

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

**Diagnóstico molecular de Doença de Fabry  
em amostras de sangue**

Gabriela Pasqualim

Porto Alegre, 2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências

**Diagnóstico molecular de Doença de Fabry  
em amostras de sangue**

Gabriela Pasqualim

Professor orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Co-orientadora: Dra. Ursula da Silveira Matte

Trabalho de conclusão de curso  
submetido ao Instituto de  
Biociências da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul  
como pré-requisito para obtenção  
do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas com Ênfase Molecular,  
Celular e Funcional.

Porto Alegre, 2010

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha grande família por todo apoio e incentivo. Em especial, à minha mãe, Elaine, pelo amor incondicional e por ser um exemplo constante de garra, dedicação e sucesso.

Ao Dr. Roberto pelo voto de confiança ao aceitar ser meu orientador neste trabalho.

A Úrsula por me ter me dado uma chance e ter me aceito em seu laboratório, mas principalmente, por ser sempre tão presente e compreensiva.

Aos amigos do Laboratório de Terapia Gênica do HCPA por terem me acolhido tão bem, pelos conhecimentos partilhados e por todos os ótimos momentos.

A todos meus amigos da faculdade, por partilharem as alegrias e as dores de cabeça nesses cinco anos.

E finalmente, aos meus velhos amigos por todo auxílio nas mais diversas situações e por todo carinho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	7
2.1. Objetivo geral .....	7
2.2. Objetivos específicos .....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Origem da amostra e critério de inclusão dos pacientes.....	8
3.2. Análise molecular.....	8
4.2.1 Coleta das amostras e extração de DNA.....	8
3.2.2 Amplificação por PCR.....	8
3.2.3 Purificação e seqüenciamento dos amplicons .....	10
3.2.4 Análise dos seqüenciamentos e efeito de mutações novas.....	10
3.3 Avaliações de sensibilidade, especificidade e cálculo de valores preditivos.....	11
3.4. Aspectos éticos .....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÕES .....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mutações descritas no Human Gene Mutation Database (HGMD) até outubro de 2010 .....	5
Tabela 2: Padrão ouro do diagnóstico de Doença de Fabry .....	6
Tabela 3: Reagentes utilizados para amplificação por PCR dos 7 éxons do gene <i>GLA</i> .....	10
Tabela 4: Caracterização dos primers utilizados para amplificação do gene <i>GLA</i> por PCR.....	9
Tabela 5: Classificação das amostras para cálculo dos valores preditivos .....	11
Tabela 6: Frequência de pacientes latino-americanos com suspeita de Doença de Fabry analisados neste estudo, agrupados por país, presença de mutação conhecida e resultado da análise molecular.....	13
Tabela 7: Alterações patogênicas encontradas no gene <i>GLA</i> de pacientes com suspeita de Doença de Fabry.....	15
Tabela 8: Alterações no gene <i>GLA</i> diagnosticadas em pacientes mexicanos com suspeita de DF. ....	16
Tabela 9: Alterações no gene <i>GLA</i> diagnosticadas em famílias de pacientes brasileiros com suspeita de DF. ....	19
Tabela 10: Diagnóstico bioquímico de Doença de Fabry. Valores de atividade enzimática da $\alpha$ -Galactosidase A em pacientes portadoras da mutação p.A156D e familiares não afetadas. ....	22
Tabela 11: Comparação entre os Valores Preditivos Positivos (VPP) e Valores Preditivos Negativos (VPN) de diferentes testes bioquímicos em mulheres com suspeita de DF. ....	26

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da $\alpha$ -Galactosidase A. ....	1
Figura 2: Reação catalisada pela enzima $\alpha$ -Galactosidase A. ....	2
Figura 3: Alterações encontradas em pacientes com suspeita de DF.....	14
Figura 4: Polimorfismos encontrados em pacientes com suspeita de DF latino-americanos .....	14
Figura 5: Eletroferogramas do gene <i>GLA</i> : a) a mutação c.195-1G>C (IVS1-1G>C) em heterozigose; b) mutação c.334C>A (p. R112S) em heterozigose; c) mutação c.1024C>T (p.R342X) em heterozigose .....	16
Figura 6: Eletroferogramas do gene <i>GLA</i> . a) mutação c.718_719delAA em heterozigose; b) mutação c.937G>T (p.D313Y) em heterozigose .....	17
Figura 7: Eletroferogramas do gene <i>GLA</i> : a) polimorfismo c.-12G>A em heterozigose; b) polimorfismo c.370-77_81delCAGCC em heterozigose. ....	17
Figura 8: Frequência de pacientes brasileiros com suspeita de Doença de Fabry portadores ou não de mutações patogênicas diagnosticados com e sem mutação familiar descrita (n=277).....	18
Figura 9: Eletroferograma do gene <i>GLA</i> com polimorfismo c.-10C>T em heterozigose .....	18
Figura 10: Eletroferograma do éxon 6 do gene <i>GLA</i> com mutação c.805G>A (p.V269M) em heterozigose.....	19
Figura 11: Eletroferograma do éxon 2 do gene <i>GLA</i> com a mutação c.352C>T (p.R118C) em heterozigose .....	20
Figura 12: Eletroferograma do éxon 1 do gene <i>GLA</i> com mutação c.30-32delG em heterozigose.....	20
Figura 13: Eletroferograma do éxon 7 do gene <i>GLA</i> com mutação c.1066C>T (p.R356W) em heterozigose.....	20
Figura 14: Eletroferograma do éxon 4 do gene <i>GLA</i> com a mutação c.605G>A (p.C202Y) em heterozigose.....	21
Figura 15: Eletroferogramas do gene <i>GLA</i> com diferentes mutações: a) c.560C>T (p.M187T) em heterozigose, b) c.1025G>A (p.R342Q) em hemizigose.....	21
Figura 16: Eletroferograma do éxon 3 do gene <i>GLA</i> com mutação c.467C>A (p.A156D) em heterozigose.....	22
Figura 17: Curva ROC para diagnóstico bioquímico de DF por atividade enzimática da $\alpha$ -Gal A em papel filtro.....	24
Figura 18: Curva ROC para diagnóstico bioquímico de DF por atividade enzimática da $\alpha$ -Gal A em leucócitos. ....	24
Figura 19: Curva ROC para diagnóstico bioquímico de DF por atividade enzimática da $\alpha$ -Gal A em plasma.....	25

**LISTA DE ABREVIATURAS**

5' UTR	5' <i>Untranslated Region</i> - Região 5' não traduzida
$\alpha$ -Gal A	$\alpha$ -Galactosidase A
AUC	<i>Area under curve</i> – área abaixo da curva
Curva ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i> - Curva de Características de Operação do Receptor
del	deleção
DF	Doença de Fabry
Gb3	globotriaosilceramida
GLA	Gene que codifica a enzima $\alpha$ -Galactosidase A
IC	Intervalo de Confiança
Kb	<i>Kilo base</i> - quilo base
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

## RESUMO

A Doença de Fabry (DF) é uma doença lisossômica de depósito ligada ao cromossomo X. É causada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -Galactosidase A, codificada pelo gene *GLA* localizado na região Xq21.33-Xq22. A progressão da doença leva a danos vasculares, renais e em diversos outros tecidos. Os pacientes podem apresentar a forma clássica ou as variantes renal, cardíaca e neurológica. Homens afetados geralmente apresentam atividade muito reduzida da enzima. Entretanto, devido à inativação aleatória do X, mulheres portadoras apresentam uma grande variabilidade na expressão clínica, podendo ser assintomáticas ou apresentar formas moderadas ou graves da doença. Logo, o diagnóstico bioquímico de mulheres é, na maioria das vezes, inconclusivo. Portanto, o diagnóstico molecular é fundamental para tratamento e aconselhamento genético. A DF apresenta alta heterogeneidade alélica e a maioria das mutações é privada. O objetivo principal desse estudo foi analisar o gene *GLA* em 301 amostras de pacientes latino-americanos, originárias do Brasil (n=277), México (n=14) e Colômbia (n=10). Em 51 pacientes foram encontrados quatro polimorfismos não patogênicos: c.-12G>A (n=13), c.370-77\_81delCAGCC (n=10), c.-10C>T (n=6) e p.A292D (n=3). Associações entre eles também foram encontradas; sendo a mais comum c.-10C>T em combinação com c.370-77\_81delCAGCC (n=9). Ao total foram diagnosticados 50 pacientes com 12 mutações patogênicas já descritas: c.30-32delG, c.195-1G>C, p.R112S, p.R118C, p.M187T, p.C202Y, c.718\_719delAA, p.V269M, p.D313Y, p.R342Q, p.R356W e p.R342X. Em 14 pacientes de uma família brasileira, foi encontrada a mutação nova c.467C>A (p.A156D), predita como possivelmente patogênica. A atividade enzimática em heterozigotas dessa família ficou abaixo do normal em plasma e muito abaixo do normal em leucócitos. Comparando-se a sensibilidade e especificidade do diagnóstico bioquímico em papel filtro de mulheres (n=70, 15 heterozigotas), leucócitos e plasma (n=19, 11 heterozigotas) com a Curva ROC, atividade em plasma se mostrou muito mais eficiente, com valores de 91% e 100%, respectivamente. Esse ensaio também foi o único que se mostrou capaz de não gerar falso-positivos e gerou apenas 27% de falso-negativos.

Palavras chave: Doença de Fabry;  $\alpha$ -Galactosidase A; mutações; polimorfismos; sensibilidade; especificidade.

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Fabry (DF), também conhecida como Doença de Anderson-Fabry, é um erro inato do metabolismo de glicoesfingolipídeos. É causada pela deficiência da galactohidrolase lisossomal  $\alpha$ -Galactosidase A (Figura 1) ( $\alpha$ -Gal A, EC 3.2.1.22) (Masson et al., 2004).

A  $\alpha$ -Galactosidase A é uma enzima homodimérica e cada monômero é composto por dois domínios (Figura 1), sendo que o domínio 1, N-terminal, contém o sítio ativo (Garman & Garboczi, 2004). Ela catalisa a hidrólise de resíduos terminais de  $\alpha$ -D-galactosil (galactose) em glicolipídios e glicoproteínas (Figura 2), predominantemente globotriaosilceramida (Gb3) nos lisossomos (Sugawara et al., 2008). Devido à deficiência total ou parcial de  $\alpha$ -Galactosidase A, os esfingolipídios neutros contendo uma  $\alpha$ -galactose terminal, principalmente globotriaosilceramida (Gb3), acumulam-se gradualmente por todo corpo desde a infância, causando uma doença multisistêmica. (Masson et al., 2004).

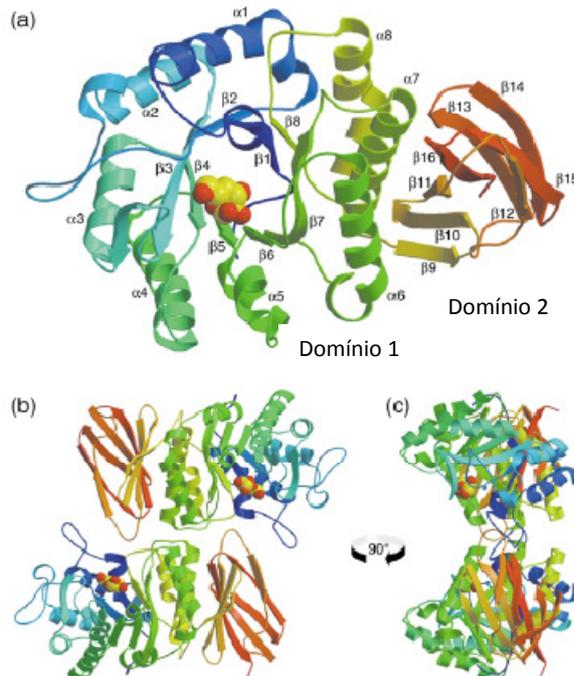


Figura 1: Estrutura da  $\alpha$ -Galactosidase A. (a) Estrutura do monômero. A extremidade N-terminal está colorida de azul e a C-terminal, de vermelho. A enzima possui 2 domínios. O domínio 1 contém o sítio ativo onde o ligante galactose é representado em a amarelo. (b) e (c) Duas visões do dímero de  $\alpha$ -Galactosidase A, forma na qual a enzima é ativa. (Adaptado de Garman & Garboczi, 2004)

Os depósitos são armazenados em corpos de várias vesículas ou em massas intracitoplasmáticas resultando na disfunção celular ou degeneração (Perrot A, et al.,

2002). O acúmulo nas células endoteliais resulta em oclusões dos vasos sanguíneos e estado pré-trombótico; nas células renais, proteinúria e falência renal. Cardiomiopatia e disfunção do músculo estriado podem resultar do depósito nas células musculares. Variados tipos celulares, como células musculares lisas, células das glândulas sudoríparas, macrófagos, astrócitos e neurônios ganglionares gastrointestinais são afetados (Masson et al., 2004).

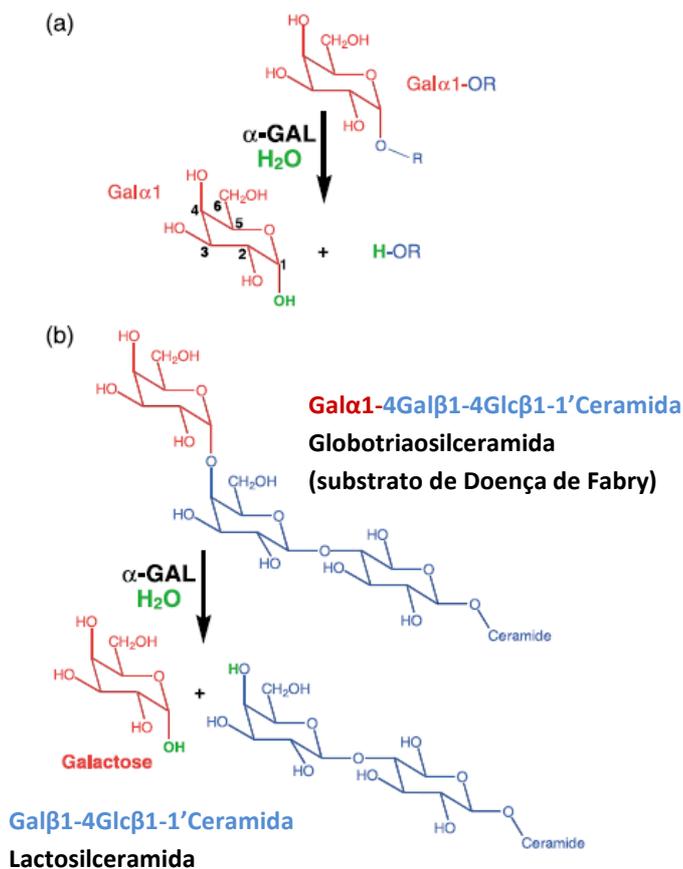


Figura 2: Reação catalisada pela enzima  $\alpha$ -Galactosidase A. (a) Reação geral. Uma galactose terminal é clivada de um oligossacarídeo, glicoproteína ou glicolípido, produzindo  $\alpha$ -galactose (Gal  $\alpha$ -1) e um álcool. (b)  $\alpha$ -Gal A e Doença de Fabry. O substrato globotriaosilceramida é clivado pela  $\alpha$ -Gal A para gerar lactosilceramida. Na ausência da enzima funcional, globotriaosilceramida acumula-se nos tecidos. (Adaptado de Garman & Garboczi, 2004)

Com relação a sintomas clínicos, a forma clássica da doença representa o fenótipo mais grave e as variantes renal, cardíaca e neurológica são fenótipos mais brandos restritos aos determinados sistemas. Derrames são os sintomas neurológicos mais comuns. As formas cardíacas podem se manifestar como distúrbios de condução, hipertrofia ventricular sem hipertensão e cardiomiopatia hipertrófica. As variantes renais são responsáveis por proteinúria ou insuficiência renal progressiva (Masson, 2004). De acordo com Clarke, 2007, uma atividade residual de 5-10% é suficiente para prevenir o acúmulo de globotriaosilceramida em níveis clinicamente significativos.

A Doença de Fabry é uma doença ligada ao X. Por isso, homens afetados (hemizigotos) geralmente apresentam atividade muito reduzida da enzima. Isso leva à forma clássica da doença, que tem início clínico na infância. É caracterizada por angioqueratomas (lesões cutâneas), acroparestesia (dor nas extremidades), córnea verticilata e hipoidrose (diminuição da transpiração) (Desnick, in Scriver, 2001). Com o tempo, os pacientes desenvolvem falência renal e cardíaca e complicações cerebrovasculares, levando a morte precoce (Rozenfeld et al., 2006) Em alguns casos os sinais e sintomas podem ser mais tardios, aparecendo somente após a segunda ou terceira década de vida (Desnick et al., 2001).

Mulheres heterozigotas podem ser completamente assintomáticas ou apresentar manifestações leves, que em geral tem início mais tardio que em homens (Mehta et al., 2010). Entretanto, elas podem apresentar formas moderadas ou graves da doença como resultado da inativação aleatória desigual do cromossomo X que não apresenta mutação. A forma grave é idêntica à forma clássica presente em homens (Masson et al., 2004).

A prevalência mundial da doença é de 1:40000 a 1:117000 homens nascidos vivos para a forma clássica da doença (Meikle et al., 1999 e Desnick, in Scriver, 2001). Isso pode ser uma subestimativa da frequência verdadeira devido à falta de verificação e dificuldades para diagnóstico de casos leves ou atípicos, principalmente os de início tardio (Nakao, 1995; Eng *et al.*, 1997; Metha et al., 2010).

Com relação ao tratamento, uma alternativa disponível aos pacientes de Fabry, desde 2001, é a Terapia de Reposição Enzimática (TRE). Ela tem se mostrado eficiente para aliviar sintomas e desacelerar a progressão da doença (Mehta et al., 2010). Existem duas enzimas comercialmente disponíveis: Agalsidase-alfa cujo nome comercial é Replagal (Shire HGT Inc.) e Agalsidase-beta, conhecida como Fabrazyme (Genzyme Corporation). A administração é feita a cada duas semanas em doses de 0,2 e 1 mg/kg, respectivamente (Masson et al., 2004). Ambas as enzimas tem seqüência de aminoácidos idênticas, mas são produzidas em linhas celulares diferentes: Replagal em uma linhagem humana produzida por engenharia genética e Fabrazyme na linhagem *Chinese hamster ovary (CHO)*. Em consequência disso, possuem diferente composição de carboidratos que resulta em diferenças na distribuição tecidual e a resposta a dosagem (Garman & Garbozci, 2004). Nenhuma diferença clara no efeito clínico foi demonstrada entre a

administração das duas enzimas em um estudo clínico randomizado e controlado, usando-se a mesma dose ou a dose aprovada (Vedder et al., 2008). Para pacientes com a variante cardíaca, existe um segundo tratamento disponível, a infusão de lactose, que presumidamente auxilia na estabilização da enzima  $\alpha$ -Gal A mutante (Mehta et al., 2010).

Além disso, o tratamento com chaperonas farmacológicas tem se mostrado promissor para pacientes com mutações específicas que resultam em enzimas com alteração conformacional e/ou instáveis (Isii et al., 2007; Shin et al., 2008). As chaperonas são pequenos ligantes que podem ser administrado oralmente e se ligar seletivamente à enzima, promover o dobramento correto e encaminhá-la aos lisossomos. Para DF, o uso da chaperona *1-deoxygalactojirimycin hydrochloride* já demonstrou aumento na atividade de muitos mutantes de  $\alpha$ -Galactosidase A e redução de níveis urinários de Gb3 em pacientes com mutações de troca de sentido (Germain & Fan, 2009).

A  $\alpha$ -Galactosidase A é codificada por um gene *housekeeping* (*GLA*, MIM No. 300644) localizado no braço longo do cromossomo X, na região Xq21.33-Xq22 (Desnick, in Scriver, 2001). O gene *GLA* é composto por 12 kb divididos em sete éxons (Kornreich, 1989; Eng et al., 1994) que variam de tamanho entre 92 a 291 pb (Bishop et al., 1988) e seis íntrons que variam de 0,2 à 3,7kb (Bishop, 1988; Kornreich, 1989). A tradução do gene origina uma proteína precursora que é processada à glicoproteína funcional de 398 aminoácidos que age como um homodímero (Garman & Garboczi, 2004) (Figura 1).

Já foram descritas mais de 500 mutações no gene *GLA* até o momento (Tabela 1). Dentre essas, apenas uma (p.D313Y) causa pseudodeficiência e uma (c.1-30G>A) é relacionada com transcrição aumentada. As demais mutações, disponíveis para acesso público no banco de dados HGMD ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk)) são descritas como tendo relação com a doença. Apesar disso, algumas alterações como g.1168G>A (c.-12G>A) e g.1170C>T (c.-10C>T) já foram descritas como não tendo relação com a diminuição da atividade enzimática, sendo consideradas polimorfismos (Davies et al., 1993b).

Tabela 1: Mutações descritas no Human Gene Mutation Database (HGMD) até outubro de 2010 (Adaptado de <http://www.hgmd.cf.ac.uk>)

<b>Tipo de mutação</b>	<b>Número de mutações</b>
Troca de sentido/ sem sentido	329
<i>Splicing</i>	26
Regulatória	1
Pequenas deleções	69
Pequenas inserções	27
Pequenas inserções e deleções	8
Grandes deleções	14
Grandes inserções/duplicações	1
Rearranjos complexos	3
<b>Total (Acesso Público)</b>	<b>478</b>
Total (membros HGMD Professional 2010.3)	599

A maioria das mutações é privada, sendo identificadas apenas em famílias individuais. Porém, algumas exceções como R227X, R227Q e N215S foram encontradas em diversas famílias; sendo, portanto, considerados eventos mutacionais independentes (Asthon-Prola et al., 1999 e Mehta et al., 2010). Muitas mutações resultam em um fenótipo clássico da doença. Contudo, cinco mutações de sentido trocado foram detectadas em hemizigotos com um fenótipo cardíaco moderado (Eng et al., 1994).

O diagnóstico de DF é feito em geral pelo menos 3 anos (e em alguns casos até 20 anos) depois do aparecimento dos sintomas (Mehta et al., 2004; Ramaswami et al., 2006; Ries et al., 2003). Razões para isso incluem a raridade da doença e a diversidade de sintomas não específicos (Mehta et al., 2010) Em homens afetados, ensaios de  $\alpha$ -Gal A mostram consistentemente atividade muito diminuída em leucócitos e no plasma. Atividade enzimática também pode ser medida em culturas de fibroblastos de pele e células renais (Masson et al., 2004). Geralmente, níveis abaixo de 20% são considerados diagnósticos e níveis entre 20% e 35% levam à suspeita de DF (Desnick, in Scriver, 2001; Kitagawa et al., 2008).

O diagnóstico pré-natal pode ser feito de maneira confiável pela demonstração do defeito enzimático em células fetais obtidas por amniocentese ou amostra de vilosidades coriônicas em fetos do sexo masculino (Desnick in Scriver 2001). Ensaios enzimáticos são úteis em hemizigotos, mas heterozigotas geralmente tem níveis de atividade enzimática levemente reduzidos ou normais devido à inativação aleatória do X (Wilcox et al., 2008).

Resumidamente, o padrão ouro do diagnóstico de DF está descrito na tabela abaixo:

Tabela 2: Padrão ouro do diagnóstico de Doença de Fabry

<b>Categoria</b>	<b>Técnica utilizada</b>
Homens	Atividade da $\alpha$ -galactosidase A em leucócitos ou plasma se a análise de leucócitos não for possível
Mulheres	Seqüenciamento do gene <i>GLA</i> e identificação da mutação patogênica ou teste para todas as mutações familiares conhecidas
Diagnóstico pré-natal	Seqüenciamento de gene <i>GLA</i> e identificação da mutação patogênica ou teste para uma mutação familiar conhecida (medida da atividade enzimática não é confiável)
	Seqüenciamento de gene <i>GLA</i> e identificação de uma mutação familiar conhecida

Adaptado de Zarate & Hopkin, 2008

Tendo em vista a grande variabilidade nos níveis enzimáticos em heterozigotas com DF, conseqüência da inativação aleatória do cromossomo X, o diagnóstico bioquímico é inconclusivo. Portanto, o diagnóstico molecular é fundamental para tratamento e aconselhamento genético.

Além disso, a identificação da mutação familiar em hemizigotos facilita o diagnóstico de parentes possivelmente afetados. Também é importante salientar que o diagnóstico molecular pode contribuir para estudos de correlação genótipo/fenótipo e para a avaliação dos resultados da terapia de reposição enzimática (Pereira, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. Objetivo geral

Analisar o gene da  $\alpha$ -Galactosidase A (*GLA*) em pacientes com suspeita de Doença de Fabry através de amostras de sangue.

### 2.2. Objetivos específicos

- Amplificar os sete éxons do gene *GLA*;
- Analisar o gene da *GLA* por seqüenciamento automatizado;
- Analisar as alterações encontradas e comparar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico genético com o bioquímico em mulheres, calculando os valores preditivos positivo e negativo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Origem da amostra e critério de inclusão dos pacientes

As amostras utilizadas neste estudo, coletadas de junho de 2009 à novembro de 2010, são originárias de três países latino-americanos: Brasil (224 mulheres e 53 homens), Colômbia (10 mulheres e 2 homens) e México (12 mulheres e 2 homens). O critério de inclusão dos pacientes no estudo foi a suspeita do médico solicitante de que o paciente tenha Doença de Fabry baseado em critérios clínicos ou história familiar positiva. Assim, quando houve essa suspeita, o próprio médico enviou sangue coletado do paciente em papel filtro ou tubo com EDTA para o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por correio.

#### 3.2. Análise molecular

##### 4.2.1 Coleta das amostras e extração de DNA

As amostras foram coletadas em papéis filtro (*FTA® Elute* ou *FTA® Classic*) ou em tubos com EDTA. O DNA total das amostras em EDTA foi extraído com o kit EasyDNA (Invitrogen, EUA); o das amostras em *FTA® Classic*, com o reagente *FTA Purification Reagent WB120204*, (Whatman, EUA); e o das amostras *FTA® Elute*, com água. Todas as extrações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

##### 3.2.2 Amplificação por PCR

Os sete éxons do gene *GLA* foram amplificados através de PCR (reação em cadeia da polimerase) no termociclador com gradiente de temperatura Veriti, da AppliedBiosystems.

O programa de amplificação usado é composto das seguintes etapas:

- 1) 1 ciclo - 5 minutos a 95°C (desnaturação)

- 2) 35 ciclos -
- 45 segundos a 95°C (desnaturação)
  - 45 segundos a 48°C-59°C, de acordo com o *primer* (anelamento)
  - 1 minuto e 30 segundos a 72°C (extensão)
- 3) 1 ciclo - 10 minutos a 72°C (extensão final)

A temperatura de anelamento de cada par de *primers* e o tamanho dos amplicons estão descritos na Tabela 3. Com exceção dos *primers* para o éxon 2, para o qual foi utilizado o *primer* descrito por Pereira (2005), todos os demais foram desenhados com o software *Primer3* (v. 0.4.0), disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, e analisados com o software *IDT OlygoAnalyser 3.1*, disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>. As reações foram feitas com um volume final de 25ul, de acordo com a Tabela 4.

Tabela 3: Caracterização dos *primers* utilizados para amplificação do gene *GLA* por PCR.

Éxon	Primer	Sequência 5' → 3'	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento
1	1+	GGA TCA CTA AGG TGC CGC	531pb	57°C
	1-	TCC CGT TGA GAC TCT CCA GT		
2	2+	CTT GTG ATT ACT ACC ACA CT*	367pb	48°C
	2-	AAC AAG CTT CTG TAC AGA AGT GC*		
3	3+	ATG ATT TTG GGG GTT TGT G	487pb	56°C
	3-	AAT GAA CTG AAA GAG AAG AGA TGG		
4	4+	GAC AGA CTG AAC CCC ATC TCA	301pb	59°C
	4-	CGT TGG ACT TTG AAG GAG ACC		
5	5+	TCA AGA GAA GGC TAC AAG TGC	450pb	55°C
	5-	CAA ACA AGA GAG GAG GAA ACA		
6	6+	TCA AGG TAA ATA CAG GTA AAG TTC	454pb	56°C
	6-	AGT AAC ATC AAG AGC AAG GGA A		
7	7+	TTT CCC TTG CTC TTG ATG TTA C	599pb	51°C
	7-	TCA GCC TCC CAA AGT GCT		

(\*Pereira, 2005)

Todos os reagentes foram adquiridos da empresa Invitrogen. A verificação da amplificação dos fragmentos foi realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Tabela 4: Reagentes utilizados para amplificação por PCR dos 7 éxons do gene *GLA*

Reagentes	Volume (em ul)
Água	16,65
dNTP 2mM	2,5
Tampão NH4 1X	2,5
MgCl2 50mM	1,25
Primer forward 20pM	0,5
Primer reverso 20pM	0,5
Taq DNA polimerase 5U/ul	0,1
DNA 100ng	1
Total	25

### 3.2.3 Purificação e seqüenciamento dos amplicons

Os amplicons foram purificados com as enzimas Exonuclease I (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) da GE *Healthcare*. Após a verificação em agarose, foram adicionadas 3,33 U de cada enzima a 6ul do produto de PCR. Em seguida, a reação foi aquecida a 37°C por 30 minutos e a 80°C por 15 minutos.

O produto de PCR purificado foi então quantificado em gel de agarose 1,5% por comparação com *Low Mass Reader* (Invitrogen). Entre 45-60ng DNA foram usados para seqüenciamento, juntamente com 1ul de *primer forward* ou reverso e água q.s.p 6ul. Os *primers* utilizados foram os mesmos do PCR, com concentração de 4 pM.

O seqüenciamento dos amplicons foi realizado de forma automatizada pelo seqüenciador ABI310 *Genetic Analyser* com a utilização do reagente *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems).

### 3.2.4 Análise dos seqüenciamentos e efeito de mutações novas

Os seqüenciamentos foram analisados com o programa *Chromas Lite* (*Technelysium Pty Ltd*) para detectar e identificar a presença de mutações no gene *GLA*. As seqüências foram comparadas com a seqüência de referência X14448.1,

disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/31755](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/31755), através do programa *Nucleotide BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todas as alterações foram confirmadas com o seqüenciamento da fita reversa.

A análise do possível impacto da mutação nova encontrada na estrutura e função da  $\alpha$ -Galactosidase A foi realizada através do software *Polyphen-2* (*Polymorphism Phenotyping v2*), disponível em <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

### 3.3 Avaliações de sensibilidade, especificidade e cálculo de valores preditivos

A avaliação da sensibilidade e especificidade do diagnóstico bioquímico em comparação ao genético (padrão ouro) em mulheres foi realizada através da análise da Curva de Características de Operação do Receptor (Curva ROC- *Receiver Operating Characteristic*). Para tanto, foi utilizado o programa *SPSS Statistics v.19* (IBM Company). Os dados de atividade enzimática em papel filtro, leucócitos e plasma foram obtidos das fichas das pacientes a partir de exames realizados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Além disso, o Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) também foram calculados usando-se como limiar os valores de referência utilizados pelo Serviço de Genética Médica e os valores gerados pela análise da Curva ROC de cada ensaio bioquímico. Para tanto, as amostras foram calculadas de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 5: Classificação das amostras para cálculo dos valores preditivos

Resultado do teste		Diagnóstico genético (Padrão Ouro)		Total
		Positivo	Negativo	
Diagnóstico bioquímico	Positivo	Verdadeiro positivo (A)	Falso positivo (B)	Total de testes positivos (A+B)
	Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro negativo (D)	Total de testes negativos (C+D)
	Total	Total de testes positivos (A+C)	Total de testes negativos (B+D)	Total (A+B+C+D)

(Adaptado de Waldman e Rosa, 1998)

Foram considerados diagnósticos genéticos positivos aqueles apresentaram mutações patogênicas ou possivelmente patogênicas. Para o diagnóstico bioquímico, aqueles que obtiveram valores abaixo dos valores de referência e dos valores gerados pela análise da curva ROC para cada ensaio em questão

Os cálculos do VPP e VPN foram realizados de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{A}{A+B}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{D}{C+D}$$

#### 3.4. Aspectos éticos

Este trabalho foi realizado no âmbito de um programa de diagnóstico de DF oferecido pelo Serviço de Genética Médica do HCPA. Os médicos participantes deste programa solicitam exames diagnósticos para seus pacientes baseados em critérios clínicos. Estes médicos são os responsáveis por informar sobre os procedimentos e realizar o aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares. O uso destes dados para pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (GPPG 09-428).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de junho de 2009 a novembro de 2010 foram analisadas 301 amostras de pacientes com suspeita Doença de Fabry sendo 244 de mulheres e 57 de homens. As amostras eram provenientes de pacientes de 3 países latino-americanos: Brasil (n= 277), México (n= 14) e Colômbia (n=10). Aproximadamente 57% dos pacientes pertenciam a famílias com mutações previamente identificadas e tiveram apenas o éxon da  $\alpha$ -Galactosidase A afetado pela mutação familiar analisado. A Tabela 6 descreve o número de pacientes diagnosticados com ou sem mutação familiar descrita, agrupados por país analisado.

Tabela 6: Frequência de pacientes latino-americanos com suspeita de Doença de Fabry analisados neste estudo, agrupados por país, presença de mutação conhecida e resultado da análise molecular.

Pacientes		Brasil	México	Colômbia	Todos os países
Com mutação descrita na família	Normais	121	4	2	127
	Com mutação patogênica	43	0	5	48
	<b>Total</b>	<b>164</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>175</b>
Sem mutação descrita na família	Normais	104	6	0	110
	Com mutação patogênica	9	4	3	16
	<b>Total</b>	<b>113</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>126</b>
Todos pacientes	Normais	225	10	2	237
	Com mutação patogênica	52	4	8	64
	<b>Total</b>	<b>277</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>301</b>

Ao total foram diagnosticados 64 pacientes com mutações patogênicas já descritas ou mutações novas possivelmente patogênicas, sendo que 2 desses pacientes também apresentaram polimorfismos não patogênicos. Dentre os 237 pacientes normais, 51 apresentaram polimorfismos não patogênicos (Figura 3)

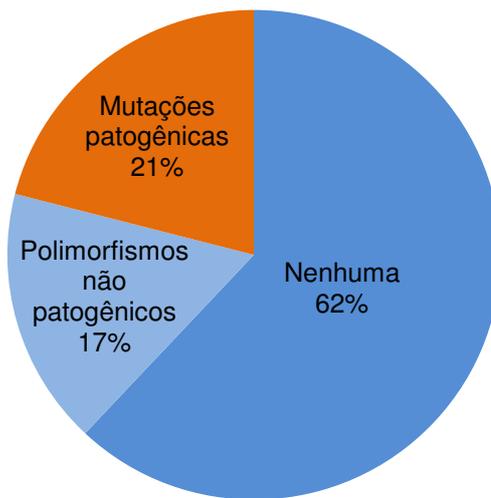


Figura 3: Alterações encontradas em pacientes com suspeita de DF.

Com relação aos polimorfismos encontrados em 51 pacientes (Figura 4), os mais comuns foram c.-12G>A (n=13), c.370-77\_81delCAGCC (n=10) e c.-10C>T (n=6). Associações entre eles também foram encontradas; sendo a mais comum c.-10C>T em combinação com c.370-77\_81delCAGCC (n=9)

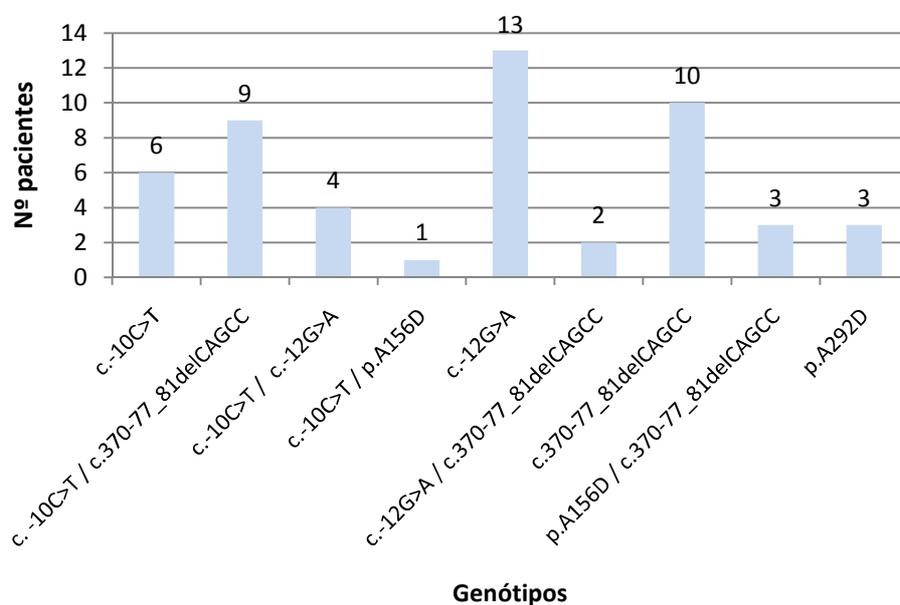


Figura 4: Polimorfismos encontrados em pacientes com suspeita de DF latino-americanos (n=51).

As alterações patogênicas já descritas na literatura e encontradas neste grupo de pacientes estão listadas na Tabela 7.

Tabela 7: Alterações patogênicas encontradas no gene *GLA* de pacientes com suspeita de Doença de Fabry.

Localização	Alteração no cDNA	Alteração na proteína	Referência
Éxon 1	c.30-32delG	p.L120X	Ashton-Prolla et al. (1999)
Íntron 1	c.195-1G>C	-	Chen et al. (1998)
Éxon 2	c.334C>A	p.R112S	Shabbeer et al. (2005)
Éxon 2	c.352C>T	p.R118C	Spada et al. (2006)
Éxon 4	c.560C>T	p.M187T	Shabbeer et al. (2006)
Éxon 4	c.605G>A	p.C202Y	Eng et al. (1997)
Éxon 5	c.718_719delAA	p.S248X	Davies et al. (1994)
Éxon 6	c.805G>A	p.V269M	Shabbeer et al. (2006)
Éxon 6	c.937G>T	p.D313Y	Eng et al. (1993); Yasuda et al.(2003)
Éxon 7	c.1025G>A	p.R342Q	Ploos van Amstel et al. (1994)
Éxon 7	c.1066C>T	p.R356W	Bernstein et al.(1989)
Éxon 7	c.1024C>T	p.R342X	Davies et al. (1996)

Nenhuma mutação patogênica foi encontrada em mais de um país. Em contrapartida, três polimorfismos p.A292D, c.1-12G>A e c.370-77\_81delCAGCC foram encontrados em pacientes brasileiros e mexicanos

As amostras colombianas pertenciam a um grupo familiar (n=8) e a dois outros indivíduos não relacionados. Nenhum polimorfismo foi identificado e 80% dos pacientes foram diagnosticados com mutações patogênicas.

No núcleo familiar foi detectada a mutação c.195-1G>C (IVS1-1G>C, Figura 5a) (Chen et al., 1998) encontrada em 80% das amostras. Nos indivíduos não relacionados foram detectadas as mutações c.334C>A (p. R112S, Figura 5b) (Shabbeer et al., 2005) e c.1024C>T (p.R342X, Figura 5c) (Davies et al., 1996).

As amostras mexicanas eram provenientes de 2 indivíduos não relacionados e 3 famílias: M1 (n=4), M2 (n=5) e M3 (n=3) (Tabela 8). Apenas na família M1 foram detectadas mutações patogênicas.

A mutação c.718\_719delAA (Figura 6a, Davies et al., 1994), detectada no éxon 5, consiste da deleção de duas adeninas do códon 228 e gera um códon de terminação prematuro no resíduo 248 da proteína. Também foi encontrada a mutação c.937G>T (p.D313Y, Figura 6b), descrita primeiramente como patogênica (Eng et al., 1993). Entretanto, um estudo posterior (Yasuda et al., 2003) revelou que essa alteração gera uma proteína estável no pH ácido lisossomal (pH 4.5) com

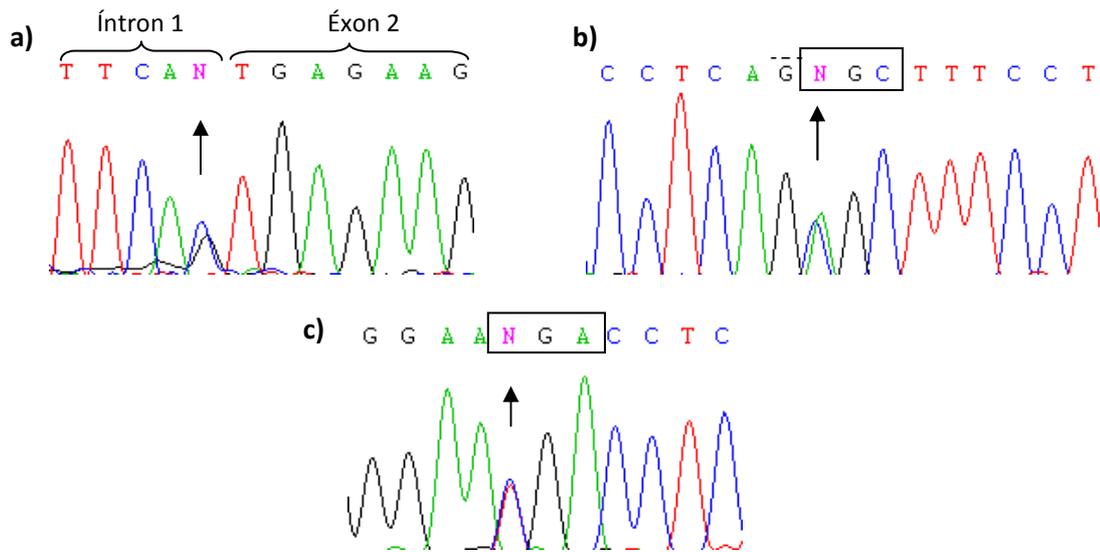


Figura 5: Eletroferogramas do gene *GLA*: a) a mutação c.195-1G>C (IVS1-1G>C) em heterozigose; b) mutação c.334C>A (p. R112S) em heterozigose; c) mutação c.1024C>T (p.R342X) em heterozigose

60% da atividade enzimática normal. Porém, causa uma pseudodeficiência no plasma por ter estrutura instável no pH neutro plasmático (pH7.4). Dessa forma, seria necessária a ocorrência de uma segunda mutação causativa da doença, fato verificado em duas heterozigotas, as quais apresentaram as mutações p.D313Y e c.718\_719delAA.

Tabela 8: Alterações no gene *GLA* diagnosticadas em pacientes mexicanos com suspeita de DF.

Família	n	Alteração	Portadores
M1	4	p.D313Y	1
		c.718_719delAA	1
		p.D313 e c.718_719delAA	2
M2	5	p.A292D	1
		nenhuma	4
M3	3	c.-12G>A	1
		c.370-77_81delCAGCC	1
		nenhuma	1
Indivíduos não relacionados	2	nenhuma	2
		Total	14

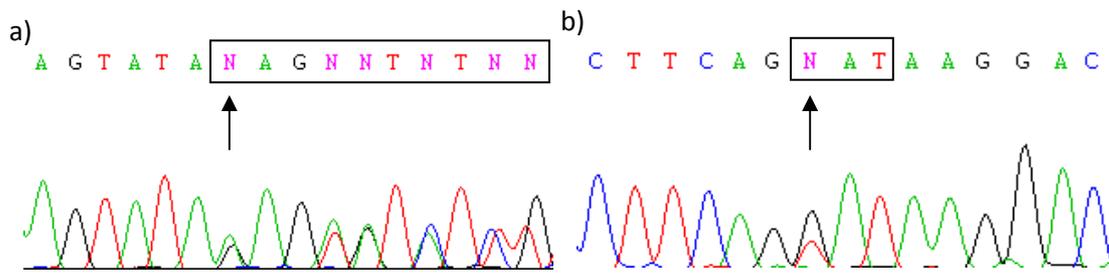


Figura 6: Eletroferogramas do gene *GLA*. a) mutação c.718\_719delAA em heterozigose; b) mutação c.937G>T (p.D313Y) em heterozigose

Com relação a polimorfismos, foi detectada uma variante na região 5' não traduzida (5' UTR), c.-12G>a (Figura 7a). Além disso, o polimorfismo c.370-77\_81delCAGCC foi detectado no íntron 2, 77 pares de base antes do éxon 3 (Figura 7b).

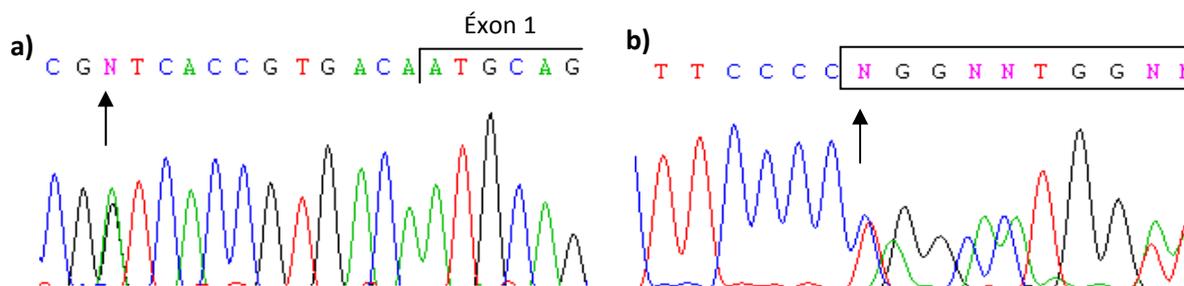


Figura 7: Eletroferogramas do gene *GLA*: a) polimorfismo c.-12G>A em heterozigose; b) polimorfismo c.370-77\_81delCAGCC em heterozigose.

As amostras brasileiras (Figura 8) foram as mais numerosas, representando 92% do total. O número de homens e mulheres analisados foi de 53 e 224, respectivamente. Cerca de 58% dos pacientes eram provenientes de famílias com mutações já diagnosticadas. Os pacientes que apresentaram mutações patogênicas ou provavelmente patogênicas representaram 19% (n=52) da amostra. A frequência de homens afetados com a doença foi 0,23 e a de homens portadores de polimorfismos foi 0,08. As frequências de heterozigotas portadoras de DF, estimadas a partir das frequências masculinas, são de 0,35 e 0,15 respectivamente.

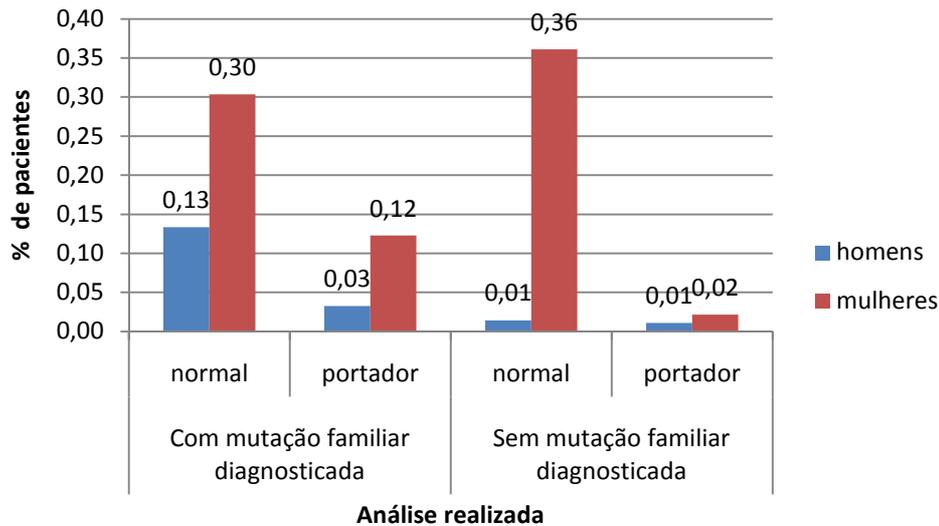


Figura 8: Frequência de pacientes brasileiros com suspeita de Doença de Fabry portadores ou não de mutações patogênicas diagnosticados com e sem mutação familiar descrita (n=277).

Além dos polimorfismos encontrados em amostras mexicanas, c.-12G>a e c.370-77\_81delCAGCC, outra variante polimórfica foi detectada em amostras brasileiras na região 5' não traduzida (5' UTR), c.-10C>T (Figura 9), presente em 20 indivíduos.

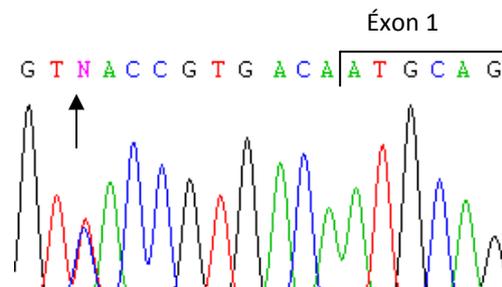


Figura 9: Eletroferograma do gene *GLA* com polimorfismo c.-10C>T em heterozigose

As mutações patogênicas encontradas foram provenientes, principalmente, de 8 grupos familiares de diferentes Estados, o que está de acordo com a característica da DF de apresentar mutações privadas. Houve apenas um caso de uma amostra da Bahia com a mesma mutação de um grupo familiar de São Paulo, c.467C>A (p.A156D). A tabela a seguir descreve as alterações encontradas em pacientes brasileiros distribuídas por núcleos familiares, quando possível, e Estados.

Tabela 9: Alterações no gene *GLA* diagnosticadas em famílias de pacientes brasileiros com suspeita de DF.

Família	Alteração			n	Portadores	Origem	Observação
	cDNA	Éxon afetado	Proteína				
B1A	c.805G>A	6	p.V269M	14	4	DF	Núcleo familiar B1 do Distrito Federal
B1B	c.805G>A	6	p.V269M	99	12	PI	Núcleo familiar B1 do Piauí
B2	c.352C>T	2	p.R118C	5	3	BA	5 irmãs
B3	c.30-32delG	1	p.L120X	4	3	RS	
B4	c.1066C>T	7	p.R356W	10	6	AL	
B5	c.605G>A	4	p.C202Y	2	2	MG	Avó e neta
B6	c.560C>T	4	p.M187T	4	4	SP	
B7	c.1025G>A	7	p.R342Q	11	3	SP	
B8	c.467C>A	3	p.A156D	19	14	SP	1 caso não relacionado na BA
NR* 1	c.467C>A	3	p.A156D	1	1	BA	Paciente sem parentesco conhecido

Total

169

52

\*NR: Não relacionado.

A família B1 foi o maior grupo familiar analisado, totalizando 113 amostras. Essa família possui um núcleo proveniente do Distrito Federal (n=14) e outro do Piauí (n=99). Ambos, porém, apresentam a mesma alteração genética. A mutação c.805G>A (p.V269M, Figura 10), localizada no éxon 6 é uma alteração patogênica descrita por Shabber et al. em 2006. Foi diagnosticada em 5 homens de um total de 37 e em 11 de 76 mulheres. Dessa forma, a frequência de homens afetados nessa família foi de 14% e a frequência estimada de mulheres de 25,2%.

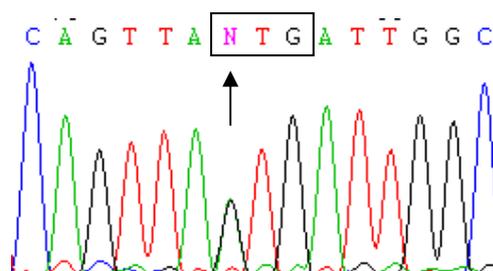


Figura 10: Eletroferograma do éxon 6 do gene *GLA* com mutação c.805G>A (p.V269M) em heterozigose.

A mutação patogênica c.352C>T (p.R118C, Figura 11) descrita por Spada et al. (2006) foi diagnosticada em 3 de 5 irmãs da família B2 da Bahia.

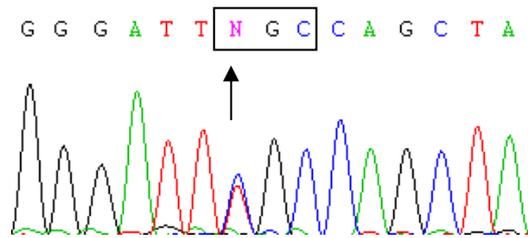


Figura 11: Eletroferograma do éxon 2 do gene *GLA* com a mutação c.352C>T (p.R118C) em heterozigose

A família B3 já havia sido analisada em um estudo de Pereira et al.(2007), que diagnosticou a mutação c.30-32delG (Figura 12) em 3 homens afetados e 3 portadoras. No presente estudo, dentre os 4 pacientes analisados 1 foi diagnosticado como hemizigoto e 2 como heterozigotas. Essa mutação patogênica, descrita por Ashton-Prolla *et al.* em 1999, resulta da deleção de uma guanina entre as posições 30 e 32 do cDNA e introduz um códon de terminação prematuro no resíduo 120 da proteína.

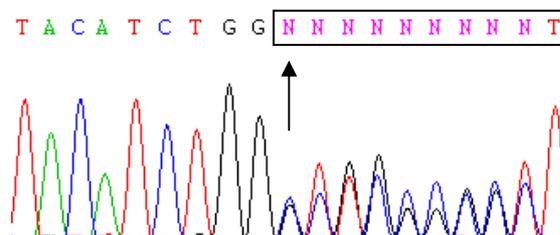


Figura 12: Eletroferograma do éxon 1 do gene *GLA* com mutação c.30-32delG em heterozigose.

Dentre os membros da família B4, originária do Alagoas, foram diagnosticados 3 hemizigotos e 3 heterozigotas para a mutação c.1066C>T (p.R356W, Figura 13). Essa mutação foi descrita como patogênica por Bernstein et al. (1989).

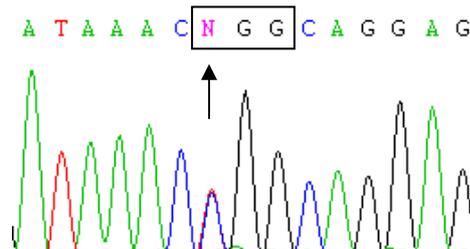


Figura 13: Eletroferograma do éxon 7 do gene *GLA* com mutação c.1066C>T (p.R356W) em heterozigose.

As duas pacientes da família B5 de Minas Gerais, avó e neta, foram diagnosticadas como heterozigotas para a mutação c.605G>A (p.C202Y, Figura 14), descrita por Eng et al.(1997). O pai da neta foi diagnosticado bioquimicamente como afetado pela doença; o que está de acordo com o esperado para uma doença ligada ao X. Outro familiar, um tio paterno, também foi diagnosticado como afetado

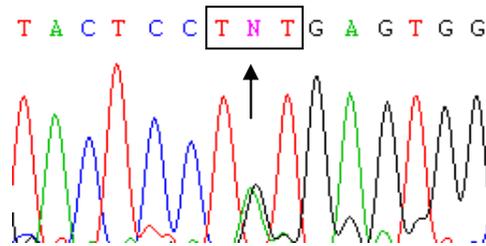


Figura 14: Eletroferograma do éxon 4 do gene *GLA* com a mutação c.605G>A (p.C202Y) em heterozigose

Em São Paulo, foram analisadas 3 famílias portadoras. Os 4 pacientes da família B6, 1 homem e 3 mulheres, foram diagnosticados com a mutação patogênica c.560C>T (p.M187T, Figura 15a), localizada no éxon 4 e descrita por Shabbeer et al. (2006). Na família B7, foi detectada a mutação c.1025G>A (p.R342Q, Figura 15b) (Ploos van Amstel et al., 1994) localizada no éxon 7 em 3 das 11 amostras originárias de Ribeirão Preto.

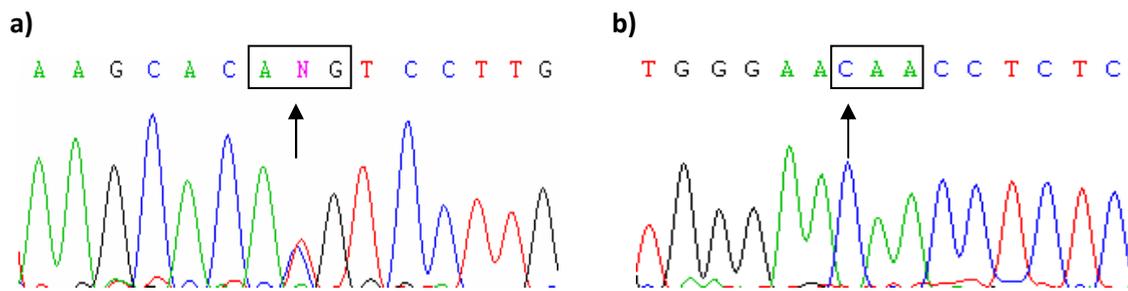


Figura 15: Eletroferogramas do gene *GLA* com diferentes mutações: a) c.560C>T (p.M187T) em heterozigose, b) c.1025G>A (p.R342Q) em hemizigose.

Em 14 membros da terceira família paulista, B8, uma alteração ainda não descrita foi encontrada no éxon 3: a mutação c.467C>A (p.A156D, Figura 16). Outras duas mutações, ambas patogênicas, já foram descritas nesse mesmo códon, p.A156V e p.A156T (Okumiva et al., 1995, e Eng et al., 1994). Com base no software PolyPhen-2, esta troca de uma aminoácido pequeno e hidrofóbico (alanina) por um

de tamanho médio e ácido (aspartato) é possivelmente danosa à proteína, com escore de 0.985 e sensibilidade e especificidade de 0.65 e 0.95 respectivamente. Pode-se inferir, portanto, que se trata de uma variante patogênica.

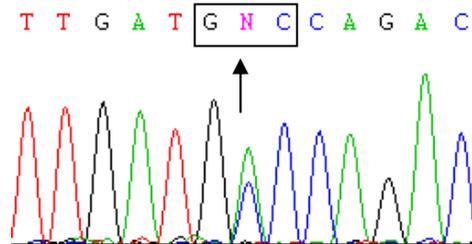


Figura 16: Eletroferograma do éxon 3 do gene *GLA* com mutação c.467C>A (p.A156D) em heterozigose.

O diagnóstico bioquímico de DF foi realizado em mulheres dessa família (Tabela 10). A análise da atividade enzimática da  $\alpha$ -Galactosidase A em papel filtro foi feita em 17 pacientes e a atividade no plasma e em leucócitos, em 7. Os valores de referência para esses ensaios são respectivamente: 2,9 a 14,4 nmol/h/mL, 4 a 22 nmol/h/mL e 26 a 53 nmol/h/mg prot.

Tabela 10: Diagnóstico bioquímico de Doença de Fabry. Valores de atividade enzimática da  $\alpha$ -Galactosidase A em pacientes portadoras da mutação p.A156D e familiares não afetadas.

		Atividade em papel filtro		Atividade em plasma		Atividade em leucócitos	
		normais	heterozigotas	normais	heterozigotas	normais	heterozigotas
N	Válidos	5	12	1	6	1	6
	Ausentes	13	6	17	12	17	12
	Média	5,08	4,38	7,40	3,12	39,00	10,73
	Mediana	4,50	4,05	7,40	3,30	39,00	8,10
	Moda	2,50 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	7	1,80 <sup>a</sup>	39	5,60 <sup>a</sup>
	Desvio Padrão	2,60	2,65		1,15		6,04
	Mínimo	2,50	1,20	7	1,80	39	5,60
	Máximo	8,20	10,00	7	4,30	39	22,00

a. Existem múltiplas modas. Os valores indicados correspondem aos menores.

A média da atividade enzimática da em papel filtro tanto de pacientes normais quanto de heterozigotas ficou acima do valor mínimo de referência. Com relação à atividade em plasma, o valor médio ficou abaixo do valor de referência, mas próximo a ele. A atividade em leucócitos também apresentou valores inferiores aos de referência. Este mesmo padrão de atividade enzimática muito baixa no plasma e em

leucócitos, em comparação aos valores de referência, também foi verificado em dois homens dessa família que obtiveram valores de 0,025 e 0,20 nmol/h/mL e 0,66 e 1,1 nmol/h/mg prot, respectivamente. O diagnóstico genético desses dois indivíduos não foi realizado. Dessa forma, com base nos dados descritos acima, pode-se inferir, que a mutação c.467C>A (p.A156D) está relacionada com o desenvolvimento da Doença de Fabry.

Para comparação da relação entre o diagnóstico genético e bioquímico, dados bioquímicos disponíveis de 82 mulheres foram analisados. A atividade enzimática da  $\alpha$ -Galactosidase A em papel filtro foi obtida para 70 pacientes, sendo 15 heterozigotas para mutações patogênicas e 55 normais. A atividade em plasma e em leucócitos foi medida em um grupo de 19 pacientes, sendo 11 heterozigotas para mutações patogênicas e 8 normais.

A Curva ROC para o diagnóstico bioquímico por dosagem de atividade enzimática em papel filtro (Figura 17) obteve uma área abaixo da curva (AUC - *area under curve*) de 0,730 (IC 95% de 0.574 a 0.887,  $p < 0,01$ ). O ponto de corte referente ao menor valor de referência desse ensaio (4 nmol/h/mL.) possui sensibilidade de 33,3% e especificidade de 90,9%. Se esse valor fosse alterado para 3,45 nmol/h/mL, a sensibilidade do ensaio aumentaria 80%, passando a ser de 60%, o que significa que mais pacientes portadoras seriam identificadas corretamente, ou seja, o número de falsos-negativos diminuiria. Em contrapartida, a especificidade teria um decréscimo de 16%, o que significaria um aumento de falsos-positivos.

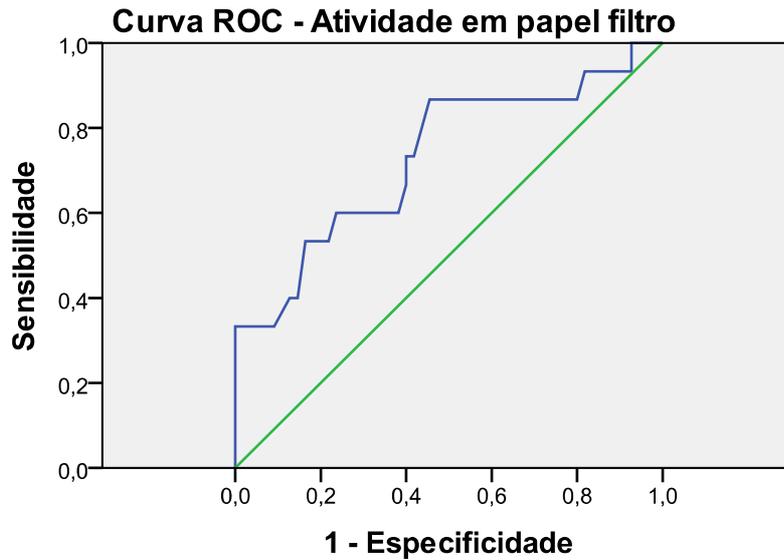


Figura 17: Curva ROC para diagnóstico bioquímico de DF por atividade enzimática da  $\alpha$ -Gal A em papel filtro.  $n=70$ ,  $AUC= 0,730$  (IC95% 0.574-0.887,  $p<0,05$ ).

A curva ROC da atividade enzimática em leucócitos (Figura 18) obteve AUC de 0,920 (IC 95% de 0,794 a 1,  $p<0,005$ ). O ponto de corte referente ao menor valor de referência desse ensaio (26 nmol/h/mg prot) possui especificidade de 100% e sensibilidade de 72,7%. Se esse valor fosse elevado para 31,5 nmol/h/ mg prot, a sensibilidade aumentaria 25%, passando a ser de 90,9%. Essa mudança, entretanto, significaria um decréscimo de 12,5% na especificidade do ensaio.

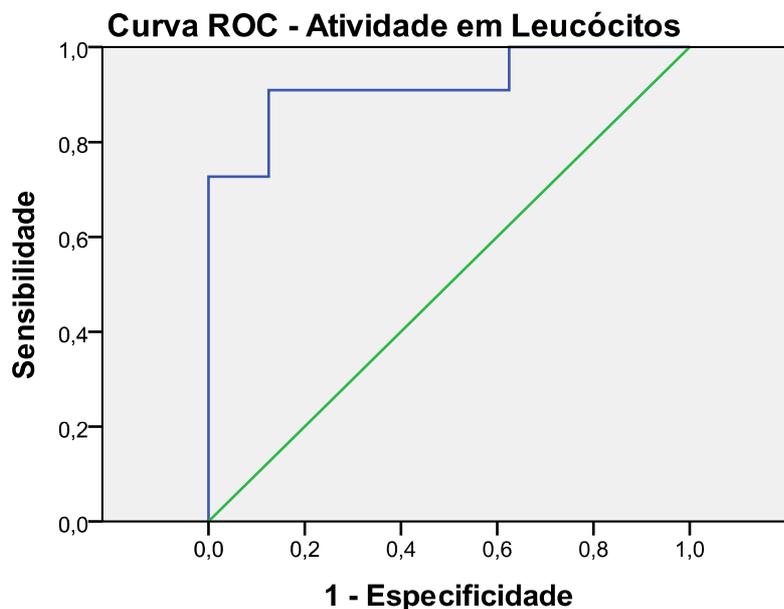


Figura 18: Curva ROC para diagnóstico bioquímico de DF por atividade enzimática da  $\alpha$ -Gal A em leucócitos.  $N=19$ ,  $AUC= 0,920$  (IC95% 0.794 - 1,  $p<0,005$ ).

A curva ROC da atividade enzimática em plasma (Figura 19) obteve AUC de 0,926 (IC 95% de 0.784 a 1,  $p < 0,005$ ). O ponto de corte referente ao menor valor de referência desse ensaio (4 nmol/h/mL.) possui especificidade de 100% e sensibilidade de 36,4%. Se esse valor fosse elevado para 6,95 nmol/h/mL, a especificidade não se alteraria e a sensibilidade aumentaria 150%, passando a ser de 90,9%.

Dessa forma, quando comparados entre si, o diagnóstico bioquímico por determinação da atividade enzimática em papel filtro tem desempenho inferior aos demais, já que apresenta valores menores de sensibilidade e especificidade mesmo quando ajustado o valor de corte.

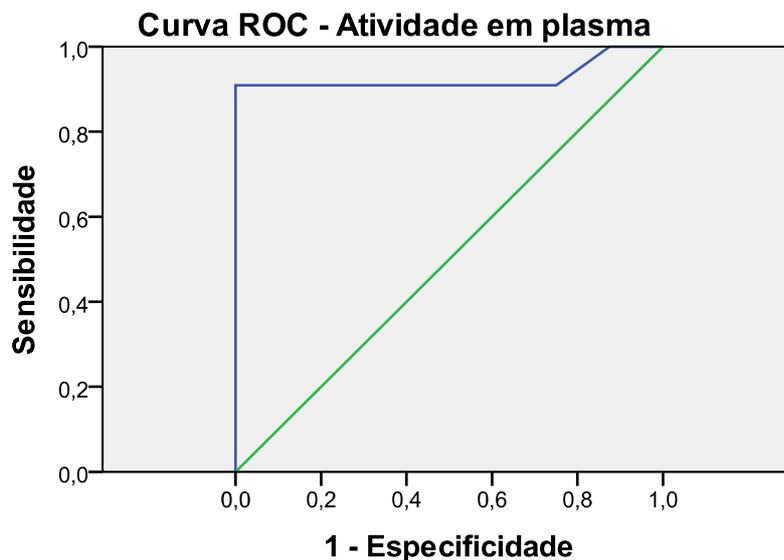


Figura 19: Curva ROC para diagnóstico bioquímico de DF por atividade enzimática da  $\alpha$ -Gal A em plasma. N=19, AUC= 0,926 (IC95% 0.784 – 1,  $p < 0,005$ ).

Os diagnósticos por atividade em leucócitos e plasma, quando ajustados os valores de corte, se mostraram muito eficientes, ambos com sensibilidade de aproximadamente 91%. Porém, a atividade em plasma obteve um nível de especificidade de 100%, enquanto em leucócitos esse valor foi de 87,5%. Portanto, poderia ser considerado o método mais sensível dentre os três.

Além de sensibilidade e especificidade, o Valor Preditivo Positivo (VPP) e o Valor Preditivo Negativo (VPN) de cada ensaio bioquímico também foram calculados usando-se o diagnóstico molecular como padrão ouro (Tabela 11). O VPP expressa

a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo, ou seja, a probabilidade de um teste com resultado positivo ser de fato positivo. O VPN expressa a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo, ou seja, a probabilidade de um teste com resultado negativo ser de fato negativo (Waldman e Rosa, 1998). Os valores calculados para os valores de referência e os valores ajustados pela análise da curva ROC estão listados na tabela abaixo.

Tabela 11: Comparação entre os Valores Preditivos Positivos (VPP) e Valores Preditivos Negativos (VPN) de diferentes testes bioquímicos em mulheres com suspeita de DF.

Ensaio	n	Valores de Referência		Valores Corrigidos	
		VPP	VPN	VPP	VPN
Atividade em papel filtro	70	0,50	0,83	0,41	0,88
Atividade em leucócitos	19	1,00	0,73	0,91	0,88
Atividade em plasma	19	1,00	0,53	1,00	0,83

A atividade em plasma foi o método que obteve melhores resultados quando ajustados os valores de referência. Foi o único que se mostrou capaz de não gerar falso-positivos e gerou apenas 27% de falso-negativos. A atividade em leucócitos teve um aumento de 20% do VPN com o ajuste do valor de referência. Em contrapartida, o VPP apresentou uma leve queda de 9%. A atividade em papel filtro apresentou um pequeno aumento do VPN, que se alterou de 83% para 88%. Porém, permaneceu com valores não satisfatórios de VPP, o que representa uma margem muito grande de falsos-positivos.

Em um estudo anterior (Tsao, 2007), a atividade enzimática em papel filtro de homens foi comparada à atividade em plasma. Amostras de 22 controles positivos e 124 controles negativos resultaram em sensibilidade de 100%, especificidade de 90,3% (IC 95%: 84,1 a 94,7%), valor preditivo positivo de 64,7% (IC95%: 48,6 a 80,2%) e valor preditivo negativo de 100%. Esses dados demonstram que, apesar de não se adequar ao diagnóstico de mulheres, a atividade em papel filtro apresenta acurácia suficiente para ser utilizado na triagem de homens com suspeita de doença de Fabry.

É importante ressaltar que o número de pacientes analisadas nos testes em leucócitos e plasma (n=19) é de aproximadamente 3,5 vezes menor que o em papel

filtro (n=70). Além disso, aproximadamente um terço dessas pacientes era pertencente à família B8 e apresentava a mutação c.467C>A (p.A156D) em heterozigose, o que pode gerar um viés nos resultados. Por isso, é necessário que a análise de um número maior de pacientes seja realizada.

## 5. CONCLUSÕES

- O gene GLA foi analisado com sucesso em todas 301 amostras de pacientes latino-americanos. Todos os éxons do gene foram seqüenciados nas 126 amostras de pacientes sem mutação descrita na família e nas 175 amostras de pacientes com mutação descrita na família, apenas o éxon afetado foi seqüenciado;
- Em 51 pacientes foram encontrados quatro polimorfismos não patogênicos: c.-12G>A, c.370-77\_81delCAGCC, c.-10C>T e p.A292D. Associações entre eles também foram encontradas; sendo a mais comum c.-10C>T em combinação com c.370-77\_81delCAGCC (n=9)
- Foram diagnosticados 64 pacientes com alterações patogênicas ou possivelmente patogênicas. Ao total foram encontradas doze mutações patogênicas já descritas, sendo que nenhuma dessas alterações foi encontrada em pacientes de mais de um dos três países analisados.
- A análise dos seqüenciamentos revelou uma mutação nova c.467C>A (p.A156D), diagnosticada em 14 indivíduos de uma família de São Paulo. Esta mutação foi considerada como possivelmente patogênica pelo software PolyPhen-2. Além disso, a atividade enzimática em plasma e leucócitos ficou abaixo dos valores de referência nas seis heterozigotas diagnosticadas e muito abaixo em 2 homens sem diagnóstico genético, todos pertencentes a família em questão.
- Os valores de sensibilidade e especificidade do diagnóstico bioquímico de sangue mulheres em papel filtro, leucócitos e plasma poderiam ser otimizados alterando-se os pontos de corte dos ensaios para 3,45 nmol/h/mL, 31,5 nmol/h/mL e 6,95 nmol/h/mL, respectivamente.
- Em conseqüência da alteração do ponto de corte, os valores preditivos negativos de todos os ensaios aumentariam, diminuindo o número de falsos positivos. Em contrapartida, os valores preditivos positivos de atividade em papel filtro e leucócitos diminuiriam aproximadamente 20% e 10%, respectivamente.

- É necessária análise bioquímica de um número maior de mulheres para que a sensibilidade e especificidade desses ensaios, comparadas ao diagnóstico genético, sejam medidas com maior acurácia.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHTON-PROLLA, P.; Ashley, G.A.; GIUGLIANI, R.; PIRES, R.F.; DESNICK, R.J.; ENG, C.M. Fabry disease: comparison of enzymatic, linkage and mutation analysis for carrier detection in family with a novel mutation (30delG). *Am. J. Med. Genet.* 1999; 84:420-424.

BERNSTEIN, H.S.; BISHOP, D.F.; ASTRIN, K.H.; KORNREICH, R.; ENG, C.M.; SAKURABA, H.; DESNICK, R.J.; Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alphagalactosidase gene. *J. Clin. Invest.* 1989; Apr;83(4):1390-9.

CHEN, C.H.; SHYU, P.W.; WU, S.J.; SHEU, S.S.; DESNICK, R.J.; HSIAO, K.J.; Identification of a novel point mutation (S65T) in alpha-galactosidase A gene in Chinese patients with Fabry disease. *Mutations in brief no. 169. Online. Hum Mutat* 1998; 11: 328–30.

CLARKE, J.T.; Narrative review: Fabry disease. *Ann Intern Med.* 2007; 146: 425–33

DAVIES, J.P.; WINCHESTER, B.G.; MALCOLM, S. Mutation analysis in patients with the typical form of Anderson-Fabry disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1051-1053.

DAVIES, J.P.; WINCHESTER, B.G.; MALCOLM, S. Sequence variations in the first exon of alpha-galactosidase A. *J Med Genet.* 1993b; 30: 658–663.

DAVIES, J.P.; CHRISTOMANOU, H.; WINCHESTER, B.G.; MALCOLM, S. Detection of 8 new mutations in the  $\alpha$ -galactosidase A gene in Fabry disease. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 667–669

DESNICK, R.J.; IOANNOU, Y.A.; ENG, C.M.  $\alpha$ -galactosidase A deficiency: Fabry disease. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001; 3733-3774.

ENG, C.M.; RESNICK-SILVERMAN, L.A.; NIEHAUS, D.J.; ASTRIN, K.H.; DESNICK, R.J. Nature and frequency of mutations in the  $\alpha$ -galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 118–1197

ENG, C.M.; NIEHAUS, D.J.; ENRIQUEZ, A.L.; BURGERT, T.S.; LUDMAN, M.D.; DESNICK, R.J. Fabry disease: twenty-three mutations including sense and antisense CpG alterations and identification of a deletional hot-spot in the alpha-galactosidase A gene. *Hum. Mol. Genet.* 1994; Oct;3(10):1795-9.

ENG, C.M.; DESNICK, R.J. Molecular basis of Fabry disease: mutations and polymorphisms in the human alpha-galactosidase A gene. *Hum. Mutat.* 1994;3(2):103-11.

ENG, C.M.; ASHLEY, G.A.; BURGERT, T.S.; ENRIQUEZ, A.L.; D'SOUZA, M.; DESNICK, R.J. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Mol. Med.* 1997; Mar;3(3):174-82.

GARMAN, S.C.; GARBOCZI, D.N. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Bio.* 2004; Mar 19;337(2):319-35.

GERMAIN, D.P.; FAN, J.Q. Pharmacological chaperone therapy by active-site specific chaperones in Fabry disease: in vitro and preclinical studies. *Int J Clin Pharmacol Therap* 2009; 47(Suppl 1):S111–7

ISHII, S.; CHANG, H-W.; KAWASAKI, K.; YASUDA, K.; WU, HL.; GARMAN, S.C. et al. Mutant a-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J* 2007; 406:285–95.

KORNREICH, R.; DESNICK, R.J.; BISHOP, D.F. Nucleotide sequence of the human alphagalactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* 1989; Apr 25;17(8):3301-2.

MASSON, C.; CISSE, I.; SIMON, V.; INSALACO, P.; AUDRAN, M. Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine.* 2004; Sep;71(5):381-3

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; 34:236–42.

MEHTA, A.; BECK, M.; EYSKENS, F.; FELICIANI, C.; KANTOLA, I.; RAMASWAMI, U.; ROLFS, A.; RIVERA, A.; WALDEK, S.; GERMAIN, D.P. Fabry disease: a review of current management strategies *QJM.* 2010; 103: 641-659.

MEIKLE, P.J.; HOPWOOD, J.J.; CLAGUE, A.E.; CAREY, W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *J Am Med Assoc* 1999; 281:249–54.

NAKAO, S.; TAKENAKA, T.; MAEDA, M.; KODAMA, C.; TANAKA, A.; TAHARA, M.; YOSHIDA, A.; KURIYAMA, M.; HAYASHIBE, H.; SAKURABA, H.; et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 1995; Aug 3;333(5):288-93.

PEREIRA, F.S. Detecção de mutações em pacientes brasileiros com doença de fabry. 2005. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, 2005

PLOOS VAN AMSTEL, J.K.; JANSEN, R.P.; DEJONG J.G.N.; HAMEL, B.C.J.; WEVERS, R.A. Six novel mutations a-galactosidase A gene in families with Fabry disease. *Hum Mol Genet.* 1994; 3 503–505

RAMASWAMI, U.; WHYBRA, C.; PARINI, R.; PINTOS-MORELL, G.; MEHTA, A.; SUNDER-PLASSMANN, G.; et al. Clinical manifestations of Fabry disease in children: data from the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr* 2006; 95:86–92.

RIES, M.; RAMASWAMI, U.; PARINI, R.; LINDBLAD, B.; WHYBRA, C.; WILLERS, I.; et al. The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2003; 162:767–72.

SHABBEER, J.; YASUDA, M.; BENSON, S.D.; DESNICK, R.J. Fabry disease: identification of 50 novel  $\alpha$ -galactosidase A mutations causing the classic phenotype

and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum Genomics* 2006; 2: 297–309

SHABBEER, J.; ROBINSON, M.; DESNICK, R.J. Detection of alpha-galactosidase a mutations causing Fabry disease by denaturing high performance liquid chromatography. *Hum Mutat* 2005; 25: 299–305

SHIN, S.H.; KLUEPFEL-STAHN, S.; COONEY, A.M.; KANESKI, C.R.; QUIRK, J.M.; SCHIFFMANN, R.; et al. Prediction of response of mutated alpha-galactosidase A to a pharmacological chaperone. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18:773–80.

SPADA, M.; PAGLIARDINI, S.; YASUDA, M.; TUKEL, T.; THIAGARAJAN, G.; SAKURABA, H.; PONZONE, A.; DESNICK, R.J. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2006; 79:31–40.

SUGAWARA, K.; OHNO, K.; SAITO, S.; SAKURABA, H.; Structural characterization of mutant alpha-galactosidases causing Fabry disease, *J Hum Gen.* 2008; 53: 812–824.

TSAO, M. Detecção de Doença de Fabry em Amostras de Sangue Impregnadas em Papel Filtro e sua Possível aplicação em Programas de Triagem. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, 2007

VEDDER, A. C.; BREUNIG, F.; DONKER-KOOPMAN, W. E.; MILLS, K.; YOUNG, E.; WINCHESTER, B.; et al. Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: effects on antibody formation and GL-3. *Mol Gen Metab.* 2008; 94(3), 319–325.

WALDMAN, E. A. Vigilância em Saúde Pública. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998. v.7 (Série Saúde & Cidadania)

WILCOX, W. R.; OLIVEIRA, J. P.; HOPKIN, R. J.; 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), 112–128.

YASUDA, M.; SHABBEER, J.; BENSON, S.D.; MAIRE, I.; BURNETT, R.M.; DESNICK, R.J.; Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat* 2003; 22: 486–492.

ZARATE, Y.A.; HOPKIN, R.J. Fabry's disease. *Lancet.* 2008; 372:1427–1435