

# Nuovi marcatori

Giuseppe Cammarata

Centro di Ricerca e Diagnosi Malattie da Accumulo Lisosomiale, Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare "A. Monroy" (IBIM), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Palermo

## New markers of Fabry disease

To avoid any irreversible organ damage in patients with Fabry disease (FD), therapeutic interventions should be undertaken at an early stage. Unfortunately, early detection of the disease based on clinical symptoms alone is complicated by the fact that all complications of FD are nonspecific and clinically indistinguishable from similar abnormalities that occur in common disorders. Although the diagnosis of FD based on the determination of  $\alpha$ -GAL A activity and GLA gene analysis can be relatively easy in affected males with classical manifestations, in male individuals with attenuated phenotypes and in heterozygous female patients the residual enzyme activity can be significant. In these cases genetic analysis may also be inconclusive due to the difficulty in establishing whether some of the encountered abnormalities in the GLA gene are truly disease-causing mutations. Because of the limitations of the current detection methods for FD, attention is now paid to the identification of biomarkers that allow solid confirmation of the diagnosis as well as monitoring of disease manifestations and therapeutic management.

**Keywords:** Fabry disease, Gb3, Lyso-Gb3, microRNA, Vasculopathy

## Gb3

Per molto tempo il globotriaosilceramide (Gb3), principale substrato dell'enzima  $\alpha$ -Gal A, nonché primaria forma di accumulo nella malattia di Fabry, è stato considerato un marker surrogato della malattia di Fabry. Infatti, nei pazienti Fabry il Gb3 risulta elevato, non solo all'interno delle cellule ma anche in diversi fluidi corporei come il plasma e le urine. Purtroppo i livelli plasmatici di Gb3 non correlano appieno con la gravità della sintomatologia e non risultano utili per il monitoraggio della terapia (1). Lo scarso valore predittivo di questo marker è legato alla discrepanza temporale tra il precoce accumulo del Gb3, rilevabile già in età fetale, e l'insorgenza dei primi sintomi che si manifestano solo diversi anni dopo la nascita. Queste evidenze hanno portato alla conclusione che

l'accumulo di Gb3 potrebbe non essere la causa diretta della malattia di Fabry e che esistono altri fattori che contribuiscono ad avviare il processo patogenetico (2).

## Lyso-Gb3

Nel 2008 Aerts et al identificarono un nuovo biomarcatore per la malattia di Fabry. Durante le loro indagini i ricercatori notarono che il plasma dei pazienti Fabry conteneva una grande quantità di globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3), la forma deacetilata del Gb3 (3). Le performance diagnostiche del lyso-Gb3 si sono poi rilevate decisamente superiori a quelle del Gb3. Infatti, in soggetti Fabry maschi sintomatici le quantità di lyso-Gb3 eccedono anche di 10 volte quelle del Gb3. Anche nelle donne sintomatiche è possibile riscontrare quantità elevate di lyso-Gb3 nonostante i livelli di Gb3 rimangano nella norma. Come nel caso del Gb3, i livelli di lyso-Gb3, nel plasma di soggetti Fabry maschi, risultano già aumentati alla nascita. Mentre nelle donne i livelli di lyso-Gb3 sono bassi alla nascita e incrementano gradualmente con l'età. L'osservazione di questo fenomeno potrebbe spiegare perché i livelli plasmatici di lyso-Gb3 dei pazienti non correlano perfettamente con la sintomatologia (3). A prescindere dal suo ruolo come biomarcatore, il lyso-Gb3 sembra essere direttamente coinvolto nella patogenesi della malattia di Fabry. Infatti si è visto che a concentrazioni paragonabili a quelle osservate nel plasma dei pazienti il lyso-Gb3 è in grado, *in vitro*, di promuovere l'accumulo di Gb3 oltre che indurre la proliferazione delle cellule

Accepted: July 11, 2017

Published online: July 31, 2017

### Indirizzo per la corrispondenza:

Dr. Giuseppe Cammarata  
Centro di Ricerca e Diagnosi  
Malattie da Accumulo Lisosomiale  
Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare "A. Monroy"  
Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Via Ugo La Malfa, 153  
90146 Palermo  
giuseppe.cammarata@ibim.cnr.it

muscolari lisce. Altre osservazioni hanno dimostrato una concentrazione particolarmente elevata di lyso-Gb3 nel fegato e nell'intestino del modello murino di malattia di Fabry. Queste evidenze hanno portato a formulare una nuova ipotesi, chiamata "la strada segreta". Di fronte all'incapacità di degradare il Gb3, i pazienti di Fabry potrebbero adattarsi a questa condizione utilizzando una via alternativa per smaltire l'eccesso di lipidi. Il percorso alternativo implicherebbe la conversione di Gb3 a lyso-Gb3, il trasporto del lyso-Gb3 al fegato e la successiva secrezione dal corpo attraverso la bile. Un tale percorso spiegherebbe perché, nei pazienti maschi Fabry, il Gb3 non sembra accumularsi progressivamente con l'età. Quindi la formazione di lyso-Gb3 potrebbe essere un adattamento metabolico all'ingolfamento cellulare causato dal deficit enzimatico (3). Nonostante questo percorso di salvataggio gli individui Fabry, col progredire dell'età, sarebbero comunque esposti prolungatamente ad elevate concentrazioni di lyso-Gb3, il che causerebbe alterazioni soprattutto a livello vascolare provocando l'ispessimento dell'intima media delle arterie.

### Marcatori della disfunzione endoteliale

Attualmente il concetto prevalente in merito alla natura della malattia di Fabry è che si tratti di una vasculopatia sistemica. Infatti le principali manifestazioni di questa patologia consistono in complicanze associate al sistema arterioso. Anche se la patofisiologia di questa vasculopatia, ad oggi, non è del tutto chiara sono state proposte due teorie per spiegarne le cause. La prima suggerisce che la proliferazione delle cellule muscolari dell'intima media delle arterie, provocata dal lyso-Gb3, sia il passo iniziale di un processo che porterebbe alla formazione di strutture neointimali fibrotiche, perdita della compliance vascolare, attivazione del sistema renina-angiotensina locale, e in ultimo la produzione di molecole di adesione, citochine, chemochine, fattori protrombotici, e una diminuzione della sintesi di ossido nitrico (4). La teoria alternativa ipotizza che l'accumulo di Gb3 nelle cellule dell'endotelio sia sufficiente per deregolare l'attività dell'ossido nitrico sintetasi endoteliale che, conseguente, provocherebbe una diminuzione nella produzione di ossido nitrico (5). Entrambe le teorie sono avvalorate da diverse evidenze che dimostrano come nei pazienti Fabry la sintesi di ossido nitrico risulti effettivamente diminuita così come è stata dimostrata una eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno come il superossido (6). Purtroppo non è ancora stato identificato un fattore circolante legato al coinvolgimento vascolare che possa servire da affidabile marcatore precoce per la malattia di Fabry.

### I microRNA

Dal 2015 presso i Laboratori di Biotecnologie Applicate alle Scienze Mediche, dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo, il nostro gruppo di ricerca ha intrapreso uno studio il cui scopo è quello di va-

lutare le potenzialità dei microRNA plasmatici come marcatori per la malattia di Fabry. I microRNA sono una classe di piccole molecole di RNA a singolo filamento non codificante che regolano l'espressione genica inibendo la traduzione degli RNA messaggeri. Molti microRNA sono espressi in maniera tessuto-specifica e i loro pattern di espressione riflettono specifiche condizioni cellulari sia fisiologiche che patologiche. Sorprendentemente, la presenza di queste molecole può essere riscontrata anche nel siero e nel plasma dove i microRNA permangono in condizioni stabili perché o complessati con specifiche proteine o perché contenuti in vescicole di diverso genere come corpi apoptotici, esosomi o microvescicole. Queste caratteristiche conferiscono ai microRNA grandi potenzialità di utilizzo come biomarcatori (7). Nel nostro studio abbiamo analizzato il profilo di 800 diversi microRNA in una casistica composta da tre categorie di soggetti: pazienti Fabry, soggetti non Fabry ma con ipertrofia ventricolare sinistra o con malattia renale cronica, e controlli sani. Il confronto dei profili delle tre diverse categorie ha permesso di individuare una coppia di microRNA plasmatici capaci di discriminare i pazienti Fabry non solo rispetto ai controlli sani ma anche rispetto a soggetti con una sintomatologia tipica delle fasi avanzate della malattia di Fabry ma riconducibile a una diversa eziologia. I nostri risultati indicano che i soggetti Fabry, indipendentemente dal sesso e dall'età, sono caratterizzati da una particolare abbondanza nel plasma del mir-126-3p e del mir-199a-5p (8). Si tratta di due microRNA di origine endoteliale e piastrinica già noti per il loro ruolo di importanti regolatori dell'integrità vascolare in grado di contrastare l'aterosclerosi e di influenzare i processi infiammatori (9). Per entrambi è stata dimostrata la capacità di regolare la proliferazione delle cellule muscolari lisce (10, 11). Per quanto preliminari, questi risultati indicano un coinvolgimento dei microRNA nella vasculopatia della malattia di Fabry e ne suggeriscono un potenziale ruolo come marcatori per la valutazione precoce del coinvolgimento vascolare dei pazienti Fabry.

### Disclosures

Financial support: No financial support was received for this submission.

Conflict of interest: The author has no conflict of interest.

### Bibliografia

1. Bekri S, Lidove O, Jaussaud R, Knebelmann B, Barbey F. The role of ceramide trihexoside (globotriaosylceramide) in the diagnosis and follow-up of the efficacy of treatment of Fabry disease: a review of the literature. *Cardiovascular Hematol Agents Med Chem.* 2006;4(4):289-97.
2. Vedder AC, Strijland A, vd Bergh Weerman MA, Florquin S, Aerts JM, Hollak CE. Manifestations of Fabry disease in placental tissue. *J Inher Metab Dis.* 2006;29(1):106-11.
3. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(8):2812-7.
4. Rombach SM, Twickler Th.B, Aerts JMFG, Linthorst GE, Wijburg

- FA, Hollak CEM. Vasculopathy in patients with Fabry disease: current controversies and research directions. *Mol Gen Met.* 2010;99(2):99-108.
5. Shu L, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, et al. Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of Fabry disease. *Kidney Int.* 2014;86(1):58-66.
  6. Biancini GB, Jacques CE, Hammerschmidt T, et al. Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta.* 2016;461:41-6.
  7. Ajit SK. Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules. *Sensors.* 2012;12(3):3359-69.
  8. Cammarata G, Scalia S, Colomba P, et al. 5<sup>th</sup> Update on Fabry Nephropathy: Biomarkers, Progression and Treatment Opportunities. April 25-27, 2017, Mexico City, Mexico: Abstracts. *Nephron.* 2017;136(3):170.
  9. Jansen F, Yang X, Proebsting S, et al. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *JAHA.* 2014;3(6):e001249.
  10. Gheinani AH, Burkhard FC, Rehrauer H, Aquino Fournier C, Monastyrskaya K. MicroRNA MiR-199a-5p regulates smooth muscle cell proliferation and morphology by targeting WNT2 signaling pathway. *J Biol Chem.* 2015;290(11):7067-7086.
  11. Jansen F, Stumpf T, Proebsting S, et al. Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;104:43-52.