



Leucodistrofia metacromática: del diagnóstico a la terapia génica como perspectiva terapéutica.

Dres. Francesca Fumagalli¹; Ana Isabel Fumagalli²; Alessandra Biffi²; Martina Cesani²; Francesco Corea¹; Maria Sessa^{1,2}; Giancarlo Comi²; Maria Grazia Roncarolo²

¹Neurology Department,

²H. S. R. - TIGET

Scientific Institute San Raffaele, Milano, Italia.

³Neuróloga-Servicio de Neurología. Sanatorio Parque.
(intermediaria en la publicación de este trabajo)

Rosario, Argentina

anif@arnet.com.ar

Resumen

La Leucodistrofia Metacromática (LDM) es una patología neurodegenerativa rara, de herencia autosómica recesiva. La frecuencia estimada en la población es de 1:40.000. Se caracteriza por la deficiencia de la arilsulfatasa A (ARSA), una enzima lisosomal relacionada con el metabolismo de los sulfatos, particularmente abundante en las vainas de mielina. Su déficit conlleva a la acumulación de sulfátidos en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico (SNP), determinando en todas las formas de la enfermedad trastornos motores y neurocognitivos progresivos. Las formas clínicas juveniles progresan más rápidamente que las formas insidiosas y crónicas del adulto. El pronóstico es severo dado que es fatal a los pocos años de su manifestación. Actualmente no existe un tratamiento específico. Se considera que el trasplante de médula ósea y la terapia génica podrían ser posibles soluciones para la corrección de la anomalía genética subyacente. La terapia de apoyo está indicada para prevenir y tratar las posibles complicaciones.

Palabras clave: leucodistrofia metacromática-arilsulfatasa A-terapéutica

Introducción

La Leucodistrofia Metacromática (LDM) es una patología rara estimada su frecuencia en 1:40.000, de herencia autosómica recesiva.

Se caracteriza por la deficiencia de la arilsulfatasa A (ARSA), una enzima lisosomal relacionada con el metabolismo de los sulfatos, particularmente abundante en las vainas de mielina.

Su déficit conlleva a la acumulación de sulfátidos en el sistema nervioso central SNC y en el sistema nervioso periférico(SNP), determinando trastornos progresivamente crecientes que deterioran intelectualmente al individuo y retardando el avance hacia las etapas madurativas. Además, hay trastornos para la deambulación, dificultad en la deglución, ceguera, sordera, epilepsia, atrofia y disminución del tono muscular.

Abstract

Metachromatic Leukodystrophy (MLD) is a neurodegenerative, rare, inherited autosomal recessive disorder that is due to deficiency of the lysosomal enzyme arylsulfatase A (ARSA). The incidence is of 1 case per 40,000 population. The disease is characterized by myelin degeneration in both CNS and peripheral nervous system (PNS), associated with the accumulation of undergraded galactosyl-3-sulfate ceramide (sulfatide) in glial cells and neurons. All forms of the disease involve a progressive deterioration of motor and neurocognitive function. In general, young patients have the most rapidly progressive disease, while patients with adult onset show a more chronic and insidious progression. The prognosis is severe, resulting in death a few years after the diagnosis. No effective treatment is currently available. Bone marrow transplantation and gene therapy are considered as possible solutions to correct the underlying genetic abnormality. Symptomatic support care is indicated to prevent and treat these problems.

Key words: metachromatic leukodystrophy-arylsulfatase A-therapy

La edad de aparición y la evolución es muy variable, pero en la mayoría de los casos, aparece en los primeros años de vida y es fatal a los pocos años de su manifestación.

Actualmente no existe un tratamiento específico, solamente es posible una terapia de sostén para prevenir y tratar las posibles complicaciones.

Se demostró que el trasplante de médula ósea de un donante histocompatible puede retrasar la evolución de la enfermedad en algunos casos seleccionados.

A causa de la rareza de la enfermedad, de la heterogenicidad de sus distintas formas y de la falta de documentación clínica, neurofisiológica y neuroradiológica, poco se conoce sobre los factores que influyen en la edad de aparición y en la velocidad de progresión, siendo difícil predecir la evolución del enfermo.

Esto representa un enorme obstáculo ya sea para una adecuado consejo a los familiares, como para individualizar cuáles son los mejores abordajes terapéuticos.

Nuestro centro se propuso reclutar un amplio grupo de enfermos, caracterizarlos desde el punto de vista bioquímico y molecular, y monitorearlos en el tiempo (1).

Estamos convencidos de que un profundo estudio clínico, es un requisito fundamental para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, y para valorar los resultados de las técnicas hasta ahora aplicadas.

En este trabajo, se presentan las características de la enfermedad, se sugieren los métodos diagnósticos y de seguimiento del paciente, vislumbrándose en los estudios pre-clínicos experimentales realizados en nuestro instituto las nuevas y fascinantes perspectivas terapéuticas.

Genética y patogénesis

La ARSA es una enzima lisosomal, relacionada con el metabolismo de grupos sulfatos. El gen de la ARSA se mapeó a nivel del brazo largo del cromosoma 22 y está compuesto por 8 exones (2). En la figura 1 se observan más de 90 mutaciones del gen ARSA asociado a la enfermedad, según la **Human Gene Mutation Database (HGMD)**

<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>.

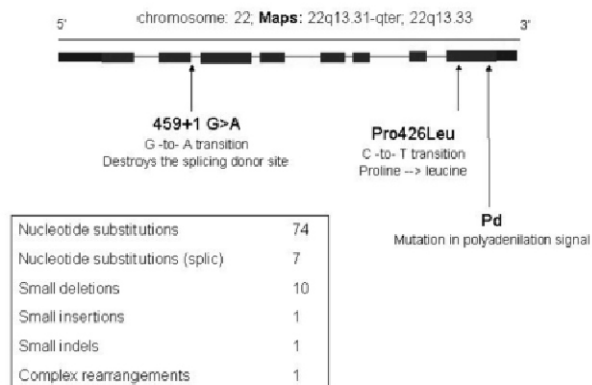


Figura 1: Mapa del gen de la ARSA y de las mutaciones responsables de la enfermedad.

La Leucodistrofia Metacromática es una enfermedad autosómica recesiva, por lo tanto para que la enfermedad se manifieste clínicamente el sujeto debe poseer una mutación patológica en ambos alelos del gen. Las mutaciones, desde el punto de vista funcional, se dividen en :alelos 0 (o1), asociados a una actividad ARSA de residuo nulo, entre las cuales, la más frecuente es la mutación (459 +1G >A) y alelos R (oA), codificados por una enzima con mínima actividad

ARSA, en el cual el residuo más frecuentemente encontrado en la población europea es el P 426L e I 179S. La homocigosis para los alelos 0 se encontró sobre todo en casos de LDM infantil tardía que es la más grave en el rango de la enfermedad. La heterocigosis compuesta, con una mutación determinante con un alelo 0 y una mutación R, es más frecuente en las formas juveniles en cambio la homocigosis de alelos R predomina en la forma más leve del adulto, atribuyéndose por esto una correlación inversa entre la severidad de la enfermedad y la actividad ARSA residual.

Actualmente gran parte de los pacientes no son rutinariamente sometidos a la secuenciación de gen ARSA, como consecuencia de esto, aproximadamente el 50% de los alelos no han sido identificados y hasta el momento no es posible predecir la evolución clínica basándose únicamente en el análisis de las mutaciones.

Las manifestaciones clínicas similares a las de la LDM, pueden ser causadas por dos defectos genéticos: déficit del activador de esfingolípidos, saposina (sphingolipid activator saposin:SAP;SAP-B) en el cual la actividad ARSA es normal y el déficit múltiple de sulfatos, debido a la mutación SUMF-1.

En la pseudodeficiencia hay un déficit parcial de ARSA, que no causa trastornos clínicos, puede complicar el diagnóstico y la identificación de los portadores de LDM. Esta condición también se puede encontrar en sujetos sanos.

Las principales características anátomo-patológicas son la desmielinización y la acumulación de gránulos metacromáticos, tanto en el SNC como en el SNP (en las células microgliales, en los oligodendrocitos y en las células de Schwann). También en algunos órganos como retina, riñones, hígado, testículo, páncreas, glándulas sudoríparas, en la corteza suprarrenal y en el tejido rectal.

Aspectos clínicos

Forma Infantil Tardía.

Forma Juvenil.

Forma del Adulto.

Se clasifica en base a la edad de aparición:

Forma infantil tardía (*late infantile* LI): se manifiesta entre el primer y segundo año de vida.

Forma juvenil: aparece entre los 4 y los 12 años; se divide en: precoz (antes de los 6 años *early juvenile* EJ) y tardía (después de los 6 años *late juvenile* LJ).

Forma del adulto (*adult AD*) de los 12 a los 70 años.

La forma infantil tardía (LI) y la juvenil precoz (EJ) son los casos más frecuentes, tienen un fenotipo más grave y progresan rápidamente.

Se caracteriza por retardo en el desarrollo y pérdida de las etapas madurativas adquiridas, crisis epilépticas, arreflexia y atrofia muscular, tetraparesia espástica,



disfagia, ceguera, sordera. El pronóstico es grave, llevando a la muerte del niño, después de pocos años de aparecidos los síntomas.

En la forma tardía juvenil (LJ) la dificultad cognitiva, precede a los disturbios de la deambulación y la progresión es más lenta.

Se caracteriza por dificultad en el aprendizaje escolar y trastornos en la conducta, como confusión, dificultad en la marcha, incontinencia, disartria y signos extrapiramidales; su desarrollo puede llevar más de 20 años.

En el adulto cursa con trastornos del comportamiento y deterioro cognitivo; hay cambio de la personalidad y disminución de la performance intelectual, ansiedad, pensamientos desorganizados, y puede haber síntomas de depresión, psicosis, esquizofrenia o paranoia.

Normalmente esta forma de enfermedad tiene un pronóstico que varía entre los 5 y 10 años, pero en algunos casos puede extenderse a varios decenios.

La mayor parte de los pacientes evidencian en el transcurso de la enfermedad crisis epilépticas focales o generalizadas. En algunos casos, podrían tratarse de crisis demostrables únicamente con el trazado de un EEG y no clínicamente evidentes.

Algunos pacientes presentan acumulación variable de sulfátidos, en especial en vesícula, excluyéndola desde el punto de vista funcional.

Hemos evidenciado entre los pacientes seguidos en nuestro centro una gran heterogeneidad del cuadro clínico y del curso de la enfermedad aún entre sujetos con una aparición similar y por eso clasificados bajo la misma forma de LDM. Por lo tanto, considerar únicamente la edad de aparición de los síntomas como el único factor pronóstico, no nos parece adecuado, además que a menudo es difícil datar con precisión el primer síntoma de la enfermedad, a causa de la variabilidad de las primeras manifestaciones y del retraso del diagnóstico que caracteriza a muchos de los pacientes.

Diagnóstico

1) Test bioquímicos

El primer paso es el dosaje de la actividad ARSA para individualizar un eventual déficit (4). Es necesario, sin embargo, tener presente que una considerable variabilidad de la actividad de la enzima entre sujetos sanos y que la presencia del alelo Pd, responsable de una actividad enzimática de 5 al 15% es más bien frecuente en la población. Una actividad ARSA normal se observa después en los sujetos enfermos que poseen un déficit de saposina B, debido a que la muestra utilizada no depende de su activador, el diagnóstico de LDM podría ser erróneamente excluido

en estos sujetos.

El mejor modo para diferenciar las diversas condiciones descriptas son: el dosaje de los sulfátidos en orina y el análisis molecular.

Se encuentra en alta cantidad en sedimento urinario de los enfermos con LDM y en los sujetos que tienen mutaciones del gen de la saposina y normal o levemente aumentada en la Pd.

2) Análisis de las mutaciones

Actualmente son investigadas en todos los pacientes como exámenes de rutina las mutaciones más comunes:

Los más comunes son: 459 + 1G > A, P426L e I179S(3). Pero éstas se identifican en menos del 50% de los casos.

Los alelos Pd (Mutation in polyadenylation signal) pueden ser identificados en una muestra sobre ADN, pero su identificación no puede excluir un alelo responsable de la enfermedad.

En resumen, el análisis de las mutaciones no conduce siempre a una certeza diagnóstica, debería ser siempre combinada con ensayos bioquímicos y evaluaciones clínicas.

Como proceso diagnóstico, hasta ahora, ha sido propuesto el siguiente algoritmo:

Actividad ARSA < 10%

LDM verdadera

El análisis molecular para los alelos LDM y Pd ayudan a distinguir los posibles genotipos.

Actividad ARSA 10-30%

LDM probable

Recolección de orina de 24 horas para dosaje de los sulfátidos urinarios:

Bandas fuertes = confirma LDM

Bandas livianas = portador LDM

Bandas ausentes = no LDM

Actividad ARSA 25-60%

Posible déficit del activador Saposina

Recolección de orina de 24 horas para dosaje de los sulfátidos urinarios:

Bandas fuertes: déficit SAP definido

Bandas livianas: test para los alelos Pd con la finalidad de diferenciar entre portador LDM, portador de Pd o Pd/Pd

Bandas ausentes: no LDM

Actividad ARSA normal

Recolección de la orina de 24 horas para dosaje de los sulfátidos urinarios:

Bandas fuertes: SAP/SAP

Bandas ausentes: no LDM

Pero consideramos seguramente útil, individualizar las mutaciones presentes en cada enfermo y su evaluación funcional, con la finalidad de caracterizar mejor la correlación entre genotipo y fenotipo, para poder en un futuro predecir el curso de la enfermedad sobre la base de las mutaciones individualizadas. Tal estudio es realizado actualmente en nuestro laboratorio para todos los pacientes investigados en nuestro centro.

3) Exámenes radiológicos, histopatológicos y neurofisiológicos

Sólo desde hace alrededor de 13 años la Resonancia Magnética (RM) del encéfalo es utilizada para el diagnóstico radiológico de la Leucodistrofia Metacromática (5).

La RM del encéfalo muestra inicialmente en T2: hiperintensidad, extendida en forma simétrica en la sustancia blanca infratentorial y periventricular

supratentorial, con un compromiso relevante, envolviendo las regiones posteriores y resguardando las fibras arcuatas.

Con el avance de la enfermedad, se afecta el cuerpo calloso, sustancia blanca cerebral, trayectos corticoespinales, cápsula interna y tálamo. En la progresión de la enfermedad hay afectación de fibras en U y signos de atrofia.

Otra manifestación común son las lesiones atigradas de desmielinización. Las lesiones no captan los medios de contraste. Reevaluando, no obstante los exámenes realizados a nuestros pacientes desde la aparición de la enfermedad se constata una clara y común progresión en el tiempo(6,7).

La neuropatía periférica está presente generalmente en las formas infantiles y juveniles, mientras que pueden

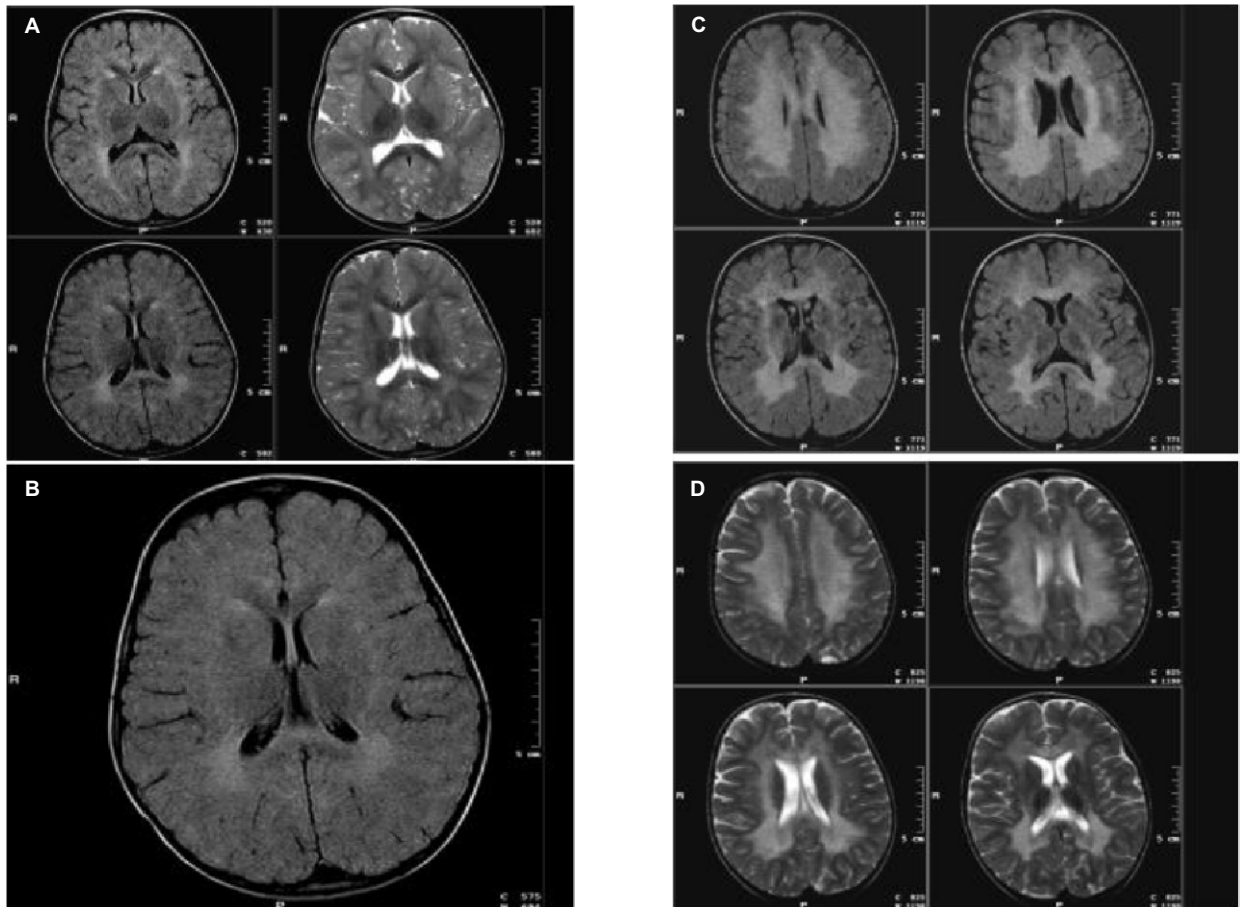


Figura 2:
A-B RMN de encéfalo de un paciente portador de la forma infantil tardía a los 16 meses del inicio de la enfermedad prevaleciendo el compromiso posterior a-derecha y b-(secuencia flair), a-izquierda (secuencia T2).
C-D otro paciente portador de la forma infantil tardía a los 2 años y 4 meses del inicio de la enfermedad con compromiso anterior y posterior (C-secuencia flair-D secuencia T2).



estar completamente ausentes cuando aparecen en el adulto. Se presenta como una neuropatía desmielinizante con una grave y progresiva reducción de la velocidad de conducción en el curso de la enfermedad. Los potenciales de acción motora, disminuyen en amplitud y aumentan en latencia. Se pueden presentar signos neurofisiológicos de neuropatía periférica cuando la enfermedad todavía es asintomática. El empleo de otras técnicas neuro-fisiológicas, como los potenciales evocados visuales y auditivos, no tienen en cambio un rol diagnóstico, pero pueden ser útiles en el monitoreo de la enfermedad y en la evaluación de la gravedad, por lo que respecta a la degeneración de la capacidad perceptiva del enfermo (7).

Por biopsia del nervio sural, se pueden observar acúmulos de gránulos metacromáticos, pero esta metodología ha dejado el lugar a otras técnicas diagnósticas bioquímicas y moleculares menos invasivas.

4) Diagnóstico prenatal y screening del estado del portador

Antes del nacimiento, se puede determinar la actividad de la ARSA, mediante cultivo celular de líquido amniótico o de vellosidades coriónicas. El diagnóstico pre-natal debería ser propuesto a todas las parejas que tienen el antecedente de un hijo afectado.

El estado de portador puede ser reconocido, mediante el dosaje de la actividad de la ARSA, pero existe la posibilidad de obtener valores que se superpongan a los de la población sana. Es indispensable diferenciar al portador LDM de la condición benigna Pd. En las familias con antecedentes, lo más efectivo es el análisis de las mutaciones.

Pronóstico y complicaciones

La LDM es una patología degenerativa que lleva inevitablemente a la invalidez total y a la muerte.

En las formas LI e I las mayores complicaciones son aquellas ligadas a la permanencia en cama, la incontinencia y la incapacidad de deglutir, de comunicarse y epilepsia. A veces manifiestan dolor, a menudo, difícilmente localizable a causa de la imposibilidad de comunicación, esto atribuible a la neuropatía.

Posibilidades terapéuticas actuales

Actualmente no existe ningún tratamiento disponible específico para la LDM a excepción del trasplante de médula ósea en algunos casos seleccionados.

En todos se los casos se requieren correctos tratamientos de los síntomas como:

Fisioterapia y fármacos antiespásticos para mejorar la deambulación y disminuir al mínimo las contracturas y las complicaciones asociadas.

Fisioterapia respiratoria y adecuado control de las

infecciones pulmonares muy frecuentes a causa de la disfagia.

Adecuado aporte calórico, vitamínico y de oligoelementos, pudiendo requerir la colocación de una sonda nasogástrica con la progresión de la enfermedad o gastrostomía permanente para la nutrición enteral.

Fármacos antiepilépticos para el control de las crisis que pueden no ser clínicamente evidentes y requerir un monitoreo electroencefalográfico.

Adaptar al paciente a un contexto educacional, promover y mantener el contacto con la familia, amigos y la actividad habitual.

Estamos convencidos y esperanzados que las reevaluaciones periódicas de la enfermedad desde el punto de vista clínico y mediante exámenes complementarios permiten una mejor calidad de vida y un válido apoyo a la familia.

No existe un tratamiento específico para la LMD a excepción del trasplante de médula ósea que se realiza como tratamiento eficaz en algunas patologías lisosomales (8).

La migración de células estaminales (stem-cells) derivadas de la médula ósea del donante en los órganos blanco de la enfermedad puede reemplazar la población celular residente carente de la enzima. Se realizaría para retardar la aparición de la enfermedad en las formas juveniles y su progresión. Se indica en la forma LI, rápidamente progresiva, en el estadio presintomático, con la condición de que exista una ventana terapéutica de por lo menos un año, pudiéndose realizar si existiese un hermano afectado por la enfermedad.

Teniendo presente estos criterios de selección se comprende como lamentablemente sólo una pequeña parte de los pacientes con LDM puede beneficiarse con el trasplante de médula ósea.

Hay muy pocos donantes HLA-compatibles, por lo que el trasplante se practica en forma reducida.

Esta modalidad terapéutica está asociada a una alta mortalidad y morbilidad ligadas al tratamiento condicionante, el rechazo y a la enfermedad injerto contra huésped (9).

Perspectiva terapéutica: la terapia génica

Luego de resultados preliminares se evidenció que la transferencia de genes mediante vectores retrovirales en células hematopoyéticas caracterizadas por tener déficit de la ARSA, no estaría en condiciones de prevenir o de controlar el fenotipo de ratones con LDM transplantados. La corrección de esta patología, parecería en efecto requerir elevados niveles de expresión del gen terapéutico por parte de las células vectoras para lograr, a través del fenómeno de la

corrección cruzada, adecuados niveles enzimáticos cerebrales.

Los vectores lentivirales, capaces de infectar con alta eficacia por largos períodos de tiempo las células afectadas representan un válido instrumento capaz de llevar la enzima a diferentes niveles del SNC. Mediante este abordaje, se comprobó que el daño neuropatológico se corrige y también el trastorno del aprendizaje ligado al hipocampo, en el ratón LDM, constituyéndose en una potencial terapia particularmente prometedora para la LDM. Inoculando directamente el vector que contiene la enzima arilsulfatasa A en el SNC (terapia génica en vivo)(10), han sido obtenidos resultados muy satisfactorios con una neta reducción de los acúmulos y una mejoría de cuadro clínico. Existe un límite fundamental a este abordaje que consiste en la distribución del gen terapéutico que queda confinado al órgano inoculado. Dado que esta enfermedad también afecta al SNP, es necesario desarrollar un sistema mediante el cual el gen sano pueda alcanzar todos los órganos afectados en la enfermedad.

El tratamiento de sostén definido como terapia génica ex vivo (11) consiste en el aislamiento de células estaminales(stem-cells) hematopoyéticas, la inserción del gen codificante de la enzima en su interior a través de vectores lentivirales y su reintroducción en el animal enfermo. Han sido recientemente demostrados por primera vez efectos terapéuticos significativos y alentadores de este tratamiento; seguidamente después del trasplante de células estaminales corregidas con el gen terapéutico arilsulfatasa A en animales afectados por la LDM, observándose la completa reconstrucción de la actividad enzimática defectuosa en las células hematopoyéticas y en los

tejidos afectados. Incluso en el SNC y nervios periféricos se ha evidenciado una reducción de los acúmulos de material patológico y los exámenes complementarios han comprobado una mejoría del cuadro clínico en los animales tratados antes de la aparición de los síntomas, obteniéndose así una completa protección del desarrollo de los síntomas y signos neurológicos característicos de la LDM murina. La terapia génica se ha demostrado significativamente más eficaz que el trasplante tradicional de donante sano para corregir la enfermedad.

Bibliografía

- (1) Biffi A, Del Carro U, Bandoli C, Gerevini S, Amadio S, Fumagalli F, Roncarolo MG, Sessa M. *Clinical History and new prognostic indicators in Metachromatic Leukodystrophy. Abstract book of World Lysosomal Disease Research Network Symposium. Minneapolis, MN, USA. May 2004: 49*
- (2) Kreysing HJ, von Figura K, Gieselmann V. *The structure of the arylsulfatase A gene. Eur J Biochem 1990; 191:627-31.*
- (3) Kolodny EH, Fluharty AL. *Metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency: sulfatide lipidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. Metabolic and molecular basis of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1994:2693-739.*
- (4) Tylki-Szymanska AT, Czartoryska B, Lugowska A. *Practical suggestions in diagnosing metachromatic leukodystrophy in probands and in testing family members. Eur Neurol 1998; 40:67-70.*
- (5) Demaerel P, Faubert C, Wilms G, Casaer P, Piepgras U, Baert AL. *MR findings in leukodystrophy. Neuroradiology 1991; 33:368.*
- (6) Gerevini S, Baldoli C, Biffi A, Fumagalli F, Roncarolo MG, Sessa M. *Uso della Risonanza Magnetica ed in particolare delle sequenze in diffusione come monitoraggio dell'evoluzione di malattia nella leucodistrofia metacromatica. Rivista di neuroradiologia 2004; 17 (suppl.1): 42*
- (7) Zafeiriou DI, Kontopoulos EE, Michelakakis HM, Anastasiou AL, Gombakis NP. *Neurophysiology and MRI in late-infantile metachromatic leukodystrophy. Pediatr Neurol 1999; 21(5):843-6.*
- (8) Krivit W, Peters C, Shapiro EG. *Bone marrow transplantation as effective treatment of central nervous system disease in globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, mannosidosis, fucosidosis, aspartylglucosaminuria, Hurler, Maroteaux-Lamy, and Sly syndromes, and Gaucher disease type III. Curr Opin Neurol 1999; 12:167-176.*
- (9) Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. *Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). Bone Marrow Transplant 2002; 30:215-22.*
- (10) Consiglio A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A et al. *In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. Nat Med 2001; 7(3):310-16.*
- (11) Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I et al. *Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cell. J Clin Invest 2004; 113(8):1118-1129.*

TERAPIA GENICA

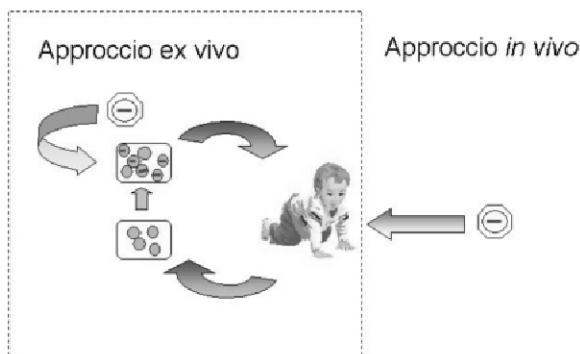


Figura 3: Terapia génica en vivo: se inocula directamente el vector lentiviral en el órgano afectado. Terapia génica ex vivo: el vector lentiviral se inocula en las células estaminales(stem-cells) hematopoyéticas y se reintroducen en el animal enfermo.