

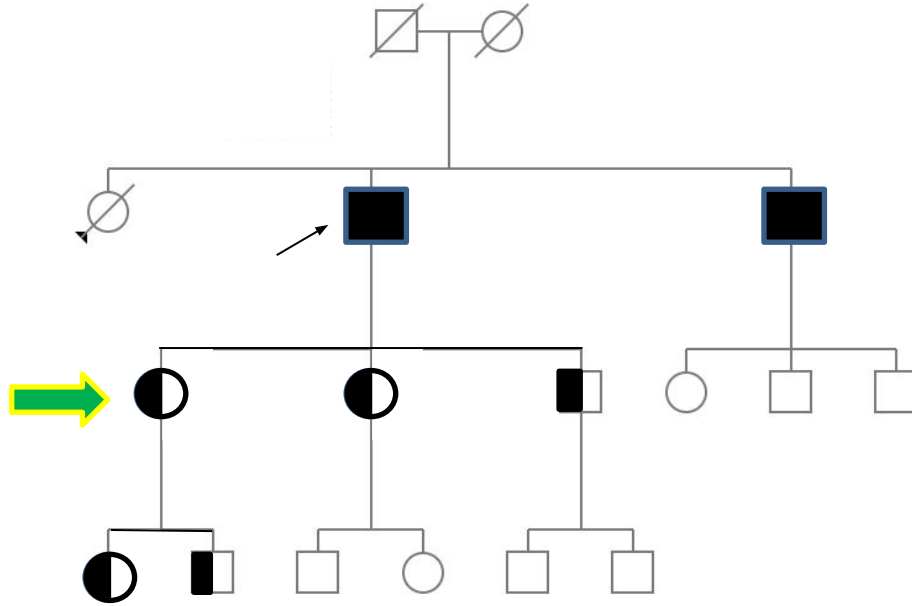


DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE ENFERMEDADES LISOSOMALES (...Y EPOF)



- Dr Paula Rozenfeld, PhD - Bioquímica
- Investigadora Principal CONICET
- DIEL/IIFP Universidad Nacional de La Plata – CONICET
- Argentina

Como nace DIEL? Un poco de historia...



Caso índice: Varón 44 años

Dolor muy fuerte e incapacitante en la articulación de la cadera: diagnóstico de gota

45 años:

Crisis de dolor

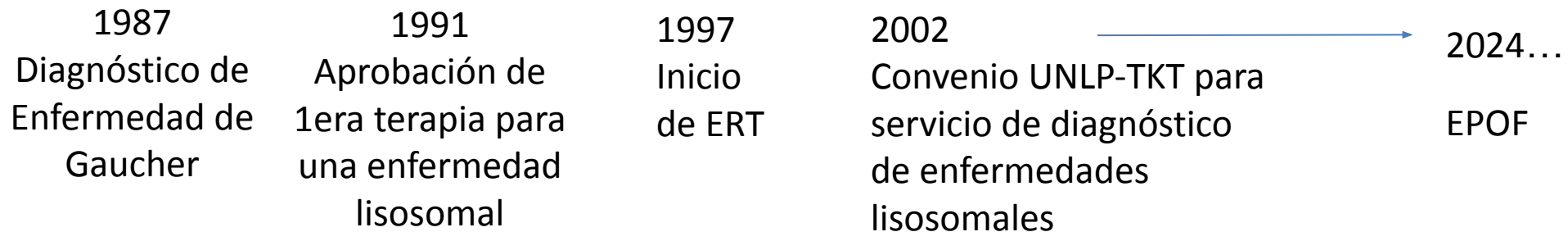
Hermano de 48 años: reciente diag de Gaucher

Indicación de estudio de Gaucher: resultado positivo

Presentó:

Hepatoesplenomegalia

anemia y plaquetopenia



ENFERMEDADES LISOSOMALES

Enfermedades hereditarias monogénicas

Errores innatos del metabolismo

Enfermedades lisosomales(EL): (n>70)

ALTERACION EN LA FUNCIÓN DE PROTEÍNA Y/O FUNCIÓN LISOSOMAL

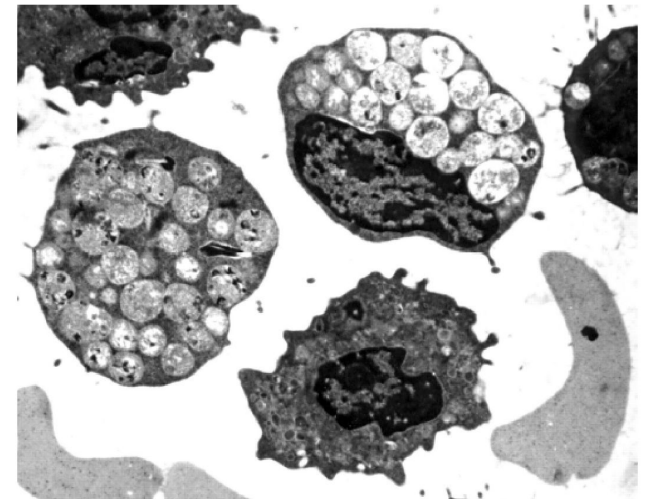
LISOSOMA

Organela rodeada por una bicapa lipídica

pH ácido (4 – 5)

Enzimas hidrolíticas

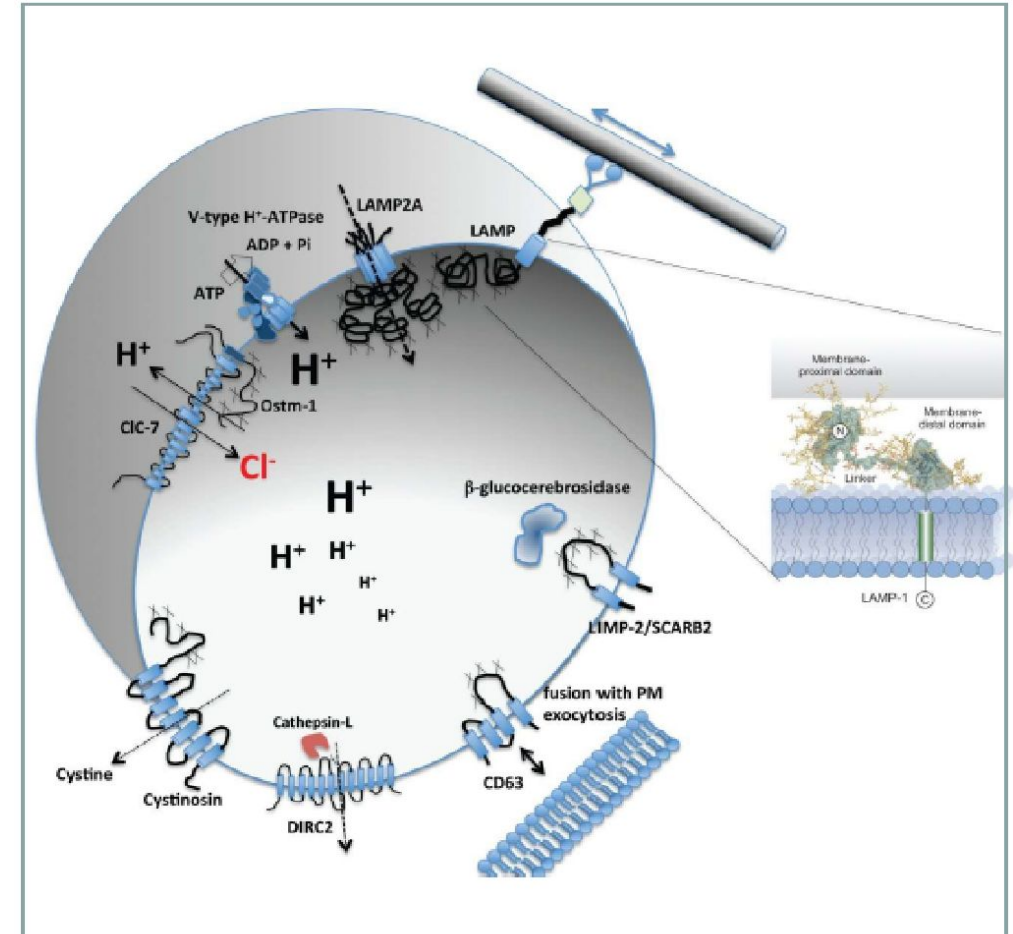
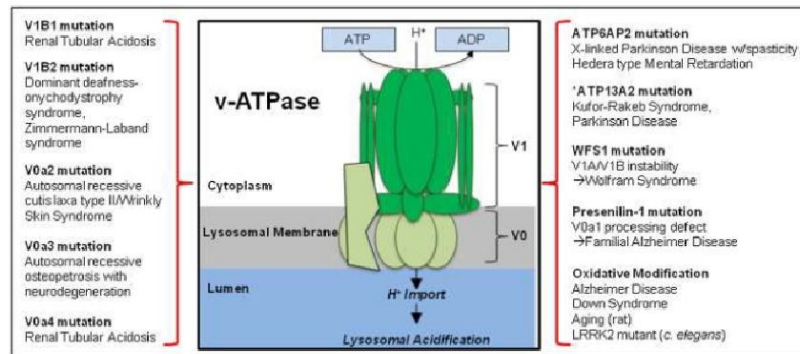
Proteínas de membrana



PROTEINAS LISOSOMALES: PROTEÍNAS DE MEMBRANA

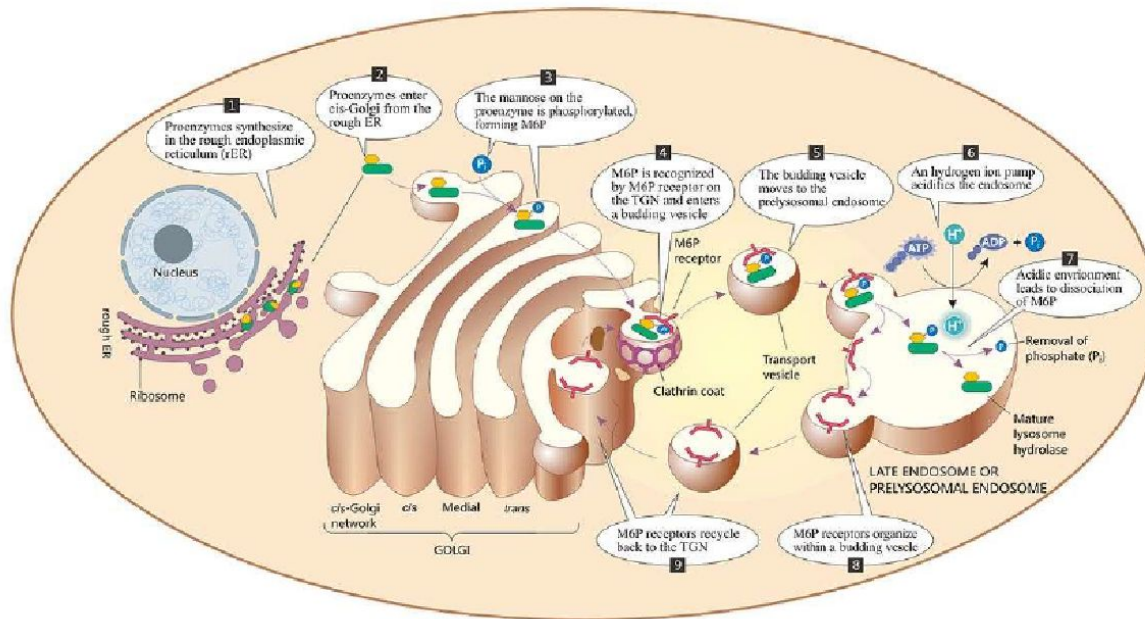
- PROTEINAS DE TRANSPORTE DE SUSTRATOS
- CANALES IONICOS

- Lysosomal membranes contain hundreds of integral and peripheral membrane proteins, including diverse transporters and ion channel
- The acidic lysosomal lumen is maintained by the lysosomal multi-subunit V-ATPase, it has a low pH of 4.5–5.5



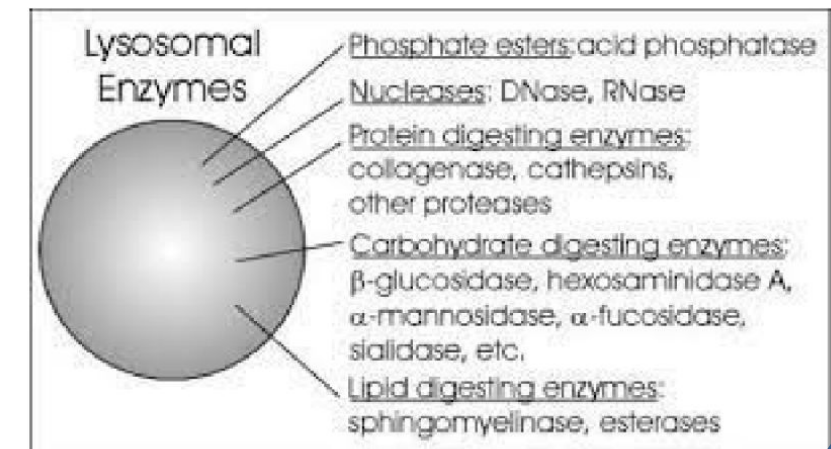
PROTEINAS LISOSOMALES: ENZIMAS

Biosynthesis and transport of lysosomal enzymes

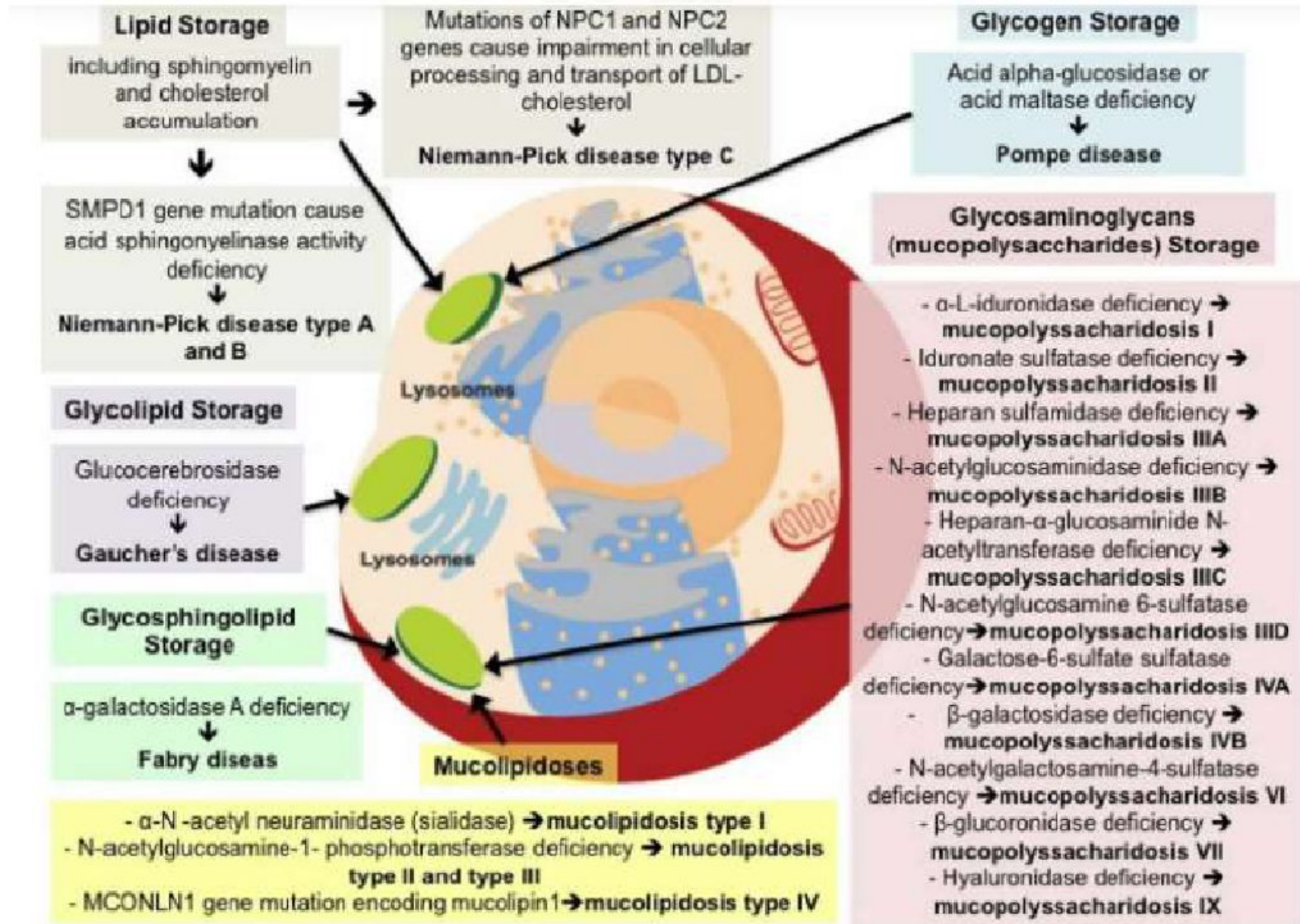


Function of lysosomal enzymes

- Substrate degradation within Lysosome



ENFERMEDADES LISOSOMALES



ENFOQUE DIAGNÓSTICO PARA ENFERMEDADES LISOSOMALES

**FENOTIPO
SOSPECHA CLÍNICA ESPECÍFICA**



ESTUDIO FUNCIONAL



DIAGNÓSTICO



GENOTIPO

Requiere que el médico conozca cada
patología poco frecuente en detalle,
para la solicitud de estudios de lab

**FENOTIPO – SOSPECHA
CLÍNICA AMPLIA**



GENOMICA CLÍNICA (EXOMA)

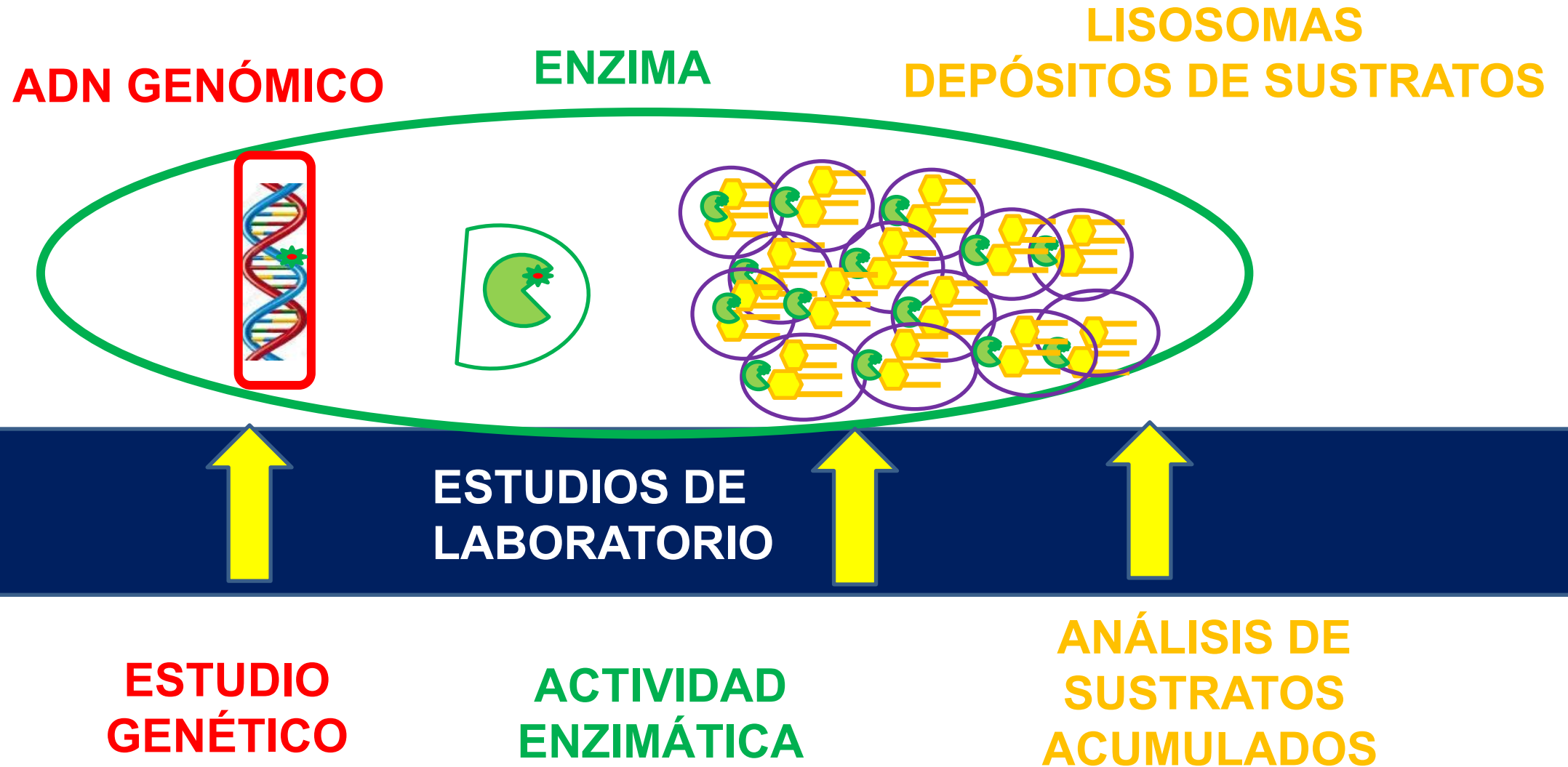


VARIANTES GENÉTICAS

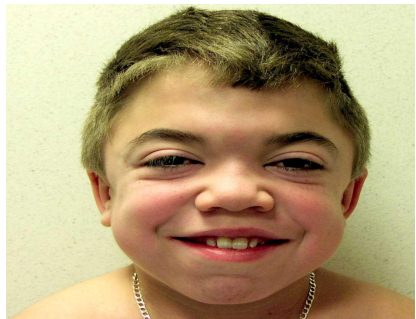


**DIAGNÓSTICO
CORRELACION ENTRE CLÍNICA,
ESTUDIOS FUNCIONALES
Y GENOTIPO**

ENFOQUE DIAGNÓSTICO



MUCOPOLISACARIDOSIS (MPS)



MUCOPOLISACARIDOSIS: MPS

Enfermedades genéticas lisosomales

Incidencia en conjunto: 1/25000

14 deficiencias enzimáticas que producen 9 enfermedades
Almacenamiento de GAGs:

Heparansulfato

Queratansulfato

Condroitinsulfato

Dermatansulfato

Ac. hialurónico

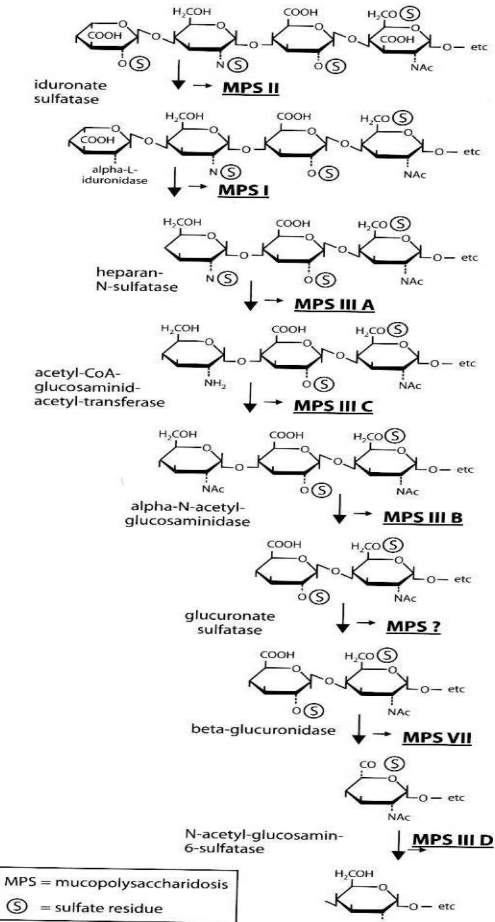


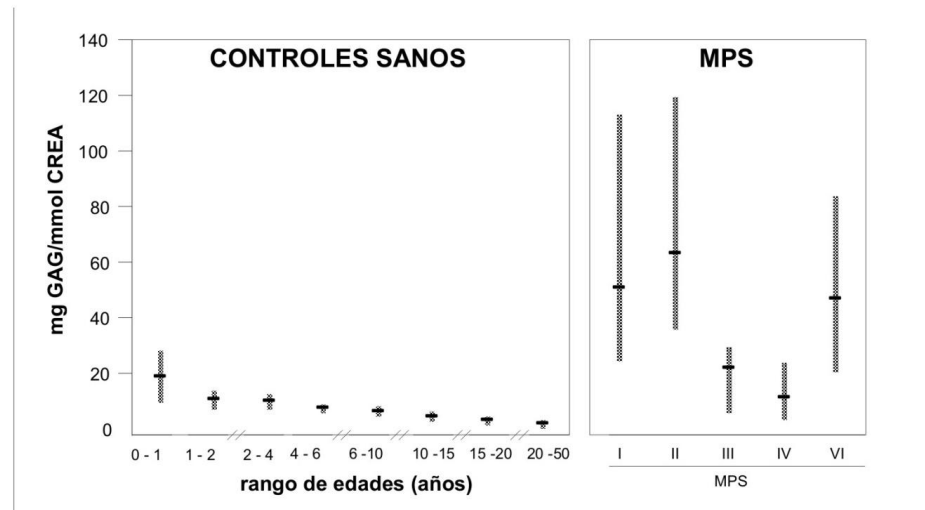
Figure 3.4: Enzymatic degradation of heparan sulfate.

Enfermedad MPS	Enfermedad	Deficiencia enzimática	GAG	GEN
MPS IH MPS IS MPS IH/S	Hurler Scheie Hurler-Scheie	α -L-iduronidasa	DS, HS	IDUA
MPS II	Hunter	Iduronato sulfatasa	DS, HS	IDS
MPS III A MPS III B MPS III C MPS III D MPS III E	Sanfilippo A Sanfilippo B Sanfilippo C Sanfilippo D Sanfilippo E	Heparan-N-sulfatasa α -N-acetilglucosaminidasa Acetil-CoA: α -glucosaminido acetiltransferasa N-acetilglucosamina-6-sulfatasa Arilsulfatasa G	HS	HSU NAGLU HGSNAT NGS ARSG
MPS IV A MPS IV B	Morquio A Morquio B	Galactosa-6-sulfatasa β -galactosidasa	KS	GALNS GLB1
MPS VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (Arilsulfatasa B)	DS	ARSB
MPS VII	Sly	β -glucuronidasa	DS, HS	GUSB
MPS IX	Natowicz	Hialuronidasa	hialuronano	HYAL1
MPS X	ARSK deficiency	Arylsulfatase K (ARSK)	DS	ARSK
MPSPS	VPS33	VPS33	DS, HS	VPS33

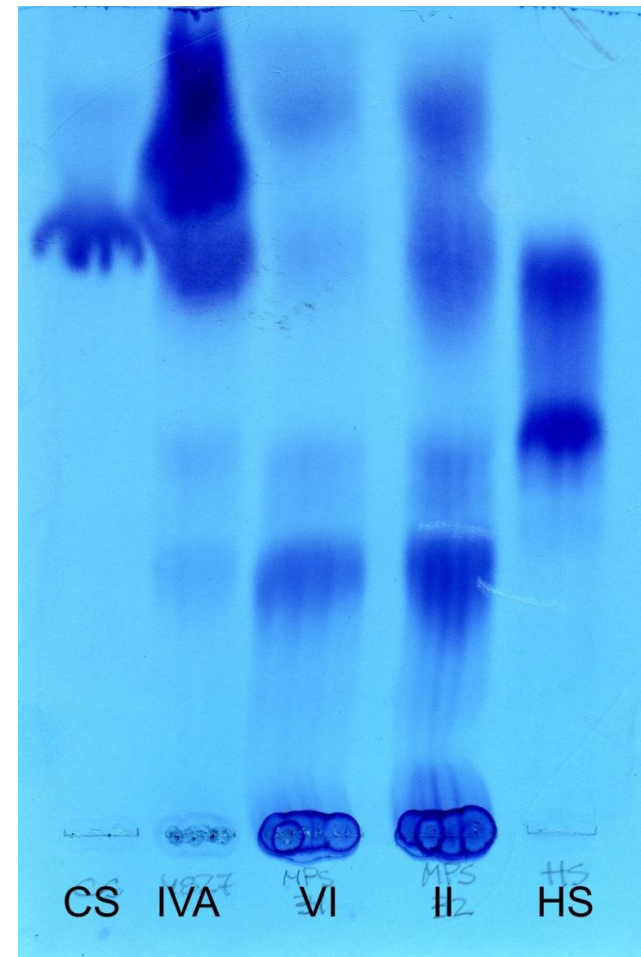
MPS-Excreción urinaria de GAGs



Cuantitativo: DMB (Dimetil Metilen Blue)



Cualitativo: Cromatografía en capa fina



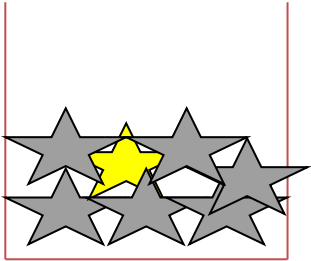
Espectrometría de masas

Fluorocromo

4-metilumbeliferon
a



Normal

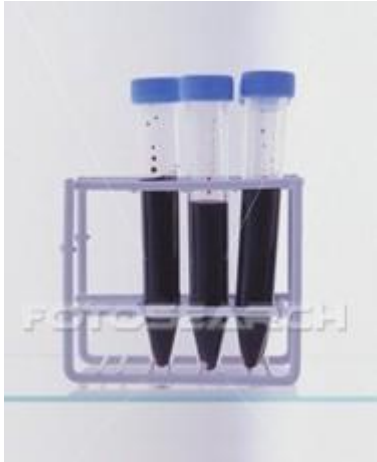


Deficiente

Formulario de diagnóstico (Ficha) con campos para:

- FICHA Nº
- FECHA
- INFORMACIÓN DEL PACIENTE: Nombre, Apellido, Fecha de nacimiento, Edad, DNI
- INFORMACIÓN DEL MÉDICO: Nombre, Apellido, Teléfono, E-mail
- ESTUDIO SOLICITADO
- DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO
- ¿ES FAMILIAR DE ALGÚN PACIENTE CON DIAGNÓSTICO? (consignar nombre del familiar y lugar dónde se realizó el diagnóstico)

Logo: DUEL



ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR

Identificar la mutación en el paciente índice

Necesario para estudio familiar: diagnóstico de heterocigotas

VARIANTES GENÉTICAS EN PACIENTES MPS II DE ARGENTINA

30 ALELOS DIFERENTES

18 missense (60%)

5 splicing (17%)

3 deleciones (10%)

2 nonsense (7%)

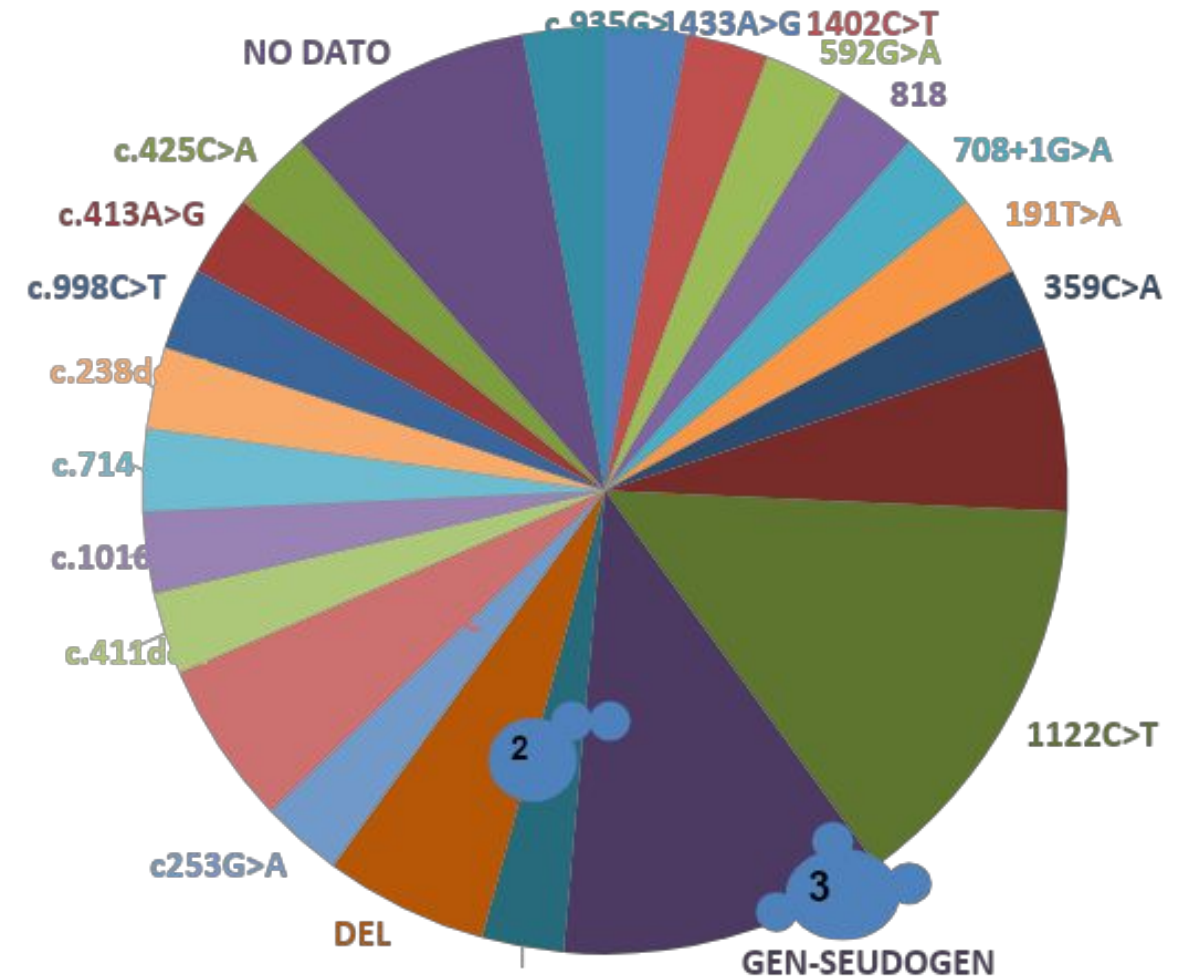
1 reordenamientos complejos

3 deleción completa del gen (3%)

75% de mutaciones privadas

57% nuevas

10% de novo



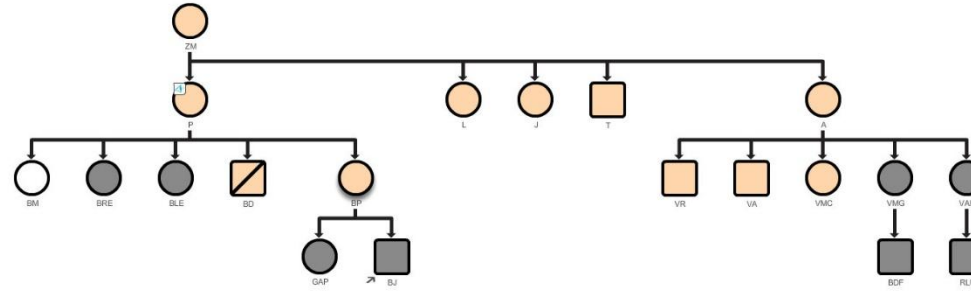
ASESORAMIENTO GENÉTICO

PROGRAMA DE ESTUDIOS FAMILIARES

OBJETIVOS

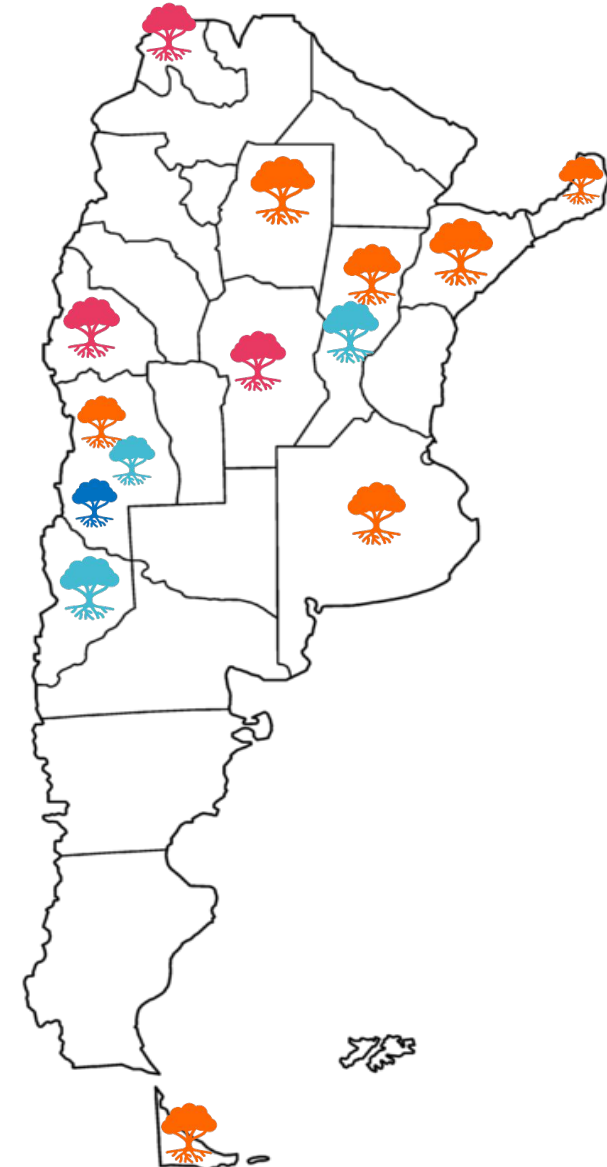
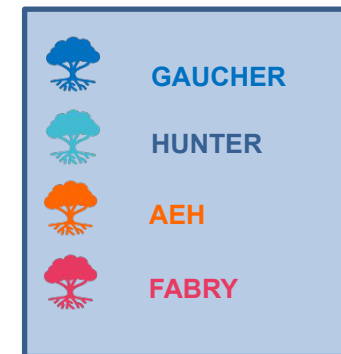
Orientación genética

• Análisis genético dirigido a familiares que están en riesgo.



caso índice.

se o aminorarse



ENFOQUE DIAGNÓSTICO PARA ENFERMEDADES LISOSOMALES

**FENOTIPO
SOSPECHA CLÍNICA ESPECÍFICA**



ESTUDIO FUNCIONAL



DIAGNÓSTICO



GENOTIPO

Requiere que el médico conozca cada
patología poco frecuente en detalle,
para la solicitud de estudios de lab

**FENOTIPO – SOSPECHA
CLÍNICA AMPLIA**



GENOMICA CLÍNICA (EXOMA)



VARIANTES GENÉTICAS



**DIAGNÓSTICO
CORRELACION ENTRE CLÍNICA,
ESTUDIOS FUNCIONALES
Y GENOTIPO**

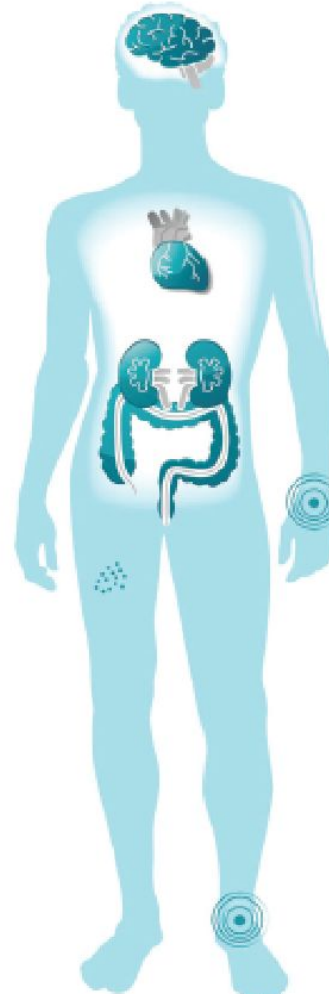
ENFERMEDAD DE FABRY: VARIANTES CLÍNICAS

Classic FD ^{1,2,17}

General
Fatigue and/or
exercise intolerance

Gastro-intestinal
Abdominal pain,
diarrhoea

Skin
Angiokeratomas,
lymphedema



Central nervous system Strokes,
transient ischemic attacks (TIA)

Cardiac
Left ventricular hypertrophy,
conduction defects,
cardiac fibrosis with arrhythmia

Renal
Albuminuria, proteinuria,
chronic renal insufficiency

Peripheral nervous system
acroparesthesia

Later-onset FD ^{3,4,16,51} mostly cardiac manifestations (rarely, proteinuria, mild GFR decrease)

ENFERMEDAD DE FABRY

- **SUBDIAGNÓSTICO**
- **ERRORES DE DIAGNÓSTICO**
- **RETRASO DIAGNÓSTICO**
- **ODISEA DIAGNÓSTICA**

Relación Fabry clásico – variante tardía

1 a 10

Prevalencia: 1/40000 – 1/4000

MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN ORGANOS BLANCO INESPECÍFICAS

SIMILARES A OTRAS MÚLTIPLES PATOLOGÍAS

RIÑÓN

PROTEINURIA E INSUFICIENCIA RENAL

CORAZÓN

CARDIOMIOPATÍA

CEREBRO

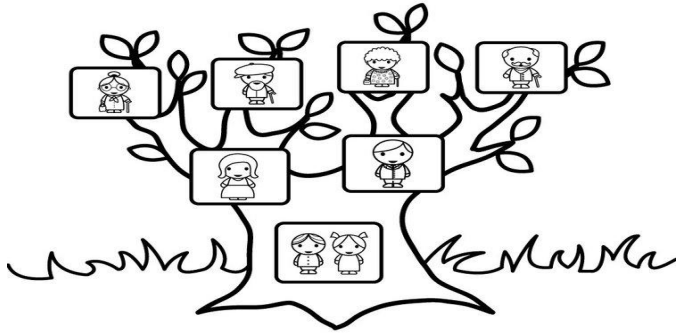
ACV

ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO DE PACIENTES FABRY



4%

**SOSPECHA
CLÍNICA**



67%

ESTUDIO FAMILIAR



<1%

**TAMIZAJE EN
POBLACIONES DE
RIESGO**

EXOMA CLÍNICO

TAMIZAJE PARA ENFERMEDAD DE FABRY EN VARONES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Choua Martin¹, Neumann Pablo², Quieto Pedro¹, Rozenfeld Paula^{1,3} on behalf of the Argentine renal group on Fabry disease. ¹AADELFA; ²Servicio de Nefrología, Ipena, La Plata, Argentina; ³IIFP, La Plata, Argentina

Criterios de inclusión:

1. Hombres
2. Edad: 18 – 65 años
3. IRC 1 a 5.
4. Consentimiento informado

Table 2: Demographics, genetics, CKD stage and frequency among the group

Patient	GLA variant	Fabry phenotype	Age	CKD stage	Previous cause of CKD	Frequency among CKD stage group (%)
1	c.520T>G-p.Cys174Gly	Late-onset	40	CKD1 Proteinuria	Hypertension – Familiar Nephropaty	3.03
2	c.520T>G-p.Cys174Gly	Late-onset	42	CKD3 Proteinuria- GFR 39ml/min	Hypertension	0.77
3	c.164A>G-p.Asp55Gly	Late-onset	41	CKD5 Dialysis	Unknown	0.17

- Importancia de la sospecha de EF en todos los estadios de IRC. Especialmente en estadios tempranos.
- Posibilidad de detectar variantes late onset.
- Frecuencia general: 0.17%
- Frecuencia de detección de EF en pacientes con proteinuria como única manifestación: 3,03 %.
- Pedigree: 16 pacientes por caso índice

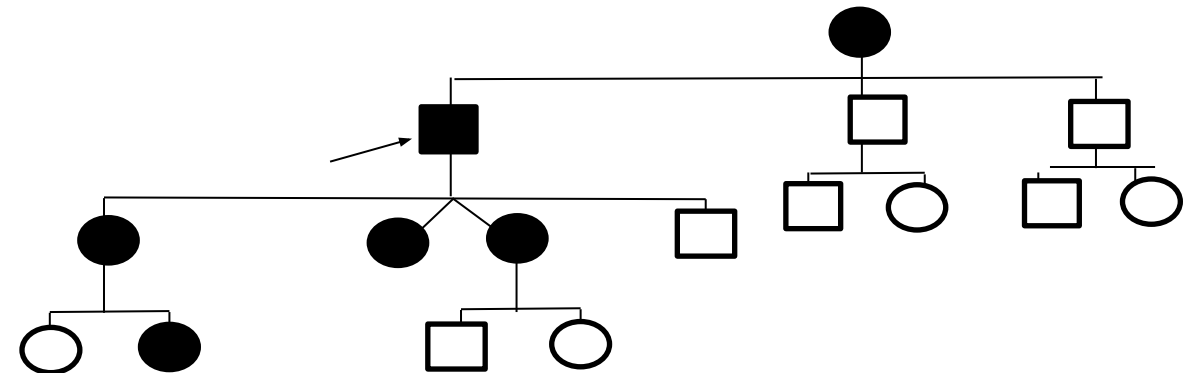
ENFERMEDAD DE FABRY Y EXOMAS

Pacientes con cardiopatía de causa desconocida – exoma clínico – genes de cardiopatía

GLA NM_000169.3							
POSICIÓN	CAMBIO DE NUCLEÓTIDO	CAMBIO EN LA PROTEÍNA	EFFECTO	GENOTIPO	PROF.	INFO EXTERNA	CLASIFICACIÓN ACMG
X:101398942	T>C c.644A>G	p.(Asn215Ser)	<i>Missense Variant</i>	HEM	45/45	rs28935197	5

CASO ÍNDICE

- Act enz GLA= 2,58 nmol/mg.h (>4,66)
- LysoGb3= 7,2 ng/ml (<3,5)



EXOMA COMPLETO DIRIGIDO A SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO ATÍPICO

Paciente masculino de 26 años - GFR=59 ml/min – Proteinuria

Biopsia renal: microangiopatía trombótica

GEN (OMIM*)	VARIANTE DETECTADA* ¹			Significado Clínico* ²	Referencia Posición cromosómica Frecuencia* ³
	RefSeq	Proteína	Cigosidad		
THBD (*188040)	NM_000361.3 c.805G>A	NP_000352.1 p.Ala269Thr	Heterocigota	Significado incierto	ND Chr20:23048700 ND
DGKE (*601440)	NM_003647.3 c.713G>A	NP_003638.1 p.Gly238Glu	Heterocigota	Significado incierto	rs201154049 Chr17:56845778 0.0002866

HALLAZGOS SECUNDARIOS

GEN (OMIM*)	VARIANTE DETECTADA* ¹			Significado Clínico* ²	Referencia Posición cromosómica Frecuencia* ³
	RefSeq	Proteína	Cigosidad		
GLA (*300644)	NM_000169.3 c.1082G>A	NP_000160.1 p.Gly361Glu	Hemicigota	Probable Patogénica	ND ChrX:101398017 ND

Act enz GLA= 0,37 nmol/mg.h (>4,66)
LysoGb3= 18,8 ng/ml (<3,5)

De novo (madre negativa)

PROYECTO GENOMICA CLÍNICA: GECEPOF

LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS SON:

- OFRECER DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO DE LABORATORIO A PACIENTES QUE PADECEN EPOF, utilizando
 - Secuenciación genómica masiva
 - Estudios funcionales
- PROVEER ASESORAMIENTO GENETICO INTEGRAL A PACIENTES Y FAMILIAS CON EPOF
- CONOCER LA FISIOPATOLOGIA DE LAS EPOF MEDIANTE MODELOS IN VITRO OBTENIDOS POR EDICION GENICA CRISPR/CAS9
- DIFUNDIR EL CONOCIMIENTO SOBRE EPOF A LA COMUNIDAD MEDICA Y GENERAL

PROYECTO GENOMICA CLÍNICA: GECEPOF

Las EPOF a las cuales nos dedicamos son:

-ENFERMEDADES METABÓLICAS

-ANGIOEDEMA HEREDITARIO

-ENFERMEDAD RENAL CRONICA DE CAUSA GENÉTICA

EQUIPO DIEL

ROMINA CECI

MARTINA GOLDBERG

DOMINGO PROCOPIO

FRANCISCO LOBOS

PAULA ROZENFELD

MAXIMILIANO ORMAZABAL

EMILIO VAENA

NAHUEL RAMELLA

ELIZABETH CATTANEO



laboratoriodiel@gmail.com

Celular: 221-454 4812



I I F P