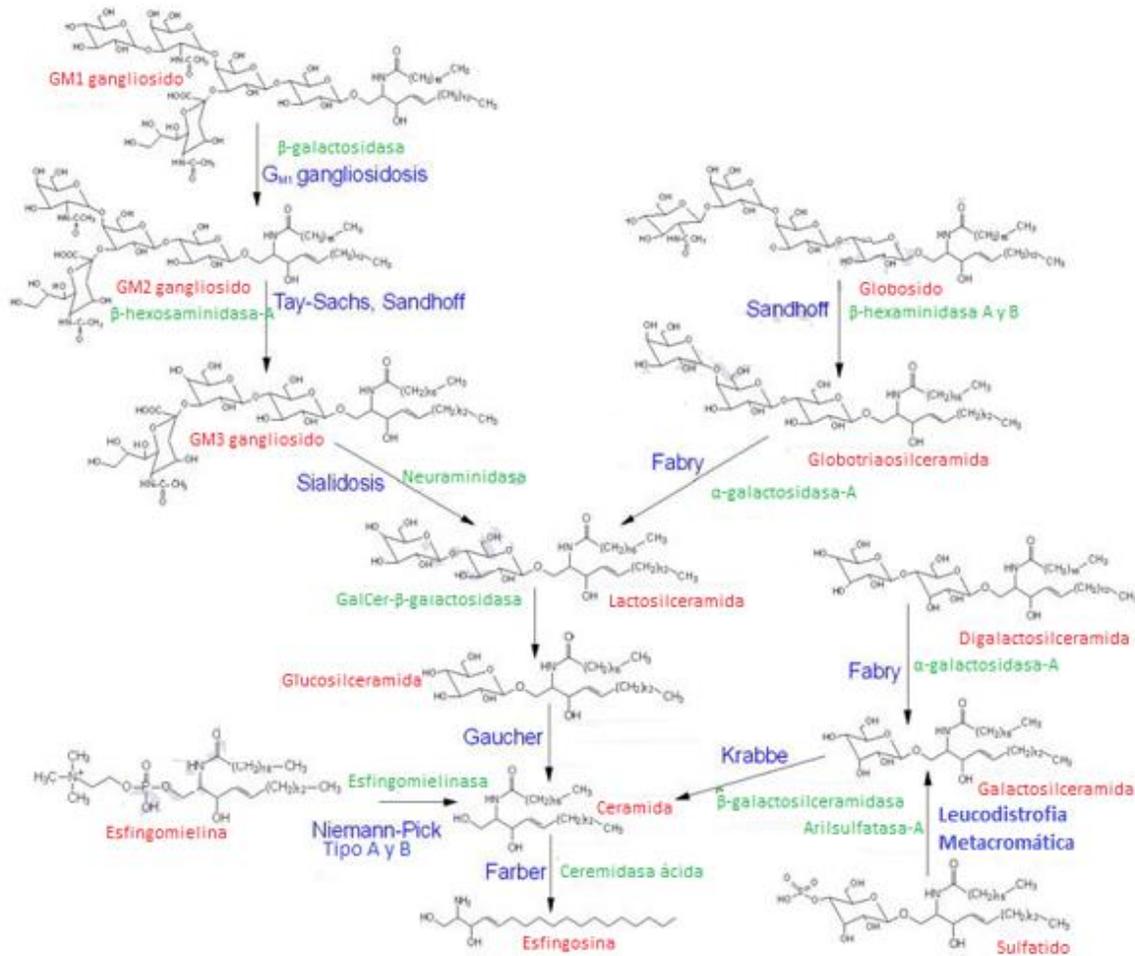


Figura 1. Ruta de degradación de los esfingolípidos. Tomado y modificado de Michael W King PhD | © 1996–2017 themedicalbiochemistrypage.org, LLC. En rojo, se muestran los sustratos; en verde, la enzima involucrada y en azul, el nombre de la enfermedad asociada al déficit enzimático.

2.2 ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LISOSOMAL (LSD's)

Los trastornos de depósito lisosomal representan un grupo de más de 50 trastornos metabólicos monogénicos y neurodegenerativos hereditarios raros causados por el déficit de una enzima específica o componente lisosomal. Estos defectos evitan la degradación completa y el reciclaje de macromoléculas específicas que se acumulan dentro del sistema endosomal o lisosomal. (13). Esto conduce al agrandamiento de la célula, colapso de las funciones celulares normales, y, finalmente, la muerte celular, dando lugar a una enfermedad progresiva y sistémica que afecta comúnmente a múltiples órganos y tejidos, incluido el sistema nervioso central (SNC) (14). Este efecto se ha denominado hipótesis de citotoxicidad (15). Aunque inicialmente se pensaba que los fenotipos clínicos de los LSD se relacionarían directamente con el defecto enzimático, ahora se reconoce que los LSD no son simplemente una consecuencia del almacenamiento puro. Ahora se sabe que los LSD

son el resultado de la perturbación de los complejos mecanismos de señalización celular en la secuencia del almacenamiento lisosomal. La afectación de los lisosomas en una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo la señalización celular, la presentación de antígenos, la inmunidad innata y adaptativa, la remodelación de la membrana, la homeostasis del colesterol, la apoptosis y la función sináptica, son todas las consecuencias fisiológicas pleiotrópicas que resultan del defecto proteico lisosomal. Dado el importante papel de los lisosomas, está claro que la acumulación de productos de almacenamiento primario desencadena una compleja cascada de eventos patológicos responsable de las características de las manifestaciones patológicas y clínicas de las LSD. Los eventos posteriores responsables de la acumulación de productos de almacenamiento secundarios (glicosfingolípidos, fosfolípidos y colesterol) pueden estar desconectados del defecto proteico primario. Por lo tanto, las consecuencias patológicas van mucho más allá de la ruta metabólica principalmente afectada.

Los LSD se pueden agrupar de 2 maneras diferentes (16): 1) en función de la naturaleza bioquímica del material de almacenamiento y 2) por el mecanismo subyacente que causa la enfermedad. En términos del material de almacenamiento, las LSD's se pueden dividir en 2 categorías principales: mucopolisacaridosis (MPS) y esfingolipidosis.

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos hereditarios causados por la ausencia o disfunción de las enzimas lisosomales involucradas en la degradación de los mucopolisacáridos, también llamados glicosaminoglicanos (GAG). Los GAG anormales se acumulan en diversos órganos y tejidos, incluidas las arterias, el esqueleto, los ojos, las articulaciones, las orejas, la piel y / o los dientes; así como en el sistema respiratorio, el hígado, el bazo, el SNC, la sangre y la médula ósea. La neurodegeneración puede ocurrir en las etapas avanzadas de la enfermedad.

Las esfingolipidosis son una clase de trastornos de almacenamiento de lípidos relacionados con el metabolismo de los esfingolípidos. De manera general, los defectos en la degradación de los esfingolípidos que son componentes de todas las membranas, pero son particularmente abundantes en la vaina de mielina, conducen a una neurodegeneración progresiva, epilepsia, neuropatía periférica, síntomas extrapiramidales y manchas de color rojo cereza características en la piel. Los trastornos de este grupo comprenden la enfermedad de Gaucher (GD), la enfermedad de Tay-Sachs, la enfermedad de Niemann-Pick (NP), la enfermedad de Fabry (EF), la enfermedad de Krabbe (KD) y la leucodistrofia metacromática (MLD). En general, se heredan de una manera autosómica recesiva pero, en particular, la EF es recesiva ligada al X. Tomados en conjunto, las esfingolipidosis tienen una incidencia de aproximadamente 1 en 10,000, pero sustancialmente más en ciertas poblaciones, como los judíos Ashkenazi (13).

2.2 ENFERMEDAD DE FABRY (EF)

2.2.1 Generalidades

La enfermedad de Fabry (EF) (OMIM # 301500) es la segunda enfermedad más frecuente de depósito lisosomal después de la enfermedad de Gaucher (17). La EF es un trastorno genético ligado al cromosoma X causado por mutaciones en el gen *GLA* (OMIM # 300644; HGNC: 4296). El gen *GLA*, mapeado en Xq22, está organizado en siete exones que abarcan más de 12 Kb (18). El ADNc de *GLA* de 1290 pb codifica una proteína precursora de ~50 kDa (429 aminoácidos), que se escinde proteolíticamente en la proteína madura lisosomal. La enzima α -Gal-A madura es una glicoproteína homodimérica de aproximadamente 46 kDa (398 aminoácidos), cada monómero compuesto por dos dominios, un dominio de 8 barriles (α / β) que contiene los sitios activos ubicados en los residuos 170 y 231 (que abarca los aminoácidos 32-330) y un dominio C-terminal. Los sitios de unión al sustrato se encuentran ubicados entre los residuos 203 y 207 de la proteína (19).

A la fecha se han reportado más de 1000 variantes para este gen siendo las más frecuentes las variantes con cambio de sentido (missense) y sin sentido (nonsense), y en menor frecuencia las alteraciones en el sitio de splicing y los grandes rearrreglos génicos (20, 21). Se ha descrito que la mayoría de las variantes reportadas son privadas (con algunas excepciones encontradas en varios sujetos no relacionados) y por lo general están asociadas con modificaciones en los dinucleótidos CpG, puntos calientes "hotspots" más conocidos para la enfermedad (22, 23). Estas alteraciones genéticas van a dar como resultado el déficit o ausencia de la enzima lisosomal hidrolasa ácida α -galactosidasa A (α -Gal-A) lo que conlleva a la acumulación progresiva de globotriaosilceramida (GL-3, Gb-3) (Figura 2) y su derivado desacilado globotriaosilesfingosina (liso-GL-3, liso-Gb3) en las células afectadas de los tejidos dañados y en los fluidos corporales, lo que pueden llevar a la falla orgánica(24).

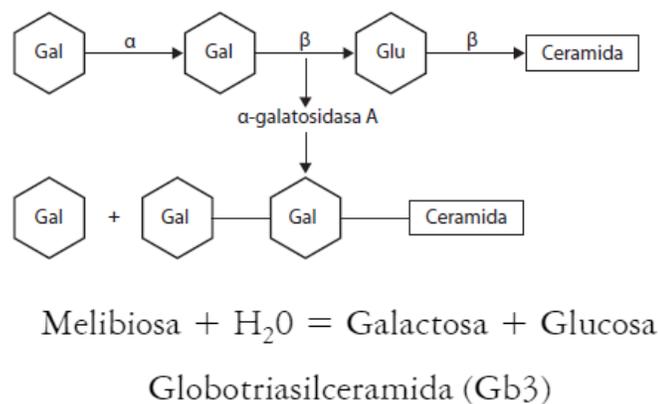


Figura 1. Reacción enzimática catalizada por la α -Galactosidasa A. Tomada de Barrera et. al 2014 (5).

2.2.2 Historia de la enfermedad de Fabry

En 1898, el dermatólogo William Anderson y el médico cirujano alemán John Fabry describieron el primer síntoma característico de lo que ahora se conoce como enfermedad de Fabry (o enfermedad de Anderson-Fabry) caracterizado por una erupción vascular que se encuentra principalmente en el tronco, los muslos, las nalgas y el área genital, dándole el nombre descriptivo de angiokeratoma o “corporis diffusum (25). En los años posteriores, entre el año 1909 y cerca del 2000 varios fueron los científicos que se encargaron de describir progresivamente otros signos y síntomas posiblemente asociados a este trastorno, así como de elucidar la posible causa. Cronológicamente los síntomas descritos fueron las alteraciones neurológicas, cardiopatía, aspectos oftalmológicos, alteraciones a nivel del sistema vascular, sensibilidad al calor y/o frío, sudoración anormal, parestesias, aumento de lipoproteínas y colesterol en células espumosas (macrófagos), en médula ósea y ganglios linfáticos, trastornos del desarrollo y esplenomegalia; así mismo, paralelamente se describió que los daños a nivel vascular eran causados por una sustancia similar a un péptido identificada como un fosfoglicolípido y que tanto los hombres como las mujeres estaban afectados. Hacia el año 1959 gracias a un estudio que recopiló información sobre 30 pacientes, se pudo concluir que la enfermedad era un trastorno hereditario del metabolismo de los lípidos y en el año 1965 debido a la implementación de la microscopía electrónica se pudo observar la presencia de cuerpos en el endotelio y en las células del músculo liso las cuales se caracterizaron como lisosomas. Estos cuerpos reaccionaban enzimáticamente con la fosfatasa ácida gracias a lo que se pudo concluir que había una alteración de las enzimas lisosomales causada por una anomalía genética. Hacia finales de los 70's después de investigar una familia con cuatro varones afectados y cuatro posiblemente afectados que cubrían cuatro generaciones, se determinó que había un gen “deficiente” relacionado con el sexo con penetrancia ocasional en hembras heterocigotas y penetrancia constante en machos homocigotos y que el defecto genético estaba localizado en el brazo largo del cromosoma X razón por la cual los hombres se ven afectados preferentemente. Se identificó la deficiencia de ceramidatrichexosidasa y la subsiguiente acumulación de sustrato, como el trastorno subyacente en la EF y fue este trabajo el que proporcionó la base para el desarrollo de la terapia de reemplazo enzimático (26) de la cual se dispone en la actualidad.

2.2.3 Epidemiología

Se ha estimado que la frecuencia general de la EF oscila entre 1 por 117,000 nacimientos totales (27) y ~ 1 en 40,000 hombres. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la EF no está bien diagnosticada en la población general. Los estudios de tamizaje neonatal han encontrado una incidencia sorprendentemente alta de alteraciones genéticas, 1: 3,100, entre los recién nacidos en Italia (28) y 1: 1,500 entre los hombres recién nacidos en Taiwán (29). Reportes en la literatura sugieren que la prevalencia puede ser mayor en la población de hemodiálisis (HD) en la que se han informado valores de hasta 1.2% (30-32) y hasta 3%

-4% en hombres adultos con accidente cerebrovascular criptogénico, hipertrofia ventricular izquierda (HVI) inexplicable o cardiomiopatía hipertrófica (33).

En las mujeres, debido a la falta de estudios epidemiológicos se desconoce la prevalencia real de la EF. Sin embargo, estudios en poblaciones de alto riesgo como las unidades de hemodiálisis, pacientes con hipertrofia ventricular izquierda (HVI) y accidentes cerebrovasculares (ACV) han permitido poner de relevancia a las mujeres como un blanco importante de estudio para esta enfermedad (34).

La EF se encuentra entre todos los grupos étnicos, raciales y demográficos (35).

2.2.4 Fisiopatología de la enfermedad de Fabry

Los lisosomas son orgánulos catabólicos que descomponen y reciclan una gama de sustratos complejos, que incluyen glicosaminoglicanos, esfingolípidos, glucógeno y proteínas. La función catabólica se realiza a través de la acción concertada de aproximadamente 60 hidrolasas ácidas diferentes que pertenecen a diferentes familias de proteínas, tales como glicosidasas, sulfatasas, peptidasas, fosfatasas, lipasas y nucleasas las cuales participan en los procesos de fagocitosis, endocitosis y autofagia. La función catabólica lisosomal depende de la interacción directa entre las hidrolasas y los sustratos en la luz lisosomal (36).

A diferencia de otras enfermedades de almacenamiento lisosomal, en la EF la Gb3 se acumula en todas las células del organismo, fundamentalmente en el endotelio vascular y, en menor medida en la neurona, el miocito y el sistema de excito-conducción cardiaco. Las manifestaciones más frecuentes en la infancia y adolescencia son el dolor neuropático, hipohidrosis/anhidrosis, angioqueratomas, cornea verticillata y microalbuminuria, la afectación renal progresa y aparece la cardiomiopatía y la enfermedad cerebrovascular (37).

2.2.4.1 Disfunción vascular

La disfunción vascular es la principal alteración fisiopatológica de la EF, en esta, intervienen factores como la acumulación de Gb3, las alteraciones estructurales de las paredes de los vasos, la disfunción endotelial y el estado protrombótico (37).

2.2.4.1.1 Depósito de Globotriaosilceramida (Gb3)

Teóricamente se ha descrito que la Gb3 es el principal metabolito nocivo, aunque no se conoce el mecanismo por el cual su acumulación conduce al trastorno multisistémico de la EF. Tradicionalmente se ha afirmado que Gb3 se almacena solo en los lisosomas y que, mecánicamente o por algún otro proceso, estos lisosomas cargados de lípidos causan enfermedades (38). Sin embargo, los estudios de los mecanismos de la vasculopatía de la EF sugirieron un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno que invocan la disfunción de otros componentes celulares, como la óxido nítrico sintasa endotelial, que se asocia con la membrana celular (39). La investigación sobre otros trastornos lisosomales apuntó hacia la interacción del glicosfingolípido acumulado con distintos canales iónicos o

transportadores que se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico (RE) (40) (41). Interacciones similares pueden ocurrir para el sustrato de acumulación en la EF no sólo a nivel de RE sino también membrana de celular y núcleo (42).

2.2.4.1.2 Alteraciones estructurales vasculares

En la EF se producen alteraciones de la pared vascular que conllevan la formación de microaneurismas en los vasos de la retina y la conjuntiva, así como telangiectasias y angioqueratomas en la piel (43). Además, se modifica el control de la actividad vasomotora, debido a la propia lesión vascular y al depósito de Gb3 en los ganglios autonómicos y las vainas de mielina. Inicialmente existe una limitación para la vasoconstricción, y en fases más avanzadas para la vasodilatación, que explica la intolerancia de estos pacientes a las variaciones en la temperatura (37).

2.2.4.1.3 Disfunción endotelial

Se entiende con este término la expresión y la liberación de moléculas proinflamatorias por las células endoteliales. Recientemente, se ha demostrado que la exposición de los leucocitos circulantes y las células endoteliales a las proteínas LDL y los glucoesfingolípidos produce un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión de los leucocitos y de la integrina MAC-1 (ligando de una molécula de adhesión leucocitaria) que conlleva a un aumento de la interacción de los leucocitos con el endotelio. Esto promueve la activación, producción y liberación de otras moléculas proinflamatorias como la interleucina 1B (IL-1B) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (44).

2.2.4.1.4 Estado protrombótico

La activación de la IL-1B, el TNF- α y otras moléculas en los pacientes con EF favorece un estado protrombotico, aumentando el riesgo de eventos isquémicos. Se ha podido constatar que distintas moléculas de adhesión se encuentran elevadas en estos pacientes, así como la expresión de la integrina MAC-1 en monocitos. Además, la elevación de la ICAM-1 y MAC-1 en los pacientes con EF es indicativa de un aumento en la interacción del endotelio con las células inflamatorias, explicando la afectación vascular precoz. Por otra parte, se ha constatado una elevación del inhibidor del activador del plasminógeno, así como una disminución de la trombomodulina, que favorecen la acción trombolítica del endotelio y el estado procoagulante existente en esta enfermedad a edades precoces de la vida (45).

2.2.5 Mecanismos fisiopatológicos

2.2.5.1 Enfermedad renal en la enfermedad de Fabry (EF)

Los pacientes con Fabry clásico típicamente desarrollan una enfermedad renal crónica (ERC) que culmina con una enfermedad terminal (ESRD) antes de la quinta década de la vida (46). La fibrosis representa un camino común hacia la ESRD, independientemente de la enfermedad renal primaria subyacente. La fibrosis renal ocurre temprano, especialmente

la glomeruloesclerosis a través de la lesión de podocitos (46, 47) y aumenta progresivamente en la nefropatía de Fabry más avanzada. Además del podocito como la célula clave en la patogénesis de la fibrosis, las células endoteliales con sobrecarga de esfingolípidos también podrían contribuir al desarrollo de la fibrosis, p. Ej. a través de la obstrucción luminal y la isquemia (47).

Los metabolitos de esfingolípidos como la liso-Gb3 que se acumulan en la EF también reclutan citocinas secundarias (por ejemplo, el factor de crecimiento transformante /TGF- β) involucradas en procesos celulares como proliferación celular, angiogénesis, diferenciación, migración y apoptosis celular en varias células renales (47).

La angiotensina II probablemente también contribuye a la nefropatía de Fabry a través de la vasoconstricción, así como a la propagación de la inflamación y la fibrosis (48). La disminución de la función renal como resultado de la fibrosis se acentúa aún más por la hipertensión arterial coexistente y la proteinuria por encima de 1 g / día (49).

El estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad renal en la EF (50). Se ha descrito una asociación entre la acumulación de Gb-3 en células endoteliales y la formación de nitrotirosina. Esto sugiere un mecanismo para la vasculopatía de Fabry mediante el cual la acumulación de Gb-3 en el endotelio afecta la actividad óxido nítrico sintasa endotelial (desacoplamiento) que conduce a una baja producción de NO (óxido nítrico) y una producción aberrante de especies reactivas de oxígeno (51).

El almacenamiento lisosomático de Gb-3 afecta la autofagia y es importante para la homeostasis y la función lisosomal en la EF. En este sentido, el deterioro de la maduración del autofagosoma podría contribuir potencialmente a los mecanismos patológicos de la nefropatía de Fabry (52).

2.2.5.2 Enfermedad cardíaca en la enfermedad de Fabry (EF)

El mal funcionamiento de la α -Gal-A conduce a una acumulación progresiva de Gb3 en todas las células del cuerpo que contienen lisosomas, incluidas las células del endotelio vascular y del músculo liso(53).

Adicional a lo que se ha demostrado, que el almacenamiento de Gb3 induce una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en células endoteliales vasculares cultivadas aumentando el estrés oxidativo y que Gb3 también regula la expresión de moléculas de adherencia en el endotelio vascular (54), se ha propuesto que la globotriaosilesfingosina (liso-Gb3), un metabolito desacilado de Gb3, parece ser un factor adicional en la patogénesis de la EF ya que inhibe la enzima α -Gal-A, promoviendo así el almacenamiento de Gb3 y estimulando la proliferación de células del músculo liso vascular (55).

Así mismo, se ha reportado que el factor activo esfingosina-1-fosfato (S1P) induce la hipertrofia de los cardiomiocitos. *In vivo*, el nivel plasmático de S1P se correlacionó fuertemente con la hipertrofia ventricular izquierda (HVI); lo que parece indicar que S1P contribuye en el desarrollo de la remodelación cardiovascular debido a su mecanismo proliferativo (56).

2.2.5.3 Enfermedad cerebrovascular en la enfermedad de Fabry (EF)

Los eventos cerebrovasculares en la EF pueden atribuirse a una vasculopatía caracterizada por anomalías en las paredes de los vasos sanguíneos, componentes sanguíneos y flujo sanguíneo alterado (57). Las alteraciones en el diámetro de los vasos sanguíneos cerebrales se desarrollan debido a la proliferación endotelial, estenosis u obstrucción que conduce a un metabolismo deficiente de la glucosa cerebral e isquemia. Como resultado, puede producirse un aumento de la reactividad plaquetaria (58), alteración de la reactividad cerebrovascular debido a una disfunción autonómica y embolia cardiogénica (59).

Otros factores que afectan el flujo sanguíneo constante y la perfusión de órganos en pacientes con EF incluyen, respuestas anormales de modulación cardíaca y vascular autonómicas a los desafíos cardiovasculares que ocurren instantáneamente, como la ortoestasis. Además, la neuropatía de fibras pequeñas en pacientes con EF afecta de manera adversa la modulación simpática del flujo sanguíneo de la piel (60), lo que también conduce a tasas de perfusión alteradas en extremidades y circulación periférica. La neuropatía de fibra pequeña también podría influir en la reactividad vascular debido a una función vasomotora simpática alterada por inervación anormal (61).

2.2.6 Mecanismo de herencia

La EF se hereda de forma ligada al cromosoma X, lo que significa que el gen que causa la enfermedad se encuentra en el cromosoma X. En los hombres (que sólo tienen un cromosoma X) una copia del gen mutado es suficiente para causar los síntomas de la enfermedad. Debido a que las mujeres tienen dos copias del cromosoma X en sus células, una copia del gen mutado por lo general produce síntomas menos severos que en los varones (o no causa ningún síntoma), ya que tienen una copia del gen normal en el otro cromosoma X de cada célula (las mujeres son “portadoras” de la mutación) que contrabalancea los efectos del gen anormal (62).

Si una madre es portadora de la EF, tenga síntomas o no, y el padre no tiene una variante patogénica en el gen GLA, la probabilidad de que la descendencia también la padezca es del 50%. Si los hijos varones heredan el cromosoma X alterado de la madre, manifestarán los síntomas, pero si heredan el cromosoma X normal de la madre, no lo harán. Si las hijas heredan el cromosoma X afectado, podrán, o no, desarrollar los síntomas de la EF (62).

Si un padre tiene la EF y la madre no es portadora, los varones no son afectados y todas las hijas serán portadoras (62).

2.2.7 Signos y síntomas

La enfermedad clásica de Fabry se observa en hombres hemicigotos con actividad residual de α -Gal-A mínima o nula (<1%). Suele aparecer en la infancia o en la adolescencia, con crisis periódicas de dolor intenso en las extremidades (acroparestesia), la aparición de lesiones cutáneas vasculares (angioqueratomas), anomalías de la sudoración (anhidrosis, hipohidrosis y, rara vez, hiperhidrosis), opacidades corneales y lenticulares características, y proteinuria. El deterioro gradual de la función renal a la enfermedad renal terminal (ESRD, por sus siglas en inglés) generalmente ocurre en hombres de la tercera a la quinta década. En la mediana edad, la mayoría de los varones tratados con éxito para la ESRD desarrollan enfermedades cardíacas y / o cerebrovasculares. Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (63).

Las formas atípicas o tardías de la EF se manifiestan en la etapa adulta y se caracterizan por tener una actividad de α -Gal A superior al 1% y síntomas asociados a un órgano específico. La afectación cardíaca generalmente se presenta en la sexta a octava década con hipertrofia ventricular izquierda, cardiomiopatía, arritmia y proteinuria, pero sin ESRD; la afectación renal, asociado con ESRD pero sin las lesiones o el dolor de la piel; o la afectación cerebrovascular que se presenta como un accidente cerebrovascular o un ataque isquémico transitorio. (64).

Las pacientes femeninas tienen un fenotipo extremadamente variable, que va desde la ausencia de enfermedad hasta las formas clínicas más graves, debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X. Las mujeres más afectadas son más propensas a expresar el cromosoma X con la variante patogénica *GLA* en los órganos afectados (65, 66).

La mayoría de las mujeres heterocigotas de familias en las que los hombres afectados tienen el fenotipo clásico tienen un curso clínico más moderado y un mejor pronóstico que los hombres afectados.

Las manifestaciones leves incluyen la característica cornea verticillata (70% -90%) y opacidades lenticulares que no afectan la visión; acroparestesia (50% -90%); angioqueratomas (10% -50%) que generalmente están aislados o escasos e hipohidrosis. Además, los heterocigotos pueden tener dolor abdominal crónico y diarrea (67).

Con la edad avanzada, los heterocigotos pueden desarrollar un agrandamiento leve a moderado del corazón izquierdo (hipertrofia ventricular izquierda) y la enfermedad valvular. Las manifestaciones más graves incluyen hipertrofia ventricular izquierda significativa, cardiomegalia, isquemia miocárdica, infarto y arritmias cardíacas (34, 68).

La aparición de la enfermedad cerebrovascular, incluidos los ataques isquémicos transitorios y los accidentes cerebrovasculares, es compatible con la patología microvascular de la enfermedad (69).

Los hallazgos renales en heterocigotos incluyen isoestenia, la presencia de eritrocitos, leucocitos y cilindros granulares e hialinos en el sedimento urinario y proteinuria. Según los registros de diálisis y trasplante de Estados Unidos y Europa, aproximadamente el 10% de los heterocigotos desarrollan insuficiencia renal que requiere diálisis o trasplante (70).

La fatiga, dificultad laboral, trastornos psiquiátricos y la depresión se han observado en los heterocigotos (71).

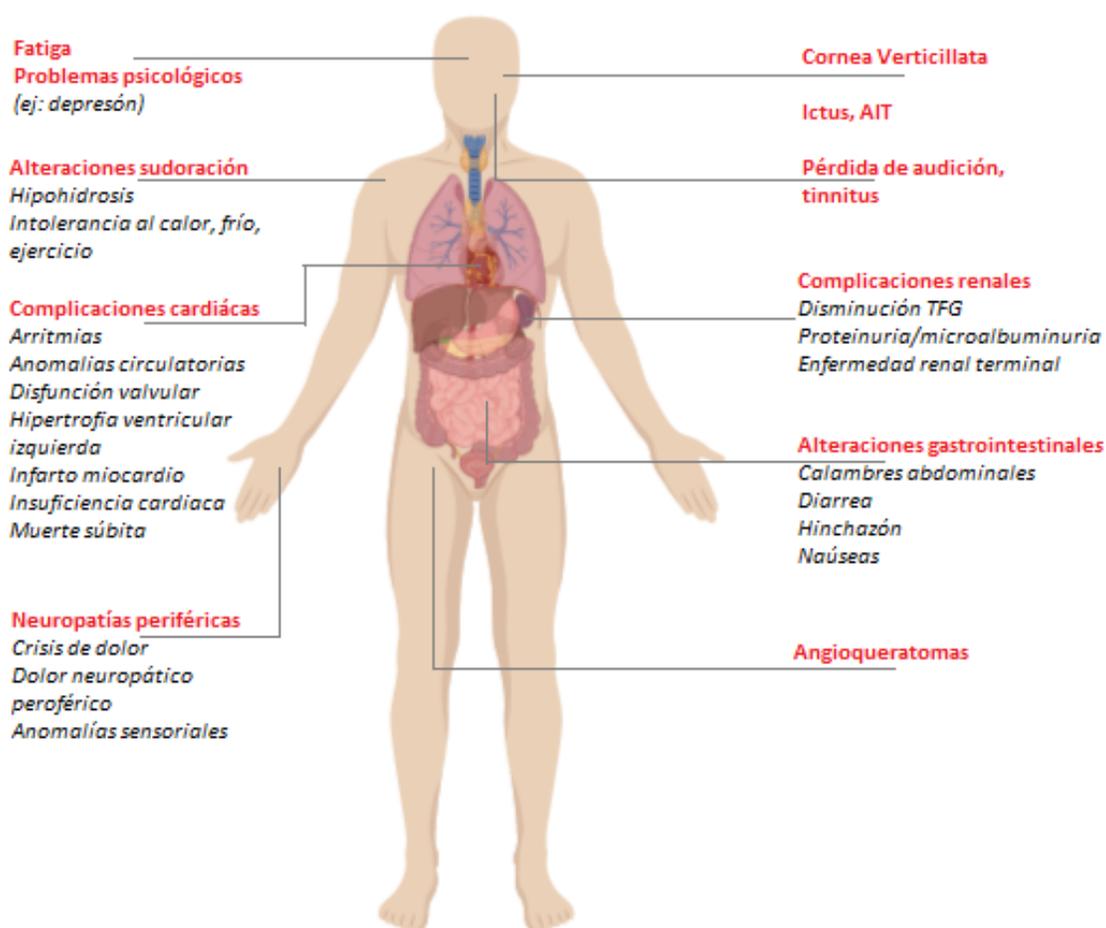


Figura 2. Signos y síntomas característicos en la EF. Elaboración propia. “Creada con BioRender.com”.

2.2.8 Esperanza de vida y causa de muerte

Según los datos del Registro de Fabry, 75 de 1422 hombres y 12 de 1426 mujeres murieron. Los 87 individuos fallecidos fueron diagnosticados a una edad mucho mayor que otros individuos en el Registro de Fabry.

La esperanza de vida de los hombres con EF fue de 58.2 años, en comparación con 74.7 años en la población general de los Estados Unidos.

La esperanza de vida de las mujeres con EF fue de 75,4 años, en comparación con 80,0 años en la población general de los Estados Unidos (72).

La causa más común de muerte entre ambos sexos fue la enfermedad cardiovascular. La mayoría de los individuos (57%) que murieron de una enfermedad cardiovascular habían recibido previamente una terapia de reemplazo renal (por ejemplo, diálisis o trasplante). (72).

2.2.9 Diagnóstico

La EF debe sospecharse en hombres y mujeres ante la evidencia de alguna(s) de las siguientes características clínicas: crisis periódicas de dolor severo en las extremidades (acroparestesia), lesiones cutáneas vasculares (angioqueratomas), anomalías de la sudoración (anhidrosis, hipohidrosis y, rara vez, hiperhidrosis), opacidad corneal y lenticular (cornea verticillata), accidente cerebrovascular (ACV) inexplicable, hipertrofia ventricular izquierda (HVI) inexplicable, insuficiencia renal de etiología desconocida que incluye proteinuria o microalbuminuria inexplicables.

El diagnóstico se establece en los hombres por la medición de la actividad específica de la enzima α -Gal-A mediante un ensayo fluorométrico que utiliza el sustrato 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido. De manera general, se encuentra por debajo del 25% al 30% del control medio en los glóbulos blancos periféricos (73). La α -Gal-A es un tanto predictiva de las manifestaciones clásicas o de inicio tardío. Los hemocigotos afectados clásicamente tienen una actividad enzimática indetectable o muy baja ($\leq 1\%$), mientras que los afectados con la EF atípica tienen actividad enzimática residual $> 1\%$ de lo normal (33). El ensayo de la actividad de α -GAL en manchas de sangre seca (DBS) también puede ser una herramienta útil para una aproximación inicial en los hombres debido a su fácil disponibilidad y ejecución, rapidez y alta sensibilidad (74, 75). La medición de actividad de α -Gal A por sí sola es diagnóstica para pacientes masculinos; sin embargo, la confirmación de la mutación *GLA* causante de la enfermedad es importante para ayudar a la búsqueda de los miembros de la familia en riesgo, para la asesoría genética y el manejo terapéutico (76).

En las mujeres, la identificación de una variante patogénica en el gen *GLA* mediante pruebas moleculares confirma el diagnóstico de EF. Respecto a la medición de la actividad enzimática en mujeres heterocigotas los datos reportados son controvertidos, algunos

autores reportan que la inactivación aleatoria de X puede dar como resultado la expresión de la actividad de la α -Gal-A en el plasma o leucocitos dentro del rango normal en el 40% hasta 80% de las mujeres (66, 67, 77); sin embargo, datos reportados por el Registro para la enfermedad de Fabry para marzo del 2008 describe que el porcentaje de mujeres con actividad enzimática dentro del valor normal sólo se había presentado en el 12% de estas, es decir, que en el 88% de las mujeres la actividad de α -Gal-A se consideró diagnóstica (34).

2.2.9.1 Pruebas bioquímicas

La evidencia de globotriaosilceramida elevada (Gb3) en tejidos relevantes (biopsias renales o cardíacas) debe ser el requisito final cuando se enfrentan con variantes de significancia incierta (VUS) en el gen *GLA* (78) y los signos clínicos son inespecíficos o se están considerando diagnósticos adicionales, o en casos en los que existe incertidumbre sobre si se debe iniciar TRE (Terapia de reemplazo enzimático) (76).

La acumulación de sustrato, incluyendo Gb3 y liso-Gb3, puede ocurrir en plasma y orina. Si bien el análisis de glicolípidos en orina puede ser útil para atribuir patogenicidad o fenotipo, puede ser menos útil en la detección porque el aumento de Gb3 urinario se ha descrito en cohortes de pacientes con enfermedad cardíaca o síndrome nefrótico sin un diagnóstico de EF (79).

Adicionalmente se ha reportado Los niveles de globotriaosilesfingosina en plasma (liso-Gb3) (el derivado de liso del sustrato acumulado) parecen correlacionarse con la gravedad de la enfermedad y disminuir con la terapia de reemplazo enzimático (80); postulándolo como un marcador candidato de la respuesta al tratamiento con terapia de reemplazo enzimático.

2.2.9.2 Pruebas moleculares

El análisis de la secuencia del gen *GLA* se realiza primero y luego se realiza un análisis de eliminación / duplicación dirigida al gen si no se encuentra una variante patogénica.

La secuenciación del gen *GLA* debe hacerse mediante la técnica de Sanger “gold standard” para secuenciación basada en exones. El análisis de secuencia detecta variantes que son benignas, probablemente benignas, de significado incierto (VUS), probablemente patogénicas o patogénicas. Las variantes patogénicas pueden incluir pequeñas deleciones / inserciones intragénicas, variantes de cambio de sentido (missense), sin sentido (nonsense) y de empalme. Por lo general, no se detectan las eliminaciones / duplicaciones de gen completo o exón (33).

La MLPA (Amplificación de la sonda dependiente de la ligadura multiplex) es una técnica molecular semicuantitativa desarrollada para detectar variaciones anormales en el número de copias que escapan a la detección por secuenciación de rutina de amplificaciones de PCR basadas en exones (Secuenciación Sanger). Aunque no está certificado para fines de diagnóstico, MLPA se ha establecido para confirmar o excluir reordenamientos genéticos gruesos en varias enfermedades monogénicas, incluida la EF (81).

2.2.10 Tratamiento

2.2.10.1 Específico

Terapia de reemplazo enzimática (TRE)

La TRE está disponible actualmente en forma de agalsidasa alfa (Replagal[®], Shire HGT, Inc., Cambridge, MA, EE. UU.) Y agalsidasa beta (Fabrazyme[®], Sanofi Genzyme, Cambridge, MA, EE. UU.) (76). Ambos fueron aprobados en 2001 por la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Médicos; sin embargo, sólo Fabrazyme[®] fue aprobado por la EFA para su uso en los Estados Unidos. Ambas tienen estructura y eficacia parecidas, con algunas diferencias en farmacocinética y posología. En los trabajos publicados en tratamiento a largo plazo con α y β , ambas moléculas se han mostrado eficaces en la estabilización de la EF, sobre todo si se inician en fases tempranas de la enfermedad (82) (83).

Se ha podido determinar que en pacientes femeninas que pueden experimentar todos los signos y síntomas de la EF al igual que los hombres y, como ocurre en los hombres, la carga de la enfermedad aumenta con la edad; la TRE con agalsidasa alfa redujo significativamente la carga de la enfermedad al reducir la participación neurológica (por ejemplo, la reducción del dolor) y al mejorar la estructura y función cardíacas (reducción de la hipertrófia ventricular izquierda). Así mismo, la función renal mejoró en pacientes con tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) basal o proteinuria moderadamente reducida y se estabilizó en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) leve o grave (84). Esto permite colocar en relevancia la importancia de considerar el uso de la TRE en mujeres con cualquier signo y síntoma de la EF.

Chaperona farmacológica

Tras más de una década desde la primera autorización de la TRE (2001), la Agencia Europea del Medicamento recientemente autorizó la comercialización de un nuevo tratamiento para la EF: migalastat, una chaperona farmacológica que se une a ciertas formas mutantes de α -Gal A, cuyos genotipos se denominan «mutaciones susceptibles» (85). La mayoría de estas mutaciones son de tipo *missense* en el gen GLA, y provocan un plegamiento anómalo de la proteína α -Gal A que impide su desplazamiento desde el retículo endoplásmico hasta el lisosoma (86). Migalastat está indicado para el tratamiento a largo plazo en pacientes \geq 16 años con manifestaciones clínicas de EF, con mutación susceptible (87).

La chaperona migalastat es un iminoazúcar de bajo peso molecular, análogo estructural del grupo galactosa terminal de Gb-3, que normalmente es escindido por la α -galactosidasa A (88). Migalastat se fija de forma selectiva, reversible y con gran afinidad al foco activo de determinadas formas mutantes de α -Gal A (mutaciones susceptibles). La fijación de migalastat estabiliza α -Gal A mutante, lo que facilita su transporte desde el retículo endoplásmico hasta el lisosoma. La fijación depende del pH: migalastat presenta mayor fijación en condiciones menos ácidas (89). Dado que el pH en el retículo endoplásmico es

menos ácido que en el lisosoma, migalastat se fija a α -Gal A en el retículo endoplásmico y libera α -Gal A en el lisosoma, para que realice su función enzimática libremente. Además, la fijación de migalastat a α -Gal A es competitiva, es decir, una vez que el complejo migalastat/ α -Gal A llega al lisosoma, los sustratos normales (Gb3) de α -Gal A compiten con migalastat. Esto favorece que migalastat libere α -Gal (90).

2.2.10.2 No Específico

Prevención de manifestaciones clínicas secundarias

Las crisis de dolor neuropático y las acroparestesias se tratan con fármacos estabilizadores de membrana (carbamacepina, fenitoína). Los angioqueratomas pueden beneficiarse de la terapia láser. Respecto a las manifestaciones cardíacas, las recomendaciones para la EF son las habituales en la práctica clínica general. La enfermedad cardíaca sigue representando la mayoría de las muertes en pacientes con EF de ambos sexos y fenotipos (91, 92). En la afectación renal, su similitud con la nefropatía diabética se traslada también al manejo terapéutico; así, es necesario un control estricto de la presión arterial con inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA) o ARA-II, que parecen ser más eficaces en el enlentecimiento de la progresión de insuficiencia renal cuanto antes se empleen; aunque es difícil definir su eficacia de manera aislada, puesto que la mayoría de trabajos publicados lo evalúan como tratamiento coadyuvante a la terapia de sustitución enzimática (93). Si la enfermedad progresa a insuficiencia renal terminal se recurrirá a diálisis o trasplante renal.

Las medidas preventivas (p. Ej., Profilaxis de accidentes cerebrovasculares con un agente antitrombótico) y modificaciones en el estilo de vida (p. Ej., Evitar temperaturas extremas) también son consideraciones importantes para la atención del paciente y deben considerarse además de los tratamientos sintomáticos (74) (94).

2.2.10.3 Perspectivas terapéuticas

Terapia génica

Durante las últimas décadas, se ha investigado una serie de diferentes vectores y serotipos virales para realizar terapia génica en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosomal obteniendo resultados exitosos en modelos animales (95). Numerosas ventajas caracterizan la terapia génica en comparación con el tratamiento de reemplazo enzimático, por ejemplo, se asocia con un efecto terapéutico a largo plazo, no es arriesgado en lo que respecta a la administración parental y, además, es menos costoso que la TRE (96).

La terapia génica, que es la introducción de una copia de trabajo del gen que codifica α -Gal A en las células del paciente (fibroblastos, linfocitos B, hepatocitos, células hematopoyéticas) a través de retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV) (97), ha mostrado resultados alentadores en algunos experimentos. Sin embargo, debido a múltiples limitaciones incluyendo la producción a gran escala de virus AAV, la terapia génica aún está lejos de poder ingresar en la práctica clínica diaria a corto plazo (96).

Los enfoques emergentes se refieren a vectores no virales: la biocompatibilidad y la facilitación de la producción a gran escala son características importantes de estos constructos que ofrecen buenas perspectivas para futuras aplicaciones en el tratamiento con Fabry (98).

Terapia enzimática alternativa

Una versión PEGilada de α -Gal A recombinante con una vida media en circulación más larga se encuentra actualmente en un ensayo. La PEGilación es la conjugación de una proteína y/o péptido con una o más moléculas de poli (etilen glicol). El poli (etilen glicol) es un polímero no tóxico, no inmunogénico y está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, USA). En los últimos años, la PEGilación ha sido utilizada para mejorar las propiedades fisicoquímicas de proteínas y drogas terapéuticas, por lo que esta tecnología ha impactado fuertemente a la industria bio-farmacéutica. La PEGilación permite prolongar el tiempo de residencia en el cuerpo, mejorar la estabilidad, aumentar la solubilidad, disminuir la proteólisis y excreción renal (99).

Terapia de reducción de sustrato

La terapia de reducción de sustrato para la EF tiene un fundamento bioquímico. Los ensayos clínicos de terapia de reducción de sustrato comenzarán pronto (100).

3- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Fabry (EF), es un trastorno de almacenamiento lisosomal ligado al cromosoma X que clásicamente se manifiesta como una enfermedad multisistémica. Se produce como resultado de una actividad enzimática deficiente o ausente de α -galactosidasa A (α -Gal A) y a la acumulación progresiva de glicosfingolípidos en los lisosomas, principalmente globotriaosilceramida (GL-3 o Gb-3) y globotriaosilfosfingosina (Lyso Gb3) (101). En general, se ha reportado una frecuencia de 1 por cada 117.000 nacidos vivos hasta 1 en 40.000 varones para la EF (27) pero probablemente esté subestimada por la existencia de casos no diagnosticados. En las mujeres, debido a la falta de estudios epidemiológicos se desconoce cuál es la prevalencia real de la EF. Sin embargo, estudios a nivel mundial en poblaciones de alto riesgo como las unidades de hemodiálisis, pacientes con hipertrofia ventricular izquierda (HVI) y accidentes cerebrovasculares (ACV) han permitido poner de relevancia a las mujeres como un blanco importante de estudio para esta enfermedad (34). El diagnóstico temprano de la EF contribuye al manejo oportuno de esta patología gracias a la disponibilidad actual de la TRE y la terapia con chaperona farmacológica que se ha evidenciado logran disminuir de manera significativa la acumulación de glicosfingolípidos a nivel lisosomal evitando la progresión de la enfermedad (82, 90). Si bien, la EF es un trastorno de herencia ligado al cromosoma X, estudios globales han permitido determinar que es una enfermedad que afecta tanto a hombres como a mujeres (102) (70) siendo en las mujeres mucho más complejo su

diagnóstico debido a una menor sensibilidad de la medición de la actividad enzimática de α -GAL A en leucocitos a causa de la inactivación aleatoria del cromosoma X, dejando como única opción el abordaje desde las pruebas moleculares (67). En Colombia, pocos son los reportes en la literatura sobre estudios de la EF, se han descrito algunos casos de pacientes varones con fenotipos atípicos o de presentación tardía (103, 104) y a la fecha, sólo se ha realizado un estudio donde se reportan de manera simultánea varios casos de pacientes con la enfermedad (105). Por otro lado, a pesar de que los estudios que recolectan información acerca de esta enfermedad en Colombia son escasos en la literatura, FEDESARROLLO – Centro de investigación económica y social en el año 2007 publicó los resultados del análisis: “Carga económica de la enfermedad de Gaucher y Fabry en Colombia” concluyendo que el tratamiento para estas enfermedades genera un costo extraordinariamente elevado para la sociedad colombiana. Con respecto a los componentes de dicho costo, el costo asociado con la TRE eclipsa todos los demás, siendo éste 30 veces el costo promedio anual del manejo médico de enfermos con Gaucher no tratados y 10 veces el costo promedio anual del manejo médico de enfermos con Fabry no tratados, lo que permite colocar de relevancia la importancia de conocer los aspectos fisiopatológicos de la enfermedad en la población colombiana, promover las estrategias de detección temprana de casos principalmente en poblaciones de alto riesgo y proporcionar bases científicas para un mejor abordaje terapéutico evitando los sobrecostos a la nación; más aún en las mujeres afectadas con la enfermedad de quienes a la fecha se desconoce su frecuencia y comportamiento para esta enfermedad y en quienes existe una mayor heterogeneidad fenotípica.

4- OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización molecular de las variantes genéticas presentes en mujeres colombianas con sospecha de enfermedad de Fabry en el período comprendido entre enero del 2016 y diciembre del 2018.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Clasificar los hallazgos moleculares encontrados en las mujeres con sospecha de enfermedad de Fabry.
- ✓ Correlacionar los hallazgos moleculares identificados con el fenotipo bioquímico descrito para la enfermedad de Fabry.
- ✓ Establecer la frecuencia de los diferentes hallazgos moleculares evidenciados en las mujeres colombianas con sospecha de enfermedad de Fabry.

5- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio de tipo transversal descriptivo en una cohorte de mujeres colombianas con signos y/o síntomas sugestivos de la EF durante un período de 36 meses a partir de la información recopilada por el laboratorio de diagnóstico genético molecular- MOLECULAB en la ciudad de Bogotá, dedicado a la realización de pruebas genéticas como soporte para el diagnóstico de enfermedades de depósito lisosomal. A partir de esta población se plantea la clasificación y descripción detallada de las variantes reportadas, su correlación con el fenotipo bioquímico descrito de la EF y comportamiento de los hallazgos en nuestra población.

5.2 POBLACIÓN EN ESTUDIO

La población universo está compuesta por mujeres que asistieron a consulta médica general o especializada de las áreas de nefrología, neurología, rehabilitación física, genética, reumatología, cardiología, pediatría, hematología, dermatología y medicina interna en diferentes centros asistenciales del país y que durante la revisión clínica se sospechó a criterio médico que alguno(s) de los signos y/o síntomas evidenciados podrían estar asociados a la EF. Este estudio se realizó durante un período de 36 meses comprendido entre enero del 2016 y diciembre del 2018.

La información de manifestaciones clínicas, información familiar y datos demográficos en algunos casos fue obtenida a partir de las órdenes clínicas remitidas por los médicos tratantes y los formatos institucionales del Laboratorio de Diagnóstico Molecular-MolecuLab.

5.3 ANÁLISIS DE ADN GENÓMICO

Se recolectó una muestra de sangre total por cada individuo referido para el estudio en tubo tratado con EDTA (3mL) y se realizó extracción de ADN mediante la técnica de Salting-Out (106) ; posteriormente, se amplificaron los 7 exones y los límites exón – intrón del gen *GLA* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR-TOUCHDOWN). El producto amplificado fue secuenciado por tecnología Sanger (técnica “gold standard” para secuenciación). El resultado fue comparado con la secuencia de referencia: NG_007119.1. National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa de análisis de secuencias de DNA Sequencher 5.0.

Tabla 1. Información de primers y temperatura de anillamiento para la amplificación de exones del gen GLA.

Exón(es)	Primers	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento
1	5' GGATCACTAAGGTGCCGC 3' 3' AAAAGCAGCAGCAGAGTCGG 5'	579	58.3°C
2	5' TCCTATTTTGTGGGGTTTTAGG 3' 3' TGTACAGAAGTGCTTACAGTCCTC 5'	451	63.2°C
3	5' AAAGCCCCCAATACCTGGTG 3' 3' GAAGAGATGGGAGCTCTGGC 5'	448	63.1°C
4	5' TTGAACCTGGGAAACAGAGG 3' 3' AGTGGGGATGGTGAGAAGTG 5'	420	64.8°C
5-6	5' AGACCTCCTTATGGAGACGTT 3' 3' ACTGATAGTAACATCAAGAGCAAGG 5'	807	60.5°C
7	5' ATGCCAAACTAACAGGGCCA 3' 3' GCCACCTAGCCTTGAGCTTT 5'	433	61.8°C

5.4 CLASIFICACIÓN DE HALLAZGOS MOLECULARES

La clasificación inicial de las variantes encontradas en patogénica, probablemente patogénica, significado incierto, probablemente benigna y benigna; se realizó de acuerdo con los estándares establecidos por el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y la Asociación de Patología Molecular (ACGM-AMP) del año 2015 el cual tiene por objetivo establecer los lineamientos dentro de un marco común para la clasificación de variantes genéticas (107). Esta clasificación incluyó el análisis de los siguientes criterios:

Tabla 2. Herramientas para la clasificación de variantes.

Criterios	Bases de datos
Frecuencias poblacionales	<ul style="list-style-type: none"> - 1000 Genomes Project - Exome Aggregation Consortium (ExAC)
Tipo de variante	<ul style="list-style-type: none"> - Cambio de sentido /Missense - Sin sentido/Nonsense - Silenciosa/Sinónima - Cambio en el marco de lectura/ Frameshift - Inserciones o deleciones
Bases de datos de enfermedades	<ul style="list-style-type: none"> - OMIM - ClinVar - Human Gene Mutation Database - Human Genome Variation Society - Leiden Open Variation Database

<p>Reportes de casos, análisis funcionales y reportes de correlación genotipo-fenotipo en población afectada</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Literatura médica general y especializada - International Fabry Disease Genotype-Phenotype Database (dbFGP) - Fabry database - Fabry Outcome Survey (FOS)
<p>Algoritmos de predicción de patogenicidad</p>	<p><u>Variantes en secuencias codificantes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT) - Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) - Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) - Mutation analysis or program mutation (MUTATION TASTER) - Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms (PhD-SNP) - Predicting disease associated variations using GO terms (SNPs&GO) <p><u>Variantes en secuencias No Codificantes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Mutation analysis or program mutation (MUTATION TASTER) - Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms (PhD-SNP) <p><u>Variantes que afectan el sitio de Splicing:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - NNSplice - Human Splice Finder

5.4.1 Frecuencias poblacionales

Las frecuencias poblacionales se revisaron en las bases de datos poblacionales 1000 Genomes y Project Exome Aggregation Consortium (ExAC).

El genoma humano comprende tres mil millones de bases, de las cuales millones difieren entre dos genomas de diferentes personas. El Proyecto 1000 Genomas, que se creó en 2008, tenía como objetivo estudiar esta variación utilizando las tecnologías de Secuenciación de Próxima Generación (NGS) en al menos esta cantidad de personas y, al hacerlo, proporcionar una base sólida sobre la cual construir una comprensión de la variación genética en la población humana (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/>).

Project Exome Aggregation Consortium (ExAC) es una base de datos generada a partir de una coalición de investigadores que buscan agregar y armonizar los datos de secuenciación

del exoma de una amplia variedad de proyectos de secuenciación a gran escala, y hacer que los datos de resumen estén disponibles para la comunidad científica en general. El conjunto de datos proporcionado en este sitio web abarca 60,706 individuos no relacionados secuenciados como parte de diversos estudios genéticos poblacionales y específicos de las enfermedades (<http://exac.broadinstitute.org/>).

5.4.2. Tipo de variante

Las variantes moleculares (génicas o puntuales), son aquellas a nivel molecular que afectan la constitución química de los genes, es decir a los nucleótidos o “letras” del DNA (cambio en un solo nucleótido o en un número reducido de nucleótidos). Las variantes encontradas en este estudio se clasificaron en:

- Cambio de sentido (missense): Aquellas donde hay un cambio en una de las bases del DNA de forma que el triplete codifica para un aminoácido diferente del que debería, es decir, en esa posición de la proteína habrá un aminoácido incorrecto.
- Sin sentido (nonsense): En este tipo de mutación hay un cambio en una de las bases del DNA de forma que el nuevo triplete que se forma determina la señal de fin de la cadena de aminoácidos- codón stop o de parada. Esto quiere decir que se trunca la proteína, no se continúa formando a partir de ahí.
- Silenciosas/ sinónimas: En este tipo de mutación hay un cambio en una de las bases del DNA de forma que el triplete de nucleótidos se modifica, pero sigue codificando para el mismo aminoácido. Esto es así porque el código genético tiene cierto margen de seguridad y para cada aminoácido hay varias combinaciones de tripletes que lo determinan.
- Inserciones: En este tipo de mutación se añade una o más bases al DNA original. De esta forma se puede alterar el marco de lectura.
- Deleciones: En este tipo de mutación se pierden una o más bases, es decir, se pierde un trozo de DNA alterando la cadena proteica que debería formarse y su función. De esta forma se puede alterar el marco de lectura.
- Cambio de marco de lectura (Frameshift): Este tipo de variaciones se da cuando por inserción o pérdida de pares de bases se cambia el marco de lectura. Con frecuencia aparece un triplete STOP o codón de parada prematuro.
- Intrónicas: Variantes que se ubican a nivel de las regiones intrónicas (no codificantes) entre los exones de un gen (108).

5.4.3. Bases de datos de enfermedades

- **Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM):** Es un compendio completo y autorizado de genes humanos y fenotipos genéticos que está disponible gratuitamente y se actualiza diariamente. Las referencias en OMIM contienen información sobre todos los trastornos mendelianos conocidos y más de 15,000 genes (<https://www.omim.org/>).

- **ClinVar:** Es un archivo público de acceso gratuito de informes sobre las relaciones entre las variaciones humanas y los fenotipos, con evidencia de respaldo. Facilita el acceso y la comunicación sobre las relaciones establecidas entre la variación humana y el estado de salud observado, y la historia de esa interpretación. ClinVar procesa las presentaciones que informan las variantes encontradas en las muestras de pacientes, las afirmaciones hechas con respecto a su importancia clínica, la información sobre el remitente y otros datos de respaldo (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).
- **Human Gene Mutation Database (HGMD):** Es una colección completa de mutaciones de la línea germinal en genes nucleares que subyacen, o están asociados con las enfermedades hereditarias humanas. Para el año 2017, la base de datos contenía más de 203,000 lesiones de genes diferentes identificadas en más de 8000 genes curados manualmente de más de 2600 revistas (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).
- **Human Genome Variation Society:** Es una base de datos en línea de variantes del genoma que se puede buscar en su totalidad, que se ha publicado en los Informes de datos revisados por expertos y en artículos relevantes en Human Genome Variation (HGV) (<https://www.hgvs.org/>).
- **Leiden Open Variation Database (LOVD):** Es una base de datos diseñada para recopilar y mostrar variantes en la secuencia del ADN. El foco de un LOVD suele ser la combinación entre un gen y una enfermedad genética (hereditaria).

5.4.4. Reportes de casos, análisis funcionales y reportes de correlación genotipo-fenotipo en población afectada

- **International Fabry Disease Genotype-Phenotype Database (dbFGP):** Es una base de datos basada en la web específica de la EF que proporciona información sobre los genotipos y fenotipos de variantes genéticas que causan los dos subtipos clínicos principales de la EF. Consolida la información de publicaciones revisadas por pares, otras bases de datos, incluida la base de datos de mutaciones genéticas humanas (HGMD) y la base de datos japonesa Fabry (fabry-database.org), evaluaciones diagnósticas y clínicas de pacientes en el Centro Internacional de la EF en Mount Sinai (ICEF), y centros expertos de diagnóstico y tratamiento de la EF en todo el mundo (<http://dbfgp.org/dbFgp/fabry/>).
- **Fabry database:** Base de datos japonesa cuyo propósito es ayudar a los investigadores y clínicos a comprender los cambios estructurales en la α -Gal-A causados por variantes (GLA) de la EF. Esta base de datos contiene fenotipos clínicos, genotipos y estructuras de GLA mutantes (<http://fabry-database.org/>).

- **Fabry Outcome Survey (FOS):** Este registro está diseñado para recopilar información sobre diversos aspectos de la EF. Los objetivos son monitorear la seguridad y efectividad a largo plazo de la agalsidasa alfa; caracterizar la población de pacientes con EF y proporcionar datos sobre el curso clínico de la enfermedad en pacientes no tratados y aquellos que reciben terapias aprobadas; y mejorar la comprensión de la historia natural de la enfermedad, incluida la variación intrafamiliar e intrafamiliar (<http://www.fabrynetwork.org/>).
- **Literatura médica general y especializada:** Artículos, publicaciones, estudios poblacionales, estudios de casos y controles y otra literatura científica indexada en bases de datos como el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.4.5 Algoritmos de predicción de patogenicidad

Variantes en secuencias codificantes y No codificantes:

Los algoritmos mencionados a continuación tienen un objetivo común que es la aproximación o predicción del impacto de las variaciones en las regiones codificantes y No codificantes respectivamente (Tabla 2.), sobre la funcionalidad de la proteína a partir de análisis de homología de secuencias mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST); sin embargo, difieren en algunas características.

- **Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT):** Se enfoca más en la conservación de la secuencia a lo largo del tiempo evolutivo en la predicción del efecto de las sustituciones de residuos en la función de la proteína. Utiliza el concepto de que regiones conservadas evolutivamente son menos tolerante a las mutaciones y, por lo tanto, se espera que las mutaciones que generen sustituciones o cambios en el marco en estas regiones afecten más la función de la proteína. La puntuación de SIFT varía de 0 a 1. Se predice que la puntuación menor a 0.05 afectará la función de la proteína y se considerará funcionalmente perjudicial, mientras que cualquier puntuación mayor o igual a 0.05 representa una sustitución neutral (109).
- **Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2):** Es una herramienta de predicción estructural y funcional que predice el efecto de un cambio de aminoácido en las características de las proteínas basadas en las anotaciones funcionales de los SNP, las propiedades estructurales de las proteínas con anotación de secuencia, y finalmente predice si la codificación no es sinónima. Los SNP se consideran dañinos o no. La puntuación de varía de 0 a 1, y la predicción correspondiente es "probablemente perjudicial" (codificada como "D" si la puntuación es mayor que 0,85); "posiblemente dañino" (codificado como "P" si está entre 0.85 y 0.15) y "benigno" (codificado como "B" si es más pequeño que 0.15) (110).

- **Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN):** Predictor basado en la secuencia que estima si una variación de tipo sustitución, inserción o delección en regiones codificantes afecta la función de la proteína (111).
- **Mutation analysis or program mutation (MUTATION TASTER):** Determina las consecuencias funcionales de las sustituciones de aminoácidos, las mutaciones cortas de inserción y / o eliminación (indel), las variantes que abarcan los bordes intrón-exón, las alteraciones intrónicas y sinónimas. Divide las alteraciones como; causante de la enfermedad: que probablemente es perjudicial, causante de la enfermedad automáticamente: aquí se conoce que la alteración es perjudicial, polimorfismo: probablemente es una alteración inofensiva y polimorfismo automático: se sabe que es inofensivo (112).
- **Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms (PhD-SNP):** Predice la asociación de la enfermedad con SNP no sinónimos (nsSNP) al dividir esos SNP en polimorfismos relacionados con la enfermedad o neutrales en base a una puntuación que oscila entre (0-1). Los SNP con una puntuación superior a 0,5 se consideran asociados con la enfermedad según el algoritmo del programa. Las salidas de PhD-SNP dependen de varias secuencias alineadas, índice de conservación de la posición de SNP, frecuencias de residuos silvestres (Wild Type) y mutantes (113).
- **Predicting disease associated variations using GO terms (SNPs&GO):** A partir de una secuencia de proteínas, puede predecir si una variación está relacionada con la enfermedad o no mediante la explotación de la correspondiente anotación funcional de la proteína. SNPs & GO recopila en un marco único información derivada de la secuencia de proteínas, información evolutiva y función codificada en los términos de Ontología de Genes (GO) (114).

Variantes que afectan el sitio de Splicing:

- NNSplice: Es un predictor de sitio de empalme mejorado que analiza las probabilidades para las características de los genes mediante el uso de la programación dinámica para combinar información de múltiples contenidos y sensores de señales, incluidos sensores que integran coincidencias con secuencias homólogas de una base de datos (115).
- Human Splice Finder: Diseñado para comprender mejor las variantes intrónicas y exónicas que conducen a defectos de empalme (<http://www.umd.be/HSF/>).

Todas las variantes reportadas en este estudio se clasificaron siguiendo la metodología previamente descrita. Sin embargo, a las variantes VUS tipo missense se les realizó los siguientes análisis adicionales.

5.5 ANÁLISIS ADICIONAL *IN SILICO* DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VUS) TIPO MISSENSE.

Para predecir el efecto estructural de las variantes con cambio de sentido (missense) clasificadas como “variantes de significado incierto (VUS)” se decidió realizar un análisis *in silico* para un estudio más detallado de las mismas. El análisis consistió en:

1. Modelar el cambio del aminoácido generado por la variante en la estructura tridimensional de la enzima alfa-galactosidasa-A (α -Gal-A) previamente descrita por Garman SC *et al* 2004 (19) mediante el programa de visualización molecular Pymol.
2. Alineamiento estructural entre la proteína wild type (proteína natural) vs. mutada (originada por la variante modelada) mediante Pymol.
3. Observar la distancia entre el sitio de la sustitución y los sitios activos reportados previamente para la proteína α -Gal A mediante Pymol.
4. Determinación del área de superficie accesible al solvente (ASA) y el potencial de superficie electrostático usando Pymol.
5. Establecer el nivel de conservación de los aminoácidos (a.a.) sustituidos en las variantes evaluadas mediante los programas T-Coffee y Clustal Omega.
6. Determinar la probabilidad de desórdenes estructurales mediante IUPred.
7. Evaluación de los efectos de las variantes sobre la estabilidad de la proteína utilizando los programas I-Mutant2.0, CUPSAT, MUpro y Eris.

5.6 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO BIOQUÍMICO

Las respectivas mediciones de la actividad enzimática de α -GAL-A de las mujeres a quienes les fue solicitado el análisis por el médico tratante fueron proporcionadas por el director del Centro de Investigaciones en Bioquímica (CIBI) de la Universidad de los Andes basados en los protocolos de medición de actividad enzimática previamente descritos en la población colombiana (116).

Las variantes clasificadas finalmente como patogénica o probablemente patogénica se correlacionaron con el fenotipo bioquímico descrito para la EF como variantes causantes de la disminución parcial de la actividad enzimática de α -GAL A (presencia 10-30% actividad enzimática residual) o variantes causantes de pérdida completa de la actividad enzimática (actividad enzimática residual <1% o indetectable), a partir de datos de reportados en la literatura de actividad enzimática en hombres.

5.7 DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES REPORTADAS EN MUJERES COLOMBIANAS CON SOSPECHA DE EF

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de todas las variantes reportadas en nuestro estudio (37 variantes en total) incluidas las clasificadas como benigna y probablemente benigna (Tabla 7.). Las frecuencias observadas en nuestra población se compararon con las frecuencias reportadas para las mujeres en la población general mediante una prueba de Chi cuadrado. Adicionalmente, se realizó un análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. Esta teoría emplea una prueba de Chi cuadrado para comparar la distribución observada de los datos con una distribución esperada de los datos.

La ley de Hardy-Weinberg establece que, en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio que en loci autosómicos se alcanza tras una generación.

Se dice que una población está en equilibrio cuando los alelos de los sistemas polimórficos mantienen su frecuencia en la población a través de las generaciones. Para lograr el equilibrio genético, según el matemático inglés Hardy y el médico alemán Weinberg, se deben dar varias condiciones:

- La población debe ser infinitamente grande y los apareamientos al azar (panmícticos).
- Que los alelos nuevos mutantes igualen a los alelos que desaparecen por muerte
- Que no haya selección natural
- Que no haya migración de individuos

En NO cumplimiento de cualquiera de estas hipótesis puede determinar que la población se aleje del equilibrio de Hardy-Weinberg (117).

5.8 ASPECTOS ÉTICOS

La autorización del uso de la información obtenida en las pruebas de secuenciación del gen *GLA* con fines investigativos de cada paciente se obtuvo mediante firma del consentimiento informado (ver anexo 1). Al momento de la recolección de la muestra se les solicitó autorización a los pacientes para el uso de sus datos de forma anónima en investigaciones posteriores y se les informó de su derecho de revocar su consentimiento de participación en el mismo.

6- RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

6.1.1 Características de la población

En el estudio se incluyeron un total de 1821 mujeres quienes a criterio del médico tratante presentaban uno o más signos y/o síntomas sugestivos de la EF con resultado de secuenciación por tecnología de Sanger para el gen *GLA*. Las edades de los individuos estuvieron entre el rango de 24 días de edad y los 87 años con un promedio de 45 años.

6.1.2 Características geográficas de la población en estudio

Los datos geográficos aquí mencionados fueron obtenidos a partir de la información registrada en los consentimientos informados y registros del Laboratorio de Diagnóstico Genético Moleculab.

La distribución demográfica de los individuos incluidos en el estudio se describe a continuación. De manera general, la población registrada era procedente del noroccidente del país. Dentro de las regiones con más cantidad de individuos reportados se encuentran la zona central del país con 569 individuos, de los cuales 544 eran provenientes de la capital Bogotá y 25 de municipios aledaños; 284 individuos eran provenientes del departamento de Atlántico siendo 273 pertenecientes a su capital Barranquilla y 11 a otros municipios, 235 distribuidos a lo largo de del departamento de Antioquía, 79 del departamento del Meta, 71 departamento del Tolima, 52 del departamento de Norte de Santander, 50 departamento del Huila, 43 del departamento de Quindío, 40 departamento de Boyacá, 39 pertenecientes al departamento del Valle del Cauca, 36 departamento de Bolívar, 19 del departamento de Caldas, 14 individuos Santander, 14 individuos del departamento de Córdoba, 10 departamento de Nariño, 7 del departamento de Casanare, Guajira 6, , Cesar 5, Magdalena 3, Amazonas 1, Chocó 1, Putumayo 1. Del total de individuos, a 242 no se logró identificar el lugar de procedencia por falta de información (Figura 4).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

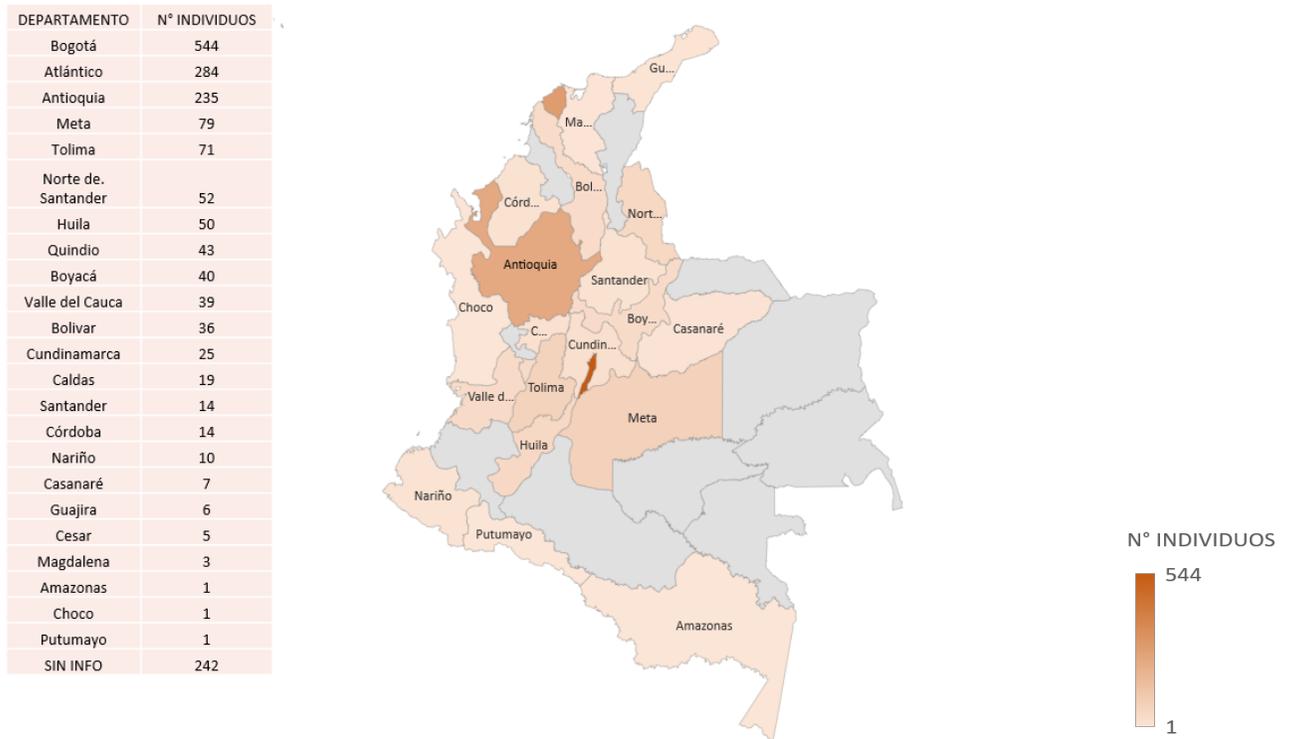
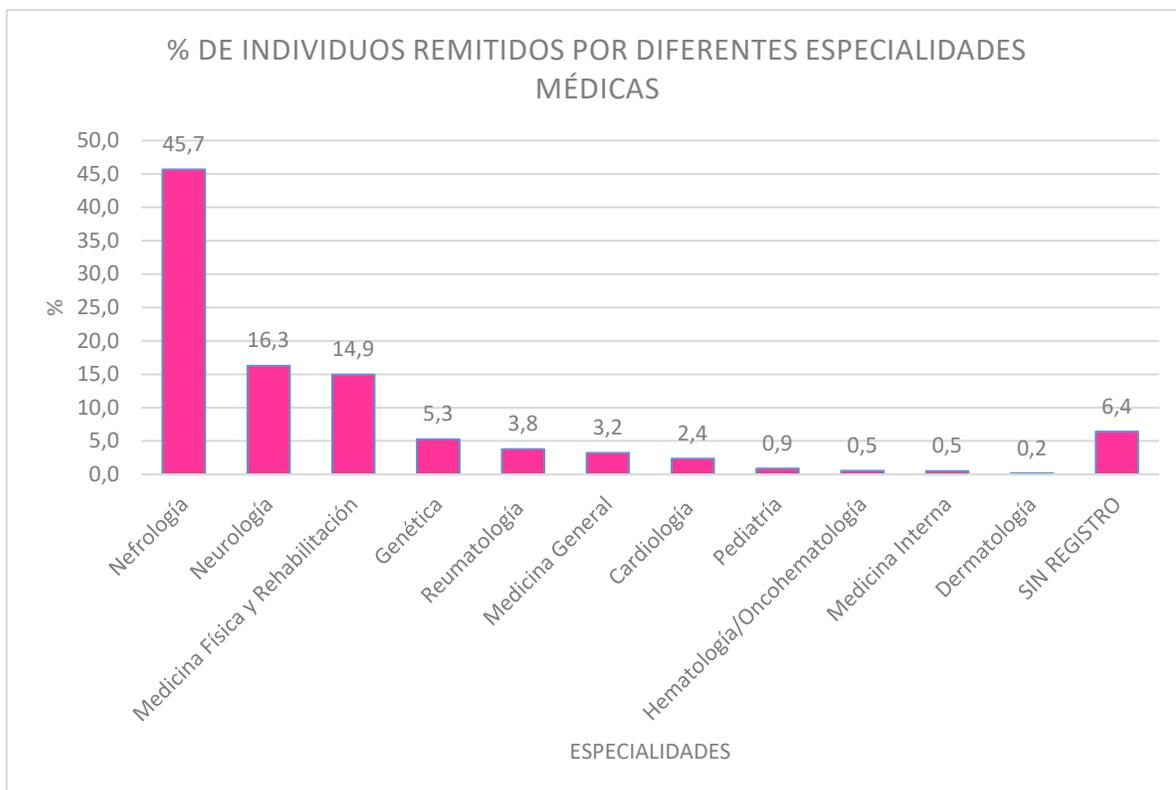


Figura 3. Distribución geográfica de la población incluida en el análisis.

6.1.3 Evidencia clínica

Los 1821 individuos incluidos en este estudio fueron remitidos por especialistas de diferentes áreas clínicas; sin embargo, en el 6,4% del total de los registros no se logró identificar la especialidad del médico tratante (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje (%) de individuos remitidos por diferentes especialidades médicas.

Los datos clínicos de los pacientes fueron recolectados a partir de la información descrita en las órdenes médicas emitidas por los médicos tratantes. A continuación se relacionan las principales manifestaciones clínicas evidenciadas para la justificación de la solicitud del análisis de secuenciación del gen *GLA* en las mujeres con sospecha de EF de acuerdo con la especialidad del médico tratante.

Tabla 3. Principales manifestaciones clínicas observadas en las mujeres con sospecha de EF desde diferentes especialidades médicas.

ESPECIALIDAD	MANIFESTACIONES CLÍNICAS
<i>Nefrología</i>	- Compromiso renal
<i>Neurología</i>	- Accidente cerebrovascular (ACV) temprano - Neuropatía - Acroparestesias
<i>Medicina Física y Rehabilitación</i>	- Intolerancia al ejercicio - Dolor en las extremidades
<i>Genética</i>	- Sospecha familiar - Acroparestesias - Intolerancia al ejercicio - Diarrea crónica no infecciosa
<i>Reumatología</i>	- Dolor articular

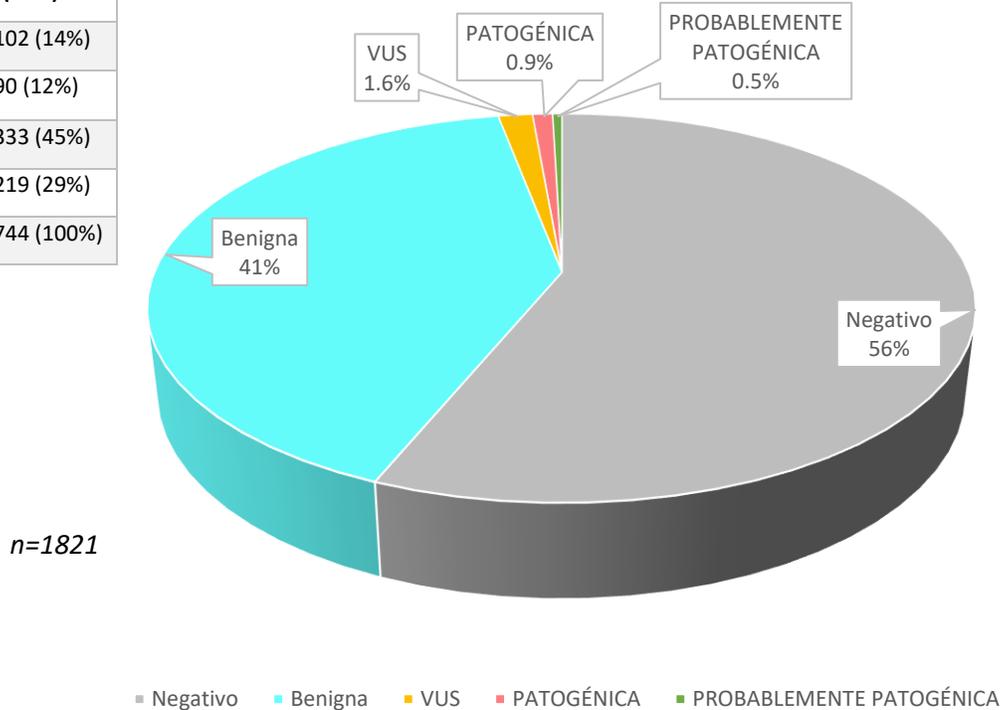
<i>Medicina General</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Enfermedad renal - Enfermedad neurológica - Debilidad muscular
<i>Cardiología</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Hipertrofia ventricular izquierda (HIV)
<i>Pediatría</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Parestesias - Sintomatología gastrointestinal
<i>Hematología/Oncohematología</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatoesplenomegalia - Anemia
<i>Medicina Interna</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Pérdida de peso - Enfermedad renal - Sintomatología gastrointestinal
<i>Dermatología</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Acroparestesias - Trastornos de la sudoración

6.1.4 Hallazgos moleculares

De los 1821 análisis realizados se obtuvieron 1024 mujeres con resultado negativo, es decir, en el 56% del total de las mujeres incluidas en el estudio no se identificó ninguna variante; en 744 mujeres, el 41% del total de los individuos se identificó al menos una variante clasificada como benigna; en 29 mujeres se identificó una variante de significado incierto *VUS* (1,6%), en 17 mujeres una variante clasificada como patogénica (0,9%) y en 8 mujeres una variante clasificada como probablemente patogénica (0,5%) (Gráfica 2). De las 17 diferentes variantes clasificadas como benigna y probablemente benigna reportadas en el 41% de las mujeres incluidas en el estudio (744 mujeres), 16 estaban ubicadas en regiones intrónicas del gen *GLA* o en la región 5'UTR y sólo 1 estaba ubicada en el exón 1. La frecuencia de mujeres con diagnóstico molecular de EF en nuestra población en estudio fue de 1.37%, es decir, 25 mujeres con reporte de una variante clasificada como patogénica o probablemente patogénica.

HALLAZGOS MOLECULARES EN MUJERES CON SOSPECHA DE ENFERMEDAD DE FABRY

BENIGNAS (41%)	
1 variante	102 (14%)
2 variantes	90 (12%)
3 variantes	333 (45%)
4 o más	219 (29%)
TOTAL	744 (100%)



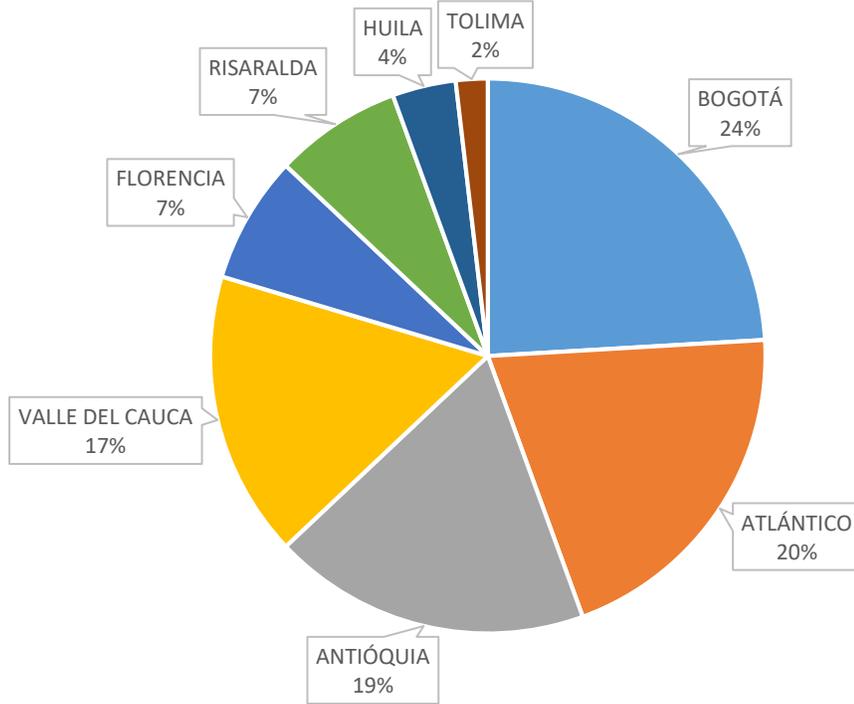
Gráfica 2. Total de hallazgos moleculares identificados en las mujeres colombianas con sospecha de EF.

6.1.5 Hallazgos moleculares con relevancia clínica

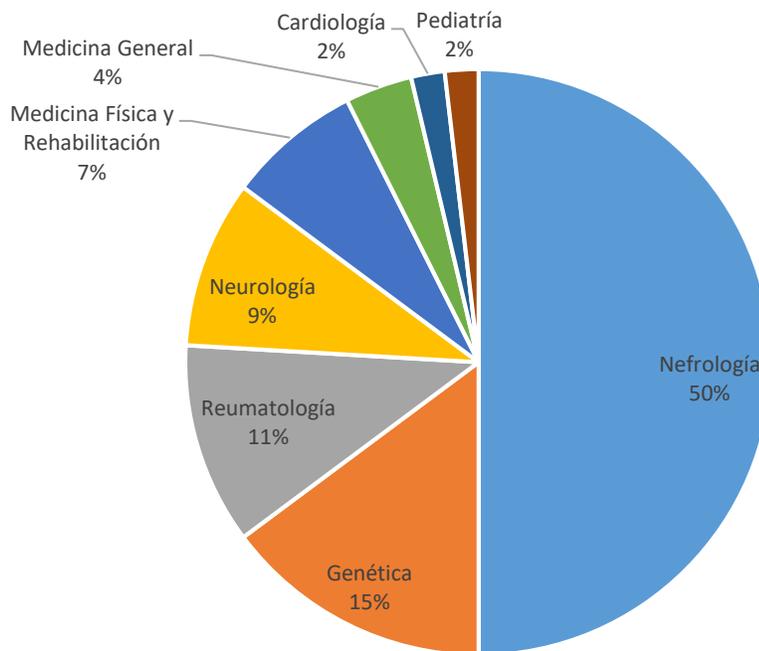
Variantes clasificadas como: Probablemente patogénica, patogénica y de significado incierto (VUS).

La distribución geográfica de las mujeres a las cuales se les reportó una variante con relevancia clínica se muestra a continuación junto con las especialidades médicas de remisión de estas.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA MUJERES CON HALLAZGOS RELEVANTES



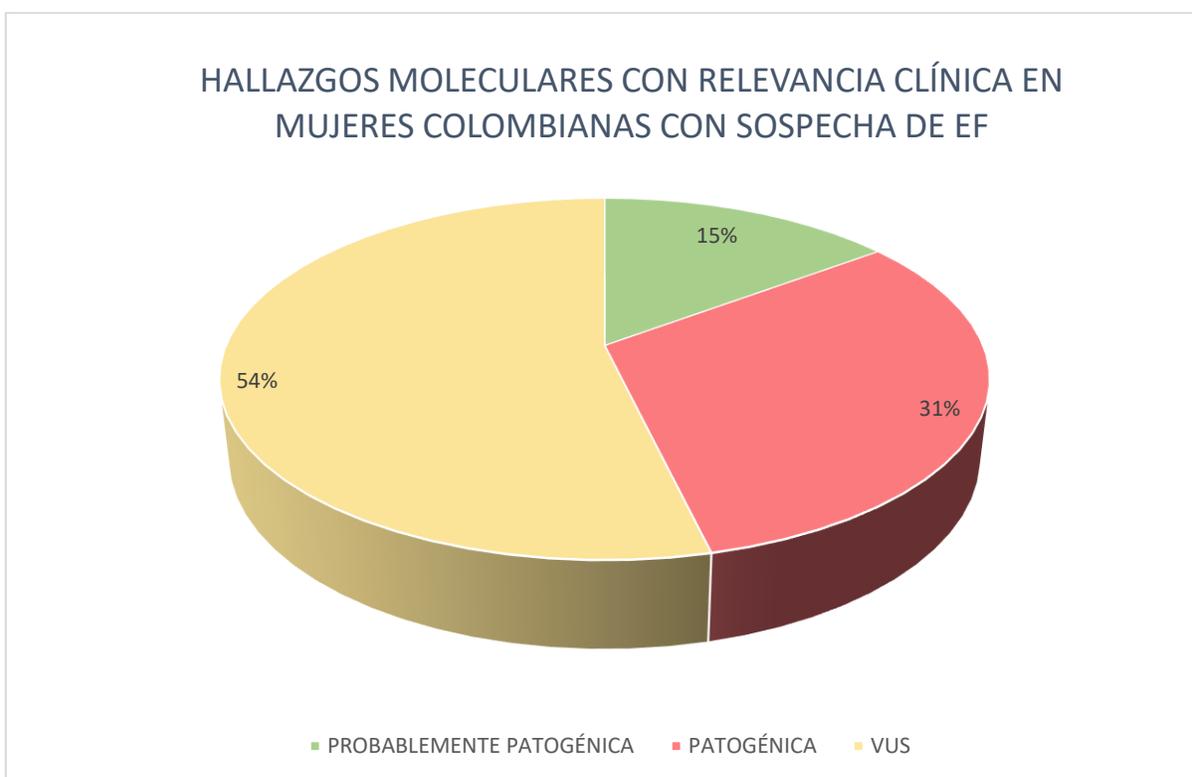
ESPECIALIDADES DE REMISIÓN MUJERES CON HALLAZGOS RELEVANTES



Gráfica 3. Mujeres con hallazgos moleculares relevantes. a) Distribución geográfica. b) Especialidades de remisión.

Entre las mujeres con reporte de variante con relevancia clínica (n=54), es decir, al menos una variante positiva (probablemente patogénica o patogénica) o una variante tipo *VUS*, se reportaron para 8 mujeres una variante clasificada como probablemente patogénica (15%), en 17 mujeres una variante clasificada como patogénica (31%) y en 29 mujeres una variante clasificada como *VUS* (54%) (Gráfica 4.).

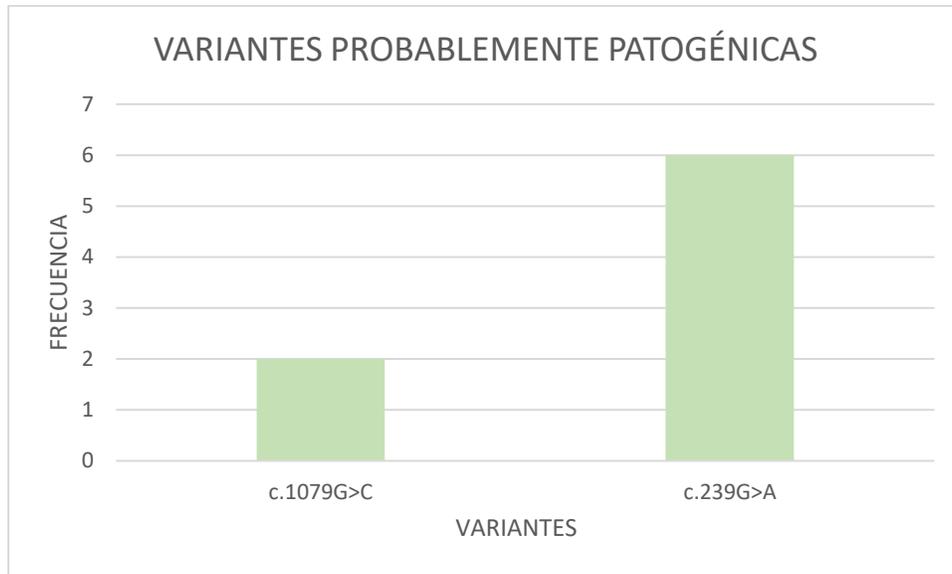
MUJERES (n=54)	
PROBABLEMENTE PATOGENICA	8
PATOGENICA	17
VUS	29



Gráfica 4. Hallazgos moleculares clasificados como probablemente patogénica, patogénica o de significado incierto (*VUS*) evidenciados en las mujeres colombianas con sospecha de EF.

6.1.5.1 Variantes probablemente patogénicas

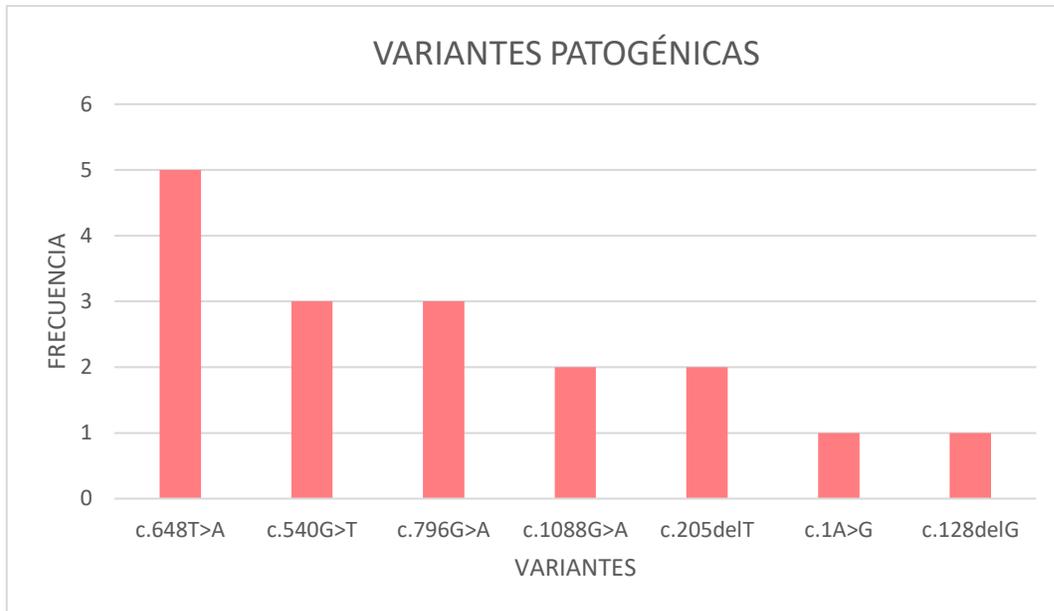
En relación con las variantes clasificadas como probablemente patogénicas (15% de los hallazgos relevantes) se observó que estaban presentes en un total de 8 mujeres; en 6 de ellas se reportó la variante c.239G>A en el exón 2, siendo 4 individuos posibles miembros de una misma familia; mientras que en 2 de ellas la variante c.1079G>C en el exón 7 probablemente pertenecientes a una misma familia; esta última, no había sido reportada previamente en la literatura (Gráfica 5).



Gráfica 5. Frecuencia absoluta de las variantes clasificadas como probablemente patogénicas en las mujeres colombianas con sospecha de EF.

6.1.5.2 Variantes patogénicas

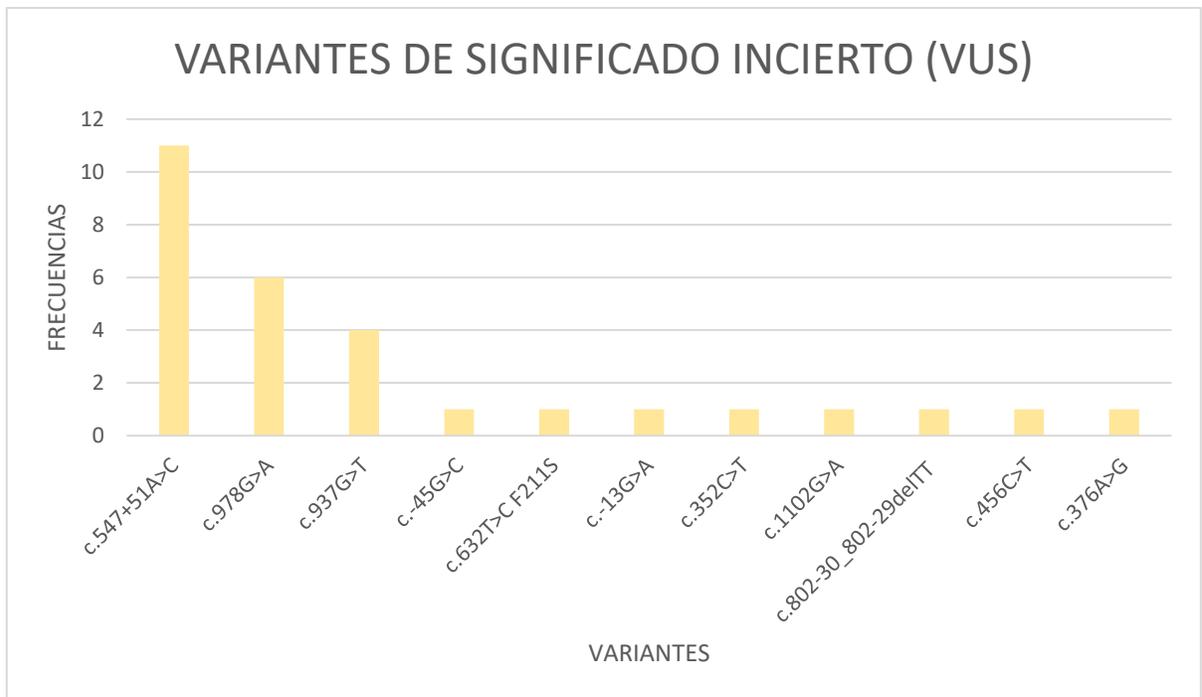
Para las variantes clasificadas como patogénicas (31% de los hallazgos relevantes) reportadas en 17 mujeres del total de individuos incluidos en el estudio se pudo observar que en 5 mujeres se describió la variante c.648T>A en el exón 6, posiblemente todas pertenecientes a una misma familia; en 3 mujeres la variante c.540G>T en el exón 3, 2 siendo posibles familiares relacionadas; en 3 mujeres la variante c.796G>A en el exón 5, 2 de ellas posibles miembros de una misma familia, en 2 mujeres probablemente relacionadas la variante c.1088G>A en el exón 7, en 2 mujeres posiblemente de una misma familia la variante c.205delT en el exón 2 y en 2 mujeres de manera independiente se encontraron las variantes c.1A>G y c.128delG en el exón 1 (Gráfica 6). La variante c.205delT ubicada en el exón 2 no había sido reportada previamente en la literatura.



Gráfica 6. Frecuencia absoluta de las variantes clasificadas como patogénicas en las mujeres colombianas con sospecha de EF.

6.1.5.3 Variantes de significado incierto (VUS)

El 54% de los hallazgos moleculares relevantes encontrados en las mujeres con sospecha de EF fueron clasificados como *VUS*. En 11 mujeres del total de individuos incluidos en el estudio se encontró la variante c.547+51A>C en el intrón 3, en 6 mujeres la variante c.978G>A en el exón 6, 2 de ellas posibles miembros de una misma familia; en 4 mujeres la variante c.937G>T en el exón 6 y en 8 diferentes mujeres, es decir, para cada una de ellas se encontraron las variantes c.-45G>C y c.-13G>A en la región 5'UTR, c.352C>T en el exón 2, c.456C>T y c.376A>G en el exón 3, c.632T>C en el exón 4, c.802-30_802-29delTT en el intrón 5 y c.1102G>A en el exón 7. La variante c.632T>C en el exón 4 no había sido reportada previamente en la literatura (Gráfica 7).



Gráfica 7. Frecuencia absoluta de las variantes clasificadas como variantes de significado incierto (VUS) en las mujeres colombianas con sospecha de EF

EPECIALIDADES DE REMISIÓN VARIANTES DE RELEVANCIA CLÍNICA: PROBABLEMENTE PATOGENICA, PATOGENICA Y VUS.

En relación con las especialidades de remisión de las mujeres con reporte de variantes clasificadas como probablemente patogénica (n=8), patogénica (n=17) y VUS (n=29); se pudo observar que 26 mujeres, es decir cerca de la mitad de todas en las que se reportó una variante de relevancia clínica eran remitidas de la especialidad de nefrología (5 con una variante clasificada como probablemente patogénica, 7 patogénica y 14 VUS), 8 de la especialidad de genética (2 con una variante probablemente patogénica, 5 patogénica y en 1 una variante tipo VUS), 7 de la especialidad de reumatología (5 con una variante clasificada como patogénica y 2 con una variante VUS), 5 de la especialidad de neurología todas con una variante clasificada como VUS, 4 de medicina física y rehabilitación con una variante VUS, 2 de medicina general con una variante VUS, 1 remitida del área de cardiología con una variante VUS y 1 sin información de especialidad de remisión con una variante clasificada como probablemente patogénica (Gráfica 8).

	Probablemente patogénica	Patogénica	VUS	TOTAL
Nefrología	5	7	14	26
Genética	2	5	1	8
Reumatología	0	5	2	7
Neurología	0	0	5	5
Medicina Física	0	0	4	4
Medicina General	0	0	2	2
Cardiología	0	0	1	1
SIN INFO	1	0	0	1
TOTAL	8	17	29	54



Gráfica 8. Frecuencia absoluta de las variantes clasificadas como probablemente patogénica, patogénica y VUS según la especialidad de remisión.

Porcentaje de detección variantes de relevancia clínica por especialidades

Las especialidades con mayor porcentaje de detección fueron las de nefrología, genética y reumatología con 48.1%, 14.8% y 12.9% respectivamente, seguido por neurología con 9.3%, medicina física con 7.4%, medicina general 3.7% y cardiología 1.8%.

Dentro de estas especialidades las de mayor especificidad fueron nefrología con 22.2%, genética 12.9% y reumatología con 9.25%, es decir, estas fueron las especialidades con mayor porcentaje de detección de individuos con variantes clasificadas como probablemente patogénica y patogénica.

6.1.5.3.1 Análisis *in silico* variantes VUS

Para las variantes puntuales clasificadas como VUS con cambio de sentido (*missense*) (ver tabla 6.), se realizó un análisis *in silico* a partir de la estructura tridimensional de la enzima α -Gal-A previamente descrita por Garman SC *et al* 2004 (19) donde se evaluaron los cambios provocados por cada una de las variantes aquí reportadas a nivel estructural y fisicoquímico en la proteína Wild Type. Los resultados de las características donde se evidenciaron cambios relevantes se muestran a continuación.

Tabla 4. Resultado análisis *in silico* variantes VUS

VARIANTE		CARACTERÍSTICAS EVALUADAS			
c.DNA	PROTEÍNA	<20 A° distancia sitios activos	Nivel de conservación cambio aminoácido	Probabilidad de desorden en la proteína	Alteración estabilidad de la proteína
c.352C>T	p.Arg118Cys	NO	Semi-conservado	Alta	Disminuida
c.376A>G	p.Ser126Gly	NO	Neutro	Alta	Disminuida
c.632T>C	p.Phe211Ser	SI	Semi-conservado	Baja	Disminuida
c.937G>T	p.Asp313Tyr	NO	Semi-conservado	Alta	Disminuida
c.1102G>A	p.Ala368Thr	NO	Neutro	Alta	Disminuida

A°= amstrongs

6.2 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO BIOQUÍMICO EF

Las variantes clasificadas como patogénica o probablemente patogénica se correlacionaron con el fenotipo bioquímico descrito para la EF.

Las correlaciones se determinaron a partir de la información reportada en hombres de otros estudios con la misma variante no relacionados o en algunos casos, reportes en la literatura. Los datos específicos para la obtención de las mediciones enzimáticas y su correlación con el fenotipo para cada variante se muestran a continuación:

Tabla 5. Correlación genotipo con el fenotipo bioquímico descrito para la enfermedad de EF.

CLASIFICACIÓN	VARIANTE		ACTIVIDAD ENZIMÁTICA			
	c.DNA	Proteína	DBS*	L*	G	FENOTIPO BIOQUÍMICO (Literatura)
Probablemente patogénica	c.239G>A	p.Gly80Asp	2,47	13,3	H ⁺	10-30%*
			1,3	25,3	M	
	c.1079G>C	p.Gly360Ala	2,57	16,37	M	Sin info
Patogénica	c.1A>G	p.Met1Val	3,8	80,07	M	Sin info
	c.128delG	p.Gly43Alafs *78	0,48	Sin info	H ⁺	Sin info
			Sin info	Sin info	M	
	c.205delT	p.Phe69Serfs*52	1,11	14,6	M	Sin info
	c.540G>T	p.Leu180Phe	16,1	161,8	M	10-30%*
	c.648T>A	p.Tyr216X	4,83	92,22	M	Sin info
	c.796G>A	p.Asp266Asn	0	0,1	H ⁺	<1%*
			1,01	0,15	H ⁺	
			4,55	70	M	
c.1088G>A	p.Arg363His	1,1	6,7	H ⁺	10-30%*	
		Sin info	Sin info	M		
*Valores de referencia actividad enzimática						
Dried Blood Spot (DBS):			Leucocitos (L):			
-CN: 2-21,8 nmol/ml/h			20-100 nmol/mg prot/h			
-Hombres Faby: 0-0,3						

G: Género del individuo en quien fue reportada la actividad enzimática en mención (M: mujer / H: hombre)

H+: Hombre no relacionado otros estudios

H*: Hombre reporte en la literatura

De acuerdo con los datos reportados para las mujeres de nuestro estudio relacionados con la actividad enzimática se determinó que la mediana de la actividad enzimática en DBS fue de 3,8 nmol/ml/h con un rango [1,11-16,1]. Para la actividad enzimática observada en leucocitos la mediana fue de 70 nmol/mg prot/h con un rango de [14,6-161,8].

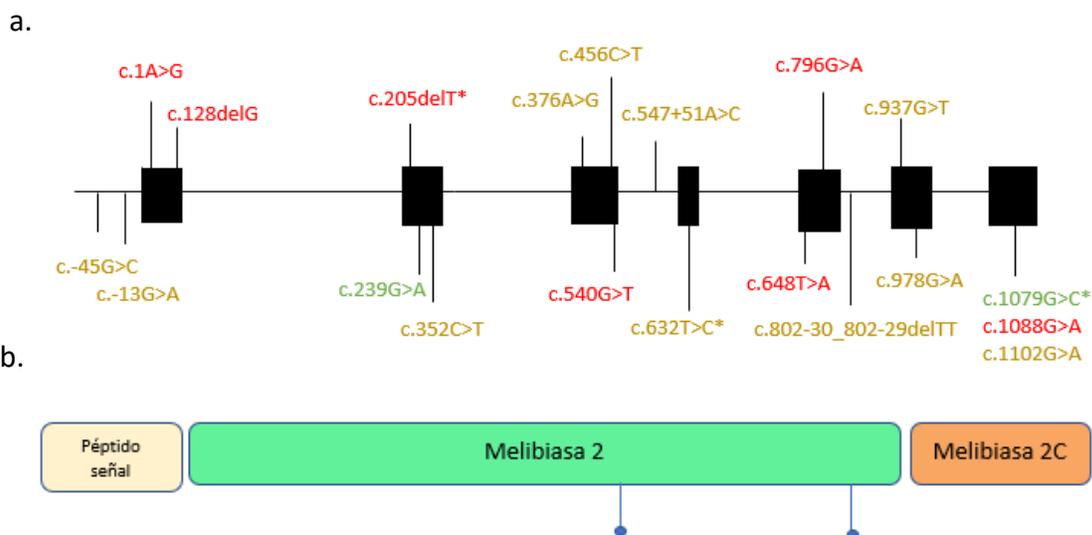
A continuación, se realiza un breve resumen de las variantes reportadas en la población de estudio con su respectiva anotación a nivel del genoma y proteína, así mismo, la ubicación en el gen GLA, el tipo de variante identificada y si ha sido reportada o no previamente en la literatura.

Tabla 6. Resumen variantes relevantes descritas en el estudio

rs	Cambio secuencia codificante NM_000169.2	Cambio en proteína NP_000160.1	Ubicación gen GLA	Tipo de mutación	Clasificación	Reporte Previo literatura
rs782646655	c.-45G>C	n/a	5' UTR	n/a	VUS	SI
rs782051708	c.-13G>A	n/a	5' UTR	n/a	VUS	SI
rs869312265	c.1A>G	p.Met1Val	EXÓN 1	Missense	Patogénica	SI
rs797044500	c.128delG	p.Gly43Alafs *78	EXÓN 1	Frameshift	Patogénica	SI
c.205delT	c.205delT	p.Phe69Serfs*52	EXÓN 2	Frameshift	Patogénica	NO
rs781838005	c.239G>A	p.Gly80Asp	EXÓN 2	Missense	Probablemente patogénica	SI
rs148158093	c.352C>T	p.Arg118Cys	EXÓN 2	Missense	VUS	SI
rs149391489	c.376A>G	p.Ser126Gly	EXÓN 3	Missense	VUS	SI
rs1555985827	c.456C>T	p.Tyr152Tyr	EXÓN 3	Silenciosa	VUS	SI
rs869312145	c.540G>T	p.Leu180Phe	EXÓN 3	Missense	Patogénica	SI
rs186273861	c.547+51A>C	n/a	INTRÓN 3	Intrónica	VUS	SI
c.632T>C	c.632T>C	p.Phe211Ser	EXÓN 4	Missense	VUS	NO
rs869312377	c.648T>A	p.Tyr216Ter	EXÓN 5	Nonsense	Patogénica	SI
rs869312407	c.796G>A	p.Asp266Asn	EXÓN 5	Missense	Patogénica	SI
rs869312422	c.802-30_802-29delTT	n/a	INTRÓN 5	Delección	VUS	SI
rs28935490	c.937G>T	p.Asp313Tyr	EXÓN 6	Missense	VUS	SI
rs151195362	c.978G>A	p.Lys326Lys	EXÓN 6	Silenciosa	VUS	SI
rs782509013	c.1079G>C	p.Gly360Ala	EXÓN 7	Missense	Probablemente patogénica	NO
rs111422676	c.1088G>A	p.Arg363His	EXÓN 7	Missense	Patogénica	SI
rs144994244	c.1102G>A	p.Ala368Thr	EXÓN 7	Missense	VUS	SI

VUS: Variante de significado incierto

Adicionalmente se muestra la ubicación en el gen GLA de las variantes con relevancia clínica descritas en el estudio y su equivalente a nivel proteico. Para la proteína AGAL -HUMANA (ID: P06280-Pfam) además del péptido señal ubicado entre los residuos 1-31, se han reportado dos dominios denominados Melibiasa 2 ubicado entre los residuos 39-322 y Melibiasa 2C en las posiciones 325-411 de la proteína. En el dominio Melibiasa 2 se encuentran los dos sitios activos de interacción con el ligando en las posiciones 170 y 231 (Tomado de: <https://pfam.xfam.org/protein/P06280>).



Amarillo: VUS, Rojo: patogénicas, Verde: probablemente patogénicas
 *Variantes No reportadas en la literatura.

Figura 4. a) Mapa del gen GLA con las variantes de relevancia clínica reportadas en las mujeres colombianas con sospecha de EF. b) Representación de la proteína AGAL-HUMANA (ID: P06280-Pfam) con sus respectivos dominios y sitios activos (azul).

6.3 FRECUENCIAS EN MUJERES DE LAS VARIANTES ALELICAS Y GENOTÍPICAS REPORTADAS EN LA POBLACIÓN CON SOSPECHA DE EF.

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de todas las variantes reportadas en nuestro estudio.

Tabla 7. Análisis de frecuencias poblacionales de las variantes reportadas en las mujeres colombianas con sospecha de EF.

ID VARIANTE			1000 Genomes Frecuencia (alelos/individuos)		ESTUDIO EF Frecuencia (alelos/n=1821)
			TOTAL n=1271	COLOMBIA n=51	
c.-105T>C	AMa	T	0,965 (2454)	0,980 (100)	0,983 (3582)
	AMe	C	0,034 (88)	0,019 (2)	0,017 (60)
		TT	0,940(1195)	0,960 (49)	0,968 (1762)
		TC	0,050 (64)	0,039 (2)	0,032 (58)
		CC	0,009 (12)	0,000	0,001 (1)
c.-30C>T	AMa	C	0,996 (2533)	1,000 (102)	0,997 (3630)
	AMe	T	0,003 (9)	0,000	0,003 (12)

		CC	0,992 (1262)	1,000 (51)	0,993 (1809)
		CT	0,007 (9)	0,000	0,007 (12)
		TT	0,000	0,000	0,000 (0,0)
c.-12G>A	AMa	G	0,904 (2298)	0,127 (13)	0,917 (3338)
	AMe	A	0,095 (244)	0,872 (89)	0,083 (304)
		GG	0,821 (1044)	0,784 (40)	0,839 (1527)
		GA	0,165 (210)	0,176 (9)	0,156 (284)
		AA	0,013 (17)	0,039 (2)	0,005 (10)
c.-10G>A	AMa	G	0,878 (2234)	0,941 (96)	0,932 (3394)
	AMe	A	0,121 (308)	0,058 (6)	0,068 (248)
		GG	0,781 (993)	0, 882(45)	0,868 (1580)
		GA	0,195 (248)	0, 117(6)	0,129 (234)
		AA	0,023 (30)	0,000	0,004 (7)
c.8A>G	AMa	A	1,000 (2542)	1,000 (102)	0,999 (3638)
	AMe	G	0,000	ND	0,001 (4)
		AA	1,000 (1271)	1,000 (51)	0,998 (1817)
		AG	0,000	0,000	0,002 (4)
		GG	0,000	0,000	0,000 (0,0)
c.-125A>C	AMa	A	0,998 (2539)	1,000 (102)	0,998 (3636)
	AMe	C	0,001 (3)	0,000	0,002 (6)
		AA	0,997(1268)	1,000 (51)	0,997 (1815)
		AC	0,002 (3)	0,000	0,003 (6)
		CC	0,000	0,000	0,000 (0,000)
c.-45C>G	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	G	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		CG	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		GG	No reportada	No reportada	0,000 (0,00)
c.-15G>C	AMa	G	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	C	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		GG	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		GC	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,000 (0,00)
c.-13C>T	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		CG	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		GG	No reportada	No reportada	0,000 (0,00)
c.1T>C	AMa	T	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	C	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		TT	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		TC	No reportada	No reportada	0,001(1)
		CC	No reportada	No reportada	0,000 (0,00)
c.128delC	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	-	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,999 (1820)

		C/-	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		-/-	No reportada	No reportada	0,000 (0,00)
c.-44G>A	AMa	G	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	A	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		GG	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		GA	No reportada	No reportada	0,001(1)
		AA	No reportada	No reportada	0,000 (0,00)
c.205delA	AMa	A	No reportada	No reportada	0,999 (3640)
	AMe	-	No reportada	No reportada	0,001 (2)
		AA	No reportada	No reportada	0,999 (1819)
		A/-	No reportada	No reportada	0,001(2)
		-/-	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.239C>T	AMa	C	No reportada	No reportada	0,998 (3636)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,002 (6)
		CC	No reportada	No reportada	0,997 (1815)
		CT	No reportada	No reportada	0,003 (6)
		GG	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.352G>A	AMa	G	No reportada	No reportada	0,9997 (3641)
	AMe	A	No reportada	No reportada	0,0003 (1)
		GG	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		GA	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		AA	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.195-30A>T	AMa	A	No reportada	No reportada	0,999 (3638)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,0011 (4)
		AA	No reportada	No reportada	0,998 (1817)
		AT	No reportada	No reportada	0,002 (4)
		TT	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.370-81_370-77del	AMa	GGCTG	0,839 (2135)	0,911 (93)	0,906 (3300)
	AMe	-	0,160 (407)	0,088 (9)	0,094 (342)
		GGCTG/ GGCTG	0,713 (907)	0,823(42)	0,817 (1488)
		GGCTG /-	0,252 (321)	0,176 (9)	0,178 (324)
		-/-	0,033 (43)	0,000	0,005 (9)
c.547+102A>G	AMa	T	0,962 (2446)	0,970 (99)	0,999 (3641)
	AMe	C	0,037 (96)	0,039 (4)	0,001 (1)
		TT	0,935(1187)	0,941 (48)	0,999 (1820)
		TC	0,056 (72)	0,058 (3)	0,001 (1)
		CC	0,009 (12)	0,000	0,000 (0,0)
c.547+51T>G	AMa	T	0,999 (2541)	0,990 (101)	0,998 (3633)
	AMe	G	0,000 (1)	0,009 (1)	0,002 (9)
		TT	0,0999 (1270)	0,980 (50)	0,995 (1812)
		TG	0,001 (1)	0,019 (1)	0,005 (9)
		GG	0,000	0,000	0,000 (0,0)
c.456C>T	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,001 (1)

		CC	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		TC	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		TT	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.408+6114A>G	AMa	A	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	G	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		AA	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		AG	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		GG	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.540C>A	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3638)
	AMe	A	No reportada	No reportada	0,001 (4)
		CC	No reportada	No reportada	0,998 (1817)
		CA	No reportada	No reportada	0,002 (4)
		AA	No reportada	No reportada	0,000 (0,00)
c.376T>C	AMa	T	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	C	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		TT	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		TC	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.632T>C	AMa	T	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	C	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		TT	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		TC	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.639+68T>C	AMa	T	0,905 (2301)	0,872 (89)	0,919 (3347)
	AMe	C	0,094 (241)	0,127 (13)	0,081 (295)
		TT	0,823(1047)	0,784 (40)	0,843 (1535)
		TC	0,162 (207)	0,176 (9)	0,152 (277)
		CC	0,013 (17)	0,039 (2)	0,005 (9)
c.978C>T	AMa	C	0,999 (2540)	1,000 (102)	0,998 (3636)
	AMe	T	0,000 (2)	0,000	0,002 (6)
		CC	0,998 (1269)	1,000(51)	0,997 (1815)
		CT	0,001 (2)	0,000	0,003 (6)
		TT	0,000	0,000	0,000 (0,0)
c.937C>A	AMa	C	0,997 (2535)	1,000 (102)	0,999 (3638)
	AMe	A	0,002 (7)	0,000	0,001 (4)
		CC	0,994 (1264)	1,000 (51)	0,998 (1817)
		CA	0,005 (7)	0,000	0,002 (4)
		AA	0,000	0,000	0,000 (0,0)
c.640-16T>C	AMa	T	0,835 (2142)	0,911 (93)	0,901 (3280)
	AMe	C	0,157 (400)	0,088 (9)	0,099 (362)
		TT	0,708 (900)	0,823 (42)	0,811 (1476)
		TC	0,255 (324)	0,176 (9)	0,180 (328)
		CC	0,036 (47)	0,000	0,009 (17)
c.999+68G>C	AMa	G	No reportada	No reportada	0,999 (3638)
	AMe	C	No reportada	No reportada	0,001 (4)
		GG	No reportada	No reportada	0,998 (1817)

		GC	No reportada	No reportada	0,002 (4)
		CC	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.796C>T	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3639)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,001 (3)
		CC	No reportada	No reportada	0,998 (1818)
		CT	No reportada	No reportada	0,002 (3)
		TT	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.648A>T	AMa	A	No reportada	No reportada	0,998 (3637)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,002 (5)
		AA	No reportada	No reportada	0,997 (1816)
		AT	No reportada	No reportada	0,003 (5)
		TT	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.802-24G>A	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		CT	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		TT	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.802-30_802-29delAA	AMa	AA	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	-	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		AA/AA	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		AA/-	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		-/-	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.1088G>A	AMa	G	No reportada	No reportada	0,999 (3640)
	AMe	A	No reportada	No reportada	0,001 (2)
		GG	No reportada	No reportada	0,999 (1819)
		GA	No reportada	No reportada	0,001 (2)
		AA	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.1145G>A	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3641)
	AMe	T	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		CC	No reportada	No reportada	0,999 (1820)
		CT	No reportada	No reportada	0,001 (1)
		TT	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)
c.1102C>T	AMa	C	0,999 (2541)	1,000 (102)	0,999 (3641)
	AMe	T	0,000 (1)	0,000	0,001 (1)
		CC	0,999 (1270)	1,000 (51)	0,999 (1820)
		CT	0,001 (1)	0,000	0,001 (1)
		TT	0,000	0,000	0,000 (0,0)
c.1079C>G	AMa	C	No reportada	No reportada	0,999 (3640)
	AMe	G	No reportada	No reportada	0,001 (2)
		CC	No reportada	No reportada	0,999 (1819)
		CG	No reportada	No reportada	0,001 (2)
		GG	No reportada	No reportada	0,000 (0,0)

AMa: Alelo Mayor

AMe: Alelo menor

Por disponibilidad de información de la base de datos seleccionada, sólo se logró hacer la comparación de las frecuencias poblacionales observadas en nuestro estudio contra las reportadas por la base de datos 1000 Genomes para las mujeres en la población general para 14 variantes. Los resultados del análisis se muestran a continuación:

Tabla 8. Resultado análisis estadístico de frecuencias poblacionales reportadas en el estudio vs. frecuencias reportadas en la base de datos 1000 Genomes en mujeres de la población general

Variante		Resultado prueba de Chi-Cuadrado (Nivel de significancia: $P < 0,05$)	
c.DNA	Clasificación	Frecuencia Alélica	Frecuencia Genotípica
c.-105T>C	Probablemente benigna	$P < 0,001$	$P < 0,001$
c.-30C>T	Benigna	$P = 0,870$	$P = 0,870$
c.-12G>A	Benigna	$P = 0,088$	$P = 0,049$
c.-10G>A	Probablemente benigna	$P < 0,001$	$P < 0,001$
c.8A>G	Probablemente benigna	$P = 0,148$	$P = 0,148$
c.-125A>C	Benigna	$P = 0,744$	$P = 0,744$
c.370-81_370-77del	Benigna	$P < 0,001$	$P < 0,001$
c.547+102A>G	Benigna	$P < 0,001$	$P < 0,001$
c.547+51T>G	Significado incierto	$P = 0,054$	$P = 0,054$
c.639+68T>C	Benigna	$P = 0,057$	$P = 0,027$
c.978C>T	Significado incierto	$P = 0,483$	$P = 0,483$
c.937C>A	Significado incierto	$P = 0,138$	$P = 0,138$
c.640-16T>C	Benigna	$P < 0,001$	$P < 0,001$
c.1102C>T	Significado incierto	$P = 1,000$	$P = 1,000$

De las 14 variantes comparadas 7 tenían un valor de $P < 0,05$, es decir, que se encontraron diferencias entre las frecuencias poblacionales estadísticamente significativas, todas ellas clasificadas como variantes probablemente benigna o benigna. Para 2 de estas, c.-12G>A y c.639+68T>C sólo se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas, pero no en las alélicas (Tabla 8).

Finalmente, Se realizó el análisis de Hardy-Weinberg, como resultado evidenciamos que todas las variantes aquí reportadas para la población en estudio se encontraban en equilibrio, es decir, que para ninguna variante analizada el valor de P en la prueba de chi cuadrado fue menor de 0,05 ($P > 0,05$) (Datos no mostrados).

7- DISCUSIÓN

La frecuencia de la EF en nuestra población en estudio fue del 1.37%. De las 25 mujeres diagnosticadas con EF 12 fueron remitidas por la especialidad de nefrología (48%), 7 desde la especialidad de genética (28%) y 5 desde reumatología (20%). Para una de las mujeres diagnosticadas no se pudo determinar la especialidad de remisión (4%); en otras palabras, cerca de la mitad de las mujeres diagnosticadas con EF presentaban compromiso renal asociado con la enfermedad. Siguiendo la línea de lo evidenciado con la población total, la mayoría eran provenientes de las principales ciudades y departamentos del país. De acuerdo con estos resultados se puede justificar que las mujeres con compromiso renal en alguna de los estadios tal como se indica en otros reportes para la EF son una población de alto riesgo. Según un reporte de la EF en América Latina con datos extraídos del Registro de Fabry (<http://www.fabryregistry.com>) al 01 de octubre de 2010 donde se incluyeron 333 pacientes provenientes de Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México, Perú, Uruguay y Venezuela, el 22% (37 de 166) de las mujeres en América Latina informaron haber experimentado un evento cardiovascular, renal o cerebrovascular significativo, a una edad media de 44 ± 12.3 años. El 2% de las mujeres (4 de 166) tuvo un evento renal, con una edad media de $41 \pm 6,8$ años. Entre estos, 2 de las 4 mujeres recibieron trasplantes de riñón. Respecto a las manifestaciones cerebrovasculares el 2% de las mujeres (3 de 166) informaron haber tenido un accidente cerebrovascular, a una edad media de 40 ± 8.4 años. El 5% de las mujeres (8 de 166) informaron un ataque isquémico transitorio (AIT) (118). En un estudio de tamizaje para la EF en población en diálisis en Brasil durante 18 meses, se pudo observar que para 10.089 mujeres estudiadas la frecuencia de la EF fue de 0.1%. A pesar de que el estudio implicaba que las pacientes tuvieran insuficiencia renal en *hemodiálisis o diálisis peritoneal*, los datos aquí reportados son consistentes con nuestros hallazgos pues a pesar de que sólo se conozca acerca de un compromiso renal de las mujeres incluidas en nuestro estudio, la frecuencia aquí reportada de EF en mujeres con compromiso renal fue de 1.4% ($12 = \text{mujeres con diagnóstico de EF con compromiso renal} / 832 = \text{número total de mujeres con compromiso renal incluidas en el estudio} * 100$), teniendo en cuenta que nuestro tamaño de muestra es cerca de 10 veces menor al del estudio en Brasil. En otras poblaciones como Rusia la frecuencia reportada de EF en mujeres en diálisis es de 0.05% ($n=2021$ mujeres) (119) y en España 0.49% ($n=1411$ mujeres) (120) lo que justifica que cada país plantee estrategias de detección temprana de acuerdo a su población y de esta manera se contribuya a disminuir los costos de la enfermedad al sistema de salud y se proporcione un tratamiento oportuno adecuado. En referencia a otras poblaciones de alto riesgo reportadas en la literatura como los pacientes con accidentes cerebrovasculares (ACV) tempranos y la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) (121), en nuestra población en estudio no se logró observar esta correlación con la EF puesto que las mujeres remitidas de las especialidades de neurología y cardiología no estaban bien representadas en nuestra muestra.

VARIANTES CLASIFICADAS COMO PROBABLEMENTE PATOGÉNICAS

De manera general, las dos variantes reportadas como probablemente patogénicas ubicadas en el exón 2 y exón 7 son de tipo missense y están ubicadas en regiones codificantes del gen.

La variante c.239G>A está ubicada en el exón 2 y es de tipo missense. Genera un cambio en la proteína en el residuo 80 de una glicina por un ácido aspártico. Esta variante en nuestro estudio se reportó en 6 mujeres, 4 de ellas pertenecientes a una misma familia. 4 fueron remitidas por especialistas en nefrología, 1 de genética y para 1 no se disponía de la información. La patogenicidad de la variante fue soportada debido a que estas mujeres portadoras tenían un familiar hombre afectado con la misma variante y con diagnóstico de EF previo. Es una variante rara en la población general, reportada como probablemente patogénica (2014) y de significado incierto (2017) en ClinVar. El análisis predictivo de los programas de bioinformática reportó un efecto deletéreo. Varios reportes en la literatura han descrito una asociación de la variante con presencia de actividad enzimática residual significativa entre el 28 y 30% (122, 123), información que es consistente en un individuo hombre no relacionado perteneciente a este estudio; además de una ligera elevación de los niveles de Lyso Gb3 en sangre (tanto hombres como mujeres) (122).

Se reportó por primera vez la variante c.1079G>C ubicada en el exón 7 en dos mujeres probablemente pertenecientes a una misma familia. Una fue remitida por un nefrólogo y la otra por un genetista. Esta es una variante tipo missense que va a generar un cambio de una glicina por una alanina en el residuo 360 de la proteína. Los datos de frecuencias poblacionales indican que es una variante rara y 5 de 6 programas de bioinformática predicen un efecto deletéreo. Para las dos mujeres aquí reportadas de 15 y 27 años procedentes del departamento de Antioquia, se reportaron características clínicas muy variables. Para la adolescente de 15 años, los primeros síntomas se evidenciaron a la edad de 6 años con presencia de hematuria ocasional, seguido de acroparestesias, tinnitus y episodios de depresión a los 11 años, hiperhidrosis a los 13 años, disnea, fatiga ocasional y edema de miembros inferiores a los 14 años; mientras que para la paciente de 27 años, el cuadro clínico de presentación se caracterizó por fotofobia y miopía a los 14 años, anemia ferropénica a los 18 años que requirió transfusión sanguínea en una ocasión, disestesias a los 24 años, sensación de hipertermia, aparición de hematomas ocasionales sin causa evidente, episodios ocasionales de sangrado de encías y hematuria a los 25 años, rectorragia, epistaxis ocasionales y neuralgia del trigémino a los 27 años. El tiempo que transcurrió desde el inicio de los primeros síntomas hasta el diagnóstico molecular mediante secuenciación del gen GLA estuvo entre los 9 y 13 años respectivamente. Reportes en la literatura describen que el riesgo de un diagnóstico retrasado o incorrecto para la EF, en consecuencia, es alto. El período de tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico molecular es de aproximadamente 13 años en hombres y hasta 17 años en mujeres (70), esto debido a una mayor heterogeneidad en la presentación de los síntomas en las mujeres afectadas, así como en la edad de inicio de estas incluso dentro de una familia afectada con una misma mutación. En la literatura se describió una variante en un hombre italiano en la misma posición descrita aquí c.1079G>A (p.Gly360Asp) donde se asoció con una actividad enzimática residual <1% así como a una pérdida de la función de

la proteína que se correlacionó positivamente con la afectación renal del paciente que recibió tratamiento temprano con terapia de reemplazo enzimático, previniendo así la progresión de la enfermedad (124).

VARIANTES PATOGENICAS

Las 7 variantes reportadas como patogénicas en este estudio estaban ubicadas en regiones codificantes. 4 eran de tipo missense (exones 1, 3, 5 y 7), 2 frameshift (exón 1, 2) y 1 nonsense (exón 5).

La variante c.648T>A ubicada en el exón 6, fue reportada en 5 mujeres probablemente todas ellas pertenecientes a una misma familia remitidas por la especialidad de reumatología. La variante genera un cambio de un residuo de triptófano por un codón de parada (nonsense) en la posición 216 de la proteína. No se reportan datos poblacionales en las bases de datos. El análisis bioinformático predice que la variante es causante de enfermedad. En 3 de las 5 mujeres con reporte de la variante se describieron algunos signos y síntomas, para las 2 restantes no se reportó sintomatología hasta la fecha del diagnóstico. Las mujeres con evidencia de manifestaciones clínicas tenían 28, 37 y 47 años. En la mujer de 28 años se describió hipohidrosis desde los 12 años acompañada de fatiga e intolerancia ejercicio, acroparestesias con crisis de dolor desde los 15 años, tinnitus a los 27 años con proteinuria y episodios crisis de ansiedad que han requerido manejo por urgencias. En la mujer de 37 años se reportó hiperhidrosis e intolerancia al frío a los 16 años junto con acroparestesias y angioqueratomas miembros inferiores. Y para la mujer de 47 años se describió catarata bilateral y tinnitus a los 36 años, hiperhidrosis e intolerancia al frío a los 46 años acompañada de taquicardia. En una de ellas el análisis de la medición enzimática fue normal. No se han descrito casos para la EF con esta variante.

La variante c.540G>T ubicada en el exón 3 se reportó en 3 mujeres, 2 de ellas posibles familiares. Todas remitidas de la especialidad de nefrología. La variante genera un cambio en la posición 180 de la proteína de un residuo de leucina por una fenilalanina. No se ha reportado la frecuencia de esta variante en las bases de datos poblacionales. ClinVar y Fabry Database la clasifican como patogénica. Los programas de bioinformática predicen un efecto deletéreo en la proteína. En la literatura se reportó una variante diferente que afecta el mismo residuo aminoacídico clasificada como patogénica en un individuo Rumano afectado por la enfermedad, mencionan que esta variante involucra un residuo altamente conservado. La variante estuvo relacionada con presencia de actividad enzimática residual (125). Otros estudios han reportado la variante como patogénica con elevación de Liso-Gb3 en sangre tanto en hombres como mujeres (122).

La variante c.796G>A ubicada en el exón 5 fue reportada en 3 mujeres, 2 de ellas posibles miembros de una misma familia remitidas por un médico genetista, y la restante por nefrología. La variante genera un cambio en el residuo 266 de la proteína de un ácido aspártico por una asparagina. No se reportan datos en la base de datos de frecuencias poblacionales. El análisis de bioinformática clasificó la variante como patogénica debido a su alta probabilidad de causar enfermedad. Para las 2 mujeres de 9 y 16 años se reportó hiperhidrosis y acroparestesias desde los 6 años y episodios de diarrea ocasional 4 veces al

año que ceden espontáneamente desde los 8 años. Hiperhidrosis desde los 12 años, cefalea frecuente tipo pulsátil asociada a aura con visión borrosa 3 veces a la semana, tinnitus y disminución de la audición desde los 14 años junto con edema de miembros inferiores, respectivamente. Se ha reportado la variante en pacientes con EF asociado al fenotipo clásico (126).

La variante c.1088G>A ubicada en el exón 7 fue reportada en 2 mujeres posibles miembros de una misma familia remitidas por un médico genetista y un nefrólogo. La variante produce un cambio en el residuo 363 de la proteína de una arginina por una histidina. Esta es una variante reportada en ClinVar como patogénica, y en LOVD (Leiden Open Variation Database) se encuentran tres reportes con diferentes clasificaciones (patogénica, probablemente patogénica y significado incierto). El análisis bioinformático de predicción de patogenicidad indica un programa como variante patogénica y 5 programas la predicen como neutral o benigna. En la literatura se describe un análisis del efecto biológico de esta variante con los programas V7 y V8 diseñados para evaluar el efecto de cambios en el gen *GLA* y reportaron que las predicciones señalaban un efecto patológico (127). Otros autores la reportan como variante patogénica asociada a presentación renal de la EF (128). La variante se reportó en un hombre de 40 años con enfermedad renal e historia familiar de enfermedad renal, hipertrofia ventricular izquierda leve, depósitos corneales, actividad enzimática en leucocitos baja y aumento de niveles plasmáticos de LisoGb3. Se hizo diagnóstico de la EF en el caso índice y en el estudio familiar se identificaron más afectados (127).

La variante c.1A>G ubicada en el exón 1 genera un cambio en el primer residuo de la proteína de una metionina por una valina. Fue reportada en 1 mujer remitida desde la especialidad de nefrología. Esta es una variante rara, que no se encuentra reportada en las bases de datos poblacionales. ClinVar, Human Gene Mutation Database, Leiden Open Variation Database y Fabry Database la reportan como patogénica. Los programas bioinformáticos de predicción de patogenicidad mostraron que esta variante afecta el primer codón del transcrito y por tanto cambia el sitio iniciador de la transcripción. En la literatura se reportó un hombre portador de esta variante con proteinuria, acroparestesias, dolor abdominal y déficit de actividad enzimática de α -Gal-A en leucocitos con diagnóstico de EF a los 28 años (129).

La variante c.128delG ubicada en el exón 1 fue reportada en una mujer remitida desde la especialidad de genética. La variante c.128delG produce el cambio de una glicina por una alanina en la posición 43 de la proteína, cambiando el marco de lectura y llevando a un codón prematuro de parada y por lo tanto a una proteína truncada (p. Gly43Alafs *78). La variante no fue encontrada en bases de datos poblacionales y ha sido reportada como patogénica en ClinVar. El análisis bioinformático predice un efecto patogénico de la variante c.128delG. Un reporte en la literatura describió el caso de un varón de 12 años afectado con la misma variante con episodios de fiebre cada 4 meses sin síntomas infecciosos asociados con una duración de 3 a 5 días y mejoría espontánea acompañada de episodios de dolor

ardiente, descritos como "sensación de ardor" en plantas de los pies y palmas, presencia de córnea verticillata, niveles de Lyso Gb3: 112 ng / ml (<0,8 ng / ml) mediante cromatografía líquida de alta resolución y actividad enzimática en DBS de 0,48 nmol/ml/h (130).

Se describió por primera vez la variante c.205delT ubicada en el exón 2 en dos mujeres posiblemente relacionadas. Una fue remitida desde un especialista en nefrología y la otra de genética. Esta variante genera una delección de una timina en la posición 205 del ADNc generando un cambio de una fenilalanina por una serina en el residuo aminoacídico de la posición 69 de la proteína y un cambio en el marco de lectura que produce posteriormente un codón de parada prematuro (p.Phe69SerFs*52). Al ser una variante que no ha sido reportada previamente, no existe información reportada en bases de datos de la enfermedad ni bases de datos poblacionales. Los programas de bioinformática la reportan con un efecto deletéreo. En una de las mujeres afectadas de 53 años se describieron antecedentes de acroparestesias, proteinuria e historia familiar de afectados.

Del total de las variantes clasificadas como probablemente patogénica (2) y patogénicas (7), es decir, entre las variantes reportadas en las mujeres con diagnóstico molecular confirmado de EF se observaron que 6 eran de tipo missense, 2 frameshift y 1 nonsense. Tal como se reporta en otros estudios, existe una mayor frecuencia de variantes tipo missense que afectan el gen *GLA* respecto a otro tipo de alteraciones genéticas (131, 132) y pueden estar asociadas tanto al fenotipo clásico como atípico o tardío (132). La variante previamente no reportada c.205delT ubicada en el exón 2 que se genera por una delección de una timina en la secuencia codificante hizo parte de las 2 variantes que generaban la aparición temprana de un codón de parada y a su vez alteraciones en el marco de lectura. Se ha reportado en la literatura que el exón 2 es un hot-spot o punto caliente para delecciones en el gen *GLA* (133). Respecto al hot-spot ubicado en los dinucleótidos CpG reportados en la literatura (22, 23), en nuestro estudio la variante c.1079G>C clasificada como probablemente patogénica previamente no descrita se reportó en una de estas regiones en el exón 7. Esto permite colocar de relevancia la heterogeneidad referente a las regiones de reporte de variantes descritas para este gen. En nuestro estudio las variantes clasificadas como probablemente patogénica y patogénica se identificaron en los exones 1, 2, 3, 5 y 7 de manera casi que homogénea, en cada exón 2 variantes excepto para el exón 3 donde sólo se reportó una variante.

VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VUS)

En el presente estudio se reportaron 29 mujeres de las 1821 incluidas en el estudio, aproximadamente el 1.6%, con una variante de significado incierto representadas en 11 variantes diferentes. Del reporte de las 29 variantes clasificadas como VUS, 14 eran remitidos por la especialidad de nefrología, es decir, que presentaban compromiso renal, 5 de neurología, 4 de medicina física y rehabilitación, 2 de medicina general y 2 de reumatología, 3 de estas de especialidades indeterminadas. Las variantes estuvieron distribuidas en la región 5'UTR, intrones 3, 5 y exones 2,3,4,6 y 7 del gen *GLA*. Para la mayoría de las variantes los reportes en la literatura presentaban interpretación conflictiva

de la patogenicidad, es decir no existía la suficiente evidencia para descartar o asociarla con la EF de ahí la justificación para su clasificación. En otros casos como las variantes reportadas en las regiones 5'UTR e intrónicas debido a la difícil interpretación y las limitantes de análisis para variantes reportadas en estas regiones debieron ser clasificadas dentro de esta categoría. Para las 2 variantes clasificadas como VUS de tipo silenciosas o sinónimas la escasa información y la alteración de una de estas del sitio de splicing de la proteína sin evidencia funcional soportaron su clasificación. Sólo para la variante c.632T>C ubicada en el exón 4 reportada por primera vez en este estudio su clasificación estuvo basada en la escasa información relacionada con esta y a la falta de evidencia que soporte su relación con la enfermedad.

Variantes en regiones 5' UTR e intrónicas

Las variantes c.-45G>C y c.-13G>A se encuentran ubicadas en la región reguladora 5'UTR, adicional a esto, la variante c.-45G>C se encuentra ubicada en un hot-spot ubicado en los dinucleótidos CpG reportados en la literatura (22, 23). La variante c.547+51A>C está ubicada en el intrón 3 y la variante c.802-30_802-29delTT en el intrón 5 es decir, en regiones no codificantes del gen lo que dificulta su interpretación.

Variantes missense

Las variantes de tipo missense clasificadas como VUS son c.352C>T ubicada en el exón 2, c.376A>G en el exón 3, c.632T>C en el exón 4, c.937G>T en el exón 6 y c.1102G>A en el exón 7.

La variante c.352C>T ubicada en el exón 2 es una variante rara que genera un cambio de un residuo de arginina en la posición 118 de la proteína por una cisteína. (p.Arg118Cys). Cuatro de seis programas de bioinformática predicen un efecto dañino sobre la proteína. Esta variante es reportada en ClinVar con interpretaciones conflictivas de patogenicidad, mientras que en Human Gene Mutation Database, Leiden Open Variation Database y Fabry Database la reportan como patogénica. En un estudio en 453 muestras de mujeres brasileras reportado en la literatura se encontró esta variante en dos mujeres y fue clasificada como Patogénica (134). Otros autores evaluaron clínica, bioquímica e histopatológicamente a individuos y familias con miembros portadores de esta variante, tanto hombres como mujeres heterocigotas e incluyendo 3 mujeres homocigotas, concluyeron que la variante es No patogénica. Se ha descrito que la variante puede tener un efecto modulador del riesgo multifactorial de enfermedad cerebrovascular, y algunos portadores podrían presentar únicamente angioqueratomas (135).

La variante c.376A>G en el exón 3 va a generar el cambio de un residuo de serina en la posición 126 de la proteína por una glicina (p.Ser126Gly). Tres de cinco algoritmos de predicción de patogenicidad predicen un efecto deletéreo causante de enfermedad para esta variante. Según su frecuencia es una variante rara y se han reportado otras variantes patogénicas que afectan este residuo aminoacídico. En ClinVar se encuentra reportada con interpretaciones conflictivas de patogenicidad y en Leiden Open Variation Database con efecto desconocido / variante de significado incierto. Mientras que en Human Gene Mutation Database y Fabry Database se encuentra como patogénica causante de la

enfermedad. Esta variante fue reportada en una mujer de 41 años con accidente cerebrovascular isquémico y se propone que pueda ser identificada como una variante asociada a EF de inicio tardío (136). Otros autores determinaron en ensayos in vitro una actividad enzimática residual de aproximadamente 50% para esta variante, y reportan niveles plasmáticos de Liso Gb3 normales en 8 mujeres y 4 hombres portadores de esta variante (94).

La variante c.937G>T en el exón 6 genera un cambio en el residuo 313 de la proteína de un ácido aspártico por una tirosina (p.Asp313Tyr). Es una variante rara debido a la baja frecuencia reportada en las bases de datos poblacionales. En cuanto a las bases de datos de enfermedad, "ClinVar" reporta la significancia clínica de esta variante como "interpretación conflictiva de la patogenicidad" y relacionada con EF, cardiomiopatía hipertrófica familiar primaria y muerte súbita inexplicada; The Human Gene Mutation Database presenta esta variante con efecto interrogado para el fenotipo de EF; en Leiden Open Variation Database respecto a su patogenicidad se encuentran reportes de todo tipo (benigna/probablemente benigna/significado incierto/probablemente patogénica y patogénica) y en Fabry Database es reportada como patogénica y también como benigna(pseudodeficiencia). Adicionalmente, 5 de 6 programas de bioinformática predicen un efecto dañino de la variante. Actualmente no existe claridad acerca del efecto de la variante p.Asp313Tyr en la salud de los individuos portadores debido a que aparentemente las manifestaciones clínicas no son las del fenotipo clásico y la medición de la actividad de la enzima muestra una importante actividad residual. Esta evidencia ha hecho que algunos médicos e investigadores la consideren un alelo de pseudodeficiencia. Se reportó en la literatura un control femenino normal como portadora heterocigota de esta variante con actividad enzimática baja en plasma y leucocitos. Los estudios de expresión in vitro mostraron que la variante tenía 76% de la actividad enzimática normal y los autores concluyeron que se trataba del primer polimorfismo identificado en la secuencia codificante del gen GLA (137). Otros reportaron para esta variante aproximadamente 60% de la actividad enzimática normal in vitro, y con actividad deficiente a pH neutro que resultaba en actividad enzimática plasmática baja. Además, realizaron una predicción bioinformática del efecto de la variante, encontrando que no alteraba de manera importante la estructura de la enzima, sin embargo, vale la pena aclarar que se basaron en la estructura cristalográfica de la alfa galactosidasa B del pollo (138). Esta variante ha sido asociada a EF con manifestaciones cardíacas. En la literatura se describen dos pacientes españoles en hemodiálisis, un hombre y una mujer, ambos con hipertrofia ventricular izquierda y disfunción valvular. La actividad enzimática en leucocitos del paciente masculino fue del 39% del promedio de los controles (139). También ha sido asociada con accidente cerebrovascular de origen desconocido. Durante la evaluación de una familia con lesiones de la sustancia blanca y portadores de esta variante, se describió que esta variante estaba involucrada en daño neurológico con lesiones multifocales de la sustancia blanca con posible afectación de pequeño vaso (140).

La variante c.1102G>A ubicada en el exón 7 genera el cambio de una alanina en la posición 368 de la proteína por una treonina (p.Ala368Thr). Es una variante rara reportada en ClinVar con interpretaciones conflictivas de patogenicidad (probablemente benigna/significado incierto), en Leiden Open Variation Database como con efecto desconocido y en Fabry Database es reportada como patogénica. El análisis de predicción de patogenicidad bioinformático pronostica que 2 programas la clasifican como causante de enfermedad y 4 programas la predicen como neutral o benigna. En la literatura se indica que esta variante es frecuente en individuos anotados como positivos para EF en tamizaje en centros de diálisis en Brasil, y especialmente frecuente en los pacientes que tenían depresión y en los que tenían enfermedad cardíaca (141). Otros reportaron esta variante en un hombre de 73 años con actividad enzimática disminuida en DBS en un tamizaje en pacientes con hemodiálisis (142).

La variante c.632T>C en el exón 4 fue reportada por primera vez en este estudio. Esta variante genera el cambio de un residuo de fenilalanina por una serina en la posición 211 de la proteína (p.Phe211Ser). Para esta variante no se disponían de evidencia funcional, no estaba registrada en bases de datos y 4 de 6 programas de probabilidades bioinformáticas la clasificaron como benigna.

Variantes silenciosas

Se identificaron dos variantes silenciosas clasificadas como VUS, la variante c.456C>T ubicada en el exón 4 y c.978G>A en el exón 6.

La variante c.456C>T ubicada en el exón 4 no cambia el aminoácido en la proteína (p.Tyr152Tyr). No ha sido reportada en la base de datos poblacional 1000 genomas y tampoco se encuentra en las bases de datos ClinVar, Human Gene Mutation Database, Leiden Open Variation Database ni Fabry Database. Tres algoritmos bioinformáticos predicen su efecto biológico como benigno. Sin embargo, debido a la falta de información sobre esta, fue clasificada como de Significado Incierto.

La variante c.978G>A es una variante silenciosa rara ubicada en el exón 6 (p.Lys326Lys). De las 6 mujeres con reporte de esta variante, 2 de ellas pertenecían a la misma familia. Los programas de predicción de variación del splicing mostraron que esta variante afecta el sitio de splicing creando un nuevo sitio donador. ClinVar la reporta a partir de varias fuentes como benigna o probablemente benigna.

Desde la disponibilidad de la terapia de reemplazo enzimático (TRE) con α -galactosidasa A recombinante humana (agalsidasa alfa, Shire HGT y agalsidasa beta, Genzyme Corp., una compañía de Sanofi), ha aumentado el número de estudios de detección en poblaciones de alto riesgo (143-145), así como de detección en recién nacidos (28, 29, 146). Se ha descrito en la literatura que en los sujetos identificados por estudios de detección/tamizaje, con frecuencia se les describe un mayor número de variantes tipo VUS en el gen GLA, es decir, la patogenicidad de la variante no está comprobada o descartada y hay un diagnóstico incierto de EF (147). Una revisión sistemática sobre la detección de la EF y la prevalencia de individuos con variantes genéticas de significado incierto permitió evidenciar que a medida

que el número de estudios de detección de la enfermedad aumenta desde el año 2001, el número de pacientes con estas variantes en *GLA* de significado incierto también aumenta en consecuencia. Así mismo, describieron que muchos estudios (aproximadamente el 45%) fueron financiados por industrias que comercializan TRE, lo cual puede haber contribuido a la creciente cantidad de estudios que se realizaron para la detección de la EF después de que ERT estuviera disponible comercialmente (148). Esta teoría es consistente con los resultados observados en este estudio. Del total de mujeres (1821) incluidas en el estudio, se pudo observar que en el 1.6% (29 mujeres) se identificó una variante clasificada como *VUS*. Una de las grandes problemáticas del reporte de este tipo de variantes es causar una angustia considerable para el paciente y su familia, además de que se puede llevar a un asesoramiento inadecuado e inicio de tratamiento con una costosa terapia de reemplazo enzimático si es el caso (147).

ANÁLISIS IN SILICO VARIANTES VUS

Muchos estudios buscan dilucidar la patogenicidad de las variantes *VUS* con ayuda de herramientas bioinformáticas al no disponer de datos complementarios como evidencia clínica y la historia clínica de los individuos, otras familiares mujeres afectadas y casos índice de varones ya que estos proporcionarían evidencia más sólida que soporte la patogenicidad de estas; además de disponer de resultados enzimáticos dentro de los valores normales (149) en lo que a mujeres con sospecha de EF concierne. A las variantes *VUS* aquí reportadas tipo missense o de cambio de sentido se les realizó además de los análisis reportados en la metodología para la clasificación de variantes convencional, un análisis *in silico* que permitiera evaluar posibles cambios estructurales de la proteína con las diferentes variantes versus la estructura de la proteína descrita en la literatura (wild type) (19). De las 5 variantes tipo missense analizadas (c.937G>T, c.632T>C, c.352C>T, c.1102G>A, c.376A>G) se pudo determinar que, sólo la variante c.632T>C se encontraba en un rango menor a 20°A de los sitios activos de la proteína. Según reportes previos de análisis de variantes tipo *VUS*, cambios en residuos ubicados en radios menores a 20°A de los sitios activos tienen una mayor probabilidad de afectar la funcionalidad de la proteína (150). Las variantes c.937G>T, c.632T>C y c.352C>T estaban ubicadas en residuos semi-conservados. Se ha descrito que las mutaciones patogénicas suelen implicar posiciones conservadas dentro de una familia de proteínas, ya que implican residuos esenciales para la estructura o función de la proteína (151). De hecho, se ha demostrado que la probabilidad de que una mutación aleatoria pueda causar una enfermedad genética aumenta con el grado de conservación del sitio (152). Todas excepto c.632T>C tenían una alta probabilidad de causar desórdenes estructurales y todas sin excepciones disminuían la estabilidad de la proteína. Estudios previos han descrito que el efecto más frecuente de las variantes tipo missense es la alteración del plegamiento de las proteínas y la disminución de la estabilidad (153); sin embargo, estos modelos *in silico* no son definitivos y por lo tanto no proporcionan evidencia suficiente para la toma de decisiones clínica. Modelos experimentales *in vitro* donde se inducen las variantes y comparan contra los modelos naturales podrían ofrecer una visión más precisa y fiable respecto a la patogenicidad de la variante en estudio (149).

CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO BIOQUÍMICO

Para 4 de las 9 variantes clasificadas como probablemente patogénica y patogénica se logró hacer la correlación con el fenotipo bioquímico para la EF. Para las restantes, no se logró encontrar información en las bases de datos de porcentaje de actividad enzimática residual asociado; esto teniendo en cuenta que dos de ellas fueron reportadas por primera vez en este estudio. Los valores de referencia fueron tomados a partir de un estudio previo de detección selectiva de enfermedades de almacenamiento lisosomal en sujetos colombianos de alto riesgo (116).

Entre las dos variantes clasificadas como patogénica, sólo para la variante c.239G>A (p.Gly80Asp) se encontró una correlación del genotipo con presencia de actividad enzimática residual entre el 10% y 30%. Varios reportes en la literatura para esta variante la han asociado con presencia de actividad enzimática residual significativa entre el 28 y 38% en hombres (122, 123). Para la variante c.1079G>C reportada aquí por primera vez, una de las mujeres afectadas tenía resultado de medición de actividad enzimática disminuida en leucocitos pero no en DBS, adicional a esto se pudo determinar que las mujeres afectadas con esta variante presentaban una sintomatología de inicio temprano con una heterogeneidad fenotípica.

En las variantes clasificadas como patogénica, sólo la variante c.796G>A (p.Asp266Asn) se correlacionó con actividad enzimática residual <1% y las variantes c.540G>T (p.Leu180Phe) y c.1088G>A (p.Arg363His) con presencia de actividad enzimática residual entre el 10% y 30%. Para las variantes c.1A>G, c.128delG, c.205delT y c.648T>A no se logró hacer la correlación con el fenotipo bioquímico debido a falta de reportes de actividad enzimática residual. Sin embargo, se ha descrito en la literatura que la variante c.1A>G está asociada con disminución de la actividad enzimática y fenotipo clásico (129, 154). La variante c.128delG fue descrita en un varón de 12 años colombiano con actividad enzimática en DBS disminuida y manifestaciones clínicas compatibles con el fenotipo clásico descrito para la EF, así mismo presentaba elevación significativa de los niveles de Lyso Gb3 (130). La variante c.205delT descrita aquí por primera vez se reportó para una de las mujeres afectadas presencia de actividad enzimática en DBS y leucocitos ligeramente disminuida con antecedentes de acroparestesias, proteinuria e historia familiar de afectados. Para la variante c.648T>A no se encontraron reportes en la literatura sobre medición de actividad enzimática residual asociada. Es importante resaltar que la correlación del genotipo con el fenotipo bioquímico en la EF debe hacerse con las actividades enzimáticas descritas en hombres esto debido a la contradicción en los reportes en la literatura respecto a la sensibilidad de la medición de la actividad enzimática en mujeres a causa de la inactivación aleatoria del cromosoma X (34, 66, 67, 77).

Respecto a las mujeres de nuestro estudio con reporte de actividad enzimática, de 7 mujeres con reporte de variante clasificada como patogénica o probablemente patogénica 5 tenían valores de actividad enzimática en leucocitos y DBS dentro de los valores normales equivalentes al 71% no siendo las mismas en los dos casos, con una mediana en leucocitos de 70 nmol/mg prot/h con un rango de [14,6-161,8] y en DBS de 3,8 nmol/ml/h. En una

cohorte de 44 mujeres con diagnóstico confirmado de EF reportada en la literatura se determinó que la actividad de α -Gal A en leucocitos fue de 14.6 ± 19.3 nmol /mg de prot/h (21). A pesar de que existen reportes en la literatura que indican que no existen diferencias entre más mediciones de actividad enzimática entre y hombres y mujeres sanos tanto en leucocitos como en DBS (29, 155), es recomendable determinar los rangos normales de actividad enzimática en las mujeres de nuestra población.

Se ha reportado que la TRE con α -GAL A recombinante, que incluye agalsidasa-alfa (Replagal, Shire) y agalsidase-beta (Fabrazyme, Genzyme), da como resultado el aclaramiento de Gb3 subcelular, lo que lleva a la estabilización o al menos una disminución de la progresión de la enfermedad en hombres y mujeres (84, 156, 157). Mientras que la aparición de los primeros síntomas (dolor asociado con Fabry, angioqueratoma, dolor abdominal, córnea verticillata, hipo o anhidrosis) en hombres hemigotos afectados con actividad de α -GAL A enzimática baja o ausente comienza en la primera infancia, las mujeres heterocigotas pueden mostrar mucha más variabilidad en inicio de la enfermedad, severidad y progresión. Debido a este cuadro clínico heterogéneo en las mujeres, el momento óptimo para el inicio de la TRE sigue siendo controvertido (157). Las pautas y recomendaciones actuales de la EF sugieren el inicio de la TRE en mujeres con EF después del inicio de las primeras complicaciones renales, cardíacas y / o cerebrales típicas de la EF, o en la enfermedad rápidamente progresiva (92, 158). Según Biegstraaten y sus colegas, la TRE debe considerarse en mujeres con fenotipo clásico y no clásico si hay presencia de albuminuria / proteinuria, tasa de filtración glomerular estimada (TFG) <90 ml / min / 1.73 m², hipertrofia cardíaca, signos de alteraciones del ritmo cardíaco, lesiones cerebrales en la materia blanca, ataque isquémico transitorio o accidente cerebrovascular, dolor relacionado con la EF o síntomas gastrointestinales (GI) (158). Sin embargo, dado que se asume que la TRE es más efectiva cuando se inicia antes del inicio de la fibrosis u otro daño tisular irreversible (93, 159), esta estrategia podría resultar en un dilema terapéutico. Por lo tanto, la medición de la liso-Gb3 se ha discutido como un marcador de pronóstico para la gravedad de la enfermedad y la progresión. Si bien este concepto se establece en los hombres, la relevancia clínica de la liso-Gb3 para las pacientes femeninas aún no está clara (160, 161).

Galafold® (migalastat), es un medicamento huérfano autorizado por la Agencia Europea del medicamento (EMA) en junio de 2016 para el tratamiento a largo plazo de adultos y adolescentes mayores de 16 años con un diagnóstico confirmado de EF (deficiencia de α -galactosidasa A) y portadores de mutaciones susceptibles de responder al tratamiento. A la fecha se han reportado aproximadamente 269 mutaciones susceptibles y 581 no susceptibles, de un total de 850 mutaciones evaluadas con la prueba HEKGLP (Human Embryonic Kidney-Good Laboratory Practice) (162). De las 9 variantes clasificadas como probable patogénica y patogénica sólo la variante c.1088G>A (p.Arg363His) es susceptible al medicamento; las demás o no son susceptibles o simplemente no se han testeado.

En referencia a la población general, se pudo observar que cualquier mujer sin importar la edad fue susceptible de sospecha para la EF y así mismo, de solicitud de análisis de secuenciación del gen GLA. Como se pudo observar en la descripción demográfica de la población en estudio, todas las mujeres eran procedentes de regiones ubicadas en el noroccidente del país, principalmente de grandes ciudades, lo cual indiscutiblemente crea un sesgo en el estudio que estaría más relacionado con las barreras de acceso de zonas más rurales a los servicios de salud y especialmente a los diferentes servicios de consulta especializada lo que está justificado con el porcentaje de remisión de las diferentes especialidades médicas al análisis de secuenciación. El 46% del total de los individuos remitidos para el análisis lo hicieron desde la especialidad de nefrología, seguida por neurología con 16% y medicina y rehabilitación física con 15%. Sólo el 3% del total de individuos fue remitido desde medicina general dejando ver la baja captación de posibles casos desde esta área (Gráfica 1).

8- CONCLUSIÓN

Aquí reportamos por primera vez la frecuencia de la EF en mujeres colombianas con sospecha. Nuestro estudio pudo determinar que evidentemente en Colombia existe una población de alto riesgo de especial interés en relación con la EF tal y como lo describen otros reportes en la literatura. Estos resultados soportan la teoría de que el gen GLA es altamente polimórfico con reporte de variantes privadas que crean retos para el diagnóstico por lo que se recomienda siempre realizar una correlación con la historia clínica del paciente apoyado en pruebas bioquímicas que permitan sumar evidencia molecular y poder soportar el diagnóstico de la enfermedad. La asesoría genética en la EF es de vital importancia para detectar posibles familiares afectados de manera temprana evitando así las complicaciones de la enfermedad y disminuyendo los costos al sector salud.

9- PERSPECTIVAS

- PUBLICACIÓN DE RESULTADOS EN LA BASE DE DATOS PÚBLICA “*LOVD v.3.0 – Leiden Open Variation Database*”
Los resultados obtenidos a partir de este estudio serán publicados en la base de datos pública *LOVD v.3.0 – Leiden Open Variation Database* contribuyendo a la ampliación del conocimiento referente a la EF y a la difusión de los nuevos hallazgos reportados para la enfermedad en nuestra población.
- Los datos aquí reportados alimentaran el *Registro Colombiano de la Enfermedad de Fabry en Colombia*.
- Los análisis *in vitro* de las variantes clasificadas como *VUS* podrían ayudar a descifrar las implicaciones funcionales de estas variantes sobre la proteína que se ha visto son reportadas con alta frecuencia en este tipo de estudios logrando así disminuir la incertidumbre relacionada con estas.

10- LIMITACIONES

- Se evidenció una falta de información en relación con la población de estudio.
- Se realizó la búsqueda de variantes únicamente en la región codificante del gen *GLA* (exones).

11- BIBLIOGRAFÍA

1. Cox TM, Cachón-González MB. The cellular pathology of lysosomal diseases. *J Pathol.* 2012;226(2):241-54.
2. Juchniewicz P, Kloska A, Tylki-Szymańska A, Jakóbkiewicz-Banecka J, Węgrzyn G, Moskot M, et al. Female Fabry disease patients and X-chromosome inactivation. *Gene.* 2018;641:259-64.
3. Ferreira CR, van Karnebeek CDM, Vockley J, Blau N. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med.* 2019;21(1):102-6.
4. Saudubray JM, Garcia-Cazorla À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65(2):179-208.
5. Barrera Avellaneda LA, Espejo Mojica AnJ, Espinosa García E. Errores innatos del metabolismo. Bogotá: Pontificia Univesidad Javeriana; 2014.
6. Morava E, Rahman S, Peters V, Baumgartner MR, Patterson M, Zschocke J. Quo vadis: the re-definition of “inborn metabolic diseases”. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2015;38(6):1003-6.
7. Vernon HJ. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatr.* 2015;169(8):778-82.
8. Barrera Avellaneda LA, Saenz Suárez H, Cuellar F YM, Ospina L SY, Garzón Bedoya K, Cabrera S MA, et al. Manual de enfermedades metabólicas: Instituto de Errores Innatos del Metabolismo; 2004.
9. Saudubray JM, Baumgartner MR, Wanders R. Complex lipids. *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(1):1.
10. A JFC, Giugliani R. ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2015;26(4):483-6.
11. Saudubray JMe, Baumgartner MRe, Walter Je. Inborn metabolic diseases : diagnosis and treatment. 6th edition. ed.
12. Alejandro BL. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO EN COLOMBIA, DURANTE DOS DÉCADAS. 2009.
13. Bellettato CM, Hubert L, Scarpa M, Wangler MF. Inborn Errors of Metabolism Involving Complex Molecules: Lysosomal and Peroxisomal Storage Diseases. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65(2):353-73.
14. Bellettato CM, Scarpa M. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(4):347-62.
15. Desnick RJ, Thorpe SR, Fiddler MB. Toward enzyme therapy for lysosomal storage diseases. *Physiol Rev.* 1976;56(1):57-99.
16. Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):684-96.
17. Kloska A, Tylki-Szymańska A, Węgrzyn G. [Lysosomal storage diseases--an overview]. *Postepy Biochem.* 2011;57(2):128-32.
18. Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(8):3301-2.

19. Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol.* 2004;337(2):319-35.
20. Saito S, Ohno K, Sakuraba H. Fabry-database.org: database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant α -galactosidase A structures in Fabry disease. *J Hum Genet.* 2011;56(6):467-8.
21. Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WR. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genetics In Medicine.* 2007;9:34.
22. Barker D, Schafer M, White R. Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA. *Cell.* 1984;36(1):131-8.
23. Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet.* 1988;78(2):151-5.
24. Wanner C, Arad M, Baron R, Burlina A, Elliott PM, Feldt-Rasmussen U, et al. European expert consensus statement on therapeutic goals in Fabry disease. *Mol Genet Metab.* 2018;124(3):189-203.
25. Fabry J. Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Archiv für Dermatologie und Syphilis.* 1898;43(1):187-200.
26. Fabry H. Angiokeratoma corporis diffusum – Fabry disease: historical review from the original description to the introduction of enzyme replacement therapy. *Acta Paediatrica Supplement.* 2002;91(s439):3-5.
27. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999;281(3):249-54.
28. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2006;79(1):31-40.
29. Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolsky R, Huang AC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat.* 2009;30(10):1397-405.
30. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A, et al. Fabry disease: Detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype. *Kidney International.* 2003;64(3):801-7.
31. Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, Devrnja D, Paschke E, Paschke E, Voigtlander T, Voigtlander T, Auinger M, Auinger M, Pagliardini S, et al. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. (1046-6673 (Print)).
32. Ichinose M, Nakayama M, Ohashi T, Utsunomiya Y, Kobayashi M, Eto Y. Significance of screening for Fabry disease among male dialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* 2005;9(3):228-32.
33. Zarate YA, Hopkin RJ. Fabry's disease. *Lancet.* 2008;372(9647):1427-35.
34. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, et al. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab.* 2008;93(2):112-28.
35. Andrade J, Waters PJ, Singh RS, Levin A, Toh BC, Vallance HD, et al. Screening for Fabry disease in patients with chronic kidney disease: limitations of plasma alpha-galactosidase assay as a screening test. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(1):139-45.
36. Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu Rev Med.* 2015;66:471-86.
37. Olivera-González S, Josa-Laorden C, Torralba-Cabeza MA. The pathophysiology of Fabry disease. *Rev Clin Esp.* 2018;218(1):22-8.
38. Kanda A, Nakao S, Tsuyama S, Murata F, Kanzaki T. Fabry disease: ultrastructural lectin histochemical analyses of lysosomal deposits. *Virchows Arch.* 2000;436(1):36-42.

39. Altarescu G, Moore DF, Pursley R, Campia U, Goldstein S, Bryant M, et al. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in Fabry disease. *Stroke*. 2001;32(7):1559-62.
40. Lloyd-Evans E, Pelled D, Riebeling C, Bodennec J, de-Morgan A, Waller H, et al. Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23594-9.
41. Pelled D, Trajkovic-Bodennec S, Lloyd-Evans E, Sidransky E, Schiffmann R, Futerman AH. Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiol Dis*. 2005;18(1):83-8.
42. Askari H, Kaneski CR, Semino-Mora C, Desai P, Ang A, Kleiner DE, et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Arch*. 2007;451(4):823-34.
43. Sodi A, Ioannidis AS, Mehta A, Davey C, Beck M, Pitz S. Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(2):210-4.
44. Mauhin W, Lidove O, Masat E, Mingozzi F, Mariampillai K, Ziza JM, et al. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. *JIMD Rep*. 2015;22:1-10.
45. Deem TL, Cook-Mills JM. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood*. 2004;104(8):2385-93.
46. Fogo AB, Bostad L, Svarstad E, Cook WJ, Moll S, Barbey F, et al. Scoring system for renal pathology in Fabry disease: Report of the International Study Group of Fabry Nephropathy (ISGFN). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;25(7):2168-77.
47. Weidemann F, Sanchez-Niño MD, Politei J, Oliveira JP, Wanner C, Warnock DG, et al. Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:116.
48. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med*. 2015;373(1):96.
49. Pisani A, Sabbatini M, Duro G, Colomba P, Riccio E. Antiproteinuric effect of add-on paricalcitol in Fabry disease patients: a prospective observational study. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(4):661-6.
50. Biancini GB, Moura DJ, Manini PR, Faverzani JL, Netto CB, Deon M, et al. DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;784-785:31-6.
51. Joly DA, Grünfeld JP. 3-Nitrotyrosine as a biomarker for vascular involvement in Fabry disease. *Kidney Int*. 2014;86(1):5-7.
52. Chévrier M, Brakch N, Céline L, Genty D, Ramdani Y, Moll S, et al. Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy*. 2010;6(5):589-99.
53. Seydelmann N, Wanner C, Störk S, Ertl G, Weidemann F. Fabry disease and the heart. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(2):195-204.
54. Shen J-S, Meng X-L, Moore DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R, et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2008;95:163-8.
55. Rombach SM, Dekker N, Bouwman MG, Linthorst GE, Zwinderman AH, Wijburg FA, et al. Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(9):741-8.
56. Brakch N, Dormond O, Bekri S, Golshayan D, Corveon M, Mazzolai L, et al. Evidence for a role of sphingosine-1 phosphate in cardiovascular remodelling in Fabry disease. *Eur Heart J*. 2010;31(1):67-76.
57. Moore DF, Kaneski CR, Askari H, Schiffmann R. The cerebral vasculopathy of Fabry disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 2007;257:258-63.

58. Igarashi T, Sakuraba H, Suzuki Y. Activation of platelet function in Fabry's disease. *American Journal of Hematology*. 1986;22(1):63-7.
59. Rombach SM, Twickler TB, Aerts JM, Linthorst GE, Wijburg FA, Hollak CE. Vasculopathy in patients with Fabry disease: current controversies and research directions. *Mol Genet Metab*. 2010;99(2):99-108.
60. Stemper B, Hilz MJ. Postischemic cutaneous hyperperfusion in the presence of forearm hypoperfusion suggests sympathetic vasomotor dysfunction in Fabry disease. *J Neurol*. 2003;250(8):970-6.
61. Kolodny E, Fellgiebel A, Hilz MJ, Sims K, Caruso P, Phan TG, et al. Cerebrovascular involvement in Fabry disease: current status of knowledge. *Stroke*. 2015;46(1):302-13.
62. Germain DP. [Genetics of Fabry disease: diagnostic and therapeutic implications]. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*. 2007;36 Spec No 1:1S14-9.
63. Schaefer E, Mehta A, Gal A. Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl*. 2005;94(447):87-92; discussion 79.
64. Pisani A, Imbriaco M, Zizzo C, Albeggiani G, Colomba P, Alessandro R, et al. A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the GLA gene: a case report. *BMC Cardiovasc Disord*. 2012;12:39.
65. Dobrovolny R, Dvorakova L, Ledvinova J, Magage S, Bultas J, Lubanda JC, et al. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(8):647-54.
66. Echevarria L, Benistan K, Toussaint A, Dubourg O, Hagege AA, Eladari D, et al. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin Genet*. 2016;89(1):44-54.
67. Gupta S, Ries M, Kotsopoulos S, Schiffmann R. The relationship of vascular glycolipid storage to clinical manifestations of Fabry disease: a cross-sectional study of a large cohort of clinically affected heterozygous women. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(5):261-8.
68. Shah JS, Hughes DA, Sachdev B, Tome M, Ward D, Lee P, et al. Prevalence and clinical significance of cardiac arrhythmia in Anderson-Fabry disease. *Am J Cardiol*. 2005;96(6):842-6.
69. Galanos J, Nicholls K, Grigg L, Kiers L, Crawford A, Becker G. Clinical features of Fabry's disease in Australian patients. *Intern Med J*. 2002;32(12):575-84.
70. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C, et al. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(3):236-42.
71. Sadek J, Shellhaas R, Camfield CS, Camfield PR, Burley J. Psychiatric findings in four female carriers of Fabry disease. *Psychiatr Genet*. 2004;14(4):199-201.
72. Waldek S, Patel MR, Banikazemi M, Lemay R, Lee P. Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease: findings from the Fabry Registry. *Genet Med*. 2009;11(11):790-6.
73. Schiffmann R. Fabry disease. *Pharmacol Ther*. 2009;122(1):65-77.
74. Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:30.
75. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*. 2001;308(1-2):195-6.
76. Ortiz A, Germain DP, Desnick RJ, Politei J, Mauer M, Burlina A, et al. Minireview: Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2018;123(4):416--27.
77. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M, et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med*. 2003;138(4):338-46.

78. Schiffmann R, Fuller M, Clarke LA, Aerts JM. Is it Fabry disease? *Genet Med.* 2016;18(12):1181-5.
79. Schiffmann R, Forni S, Swift C, Brignol N, Wu X, Lockhart DJ, et al. Risk of death in heart disease is associated with elevated urinary globotriaosylceramide. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(1):e000394.
80. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2812-7.
81. Ferri L, Cavicchi C, Fiumara A, Parini R, Guerrini R, Morrone A. Pitfalls in the detection of gross gene rearrangements using MLPA in Fabry disease. *Clin Chim Acta.* 2016;452:82-6.
82. Beck M, Hughes D, Kampmann C, Larroque S, Mehta A, Pintos-Morell G, et al. Long-term effectiveness of agalsidase alfa enzyme replacement in Fabry disease: A Fabry Outcome Survey analysis. *Mol Genet Metab Rep.* 2015;3:21-7.
83. Germain DP, Charrow J, Desnick RJ, Guffon N, Kempf J, Lachmann RH, et al. Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *J Med Genet.* 2015;52(5):353-8.
84. Whybra C, Miebach E, Mengel E, Gal A, Baron K, Beck M, et al. A 4-year study of the efficacy and tolerability of enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in 36 women with Fabry disease. *Genet Med.* 2009;11(6):441-9.
85. Benjamin ER, Della Valle MC, Wu X, Katz E, Pruthi F, Bond S, et al. The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. *Genet Med.* 2017;19(4):430-8.
86. Thomas AS, Hughes DA. Fabry disease. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014;12 Suppl 1:88-101.
87. Johnson FK, Mudd PN, Bragat A, Adera M, Boudes P. Pharmacokinetics and Safety of Migalastat HCl and Effects on Agalsidase Activity in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2013;2(2):120-32.
88. Yam GH, Zuber C, Roth J. A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. *FASEB J.* 2005;19(1):12-8.
89. Guce AI, Clark NE, Rogich JJ, Garman SC. The molecular basis of pharmacological chaperoning in human α -galactosidase. *Chem Biol.* 2011;18(12):1521-6.
90. Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, Bichet DG, Giugliani R, Wilcox WR, et al. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N Engl J Med.* 2016;375(6):545-55.
91. Yogasundaram H, Kim D, Oudit O, Thompson RB, Weidemann F, Oudit GY. Clinical Features, Diagnosis, and Management of Patients With Anderson-Fabry Cardiomyopathy. *Can J Cardiol.* 2017;33(7):883-97.
92. Eng CM, Germain DP, Banikazemi M, Warnock DG, Wanner C, Hopkin RJ, et al. Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. *Genet Med.* 2006;8(9):539-48.
93. Germain DP, Waldek S, Banikazemi M, Bushinsky DA, Charrow J, Desnick RJ, et al. Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase beta therapy in patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(5):1547-57.
94. Lukas J, Giese AK, Markoff A, Grittner U, Kolodny E, Mascher H, et al. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003632.
95. Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science.* 2013;341(6148):1233158.
96. Simonetta I, Tuttolomondo A, Di Chiara T, Miceli S, Vogiatzis D, Corpora F, et al. Genetics and Gene Therapy of Anderson-Fabry Disease. *Curr Gene Ther.* 2018;18(2):96-106.

97. Jung S-C, Han IP, Limaye A, Xu R, Gelderman MP, Zerfas P, et al. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer results in long-term enzymatic and functional correction in multiple organs of Fabry mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(5):2676.
98. Ortolano S, Viéitez I, Navarro C, Spuch C. Treatment of lysosomal storage diseases: recent patents and future strategies. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2014;8(1):9-25.
99. Morgenstern J, Baumann P, Brunner C, Hubbuch J. Effect of PEG molecular weight and PEGylation degree on the physical stability of PEGylated lysozyme. *Int J Pharm*. 2017;519(1-2):408-17.
100. Desnick RJ. Chapter 38: Fabry Disease. α -Galactosidase A Deficiency. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*. 2015:419-30.
101. Politei JM, Bouhassira D, Germain DP, Goizet C, Guerrero-Sola A, Hilz MJ, et al. Pain in Fabry Disease: Practical Recommendations for Diagnosis and Treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2016;22(7):568-76.
102. Whybra C, Kampmann C, Willers I, Davies J, Winchester B, Kriegsmann J, et al. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *J Inher Metab Dis*. 2001;24(7):715-24.
103. Blanco J, Herrero J, Arias LF, Garcia-Miralles N, Gamez C, Barrientos A. Renal variant of Anderson-Fabry disease and bilateral renal cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2005;200(11-12):857-60.
104. De Jesús Cantillo J, Rojas WG. Enfermedad de Fabry. *Acta Medica Colombiana*. 2014;39(2):202--6.
105. Uribe A, Mateus HE, Prieto JC, Palacios MF, Ospina SY, Pasqualim G, et al. Identification of mutations in Colombian patients affected with Fabry disease. *Gene*. 2015;574(2):325-9.
106. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
107. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med*. 2017;19(10):1105-17.
108. Jorde LBa, Carey JCa, Bamshad MJa. *Genética Médica*. 5th ed.
109. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W452-7.
110. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7.20.
111. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015;31(16):2745-7.
112. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575-6.
113. Capriotti E, Altman RB, Bromberg Y. Collective judgment predicts disease-associated single nucleotide variants. *BMC Genomics*. 2013;14 Suppl 3:S2.
114. Capriotti E, Calabrese R, Fariselli P, Martelli PL, Altman RB, Casadio R. WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. *BMC Genomics*. 2013;14 Suppl 3:S6.
115. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*. 1997;4(3):311-23.
116. Uribe A, Giugliani R. Selective screening for lysosomal storage diseases with dried blood spots collected on filter paper in 4,700 high-risk colombian subjects. *JIMD Rep*. 2013;11:107-16.

117. Ginnobili S. LA TEORÍA DE LA SELECCIÓN NATURAL DARWINIANA Y LA GENÉTICA DE POBLACIONES. THE THEORY OF NATURAL SELECTION AND POPULATION GENETICS. 2009(24):169-83.
118. Villalobos J, Politei JM, Martins AM, Cabrera G, Amartino H, Lemay R, et al. Fabry disease in latin america: data from the fabry registry. *JIMD Rep.* 2013;8:91-9.
119. Moiseev S, Fomin V, Savostyanov K, Pushkov A, Moiseev A, Svistunov A, et al. The Prevalence and Clinical Features of Fabry Disease in Hemodialysis Patients: Russian Nationwide Fabry Dialysis Screening Program. *Nephron.* 2019;141(4):249-55.
120. Herrera J, Miranda CS. Prevalence of Fabry's disease within hemodialysis patients in Spain. *Clin Nephrol.* 2014;81(2):112-20.
121. Linthorst GE, Bouwman MG, Wijburg FA, Aerts JM, Poorthuis BJ, Hollak CE. Screening for Fabry disease in high-risk populations: a systematic review. *J Med Genet.* 2010;47(4):217-22.
122. Lukas J, Scalia S, Eichler S, Pockrandt AM, Dehn N, Cozma C, et al. Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease. *Hum Mutat.* 2016;37(1):43-51.
123. Wasserstein MP, Caggana M, Bailey SM, Desnick RJ, Edelmann L, Estrella L, et al. The New York pilot newborn screening program for lysosomal storage diseases: Report of the First 65,000 Infants. *Genet Med.* 2019;21(3):631-40.
124. Mignani R, Feriozzi S, Pisani A, Cioni A, Comotti C, Cossu M, et al. Agalsidase therapy in patients with Fabry disease on renal replacement therapy: a nationwide study in Italy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(5):1628-35.
125. Catana C-S, Drugan C, Spanu C, Puech JP, Caillaud C. Identification of three novel mutations in Romanian patients with Fabry disease 2011. 367-72 p.
126. Lee BH, Heo Sh Fau - Kim G-H, Kim Gh Fau - Park J-Y, Park Jy Fau - Kim W-S, Kim Ws Fau - Kang D-H, Kang Dh Fau - Choe KH, et al. Mutations of the GLA gene in Korean patients with Fabry disease and frequency of the E66Q allele as a functional variant in Korean newborns. (1435-232X (Electronic)).
127. Serebrinsky G, Calvo M, Fernandez S, Saito S, Ohno K, Wallace E, et al. Late onset variants in Fabry disease: Results in high risk population screenings in Argentina. *Mol Genet Metab Rep.* 2015;4:19-24.
128. Blaydon D, Hill J, Winchester B. Fabry disease: 20 novel GLA mutations in 35 families. *Hum Mutat.* 2001;18(5):459.
129. Tomberli B, Cecchi F, Sciagrà R, Berti V, Lisi F, Torricelli F, et al. Coronary microvascular dysfunction is an early feature of cardiac involvement in patients with Anderson-Fabry disease. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(12):1363-73.
130. Proceedings of the 25th European Paediatric Rheumatology Congress (PREs 2018): Lisbon, Portugal. 5-8 September 2018. *Pediatric Rheumatology Online Journal.* 2018;16(Suppl 2):52.
131. Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the α -galactosidase A gene that cause Fabry disease. *American Journal of Human Genetics.* 1993;53(6):1186-97.
132. Pan X, Ouyang Y, Wang Z, Ren H, Shen P, Wang W, et al. Genotype: A Crucial but Not Unique Factor Affecting the Clinical Phenotypes in Fabry Disease. *PLoS one.* 2016;11(8):e0161330-e.
133. Eng CM, Niehaus DJ, Enriquez AL, Burgert TS, Ludman MD, Desnick R. Fabry disease: twenty-three mutations including sense and antisense CpG alterations and identification of a deletional hot-spot in the α -galactosidase A gene. *Human Molecular Genetics.* 1994;3(10):1795-9.
134. Pasqualim G, Simon L, Sperb-Ludwig F, Burin MG, Michelin-Tirelli K, Giugliani R, et al. Fabry disease: a new approach for the screening of females in high-risk groups. *Clin Biochem.* 2014;47(7-8):657-62.

135. Ferreira S, Ortiz A, Germain DP, Viana-Baptista M, Caldeira-Gomes A, Camprecios M, et al. The alpha-galactosidase A p.Arg118Cys variant does not cause a Fabry disease phenotype: data from individual patients and family studies. *Mol Genet Metab.* 2015;114(2):248-58.
136. Brouns R, Paul De Deyn P, Thijs V, Eyskens F, Van Den Broeck M, Van Broeckhoven C, et al. Belgian fabry study: Prevalence of fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke.* 2010;41(5):863-8.
137. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab.* 2003;80(3):307-14.
138. Yasuda M, Shabbeer J, Benson SD, Maire I, Burnett RM, Desnick RJ. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat.* 2003;22(6):486-92.
139. Gaspar P, Herrera J, Rodrigues D, Cerezo S, Delgado R, Andrade CF, et al. Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. *BMC Med Genet.* 2010;11:19.
140. Lenders M, Duning T, Schelleckes M, Schmitz B, Stander S, Rolfs A, et al. Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the α -galactosidase A gene. *PLoS One.* 2013;8(2):e55565.
141. Coutinho M, M V Neto O, Betta J, Santos T, E P Lopez J, R Baptista L, et al. Screening for Fabry Disease among Dialysis Patients in Brazil: Findings from the First 18 months of a Nationwide Study Article Information2017. 1-16 p.
142. Silva CA, Barreto FC, Dos Reis MA, Moura Junior JA, Cruz CM. Targeted Screening of Fabry Disease in Male Hemodialysis Patients in Brazil Highlights Importance of Family Screening. *Nephron.* 2016;134(4):221-30.
143. Bekri S, Enica A, Ghafari T, Plaza G, Champenois I, Choukroun G, et al. Fabry disease in patients with end-stage renal failure: the potential benefits of screening. *Nephron Clin Pract.* 2005;101(1):c33-8.
144. Wallin EF, Clatworthy MR, Pritchard NR. Fabry disease: results of the first UK hemodialysis screening study. *Clin Nephrol.* 2011;75(6):506-10.
145. Dubuc V, Moore DF, Gioia LC, Saposnik G, Selchen D, Lanthier S. Prevalence of Fabry disease in young patients with cryptogenic ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013;22(8):1288-92.
146. Lin HY, Chong KW, Hsu JH, Yu HC, Shih CC, Huang CH, et al. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(5):450-6.
147. van der Tol L, Cassiman D, Houge G, Janssen MC, Lachmann RH, Linthorst GE, et al. Uncertain diagnosis of fabry disease in patients with neuropathic pain, angiokeratoma or cornea verticillata: consensus on the approach to diagnosis and follow-up. *JIMD Rep.* 2014;17:83-90.
148. van der Tol L, Smid BE, Poorthuis BJHM, Biegstraaten M, Deprez RHL, Linthorst GE, et al. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. 2014. p. 1-9.
149. Al-Thihli K, Salvarinova R, Ebrahim H, Hughes DA, Patel M, Tipple M, et al. A variant of unknown significance in the GLA gene causing diagnostic uncertainty in a young female with isolated hypertrophic cardiomyopathy. *Gene.* 2012;497(2):320-2.
150. Filoni C, Caciotti A, Carraresi L, Cavicchi C, Parini R, Antuzzi D, et al. Functional studies of new GLA gene mutations leading to conformational Fabry disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(2):247-52.
151. Suri M, Evers JMG, Laskowski RA, O'Brien S, Baker K, Clayton-Smith J, et al. Protein structure and phenotypic analysis of pathogenic and population missense variants in. *Mol Genet Genomic Med.* 2017;5(5):495-507.

152. Vitkup D, Sander C, Church GM. The amino-acid mutational spectrum of human genetic disease. *Genome Biol.* 2003;4(11):R72.
153. Stefl S, Nishi H, Petukh M, Panchenko AR, Alexov E. Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. *J Mol Biol.* 2013;425(21):3919-36.
154. Liguori R, Incensi A, de Pasqua S, Mignani R, Fileccia E, Santostefano M, et al. Skin globotriaosylceramide 3 deposits are specific to Fabry disease with classical mutations and associated with small fibre neuropathy. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180581.
155. Olivova P, van der Veen K, Cullen E, Rose M, Zhang XK, Sims KB, et al. Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta.* 2009;403(1-2):159-62.
156. Weidemann F, Niemann M, Störk S, Breunig F, Beer M, Sommer C, et al. Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications. *J Intern Med.* 2013;274(4):331-41.
157. Ortiz A, Abiose A, Bichet DG, Cabrera G, Charrow J, Germain DP, et al. Time to treatment benefit for adult patients with Fabry disease receiving agalsidase β : data from the Fabry Registry. *J Med Genet.* 2016;53(7):495-502.
158. Biegstraaten M, Arngrímsson R, Barbey F, Boks L, Cecchi F, Deegan PB, et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:36.
159. Weidemann F, Niemann M, Breunig F, Herrmann S, Beer M, Störk S, et al. Long-term effects of enzyme replacement therapy on fabry cardiomyopathy: evidence for a better outcome with early treatment. *Circulation.* 2009;119(4):524-9.
160. Tøndel C, Bostad L, Larsen KK, Hirth A, Vikse BE, Houge G, et al. Agalsidase benefits renal histology in young patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(1):137-48.
161. Rombach SM, Smid BE, Bouwman MG, Linthorst GE, Dijkgraaf MG, Hollak CE. Long term enzyme replacement therapy for Fabry disease: effectiveness on kidney, heart and brain. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:47.
162. Galafold (Amicus) 123 mg capsules Australian Medicines Handbook Appendix A. Australian Prescriber. 2019;42(1):36--7.
163. Nance CS, Klein CJ, Banikazemi M, Dikman SH, Phelps RG, McArthur JC, et al. Later-onset Fabry disease: an adult variant presenting with the cramp-fasciculation syndrome. *Arch Neurol.* 2006;63(3):453-7.
164. Beer G, Reinecke P, Gabbert HE, Hort W, Kuhn H. Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM). *Z Kardiol.* 2002;91(12):992-1002.
165. MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet.* 2001;38(11):769-75.
166. Perretta F, Antongiovanni N, Jaurrette S. Major Organic Involvement in Women with Fabry Disease in Argentina. *ScientificWorldJournal.* 2018;2018:6515613.
167. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NS, et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med.* 2009;1(1):13.
168. Laney DA, Fernhoff PM. Diagnosis of Fabry disease via analysis of family history. *J Genet Couns.* 2008;17(1):79-83.
169. Brown RM, Brown GK. X chromosome inactivation and the diagnosis of X linked disease in females. *J Med Genet.* 1993;30(3):177-84.
170. Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, Goldman M, Phelps R, Kim L, et al. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am J Hum Genet.* 2001;68(3):711-22.

171. Smid BE, Hollak CE, Poorthuis BJ, van den Bergh Weerman MA, Florquin S, Kok WE, et al. Diagnostic dilemmas in Fabry disease: a case series study on GLA mutations of unknown clinical significance. *Clin Genet*. 2015;88(2):161-6.
172. Chen C, Huang H, Wu CH. Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods Mol Biol*. 2017;1558:3-39.
173. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*. 1999;112:531-52.
174. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*. 2000;302(1):205-17.
175. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7:539.
176. Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Web Server issue):W529-33.
177. Dosztányi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3433-4.
178. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Web Server issue):W306-10.
179. Parthiban V, Gromiha MM, Schomburg D. CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server issue):W239-42.
180. Cheng J, Randall A, Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins*. 2006;62(4):1125-32.
181. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.
182. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361-2.
183. Capriotti E, Fariselli P. PhD-SNPg: a webserver and lightweight tool for scoring single nucleotide variants. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W247-W52.
184. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat*. 2009;30(8):1237-44.
185. Reva B, Antipin Y, Sander C. Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization. *Genome Biol*. 2007;8(11):R232.
186. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, Edwards KJ, et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat*. 2013;34(1):57-65.
187. Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet*. 2016;48(12):1581-6.
188. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):877-85.
189. Al-Numair NS, Martin AC. The SAAP pipeline and database: tools to analyze the impact and predict the pathogenicity of mutations. *BMC Genomics*. 2013;14 Suppl 3:S4.
190. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D222-30.

191. Lins L, Thomas A, Brasseur R. Analysis of accessible surface of residues in proteins. *Protein Sci.* 2003;12(7):1406-17.

12- ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado estudios de investigación

TBTBACOLAB	CONSENTIMIENTO INFORMADO	Código: _____ Página: 1	
------------	--------------------------	----------------------------	--

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE ESTUDIO ENFERMEDADES DE DEPOSITO LISOSOMAL O SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MULTIPLE CON TRATAMIENTOS QUE REQUIEREN MONITOREO.

Yo, [Redacted] identificado con C.C. N. [Redacted] mediante el presente documento autorizo la realización del procedimiento denominado venopunción o punción capilar (Toma de muestra sanguínea) por el profesional y/o auxiliar a cargo, y declaro se me ha explicado de manera clara el objetivo de la intervención y los posibles eventos adversos descritos a continuación, los cuales no van a comprometer mi integridad física ni la de familiares y/o acompañantes:

- Dolor en el sitio de punción
- Hematoma
- Múltiples punciones
- Lipotimia o desvanecimiento acompañado de vértigo, cansancio, palidez.

Autorizo al Laboratorio Clínico TBTB Acolab S.A.S. (en adelante TBTB Acolab o al tercero que este autorice, para que de manera directa o indirecta lleve a cabo la toma de las muestras solicitadas, haga su envío por cualquier servicio de mensajería para su posterior análisis por parte de sus proveedores, de acuerdo a las pruebas solicitadas (CIBI- Universidad de Los Andes, Moleculab S.A.S, Greenwood Genetic Center-USA, IDIME COLCAN Laboratorio y otros Laboratorio de la Res Nacional o Regional, dichos proveedores de análisis mantendrán las muestras almacenadas para el análisis y/o su confirmación durante el tiempo que consideren pertinente y procederán a su descarte de acuerdo a los tiempos y condiciones estipuladas en sus Planes de Gestión Integral de Residuos Hospitalarios a fin de dar cumplimiento a lo establecido por el Decreto 351 de 2014 del Ministerio de protección social. Así mismo, para que TBTB Acolab y sus proveedores de análisis, así como el operador logístico con el que éstos funcionen, recolecten, guarden, transmitan y traten mi información personal y la derivada de los resultados de las muestras tomadas y analizadas, por el término razonable para cumplir con el fin establecido o hasta que esta autorización sea revocada por mí.

Se me ha informado que el estudio para las enfermedades de depósito lisosomal se realizará a través de la toma y análisis de muestras de sangre y/u orina, y sus resultados serán usados únicamente para fines científicos y guardados en absoluta reserva. Soy consciente de que este estudio, en algunos casos, no cambia el curso normal de estas enfermedades, pero si aporta información acerca de su evolución, manejo y permite su diagnóstico definitivo.

He sido informado/a de mi derecho a conocer, rectificar, incluir, actualizar y solicitar la supresión de mis datos personales en cualquier momento y sin perjuicio alguno, así como a elevar consultas o preguntas sobre mis datos personales que están siendo tratados o interponer quejas que serán tratadas de acuerdo al procedimiento establecido en el artículo 15 de la Ley 1581 de 2012 mediante el envío de comunicación escrita que incluya mi nombre y dirección e identifique mis datos personales. Dicha comunicación debe ser enviada a 2, Consultorio 408, Bogotá, Colombia, o al siguiente correo electrónico

Asimismo, he sido informado/a del derecho a no responder preguntas relacionadas con mis datos personales sensibles y a conocer la Política de Tratamiento de Datos de TBTB Acolab

Firma (Paciente/representante legal en el caso de menores de edad):

Fecha: _____
Nombre (Claro): _____
Identificación: _____

Firma menor de edad: _____
Fecha: _____
Nombre (Claro): _____
Identificación: _____

(Para ser diligenciado por el menor de edad en el momento de la firma del consentimiento dependiendo de su madurez, autonomía y capacidad para entender el asunto).

Anexo 2. Carta autorización para el manejo de información proveniente del laboratorio MolecuLab con fines investigativos

Bogotá, Noviembre 13 de 2018

A QUIEN CORRESPONDA:

La bacterióloga Alisson Geraldine Poveda Gutiérrez, empleada de la empresa MolecuLab SAS, identificada con número de cedula 1.018.458.729 de Bogotá adelanta su trabajo de grado en Maestría en Ciencias Biológicas en la Pontificia Universidad Javeriana. Alisson utilizará para tal fin datos anonimizados derivados de las actividades del laboratorio. Confirmamos que conocemos plenamente el uso que se dará a esta información, garantizamos el buen manejo de la misma y damos aval para que los datos sean utilizados en el trabajo de grado de Alisson Geraldine Poveda Gutiérrez. Este trabajo es dirigido por Reggie García Robles (asesor científico de MolecuLab SAS, profesor investigador de la Pontificia Universidad Javeriana) y con cotutoría de Paola Andrea Ayala Ramírez (directora científica y coordinadora de laboratorio de MolecuLab SAS, profesora investigadora de la Pontificia Universidad Javeriana), y se enmarca dentro del proyecto "Registro de la Enfermedad de Fabry", registrado y aprobado por el comité de ética e investigaciones de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana.

Cordialmente,



PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ, Bac, MSc, PhD^c

Directora Científica y Coordinadora de Laboratorio

MolecuLab SAS



REGGIE GARCIA ROBLES, MD, PhD

Asesor Científico

MolecuLab SAS

Anexo 3. Protocolo de extracción DNA-MolecuLab.

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE DNA- MÉTODO PROBE

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

- 1- En un tubo Falcon de 15 ml medir 8 ml de Buffer de Lisis de Glóbulos rojos (RBC) y sobre este adicionar con una pipeta de transferencia plástica 5 ml de sangre total. Mezclar muy bien.
- 2- Agitar fuertemente en la plataforma (shaker) durante 15 minutos a temperatura ambiente
- 3- Centrifugar a 3000 rpm durante 8 minutos sin freno
- 4- Descartar el sobrenadante y conservar el pellet
- 5- Mezclar vigorosamente el pellet (vortex) en el líquido residual
- 6- Adicionar 2.5 ml de Buffer de lisis celular y mezclar cuidadosamente con chupa plástica varias veces. Dejar al menos 60 minutos a temperatura ambiente. En este paso se puede suspender el procedimiento incluso hasta el día siguiente dejando los tubos a 4°C.
- 7- Adicionar 800 ul de solución precipitante de proteínas
- 8- Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos sin freno.
- 9- Verter el sobrenadante en un tubo Falcon de 15 ml que contenga 4 ml de isopropanol frío. Dejar en reposo al menos 5 minutos.
- 10- Mezclar cuidadosamente por inversión hasta precipitar el DNA.
- 11- Envolver el DNA en una pipeta pasteur de vidrio. Resuspender en agua estéril o buffer TE dependiendo de la cantidad de DNA obtenido. (Generalmente 300 ul)
- 12- Colocar en una plataforma (shaker) toda la noche a temperatura ambiente para resuspender por completo el DNA.

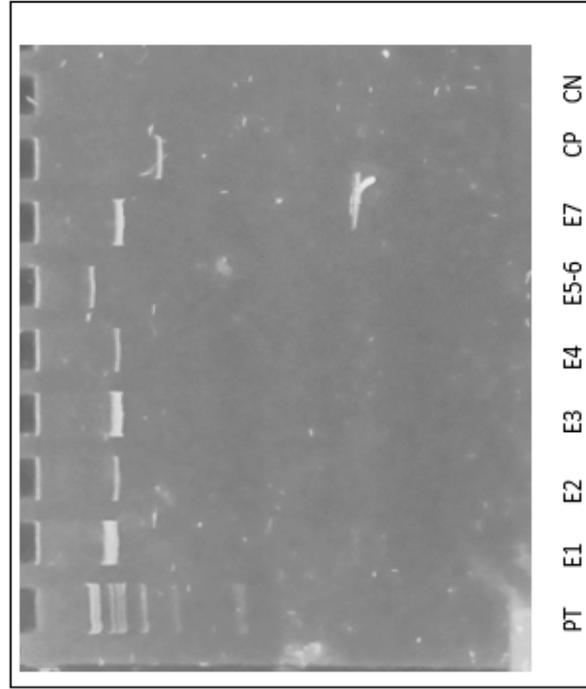
Anexo 4. Protocolo amplificación exones gen GLA PCR-TOUCHDOWN

PROTOCOLO AMPLIFICACIÓN GEN GLA

MONTAJE PCR-ENZIMA genTaq:

Master Mix	1X (ul)	X+1	Conc. Final
Buffer	4.74		5x
MgCl ₂	2.86		25mM
dNTPs	2		4mM
*Primer F	2		5uM
*Primer R	2		5uM
genTaq Polimerasa	0.28		5U/ul
Agua	22.12		
DNA	4		
Volumen Final	40		
Fragmento esperado			

PATRÓN DE BANDEO ESPERADO



TERMOCICLADOR: PROGRAMA FABRY-TD

EXÓN	T° AMPLIFICACIÓN	TAMAÑO (pb)	PROTOCOLO	TERMOCICLADOR
1	58.3	579	TD-genTaq	LABNET
2	63.2	451	TD-genTaq	LABNET
3	63.1	448	TD-genTaq	LABNET
4	64.8	420	TD-genTaq	LABNET
5-6	60.5	807	TD-genTaq	LABNET
7	61.8	433	TD-genTaq	LABNET

In silico analysis of two novel Alpha-Galactosidase-A variants in patients with suspected Fabry disease

Alisson Poveda-Gutiérrez¹, Paola Ayala-Ramírez¹, Reggie García-Robles¹, Janneth Gonzalez-Santos², Alfredo Uribe-Ardila.³

¹Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

²Departamento de Nutrición y Bioquímica, Biología Computacional, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

³Departamento de Ciencias, Centro de Investigaciones Bioquímicas, Universidad de los Andes.

Abstract

Fabry disease (EF) is caused by deficient activity of alpha-galactosidase-A (α -Gal-A) due to mutations in the X-chromosome GLA gene. The disorder affects multiple organ systems. Some α -Gal-A variants, leads to the systemic accumulation of glycolipids, mainly globotriaoslyceramide (Gb3) and globotriaosylphingosine (lyso-Gb3) in the plasma and cellular lysosomes of vessels, nerves, tissues and different organs. Lacking structural and experimental data for mutant proteins induced by different types of variants in the enzyme α -Gal-A its involvement in metabolism is unknown. In the present study, two new mutant structural models (3D) p.Phe211Ser and p.Gly360Ala were constructed for the α -Gal-A enzyme by means of a coordinated reconstruction approximation model using as a template the 1R46 protein (Protein Data Bank) previously described for the protein alpha-galactosidase-A in humans. The structural analysis of the computational models showed that changes reported here seem to significantly affect the functionality of the protein, however it is necessary to support the findings with clinical evidence.

Key Words: Lysosomal storage disease, Fabry disease, Alpha -galactosidase A, Variant, Models molecular, Computational biology

1- Introduction

Fabry disease (EF) is an X-linked genetic disease caused by the deficient enzyme activity of α -galactosidase A [α -gal A; Online Mendelian Inheritance in Man of the galactosidase (GLA) gene, 301500; Enzyme Commission number of α -gal A, 3.2.1.22], which is encoded by the GLA gene (Xq22) (74). This enzymatic defect leads to the systemic accumulation of glycolipids, mainly globotriaoslyceramide (Gb3) and globotriaosylphingosine (lyso-Gb3) in the plasma and cellular lysosomes of vessels, nerves, tissues and different organs (163). There are two phenotypes associated with fabry disease in men: the classic phenotype of early onset is characterized by a residual enzyme activity <1% and clinical manifestations include pain in the extremities, angiokeratomas, corneal opacity and alterations in the kidneys, heart and neurological. On the other hand, in the mild or late phenotype, there is a residual enzymatic activity between 1-10% compared to the levels in healthy individuals, and the clinical manifestations are late onset and less severe (64). Disease manifestations in female heterozygotes have been reported, but are considered to be rare and usually mild (164). Corneal alterations (cornea verticillata and posterior lenticular cataract) are present in about 70% of women and are useful for the detection of heterozygotes. About 30% of women have minimal angiokeratomas and <10% have infrequent attacks of neuropathic pain (165). However, heterozygous women with severe and early cerebrovascular disease, stroke and renal failure have been documented, but it was estimated that these severe manifestations only occurred 1%. The great variability in the severity of the phenotype has been attributed mainly to the random inactivation of the X chromosomes in each of their cells, that is, by the skewed X inactivation (Lyon hypothesis)(166).

The human GAL-A gene (GLA), is organized in seven exons encompassing over 12 Kb (18). The X-ray structure reveals a-GAL as a homodimeric glycoprotein of about 46 kDa (398 amino acids), with each monomer composed of two domains, a $(\alpha/\beta)_8$ barrel domain

containing the active site (encompassing amino acids 32-330) and a C-terminal domain containing eight antiparallel β strands on two sheets in a β sandwich (19).

Currently, more than 1000 mutations are reported for the GLA gene and these include missense and nonsense mutations and splice defects (20, 167) and most of them are unique to a family (private) and therefore genotype–phenotype correlation is limited (168). Mutation identification in Fabry disease is important for many reasons including heterozygote detection by enzyme assay of carriers for this X-linked recessive disease is unreliable (169), treatment for Fabry disease using replacement therapy is available worldwide (170), it is important to identify affected males and carriers for medical monitoring and early treatment (77) and the use of specific therapies such as pharmacological chaperones dependent on the mutation type of the affected patient (90), however, while the pathogenicity of some GLA mutations is well described, many subjects often have an unknown gene variant / GLA mutation meaning (VUS) (171), therefore, it is necessary to elucidate the structural and functional affectation of the two novel variants described in this study on the α -galactosidase A protein, in order to provide more information and support at the time of the classification of the variants as well as to provide scientific evidence that facilitates the choice of the most appropriate treatment according to the damage to the protein level that is being generated.

Here we describe the functional analysis of two novel GLA variants, p.Phe211Ser (c.632T>C) and p.Gly360Ala (c.1079G>C) identified in two female individuals with suspected Fabry disease in Colombia by screening the population at risk for this disease.

2- Materials and methods

2.1 Patients

We report the clinical and molecular studies of two unrelated Colombian female patients with suspected Fabry disease. Patients were identified from the screening program for high risk population for Fabry disease, among those that include individuals with alterations in renal, cardiac and nervous system level.

2.2 Patient specimens

Peripheral blood was collected, using EDTA as an anticoagulant from patients with clinical manifestations related to Fabry disease symptomatology and signed informed consent was obtained from all participants.

2.3 Analysis of genomic DNA

Genomic DNAs from patients and their relatives were isolated from blood cells from the total blood sample in EDTA tube, then the exons and the exon - intron limits of the GLA gene were amplified. The exons and the exon - intron limits of the GLA gene were amplified. The amplified product was sequenced by Sanger technology ("gold standard" technique for sequencing). The result was compared with the reference sequence: NG_007119.1.

2.4 Mapping variants onto structure of α -gal A

In Silico Variants Analysis

To predict the structural effect of the novel missense variants on resulting α -Gal-A enzymes we modeled the variants onto the three-dimensional structure of α -Gal-A previously determined by X-ray crystallography (19). Amino acid substitutions corresponding to the two mutant proteins were introduced into the wild type structure in the molecular visualization program Pymol. RMSD was determined for each model using PyMOL. The solvent-accessible surface area (ASA) value of each variant in the wild-type and the mutated model of α -Gal-A and electrostatic surface potential were calculated using PyMOL. The physicochemical characteristics of the substitutions of a single amino acid were determined with the help of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) amino acid explorer(172) and detection of hydrophobic regions in α -Gal-A by ProtScale (173).

The evolutionary conservation of the sequences was studied with T-Coffee (174) and Clustal Omega (175). Conservation indices were calculated with ConSurf (176). Structural disorders generated by the variants in the protein were studied using IUPred (177). The consequences of variants on protein stability were predicted by I-Mutant2.0 (178), CUPSAT (179) and MUpro (180). The pathogenic effects of point variants were analyzed using several

methods: SIFT (181) , PolyPhen-2 (110) , Provean (111), Mutation taster (182) , PhD-SNP (183) , SNP&Go (184), Mutation Assessor (185), FATHMM (186), M-CAP (187), MetaLR & MetaSVM (188), SAAP (189).

3- Results

In this paper, we describe two novel variants that we found in female patients no related with suspected fabry disease, in whom we performed the molecular identification by sequencing the *GLA* gene. The absence of these variants was verified in the databases of human gene mutations (<http://www.hgmd.org>), in the databases of Fabry disease (<http://fabry-database.org>), Leiden open variation database 3.0 (<http://www.lovd.nl/3.0/home>) and the ClinVar database of ncbi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) [Cited Feb 15, 2019]. We named the two variants according to the guidelines for mutation nomenclature recommended by the Human Genome Variation Society (www.hgvs.org/mutnomen). Where it was possible, we also extended the molecular analysis to the relatives of probands.

3.1 Index Case 1

Patient 1 (P1), is a 42 years old woman, who is referred by a nephrologist for sequencing the *GLA* gene. Clinical examinations showed the presence of subnephrotic proteinuria and phospholipidosis in podocytes reported as vacuolization.

The genetic analysis of the *GLA* gene in this patient allowed us to identify a new variant in the heterozygous state which produces a change of a phenylalanine residue by a serine at position 211 (c.632T>C, p.Phe211Ser) in the exon 4 of the gene.

3.2 Index case 2

Patient 2 (P2), is a 15-year-old girl, referred by a specialist in nephrology for sequencing the *GLA* gene. Clinical examinations showed occasional hematuria from 6 years, acroparesthesia in hands, occasional tinnitus and episodes of depression since the age of 11, hyperhidrosis from the 13 years, dyspnea and occasional fatigue accompanied by edema

of lower limbs from the age of 14. Pathological antecedents of asthma and allergic rhinitis since 2 years, consumption of psychoactive substances (marijuana).

The genetic analysis of the GLA gene in this patient allowed us to identify a new variant in the heterozygous state which produces a change of a glycine residue by alanine at position 360 (c.1079G>C, p.Gly360Ala) in the exon 7 of the gene. When extending the analysis to other family members of the patient, it was found that her 63-year-old father, previously diagnosed with Fabry disease and on enzyme replacement therapy, manifested diarrhea for 4 days / week from 8 years of age, tinnitus from the age of 25 accompanied of edema of lower limbs, cardiomegaly since 43 years, two acute myocardial infarctions for 7 years and renal failure from 58 years. In addition, her 27-year-old half sister reported myopia from age 14, iron deficiency anemia from 18 years of age with a possible bleeding disorder, dysaesthesia from the age of 24, and photophobia. She has been experiencing an episode of increased sensation for 2 years. Unexplained body temperature that yielded spontaneously, occasional bruising, episodes of bleeding gums, hematuria, rectal bleeding and abundant epistaxis. A history of appendicetomy at 15 years of age complicated by heavy bleeding, cholecystectomy (cholelithiasis) at 19 years, urolithiasis at 24 years, trigeminal neuralgia 6 months ago and blood transfusion 6 months ago was reported.

3.3 Molecular and tridimensional data

We identified the putative disease-causing mutations of the patients' α -Gal-A enzyme in two novel amino acid substitutions: p.Phe211Ser (c.632T>C) and p.Gly360Ala (c.1079G>C). The effect of the novel variants on the α -Gal-A structure was predicted by three-dimensional structural analyses of the mutated enzymes (Fig. 1). The substitution site p.Phe211Ser is within a radius of less than 20Å of the active sites reported for α -Gal-A D170 and D231. While for the p.Gly360Ala substitution the distances reach between 28.7Å for the active site located at position D231 and 28.7Å for the active site at position D170. These findings are relevant because variants mapping near the active site, appear to impair protein function (150).

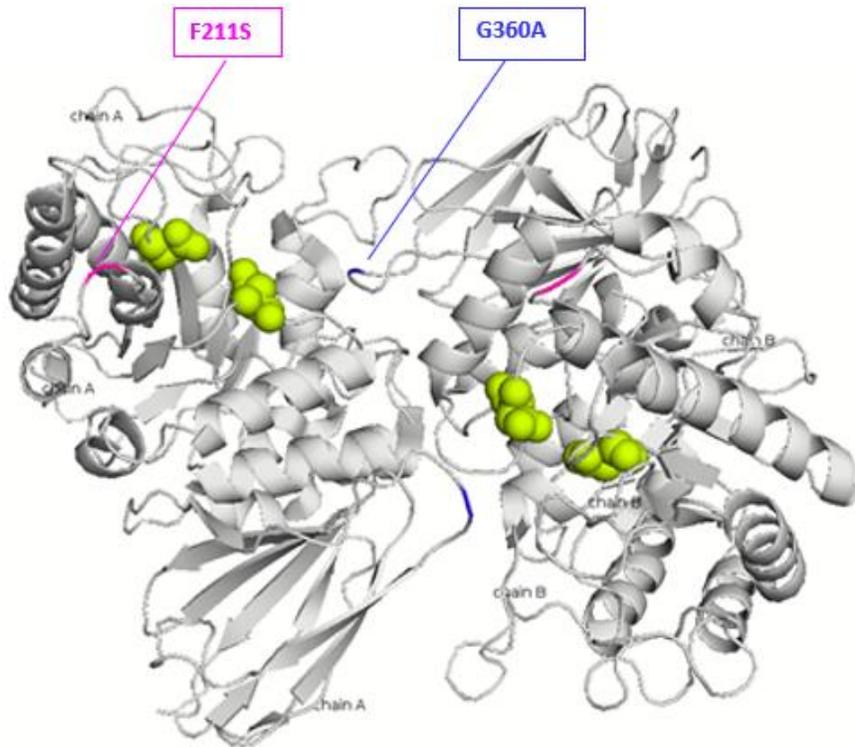


Fig 1. α -Gal-A three-dimensional structural map of the two novel amino acid substitutions together with the two active sites (spheres) in the A and B chains of the enzyme. Pymol

3.4 Physicochemical characterization of altered amino acids

The p.Phe211Ser variant that generates the substitution of a phenylalanine residue for a serine residue in position 211 reveals the following characteristics in terms of the physicochemical changes altered at the protein level. Phenylalanine is the simplest of the aromatic amino acids, its side chain is highly hydrophobic and is found more frequently in the interior of folded proteins, it is a non-polar amino acid and has a moderate flexibility in its side chain, it interacts with forces of van der Waals and its hydrophobicity is 0.951. On the other hand, serine is a hydroxylated amino acid whose flexibility of its side chain is low with respect to phenylalanine, interacts through hydrogen bonds and van der Waals forces and can form up to 3 H bonds with its side chain. Its hydrophobicity is close to 0.601 making it a polar amino acid.

Regarding the variant p.Gly360Ala where the substitution of a glycine in position 360 by an alanine was generated, it is observed that the residues that involve the changes are chemically of the simplest, their side chains are composed of a proton and a methyl group respectively, however, it is that simplicity that allows glycine to acquire unusual conformations and for accommodating dramatic changes in the direction of the polypeptide chain, for example in tight turns. The residue involved in the substitution interact through van der Waals forces and are classified as non-polar.

The Kyte-Doolittle scale confirmed that the p.Phe211 residue is highly hydrophobic and is also located in a hydrophobic region of the protein, while the p.Gly360 residue is highly hydrophilic as well as its location region within the α -Gal-A protein.

3.5 Sequence conservation

The sequence conservation analysis showed a semi-conservative residue in the p.Phe211Ser position, while highly conserved residues were evidenced in the p.Gly360Ala position. Pathogenic mutations typically involve conserved positions within a protein family, since these involve residues essential for structure or function of the protein (151) . In fact, the probability that a random mutation can cause a genetic disease has been shown to increase with an increase in the degree of site conservation (152) .

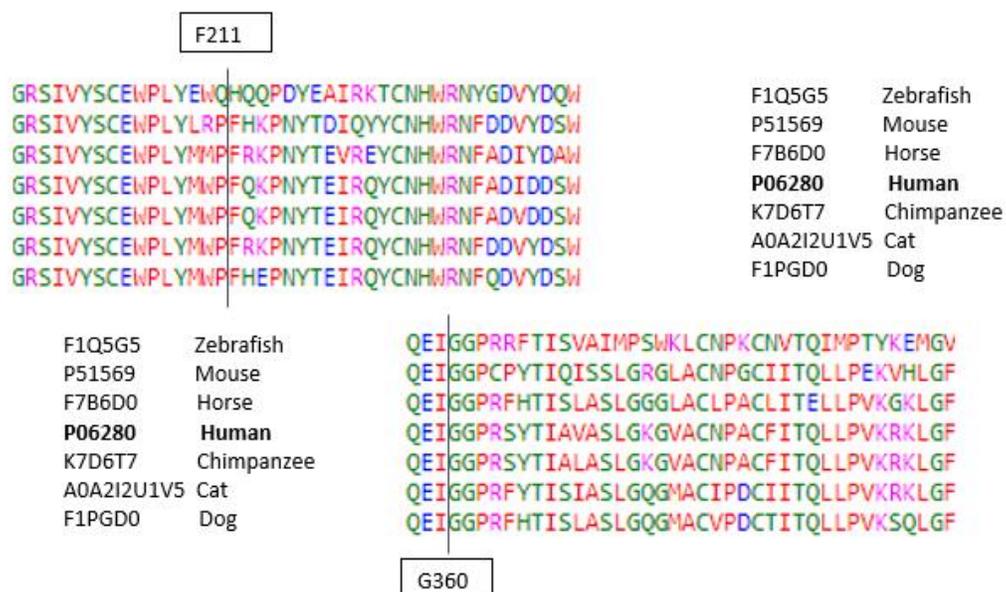


Fig. 2. Alignment of wild-type human α -Gal A amino acids with other organisms sequences. The rectangles indicates the amino acids at position 211 and 360 that we found mutated in the index cases.

3.6 Stability

The most frequent effect of missense variants is alteration of protein folding and stability decreased (153) . 2/3 prediction tools show that the p.Phe211Ser substitution exerts a decrease in the stability of the protein, while for the substitution located in the p.Gly360Ala position a decrease in the stability of the protein was found in 3/3 predictive tools.

3.7 Surface and electrostatic potential effects

Both the variant p.Phe211Ser and p.Gly360Ala alter the electrostatic potential of the protein. These changes in the electrical potential around the enzyme could influence the rate of association for the substrate.

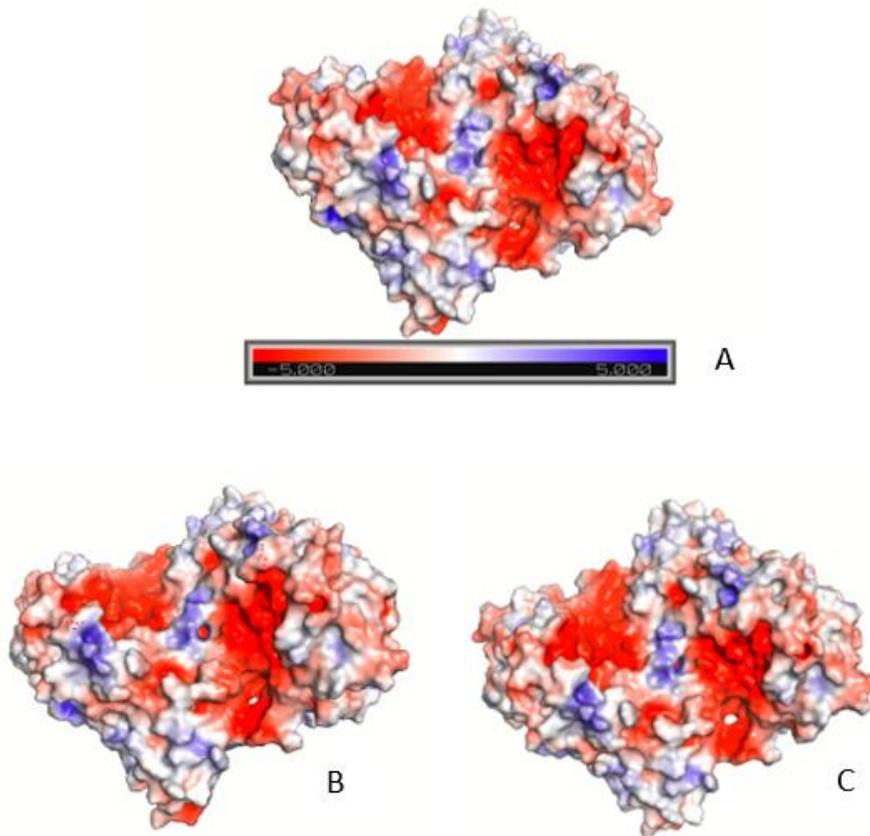


Fig 3. Electrostatic Surface potential of the mutant proteins, products of the novel missense variants. The color scale ranges from $-5KT/e$ (red) to $5 KT/e$ (blue). A) Wild type protein; B) p.Phe211Ser; C) p. Gly360Ala. Alterations in the potential of the electrostatic surface in the mutant proteins are observed.

3.8 Predictive algorithms used for sequence variant interpretation

Twelve pathogenic prediction tools were used to establish a consensus to determine the degree of tolerance for each amino acid substitution based on the physico-chemical properties. According to these results, for the variant p.Phe211Ser the results were not conclusive, since 7/12 programs classified it as benign (except SNP & GO, FATHMM, M-CAP, MetaLR_MetaSVM that classify it as cause of illness and probably harmful); while for the variant p.Gly360Ala seems to have a detrimental effect since 11/12 prediction tools (except PhD-SNP) classify it as harmful or causing disease.

Variant	Tool	p.Phe211Ser (c.632T>C)	p.Gly360Ala (c.1079G>C)
SIFT		Tolerated	Deleterious
Poly-Phen2		Benign	Probably damaging
FATHMM		Harmful	Harmful
M-CAP		Harmful	Harmful
MetaLR		Harmful	Harmful
MetaSVM		Harmful	Harmful
Mutation Assessor		Moderate	Moderate
Mutation Taster		Neutral	Harmful
PROVEAN		Neutral	Harmful
SNP & GO		Disease causing	Disease causing
SAAP		No effects	Pathogenic
PhD - SNP		Benign	Benign

Table 1. Predictions of the effect of novel variants on α -Gal-A protein

4- Discussion

Fabry disease has been regarded as a rare lysosomal storage disease with an incidence rate of 1 in 40,000 to 1 in 117,000 live births (27). However, newborn screening results have shown a relatively high incidence, ranging from 1 in 1250 to 1 in 4600, with 6–7 times more late-onset patients than those with classical Fabry disease (29). Fabry disease is progressive, whereas the clinical phenotype, both at age of onset and throughout the course of the disease, is very variable, even within the same family (63). Because mutations in most cases are currently private, more than 1000 mutations are reported in the GLA gene. Although, thanks to scientific and clinical evidence, many variants reported in patients with suspected Fabry disease have been classified as causing many other diseases due to the lack of clinical criteria and experimental trials are classified as of uncertain significance since it is unknown how the mutations affect the protein and its function generating an uncertainty both in the affected patient and in the treating doctor regarding their therapeutic management.

Here we report for the first time the variant p.Phe211Ser (c.632T> C), in a 42-year-old female patient with suspected Fabry disease due to renal alterations. The variant is within a radius of less than 20Å of the active sites reported for the α -Gal-A protein, possibly affecting the function of the protein due to alterations that can be generated in the

interaction with the substrate. This substitution is in the domain melibiasa_2 reported for the α -Gal-A protein as a domain belonging to the glycoside hydrolase family 27 (PF16499) (190) whose function is to break the glycosidic link between two or more carbohydrates, in this case two galactoses of the globotriaosylceramide (Gb3) compound allowing its conversion to lactosylceramide avoiding the progressive accumulation of Gb3 (19). The p.Phe211Ser substitution seems to alter the electrostatic potential and the conformation of the protein since it shows the change of a non-polar residue to a polar one, as well as the stability of the protein justifying a possible detrimental effect on the protein's function. It was determined that the conservation of the residue affected by the variant is of a semi-conservative type since it was present in 5 of the 6 organisms evaluated (figure 2). On the other hand, 7/12 algorithms used for the interpretation of sequence variants classified the variant as benign, however, SNP&GO, FATHMM, M-CAP, MetaLR, MetaSVM that classify it as a cause of illness and probably harmful (Table 1). To date, other changes in residues for position 211 in the protein have not been reported in the literature.

In relation to the p.Gly360Ala (c.1079G>C) variant reported for the first time in a 15-year-old female patient who reported acroparesthesias, hyperhidrosis, fatigue, occasional tinnitus and episodes of depression since childhood, it was found that it is a variant that, despite being far from the active sites of the α -Gal-A protein with more than 20Å distance and that the residues involved in the substitution seem to have no relevant physicochemical differences, 3/3 programs predict that the variant the stability of the protein decreases, likewise, the ancestral residue involved in the substitution is a conserved residue in all the evaluated species (figure 2.) supporting a possible alteration on the function of the protein. The folding process of soluble proteins decreases the surface in contact with the solvent. This is related to the secondary structures of proteins (191). Further, because active sites of proteins are often located at the surface of the protein, greater insight into residue accessibility would be important in understanding and predicting structure/function relationships. Finally, 11/12 prediction tools for the degree of tolerance for amino acid substitution p.Gly360Ala determined by consensus that this variant is probably harmful and causing disease (Table 1). In the literature, a variant in an Italian man in the same position

described here was reported p.Gly360Asp (c.1079G> A) by (124) which was associated with a residual enzyme activity <1%, as well as a loss of protein function that correlated positively with renal involvement of the patient who was treated early with enzyme replacement therapy thus preventing the progression of the disease.

5- Conclusion

We present a complete bioinformatic analysis of 2 new variants in the GLA gene found in individuals with suspected Fabry disease. The results of the prediction of the biological effect of these variants in the protein suggest changes that would compromise its function, with greater evidence for the change p. Gly360Ala than for p.Phe211Ser. It is necessary to have more clinical and paraclinical information (biochemical and pathological studies) to clearly determine the clinical significance of these variants.

Acknowledgments

This work was partially supported by the company Sanofi of Colombia and the Molecular Genetic Diagnosis laboratory, MolecuLab. We appreciate the support.

References

- Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet, Chapter 7, Unit7.20*. doi:10.1002/0471142905.hg0720s76
- Al-Numair, N. S., & Martin, A. C. (2013). The SAAP pipeline and database: tools to analyze the impact and predict the pathogenicity of mutations. *BMC Genomics, 14 Suppl 3, S4*. doi:10.1186/1471-2164-14-S3-S4
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2010). ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res, 38(Web Server issue), W529-533*. doi:10.1093/nar/gkq399
- Beer, G., Reinecke, P., Gabbert, H. E., Hort, W., & Kuhn, H. (2002). Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM). *Z Kardiol, 91(12), 992-1002*. doi:10.1007/s00392-002-0870-7
- Brown, R. M., & Brown, G. K. (1993). X chromosome inactivation and the diagnosis of X linked disease in females. *J Med Genet, 30(3), 177-184*.
- Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., Martelli, P. L., & Casadio, R. (2009). Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat, 30(8), 1237-1244*. doi:10.1002/humu.21047

- Capriotti, E., & Fariselli, P. (2017). PhD-SNPg: a webserver and lightweight tool for scoring single nucleotide variants. *Nucleic Acids Res*, *45*(W1), W247-W252. doi:10.1093/nar/gkx369
- Capriotti, E., Fariselli, P., & Casadio, R. (2005). I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res*, *33*(Web Server issue), W306-310. doi:10.1093/nar/gki375
- Chen, C., Huang, H., & Wu, C. H. (2017). Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods Mol Biol*, *1558*, 3-39. doi:10.1007/978-1-4939-6783-4_1
- Cheng, J., Randall, A., & Baldi, P. (2006). Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins*, *62*(4), 1125-1132. doi:10.1002/prot.20810
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, *31*(16), 2745-2747. doi:10.1093/bioinformatics/btv195
- Desnick, R. J., Brady, R., Barranger, J., Collins, A. J., Germain, D. P., Goldman, M., . . . Wilcox, W. R. (2003). Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med*, *138*(4), 338-346.
- Dosztányi, Z., Csizmek, V., Tompa, P., & Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, *21*(16), 3433-3434. doi:10.1093/bioinformatics/bti541
- Eng, C. M., Banikazemi, M., Gordon, R. E., Goldman, M., Phelps, R., Kim, L., . . . Desnick, R. J. (2001). A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am J Hum Genet*, *68*(3), 711-722. doi:10.1086/318809
- Filoni, C., Caciotti, A., Carraresi, L., Cavicchi, C., Parini, R., Antuzzi, D., . . . Morrone, A. (2010). Functional studies of new GLA gene mutations leading to conformational Fabry disease. *Biochim Biophys Acta*, *1802*(2), 247-252. doi:10.1016/j.bbadis.2009.11.003
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., . . . Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*, *42*(Database issue), D222-230. doi:10.1093/nar/gkt1223
- Garman, S. C., & Garboczi, D. N. (2004). The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol*, *337*(2), 319-335. doi:10.1016/j.jmb.2004.01.035
- Germain, D. P. (2010). Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*, *5*, 30. doi:10.1186/1750-1172-5-30
- Germain, D. P., Hughes, D. A., Nicholls, K., Bichet, D. G., Giugliani, R., Wilcox, W. R., . . . Schiffmann, R. (2016). Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N Engl J Med*, *375*(6), 545-555. doi:10.1056/NEJMoa1510198
- Hwu, W. L., Chien, Y. H., Lee, N. C., Chiang, S. C., Dobrovolny, R., Huang, A. C., . . . Hsu, L. W. (2009). 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*, *30*(10), 1397-1405. doi:10.1002/humu.21074
- Ioannidis, N. M., Rothstein, J. H., Pejaver, V., Middha, S., McDonnell, S. K., Baheti, S., . . . Sieh, W. (2016). REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*, *99*(4), 877-885. doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.016
- Jagadeesh, K. A., Wenger, A. M., Berger, M. J., Guturu, H., Stenson, P. D., Cooper, D. N., . . . Bejerano, G. (2016). M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet*, *48*(12), 1581-1586. doi:10.1038/ng.3703
- Kornreich, R., Desnick, R. J., & Bishop, D. F. (1989). Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res*, *17*(8), 3301-3302.

- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4(7), 1073-1081. doi:10.1038/nprot.2009.86
- Laney, D. A., & Fernhoff, P. M. (2008). Diagnosis of Fabry disease via analysis of family history. *J Genet Couns*, 17(1), 79-83. doi:10.1007/s10897-007-9128-x
- Lins, L., Thomas, A., & Brasseur, R. (2003). Analysis of accessible surface of residues in proteins. *Protein Sci*, 12(7), 1406-1417. doi:10.1110/ps.0304803
- MacDermot, K. D., Holmes, A., & Miners, A. H. (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet*, 38(11), 769-775.
- Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E., & Carey, W. F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 281(3), 249-254.
- Mignani, R., Feriozzi, S., Pisani, A., Cioni, A., Comotti, C., Cossu, M., . . . Cagnoli, L. (2008). Agalsidase therapy in patients with Fabry disease on renal replacement therapy: a nationwide study in Italy. *Nephrol Dial Transplant*, 23(5), 1628-1635. doi:10.1093/ndt/gfm813
- Nance, C. S., Klein, C. J., Banikazemi, M., Dikman, S. H., Phelps, R. G., McArthur, J. C., . . . Desnick, R. J. (2006). Later-onset Fabry disease: an adult variant presenting with the cramp-fasciculation syndrome. *Arch Neurol*, 63(3), 453-457. doi:10.1001/archneur.63.3.453
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, 302(1), 205-217. doi:10.1006/jmbi.2000.4042
- Parthiban, V., Gromiha, M. M., & Schomburg, D. (2006). CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue), W239-242. doi:10.1093/nar/gkl190
- Perretta, F., Antongiovanni, N., & Jaurretche, S. (2018). Major Organic Involvement in Women with Fabry Disease in Argentina. *ScientificWorldJournal*, 2018, 6515613. doi:10.1155/2018/6515613
- Pisani, A., Imbriaco, M., Zizzo, C., Albeggiani, G., Colomba, P., Alessandro, R., . . . Duro, G. (2012). A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the GLA gene: a case report. *BMC Cardiovasc Disord*, 12, 39. doi:10.1186/1471-2261-12-39
- Reva, B., Antipin, Y., & Sander, C. (2007). Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization. *Genome Biol*, 8(11), R232. doi:10.1186/gb-2007-8-11-r232
- Saito, S., Ohno, K., & Sakuraba, H. (2011). Fabry-database.org: database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant α -galactosidase A structures in Fabry disease. *J Hum Genet*, 56(6), 467-468. doi:10.1038/jhg.2011.31
- Schaefer, E., Mehta, A., & Gal, A. (2005). Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl*, 94(447), 87-92; discussion 79.
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, 11(4), 361-362. doi:10.1038/nmeth.2890
- Shihab, H. A., Gough, J., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Barker, G. L., Edwards, K. J., . . . Gaunt, T. R. (2013). Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat*, 34(1), 57-65. doi:10.1002/humu.22225
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., . . . Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7, 539. doi:10.1038/msb.2011.75

- Smid, B. E., Hollak, C. E., Poorthuis, B. J., van den Bergh Weerman, M. A., Florquin, S., Kok, W. E., . . . Linthorst, G. E. (2015). Diagnostic dilemmas in Fabry disease: a case series study on GLA mutations of unknown clinical significance. *Clin Genet*, *88*(2), 161-166. doi:10.1111/cge.12449
- Stefl, S., Nishi, H., Petukh, M., Panchenko, A. R., & Alexov, E. (2013). Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. *J Mol Biol*, *425*(21), 3919-3936. doi:10.1016/j.jmb.2013.07.014
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Howells, K., Phillips, A. D., Thomas, N. S., & Cooper, D. N. (2009). The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med*, *1*(1), 13. doi:10.1186/gm13
- Suri, M., Evers, J. M. G., Laskowski, R. A., O'Brien, S., Baker, K., Clayton-Smith, J., . . . Study, D. (2017). Protein structure and phenotypic analysis of pathogenic and population missense variants in. *Mol Genet Genomic Med*, *5*(5), 495-507. doi:10.1002/mgg3.304
- Vitkup, D., Sander, C., & Church, G. M. (2003). The amino-acid mutational spectrum of human genetic disease. *Genome Biol*, *4*(11), R72. doi:10.1186/gb-2003-4-11-r72
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, *112*, 531-552.