

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM PACIENTES BRASILEIROS
COM DOENÇA DE FABRY**

FERNANDA DOS SANTOS PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Co-orientadora: Dra. Ursula Matte

Dissertação de Mestrado

2005

P436d Pereira, Fernanda dos Santos

Detecção de mutações em pacientes brasileiros com
Doença de Fabry / Fernanda dos Santos Pereira ; orient.
Roberto Giugliani ; co-orient. Ursula Matte. – 2005.
59 f. ; il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Doença de Fabry 2. Mutação 3. Análise citogenética 4. Brasil I.

Giugliani, Roberto II. Matte, Ursula III. Título.

NLM: WD 205.5.L5

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
INTRODUÇÃO	5
REVISÃO DA LITERATURA	7
1. ERROS INATOS DO METABOLISMO	7
2. DOENÇAS LISOSSÔMICAS	8
3. DOENÇA DE FABRY	10
3.1 Aspectos bioquímicos	11
3.2 Aspectos genéticos	13
3.3 Aspectos clínicos	15
3.4 Terapia de Reposição Enzima	21
3.5 Aspectos moleculares	23
OBJETIVOS	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ARTIGO EM PORTUGUÊS	38
Detecção de mutações em pacientes brasileiros com Doença de Fabry	
Resumo	39
Introdução	40
Pacientes e Métodos	40
Resultados e Discussão	41
Referências bibliográficas	45
Tabelas	46
ARTIGO EM INGLÊS	47
Mutation detection of Brazilian patients with Fabry Disease	
Abstract	48
Introduction	49
Patients and Methods	49
Results and Discussion	50
References	53
Tables	54
ANEXOS	55
Heredograma família A	55
Heredograma família B	56
Heredograma família C	57
Heredograma família D	58
Amplificação dos sete exons do gene GLA	59

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por permitir que eu viesse ao mundo no ventre de uma mulher excepcional, dotada de muita força, muita garra e muito amor para me oferecer.

Agradeço a esta mulher maravilhosa, minha mãe Maria da Glória, por ter abdicado de muitas coisas em prol da minha vida. Pelo amor incondicional, pelas palavras, pelo carinho e dedicação.

A minha família, que mesmo distante, torce e vibra comigo a cada vitória. Também à minha avó Elza e tia Gracinha, já ausentes deste plano.

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani pela oportunidade que me foi dada de fazer parte do seu grupo, sem mesmo me conhecer.

À Prof. Dra. Ursula Matte pelo enorme empenho para que este trabalho pudesse ser realizado e, também, por me acolher de braços abertos quando fui indicada pelo Dr. Roberto.

Aos pacientes, que permitiram que seu patrimônio genético fosse "invadido" para que eu pudesse realizar este trabalho.

À equipe da clínica do Serviço de Genética Médica por permitir e facilitar a coleta de dados.

Aos meus queridos colegas de laboratório que sempre ouviam as minhas queixas e reclamações sem reclamar. Pelos ótimos momentos que passamos juntos durante o desenvolvimento deste trabalho (jantas, formaturas, congressos,...).

Por fim, agradeço a todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para que este trabalho fosse executado com êxito.

INTRODUÇÃO

A Doença de Fabry (DF) é um erro inato do metabolismo caracterizado por um distúrbio no funcionamento da enzima lisossomal α -galactosidase A. Esse defeito enzimático causa o acúmulo dos glicoesfingolipídios globotriaosilceramida (Gb₃) e galabiosilceramida em todas as células do corpo, principalmente nas células do endotélio vascular levando a isquemia e infartos do coração, rins e cérebro (Schiller e Itin, 1996). A DF tem herança ligada ao cromossomo X, uma incidência de 1:60.000 homens (Desnick *et al*, 2003) e é pan-étnica, sendo representada em todos os grupos étnicos, incluindo caucasianos, africanos e asiáticos (Desnick *in* Scriver, 2001).

Homens (hemizigotos) classicamente afetados apresentam os primeiros sintomas da doença na infância ou adolescência. Estes incluem dores e parestesias nas extremidades, angioqueratomas e hipohidrose. Córnea opaca e verticilata também pode ser observada e com o aumento da idade, proteinúria, hipostenúria e edemas também aparecem. A morte normalmente ocorre por falência renal, doença cardíaca ou cerebrovascular. Homens moderadamente afetados, com atividade residual da α -galactosidase A podem ser assintomáticos ou apresentam manifestações limitadas ao envolvimento cardíaco (Desnick *in* Scriver, 2001).

Mulheres portadoras (heterozigotas) apresentam, na sua maioria uma forma atenuada ou assintomática da doença, sendo muitas vezes a córnea verticilata o único achado clínico. Contudo, a expressividade clínica pode ser extremamente variável como exemplificado por heterozigotas apresentando doença clínica grave (MacDermot *et al*, 2001 e Masson *et al.*, 2003), bem como gêmeas monozigóticas com achados clínicos discordantes (Levade *et al.*, 1991). Esta expressividade clínica variável é observada em heterozigotas portadoras de outras doenças ligadas ao X e provavelmente resulta de diferentes padrões de inativação do cromossomo X (Azofeifa *et al.*, 1995).

O diagnóstico bioquímico para DF é definitivo para os hemizigotos, mas pouco confiável quando se trata de heterozigotas. Mulheres portadoras podem apresentar níveis que variam de quase zero aos níveis normais da atividade enzimática. Por isso a análise molecular torna-se o método mais confiável para diagnosticá-las. Para identificar correlações genótipo/fenótipo e realizar a detecção precisa de heterozigotas, foram analisadas quatro famílias brasileiras, cada uma constituída de pelo menos um homem com diagnóstico bioquímico para DF (caso índice).

REVISÃO DA LITERATURA

1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo Erro Inato do Metabolismo (EIM) foi sugerido por Garrod, em 1909, com base na investigação de quatro doenças (cistinúria, albinismo, alcaptonúria e pentosúria). Garrod observou que essas doenças eram decorrentes de deficiências nos processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas dentro do organismo (Scriver, 2001).

Os EIM são desordens genéticas que alteram o funcionamento normal da rota metabólica. A maioria das desordens metabólicas genéticas são herdadas de forma autossômica recessiva ou ligadas ao X e muito raramente têm herança autossômica dominante ou mitocondrial (Ellaway *et al*, 2002).

São individualmente raros, mas coletivamente a incidência pode ser alta (Tang *et al*, 2001). Por exemplo, no Canadá, a incidência das doenças metabólicas é de 70 em 100.000 nascidos (Applegarth *et al*, 2000). No Japão, onde um programa sistemático de triagem foi desenvolvido, a incidência de todas as doenças metabólicas triadas foi de 12 em 100.000 (Tada *et al.*, 1984). A diferença de incidência entre os grupos étnicos é esperada devido a diferenças na constituição genética de sua população (Kahler, 1999).

Na maior parte dos EIM os sinais e sintomas surgem precocemente e o diagnóstico requer análises laboratoriais para identificar os metabólitos acumulados e, sempre que possível, ensaios bioquímicos para comprovar a deficiência enzimática. O diagnóstico preciso possibilita a implementação do tratamento em muitos casos, bem como a detecção de portadores, o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal (Tang *et al.*, 2001).

2. DOENÇAS LISOSSÔMICAS

As doenças lisossômicas (DL) são uma família de mais de 50 doenças genéticas distintas, cada uma das quais é o resultado de um defeito específico na função de uma enzima lisossomal. Esses defeitos levam ao acúmulo de substâncias dentro dos lisossomos que normalmente deveriam ser degradadas.

As DL podem ser classificadas pelo tipo de material que é acumulado (por exemplo doença de depósito de lipídios, mucopolisacaridoses, glicoproteinoses), embora muitas dessas condições apresentem similaridades significantes (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos EIM segundo Sinclair, 1982.

EIM	Descrição	Exemplos
Envolvendo distúrbios de transporte	Afetam o transporte renal e/ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas	Defeitos no transporte de magnésio
Envolvendo distúrbios de armazenamento, degradação e secreção	Acúmulo de substratos na célula em grandes quantidades	Doenças Lisossômicas
Envolvendo distúrbios de síntese	Síntese de moléculas incompletas ou incorretas	Hiperplasia Adrenal Congênita
Envolvendo distúrbios do metabolismo intermediário	Comprometem as vias metabólicas de pequenas moléculas	Aminoacidopatias, Distúrbios das glicinas e purinas

A interrupção de um único passo da rota de degradação pode levar a diferentes condições, dependendo de onde esse defeito ocorra (figura 1). Características comuns de muitas DL incluem anormalidades ósseas, organomegalia, desordens no sistema nervoso central, pêlos grossos e fácies características (Meikle e Hopwood, 2003).

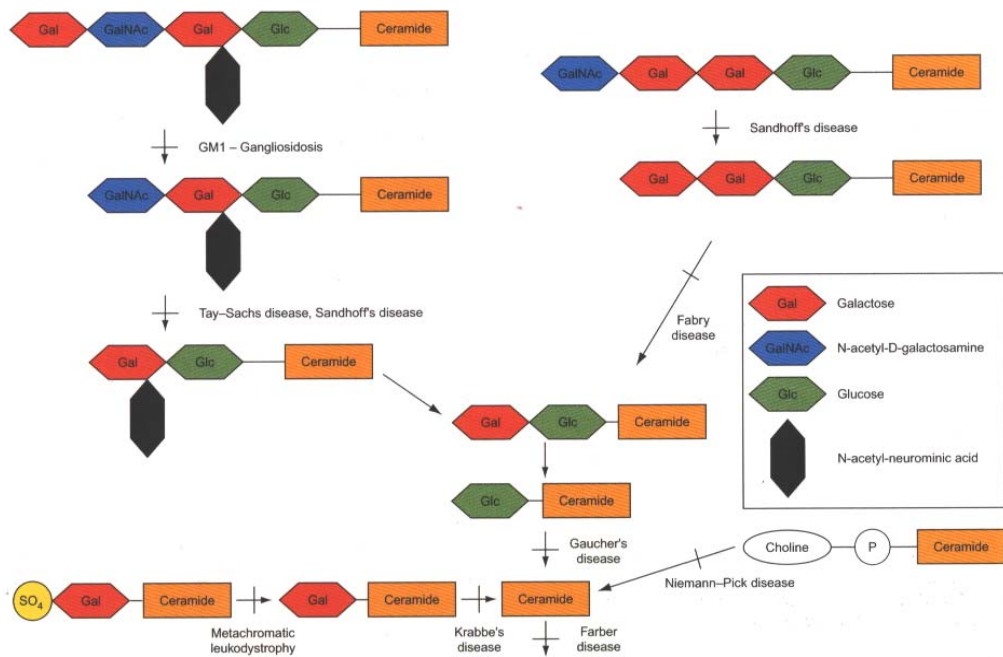


Figura 1: Via de degradação de diferentes metabólitos e doenças causadas pela alteração das mesmas (Beck e Ries, 2001).

A maioria dessas doenças são herdadas de forma autossômica recessiva, com exceção da Doença de Fabry (DF) e Síndrome de Hunter (Mucopolissacaridose tipo II), as quais são herdadas ligadas ao cromossomo X.

A frequência individual das DL não é alta, mas em conjunto elas são um grupo significativo e são a causa mais comum das doenças neurodegenerativas pediátricas (Meikle *et al.*, 1999). A prevalência das DL combinadas, na Austrália, é em torno 1 em 5000 nascidos vivos (Meikle *et al.*, 2003). No Brasil, uma das DL mais frequentes é a Gangliosidose GM1, com uma incidência de 1 para 17.000 nascidos vivos (Severini *et al.*, 1999).

3. DOENÇA DE FABRY

Em 1898, dois dermatologistas, Anderson na Inglaterra e Fabry na Alemanha, descreveram independentemente os primeiros pacientes com *angiokeratoma corporis diffusum* (Anderson, 1898 e Fabry, 1898). Em 1963, Sweeley e Klionsky isolaram e caracterizaram dois glicosfingolipídios neutros – globotriaosilceramida (Gal-Gal-Glc-Cer) e galabiosilceramida (Gal-Gal-Cer) – do rim de um paciente do sexo masculino com Doença de Fabry (DF) obtido por autópsia. Com base nesses achados, eles classificaram a DF como uma esfingolipidose. Análises químicas subsequentes de vários tecidos e fluidos de pacientes com DF demonstraram um acentuado acúmulo de globotriaosilceramida e, em menor grau, de galabiosilceramida (Desnick *in* Scriver, 2001). Além disso, o acúmulo anormal de glicosfingolipídios com alfa-galactosil, foram relatados em indivíduos afetados que pertenciam aos grupos sanguíneos B ou AB (Wherrett e Hakomiri, 1973). Em 1967, Brady e colaboradores demonstraram que o defeito enzimático estava relacionado à enzima ceramida trihexosidase, uma hidrolase galactosil lisossomal necessária para o catabolismo do globotriaosilceramida (Brady *et al.*, 1967).

Kint, em 1970, utilizando substratos sintéticos, caracterizou a enzima deficiente como uma alfa-galactosil hidrolase (Kint, 1970). Pouco tempo depois, foi reconhecido que haviam duas enzimas (designadas alfa-galactosidase A e B) que hidrolizam os substratos sintéticos com meios alfa-galactosil, sendo a alfa-galactosidase A deficiente na DF (Desnick *in* Scriver, 2001).

A Doença de Fabry (DF) é um erro inato do catabolismo de glicosfingolipídios resultante da atividade deficiente da exogalactohidrolase lisossomal, alfa-galactosidase A (EC 3.2.1.22) (Desnick *et al.*, 1989; Eng e Desnick, 1993) (figura 2).

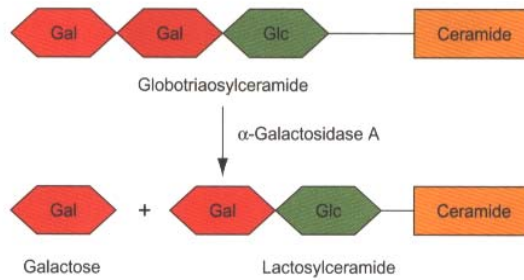


Figura 2: Rota de degradação do globotriaosilceramida (Gb₃). (Adaptado de Beck e Ries, 2001).

Em homens afetados com DF (hemizigotos), a atividade deficiente da alfa-galactosidase A resulta no acúmulo progressivo de glicosfingolipídios neutros com alfa-galactosil terminal, sendo o globotriaosilceramida [galactosil-(alfa1_4)-galactosil-(beta1_4)-glucosil-(beta1_1')-ceramida; Gb₃ ou GL₃] o primeiro substrato a acumular no plasma e nos lisossomos dos vasos sangüíneos (Desnick *in* Scriver, 2001).

3.1 Aspectos bioquímicos

A alfa-galactosidase A humana cliva resíduos alfa-D-galactosil terminais de glicolipídios e glicoproteínas (Desnick e Sweeley, 1982). Essa enzima é uma glicoproteína homodimérica com uma subunidade madura de peso molecular de aproximadamente 46 kDa (Bishop e Desnick, 1981) (figura 3). Estudos biossintéticos usando anticorpos policlonais produzidos contra a enzima humana purificada indicaram que cada subunidade da alfa-galactosidase A é normalmente sintetizada como um glicopeptídeo precursor de aproximadamente 50 kDa. Após a clivagem do peptídeo sinal e modificações por carboidratos no complexo de Golgi e lisossomos, a enzima madura adquire a forma ativa com 46 kDa (Lemansky *et al*, 1987; Bernstein *et al*, 1989).

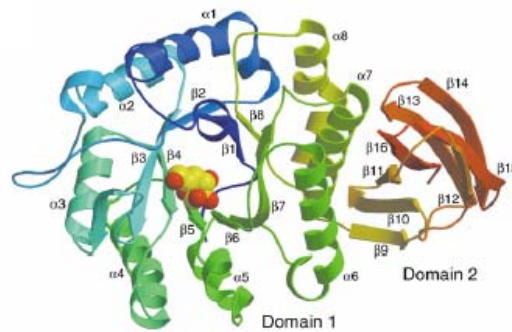


Figura 3: Estrutura da alfa-galactosidase A. Monômero da alfa-galactosidase A. O domínio 1 contém o sítio ativo no centro da fita beta (concauidade), enquanto o domínio 2 contém duas fitas antiparalelas. O ligante galactose está representado em amarelo (Germain e Garboczi, 2004).

Lemansky e colaboradores, no ano de 1987, em um estudo sobre a síntese e o processamento da alfa-galactosidase A em fibroblastos humanos, observaram que tal enzima era sintetizada como um precursor glicosilado de $M_r=50,500$ e que na ausência de resíduos de manose-6-fosfato ou na presença de NH_4Cl , a enzima recém sintetizada era secretada. Isso seria um indicativo de que seu transporte para o lisossomo do fibroblasto seria dependente de receptor específico para manose-6-fosfato (Lemansky *et al*, 1987).

Na DF, duas situações distintas podem ser encontradas: 1) pode haver atividade residual com presença da enzima, o que resulta em fenótipo moderado ou 2) ausência de atividade residual com presença ou ausência da enzima (Bach *et al*, 1982; Kobayashi *et al*, 1985). Estudos posteriores da biosíntese de alfa-galactosidase A em fibroblastos de hemizigotos com DF demonstrou a ocorrência de vários tipos alterações na enzima (Lemansky *et al*, 1987). Essas incluíam: (a) síntese não detectável do precursor da enzima, (b) síntese de um precursor instável da proteína e ausência da enzima madura, (c) síntese de um precursor mutado de tamanho normal seguido pelo processamento da enzima mutante para a forma lisossomal madura e (d) síntese de um precursor normal e processamento de uma proteína mutante. Esses achados sugeriram a ocorrência de uma variedade de mutações incluindo rearranjos gênicos e mutações de ponto que afetam a síntese, maturação e estabilidade da alfa-

galactosidase A, bem como propriedades de associação e cinética das subunidades (Bernstein *et al*, 1989).

3.2 Aspectos genéticos

A DF tem herança ligada ao X, pois o gene para a enzima alfa-galactosidase A está localizado no braço longo do cromossomo X. Durante muitos anos esta doença foi classificada como sendo uma doença genética com herança recessiva ligada ao X. Entretanto, a descrição de mulheres portadoras sintomáticas com uma ampla variabilidade clínica levou à sugestão de que pudesse se tratar de uma herança semi-dominante. Mais recentemente, porém, a classificação de alelos dominantes e recessivos para genes ligados ao cromossomo X tem sido revista (Dobyns *et al*, 2004). Segundo estes autores, os conceitos de herança ligada ao X dominante ou recessiva são baseados no sistema de compensação de dose para genes localizados no cromossomo X estudados em outros organismos que não humanos e não se aplicam da mesma forma às doenças humanas. Portanto, de acordo com o proposto por Dobyns *et al* (2004) a DF, por suas características na forma de herança, é uma doença ligada ao X simplesmente.

Homens afetados (hemizigotos) em geral apresentam a forma clássica da doença e atividade enzimática marcadamente reduzida. Mulheres portadoras (heterozigotas) apresentam, na maioria dos casos, atividade enzimática intermediária e uma forma atenuada (ou assintomática) da doença. Porém, a expressividade clínica pode ser extremamente variável como exemplificável por heterozigotas apresentando doença clínica grave (MacDermot, 2001 e Masson *et al*, 2003), bem como gêmeas monozigóticas com apresentações clínicas discordantes (Redonnet-Vernhet *et al*, 1996). Esta expressividade clínica variável é observada em heterozigotas portadoras de várias doenças ligadas ao X e provavelmente resulta de diferentes padrões de inativação do cromossomo X (Brown *et al*, 1993; Azofeifa *et al*, 1995). De acordo com

a hipótese postulada por Mary Lyon (Lyon, 1961; Lyon, 1988), um dos cromossomos X das mulheres é inativado randomicamente em estágios precoces do desenvolvimento embrionário. Como resultado, heterozigotas para a maioria das doenças ligadas ao X, apresentam, a nível celular, duas populações de células: uma com o alelo normal ativo e outra com o alelo mutante ativo.

A identificação enzimática de heterozigotas para DF é pouco confiável, uma vez que elas podem expressar níveis de atividade da alfa-galactosidase variando de próximo de zero até níveis normais. Assim, relatos de heterozigotas obrigatórias com atividade normal da enzima e queratopatia (Lyon, 1961; Spaeth e Frost, 1965 ; François, 1967; Avila *et al*, 1973) não são inesperados e enfatizam a necessidade de detecção molecular precisa de portadoras. Evidências sugerem que os genes inativados no cromossomo X podem tornar-se reativados como uma resposta contra a queda dos níveis de 5-metildeoxicitidina (Wareham *et al*, 1987 e Wilson *et al*, 1987), o que ocorre com o aumento da idade.

A demetilação e subsequente reativação dos genes do cromossomo X pode, portanto, explicar a freqüente observação de que heterozigotas obrigatórias mais velhas têm níveis de atividade da alfa-galactosidase A dentro dos valores normais. Isso pode, também, obscurecer o diagnóstico enzimático preciso de heterozigotas (Desnick *et al.*, 1987; Bernstein *et al.*, 1989).

A presença de doença clínica grave em algumas heterozigotas, provavelmente decorre de um processo não-randômico de inativação preferencial do alelo normal e preponderância da atividade do alelo mutante em tecidos-alvo (Morrone *et al*, 2003). Alguns estudos de famílias com DF também têm indicado que a expressividade clínica variável em heterozigotas possa se dever à influência da origem dos alelos normal e mutante (materna vs. paterna), sugerindo *imprinting* do gene da alfa-Gal A (Redonnet-Verhet *et al.*, 1996).

3.3 Aspectos clínicos

A DF é uma condição pan-étnica com uma frequência estimada de 1:60.000 homens (Desnick *et al.*, 2003). Isso pode ser uma subestimativa da frequência verdadeira devido à falta de verificação e dificuldades para diagnóstico de casos leves ou atípicos (Nakao, 1995; Eng *et al.*, 1997).

Em homens classicamente afetados (que têm pouca ou nenhuma atividade detectável da alfa-galactosidase A), as primeiras manifestações da doença ocorrem na infância ou adolescência e são caracterizadas por angioqueratomas, acroparestesias, hipohidroses, distrofia corneal e doença valvular do coração, rins e cérebro levando à morte no princípio da vida adulta (Okumiya *et al.*, 1994; Eng *et al.*, 1997; Desnick *in* Scriver, 2001). Hemizigotos assintomáticos ou com sintomas leves com atividade residual da alfa-galactosidase A foram descritos como tendo uma forma atenuada da doença que é limitada ao envolvimento cardíaco (variante cardíaca) (Sakuraba *et al.* 1990; Nagao *et al.* 1991; Ishii *et al.* 1992; Desnick *in* Scriver, 2001). Essa inclui cardiomegalia, tipicamente envolvendo a parede ventricular esquerda e septo interventricular, ecocardiogramas alterados consistentes com uma cardiomiopatia e infartos do miocárdio (Eng *et al.*, 1997; Desnick *in* Scriver, 2001).

Mulheres heterozigotas normalmente são assintomáticas ou podem ter angioqueratomas isolados, ocasionalmente acroparestesias na infância ou alterações oculares (Eng e Desnick, 1994). Aproximadamente 30% das heterozigotas têm angioqueratomas isolados, menos de 10% acroparestesias e cerca de 70% apresentam alterações oculares características (MacDermot *et al.*, 2001). Nessas heterozigotas, a atividade da enzima no plasma pode ser normal, necessitando-se a análise molecular para confirmação do diagnóstico (Masson, *et al.*, 2003).

As principais manifestações clínicas são descritas abaixo e sumarizadas na tabela 2.

I) Sistema nervoso periférico – Crises dolorosas episódicas e dor crônica – descrita como dores agudas nos braços e pernas, conhecidas como acroparestesias – ocorrem em 80-90% dos pacientes nas primeiras décadas de vida. As crises consistem de sensações dolorosas e de queimação nas solas e palmas, freqüentemente irradiando para as extremidades proximais e outras áreas do corpo (Desnick *in* Scriver, 2001).

A dor na DF é considerada como resultado do dano às pequenas fibras nervosas causado pela difusão do Gb3 dentro dos axônios dos nervos e da raiz dorsal da glia. A taxa de difusão está relacionada à área de superfície dos axônios e a mielina que o reveste pode fornecer alguma proteção (Cable *et al.*, 1982a). Isso pode explicar porquê as dores ocorrem inicialmente na periferia – os maiores axônios são aqueles com a maior área de superfície.

Como resultado da natureza crônica das dores, esses pacientes muitas vezes experimentam uma grande queda da qualidade de vida, junto com sentimentos de falta de energia, depressão e perda de motivação. Em alguns casos, a severidade das dores pode levar os pacientes ao suicídio (Grewall, 1993). As dores podem persistir na vida adulta, mas geralmente tornem-se menos intensas e menos freqüentes (Desnick *in* Scriver, 2001).

II) Pele – Lesões nas células vasculares endoteliais da pele levam ao inchaço (linfedema) e aumento da pressão.

Quando são acumulados danos suficientes, telangiectasias, na forma de pequenos angiomas superficiais, ou angioqueratomas, são observados. Os angioqueratomas são pequenos, salientes, cor-de-vinho ou azulados, que geralmente aparecem durante a infância (figura 4). Eles podem ocorrer bem individualizados ou em grupos, cobrindo uma grande área do corpo (Shelley *et al.*, 1995). Essas lesões são encontradas principalmente nas coxas, costas, nádegas, virilha, parte inferior do

abdômen (quadril) e área genital. O envolvimento das mucosas oral e conjuntiva também pode ocorrer (Desnick *in* Scriver, 2001)



Figura 4: Angioqueratoma típico da DF: múltiplas elevações ligeiramente palpáveis, principalmente em grupos (Beck e Ries, 2001).

O depósito cumulativo de lipídios nos vasos sangüíneos da pele significa que há um aumento progressivo do número de lesões com a idade. Contudo, há relatos de pacientes atípicos com nenhuma lesão de pele (Nagao *et al.*, 1991; von Scheidt *et al.*, 1991).

Pacientes com DF freqüentemente apresentam hipohidrose ou, ocasionalmente, anidrose, causada pelo acúmulo de Gb3 nas glândulas sudoríparas e seus vasos sangüíneos associados (Lao *et al.*, 1998). Estes pacientes são intolerantes ao exercício e podem sofrer de náuseas, dispnéia, intolerância à luz, dores de cabeça ou, muitas vezes, perda de consciência em ambientes quentes (Shelley *et al.*, 1995). A hipohidrose é, muitas vezes, acompanhada pela redução da produção de lágrimas e saliva (Cable *et al.*, 1982 b).

III) Olhos – O envolvimento ocular é mais proeminente na córnea, cristalino, conjuntiva e retina. A opacidade da córnea é observada em hemizigotos afetados e em muitas heterozigotas. Alterações vasculares na retina e conjuntiva são comuns e representam o envolvimento vascular sistêmico. Essas alterações vasculares são caracterizadas por vasos tortuosos que, com o avanço da doença, progridem para uma opacificação mais condensada da córnea caracterizando a córnea verticilata

(figura 5), sinal clínico importante para a detecção de heterozigotas (Desnick *et al*, 2001). Em um estudo, Larralde *et al* (2004) obtiveram esse achado clínico como a principal característica dos hemizigotos analisados. Com o progresso da doença, alterações na retina associadas ao desenvolvimento de hipertensão e uremia também podem ocorrer (Desnick *et al*, 2001).

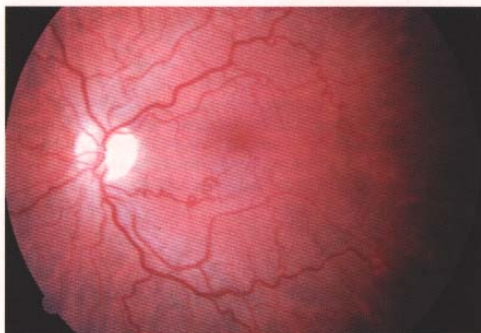


Figura 5: Imagem de uma retina mostrando vasos tortuosos (Brady e Schiffmann, 2000).

IV) Sistema cardiovascular – o comprometimento cardíaco pode ser observado na maioria dos hemizigotos e é decorrente do depósito de Gb3 no tecido vascular, no sistema de condução e no próprio miocárdio. Os achados mais comuns são hipertrofia do ventrículo esquerdo, doença valvular, especialmente insuficiência mitral, doença da artéria coronariana e anormalidades da condução miocárdica (Kampmann *et al.*, 2002)

V) Rins – Na DF, os rins são, talvez, os órgãos mais significativamente afetados. A deterioração renal muitas vezes inicia antes da chegada da puberdade e, freqüentemente, ocorre durante infância (Desnick *in* Scriver, 2001).

Com o aumento da idade a progressão da deterioração renal é indicada por proteinúria e uma queda na taxa da filtração glomerular. A deposição de Gb3 nas células endoteliais e epiteliais da cápsula de Bowman e nas células epiteliais da alça de Henle e dos túbulos distais levam a uma perda gradual da função renal e a uma incapacidade para produzir urina concentrada (Meroni *et al.*, 1997).

A deterioração gradual da função renal geralmente ocorre entre a segunda e quarta décadas de vida e a progressão para o estágio final da falência renal é a primeira causa de morte nos pacientes com DF (Desnick *in* Scriver, 2001).

VI) Trato gastrointestinal – Pacientes com DF freqüentemente apresentam dores abdominais decorrentes do depósito de glicosfingolipídios na vasculatura e gânglios autonômicos intestinais, dismotilidade crônica (diarréia/constipação), náuseas e vômitos (Sheth *et al.*, 1981).

A perda de peso na DF é provavelmente devida à má absorção causada pelo depósito de glicosfingolipídios no intestino delgado, enquanto diarréia e danos à motilidade intestinal provavelmente resulta do acúmulo de lipídios no nervo ganglial autonômico (Tumer *et al.*, 2004).

VII) Sistema nervoso periférico – Os sintomas do SNC incluem zumbidos nos ouvidos, os quais podem ser uni ou bilaterais (Morgan *et al.*, 1990). Estudando o envolvimento do SNC na DF, Jardim *et al* (2004) relatam que a alteração neurológica mais comum observada foi a perda da audição e que esse achado teria correlação com o tempo de manifestação da doença. Germain *et al* (2002) obteve resultados similares em estudo de 22 pacientes, dos quais 12 apresentaram perda progressiva de audição e tinham média de idade de 39 anos.

A deposição de substrato no endotélio vascular, e conseqüente isquemia, resulta em acidentes tromboembólicos, ataques isquêmicos transitórios, aneurismas, convulsões e acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos ou isquêmicos mais extensos. Acúmulo de glicosfingolipídios também pode ocorrer em diversas regiões do tronco cerebral, gânglios da base e hemisférios cerebrais (Morgan *et al.*, 1990; Mitsias e Levine, 1996).

Outros sinais e sintomas da DF incluem comprometimento pulmonar (doença pulmonar obstrutiva) (Brown *et al.*, 1997), comprometimento músculo-esquelético (deformidade de articulações por depósito de substrato), atraso do crescimento e desenvolvimento puberal, fadiga e baixo ganho de peso (Desnick *in* Scriver, 2001).

Tabela 2: Principais manifestações clínicas na Doença de Fabry (Adaptado de Beck e Ries, 2001).

Sítios de depósito de glicosíngolipídios	Manifestações clínicas
Sistema nervoso pariférico	Acroparestesias, hipoidrose
Pele	Angioqueratomas
Olhos	Distrofia da córnea e cristalino Vasculopatia retiniana
Sistema cardiovascular	Hipertrofia do ventrículo esquerdo Arritmias Doença cardíaca isquêmica Valvulopatias
Rins	Proteinúria Insuficiência renal
Trato gastrointestinal	Dismotilidade Dores abdominais
Sistema nervoso central	Acidentes vasculares cerebrais Hipoacusia neurosensorial
Outros	Fadiga Baixo ganho de peso Doença pulmonar obstrutiva Comprometimento músculo-esquelético Atraso de crescimento

O diagnóstico definitivo de hemizigotos com suspeita de DF pode ser feito pela demonstração da atividade deficiente de alfa-galactosidase A em vários tecidos, incluindo plasma, leucócitos, lágrimas e cultura de células (Whybra *et al.*, 2001). 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). Em contraste, a identificação enzimática de heterozigotas para DF é pouco confiável, uma vez que elas podem expressar níveis de atividade da alfa-galactosidase variando de quase zero ao nível normal devido à inativação randômica do cromossomo X. O

diagnóstico molecular é efetivo em todos os casos, desde que a mutação no caso índice seja conhecida.

Embora não haja estudos específicos sobre a qualidade de vida na DF, está claro que os sintomas desta doença podem ter um impacto significativo na qualidade de vida destes pacientes. Na infância, dores e intolerância a exercícios que não são reconhecidas e tratadas apropriadamente podem levar a problemas na escola. Quando os pacientes chegam à vida adulta, suas condições podem limitar sua habilidade ao trabalho e à vida normal. A DF está também associada a problemas psiquiátricos. Grewall *et al* (1993) e Wendrich *et al* (2001) atribuíram à comorbidade psiquiátrica a causa de depressão entre pacientes com DF. Ambos os grupos também descreveram um aumento na taxa de suicídio entre estes pacientes (6% e 5,7%, respectivamente).

Pacientes com DF têm um risco aumentado de morrer por doença renal, cardiovascular ou cerebrovascular. A presença de complicações cerebrovasculares parece indicar um mau prognóstico tanto em hemizigotos quanto em heterozigotas. Em um estudo de Mitsias e Levine (1996), a média de idade de início das complicações cerebrovasculares foi de 33,8 anos em hemizigotos e 40,3 nas heterozigotas.

Antes do advento da diálise e do transplante renal, muitos hemizigotos não sobreviviam mais do que a quarta década de vida. Em contraste, muitas heterozigotas são assintomáticas ou têm sintomatologia clínica mínima e vivem uma vida normal (Desnick *in* Scriver, 2001).

3.4 Terapia de Reposição Enzima

Considerando-se que a DF é causada pela deficiência de uma única enzima (alfa-galactosidase A), a reposição dessa enzima representa um meio de tratamento lógico e potencialmente efetivo para esta condição. A enzima é dirigida ao sítio de

ação lisossomal por resíduos de manose-6-fosfato (M6P) na molécula de alfa-galactosidase A. A M6P liga-se a receptores específicos no complexo de Golgi e, assim, é direcionada a compartimentos pré-lisossomais (endossomos). Enzimas que escapam desse sistema são secretadas pela célula através da via de secreção constitutiva e, muitas vezes, são recapturadas pelos receptores de M6P que retornam a alfa-galactosidase A aos lisossomos pela via endocítica (Kornfeld e Mellman, 1989). Essa característica de transporte das enzimas lisossomais é que torna a terapia de reposição enzimática (TRE) uma estratégia terapêutica possível para pacientes com DF (Schiffmann *et al.*, 2000).

O primeiro uso bem sucedido da terapia de reposição da alfa-galactosidase A para DF ocorreu no início da década de 70 (Brady *et al.*, 1973). Naquela época, contudo, o principal problema com esse tratamento foi a falta de quantidades suficientes da alfa-galactosidase A humana disponível, a qual tinha que ser purificada de placenta e preparada para uso médico. A quantidade disponível também era pequena para conduzir estudos clínicos apropriados em grande escala ou para o tratamento dos pacientes. No princípio, testes em pequena escala da reposição de alfa-galactosidase A em dois irmãos com DF mostraram que as injeções eram bem toleradas, com nenhuma resposta imune à enzima exógena (Desnick *et al.*, 1980).

Mais recentemente, a enzima foi obtida artificialmente por engenharia genética e produzida em cultura de células em quantidades suficientes para tornar o tratamento uma realidade possível. Um estudo realizado por Schiffmann *et al.* (2000) mostrou que a infusão intravenosa da alfa galactosidase foi bem tolerada e reduziu significativamente os níveis de Gb3 no fígado e urina de 10 pacientes.

Eng e colaboradores (2001) estudaram 15 pacientes, os quais receberam cinco infusões de beta galactosidase (alfa-galactosidase A recombinante). Foi observada a redução rápida e marcada dos níveis de Gb₃ no plasma e endotélio vascular e em 13 pacientes que fizeram biópsias pré e pós tratamento houve uma redução média de Gb3 no fígado de 84%.

Um estudo randomizado, placebo-controlado, duplo-cego da agalsidase alfa foi conduzido por Schiffmann e colaboradores, 2001. Uma queda significativa na intensidade da dor e uma melhora significativa na qualidade de vida foi observada nos pacientes do grupo tratado (Schiffmann *et al.*, 2001). Uma melhora na estrutura dos rins desses pacientes que receberam reposição enzimática foi refletida pelo aumento da remoção de insulina e creatinina. Esses pacientes também apresentaram uma redução dos níveis de glicosfingolipídios no plasma, com melhora da perfusão cerebral. Os efeitos benéficos da reposição de agalsidase alfa no coração foram confirmado por MacDermot e colaboradores (2001), os quais mostraram que houve uma redução significativa na massa cardíaca em indivíduos tratados comparado com um aumento nos pacientes que receberam placebo.

Até o momento, os métodos de tratamento de pacientes com DF têm sido somente para diminuir os sintomas e, portanto, nenhum tratamento está atualmente disponível para tratar a causa da condição. A terapia de reposição enzimática, contudo, representa um enorme avanço no tratamento da DF e tem um potencial para melhorar não somente os sintomas imediatos da doença, mas também para reduzir a mortalidade e melhorar a qualidade de vida desses pacientes (Beck *et al.*, 2004).

3.5 Aspectos moleculares

O isolamento e caracterização do cDNA completo (Bishop, 1986; Bishop, 1988) e a seqüência genômica (Korneich, 1989) codificando a enzima alfa-galactosidase A (EC 3.2.1.22, alfa-Gal A) facilitou a identificação e análise de mutações do gene causando DF. A alfa-galactosidase A é codificada por um único gene *housekeeping* que foi localizado na região cromossômica Xq21.33-22 por hibridização *in situ* e por análises de RFLP (Desnick, *in* Scriver, 2001).

A região onde está localizado o gene GLA abrange de 10 à 12 Mb do braço longo proximal do cromossomo X e também contém o gene do colágeno alfa-5 (IV)

que está alterado na Síndrome de Alport e o gene da agamaglobulina tirosina kinase que está alterado na agamaglobulinemia de Bruton (Vetrie *et al.*, 1993). O gene GLA contém 12 kb divididos em sete exons (Kornreich, 1989; Eng *et al.*, 1994) que variam de tamanho entre 92 a 291 pb (Bishop *et al.*, 1988) e seis introns que variam de 0,2 à 3,7kb (Bishop, 1988; Korneich, 1989) (figura 6b).

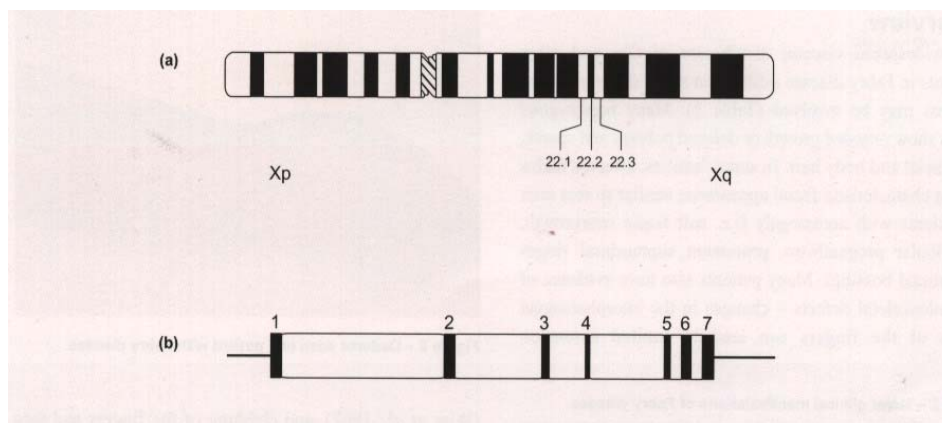


Figura 6: a) Representação do cromossomo X humano mostrando a posição da banda Xq22. b) Estrutura dos exons do gene da alfa-galactosidase A. (Adaptado de Bishop *et al.*, 1988).

O gene GLA é um dos genes mais ricos em seqüências *Alu* e a seqüência genômica contém 12 elementos repetitivos *Alu* dispersos entre os seis introns e a região 3' flanqueadora, representando cerca de 30% do gene ou aproximadamente 1 *Alu* / 1.0kb (Korneich, 1989; Eng *et al.*, 1997). A cadeia de 1437 pb do cDNA da alfa-galactosidase A codifica um peptídeo precursor de 429 aminoácidos incluindo um peptídeo sinal de 31 resíduos de aminoácidos (Bernstein, 1989 e Eng *et al.*, 1997). O precursor é glicosilado durante a tradução e, então, modificado no complexo de Golgi e lisossomos para um peptídeo maduro com 398 resíduos que dimerizam para formar uma glicoproteína lisossomal ativa de 101 kDa (Bishop, 1981; Lemansky, 1987; Kornreich *et al.*, 1990).

Uma variedade de mutações no gene da alfa-galactosidase A causando DF tem sido descrita, incluindo rearranjos parciais do gene, pequenas inserções e deleções, alterações no sítio consenso de junção de *splicing* e várias substituições de

uma única base na região codificante (Eng and Desnick, 1994). Muitas mutações resultam em um fenótipo clássico da doença (Quadro 1); contudo, cinco mutações de sentido trocado foram detectadas em hemizigotos com um fenótipo cardíaco moderado (Eng et al, 1994). Das 356 mutações descritas no gene GLA até o momento, todas são citadas como patogênicas.

Quadro 1: Mutações descritas até janeiro de 2005 (Adaptado de www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0).

Tipo de mutação	Número total de mutações
Substituição de nucleotídeos (missense / nonsense)	241
Substituição de nucleotídeos (splicing)	18
Pequenas deleções	57
Pequenas inserções	22
Pequenas inserções e deleções	4
Grandes deleções	10
Grandes inserções e deleções	1
Rearranjos complexos (incluindo inversões)	3
TOTAL	356

Bernstein *et al*, (1989) em seus estudos observaram que, comparado com outras doenças ligadas ao cromossomo X, a frequência de rearranjos no gene GLA foi de 6%, similar a valores reportados para os genes da ornitina transcarbamilase e fator VIII (Rozen *et al*, 1985 e Antonarakis *et al*, 1985). Esse valor corresponde a menos da metade do gene da hipoxantina fosforribosiltransferase, que tem 11% de sua composição em rearranjo (Jolly, 1986) e é muito mais baixo do que os 40-80% das

mutações encontradas nos genes do fator IX e distrofina (Matthews *et al*, 1987 e Bartlett *et al*, 1988; Bernstein *et al*, 1989).

As alterações moleculares em hemizigotos clássicos com nenhuma atividade enzimática nem enzima imunologicamente detectável podem resultar de deleção parcial ou completa do gene ou de mutações de ponto que alteram o processamento do mRNA, causando terminação prematura. A possibilidade de utilização do cDNA da alfa-galactosidase A permite a investigação de vários tipos de alterações moleculares que causam o defeito enzimático tanto em pacientes classicamente afetados quanto em hemizigotos atípicos e heterozigotas (Desnick *in* Scriver, 2001).

Uma vez que o diagnóstico bioquímico para DF é pouco confiável quando se trata de heterozigotas, a identificação molecular é extremamente importante para o aconselhamento genético e para a determinação da necessidade de tratamento. Além disso, a análise molecular de homens e mulheres com DF pode contribuir para estudos de correlação genótipo/fenótipo e para a avaliação dos resultados da terapia de reposição enzimática.

O Serviço de Genética Médica do HCPA é um centro de referência para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo. Até dezembro de 2004, 10 famílias foram diagnosticadas com essa doença.

Neste trabalho, foram analisados os pacientes homens diagnosticados bioquimicamente com DF até dezembro de 2003 e que estão em terapia de reposição enzimática. No total, foram analisadas 4 famílias com DF, sendo 6 homens afetados e 2 possíveis portadoras.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar, do ponto de vista molecular, os pacientes com diagnóstico bioquímico para Doença de Fabry diagnosticados pelo Serviço de Genética Médica do HCPA, que estão em terapia de reposição enzimática.

Objetivos Específicos

- * Identificar a mutação presente em pacientes com DF.
- * Identificar a mutação em prováveis portadoras (mães) e outros familiares afetados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson W. A case of angiokeratoma. *Br J Dermatol.* 1898; 10:113-7.
- Antonarakis SE, Waber PG, Kittur SD, Patel AS, Kazazian HH Jr, Mellis MA, Counts RB, Stamatoyannopoulos G, Bowie EJ, Fass DN, et al. Hemophilia A. Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Engl J Med.* 1985;Oct 3;313(14):842-8.
- Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 2000;105:10.
- Ashton-Prolla P, Ashley GA, Giugliani R, Pires RF, Desnick RJ, Eng CM. 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.
- Avila JL, Convit J, Velazquez-Avila G. Fabry's disease: normal alpha-galactosidase activity and urinary-sediment glycosphingolipid levels in two obligate heterozygotes. *Br J Dermatol.* 1973; Aug;89(2):149-57.
- Azofeifa J, Voit T, Hubner C, Cremer M. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum. Genet.* 1995; Aug;96(2):167-76.
- Bach G, Rosenmann E, Karni A, Cohen T. Pseudodeficiency of alpha-galactosidase A. *Clin Genet.* 1982; Jan;21(1):59-64.
- Beck M., Ries M. Fabry disease:clinical manifestations, diagnosis and therapy. LSDN – TKT 2001.
- Beck M, Ricci R, Widmer U, Dehout F, de Lorenzo AG, Kampmann C, Linhart A, Sunder-Plassmann G, Houge G, Ramaswami U, Gal A, Mehta A. Fabry disease: overall effects of agalsidase alfa treatment. *Eur. J. Clin. Invest.* 2004; Dec;34(12):838-44.

- Bartlett RJ, Pericak-Vance MA, Koh J, Yamaoka LH, Chen JC, Hung WY, Speer MC, Wapenaar MC, Van Ommen GJ, Bakker E, et al. Duchenne muscular dystrophy: high frequency of deletions. *Neurology*. 1988; Jan;38(1):1-4.
- Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng CM, Sakuraba H, Desnick RJ. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. *J. Clin. Invest.* 1989; Apr;83(4):1390-9.
- Bishop DF, Desnick RJ. Affinity purification of alpha-galactosidase A from human spleen, placenta, and plasma with elimination of pyrogen contamination. Properties of the purified splenic enzyme compared to other forms. *J. Biol. Chem.* 1981; Feb 10;256(3):1307-16.
- Bishop DF, Calhoun DH, Bernstein HS, Hantzopoulos P, Quinn M, Desnick RJ. Human alpha-galactosidase A: nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the mature enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1986; Jul;83(13):4859-63.
- Bishop DF, Kornreich R, Desnick RJ. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1988; Jun;85(11):3903-7.
- Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 1967; May 5;276(21):1163-7.
- Brady RO, Tallman JF, Johnson WG, Gal AE, Leahy WR, Quirk JM, Dekaban AS. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *N. Engl. J. Med.* 1973; Jul 5;289(1):9-14.
- Brown RM, Brown GK. X chromosome inactivation and the diagnosis of X linked disease in females. *J. Med. Genet.* 1993; 30:177-184.
- Brown LK, Miller A, Bhuptani A et al. Pulmonary involvement in Fabry disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155(3):1004-10.

- Cable WJ, Dvorak AM, Osage JE, Kolodny EH. Fabry disease: significance of ultrastructural localization of lipid inclusions in dermal nerves. *Neurology*. 1982; Apr;32(4):347-53 (a)
- Cable WJ, Kolodny EH, Adams RD. Fabry disease: impaired autonomic function. *Neurology*. 1982; May;32(5):498-502 (b)
- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur. J. Pediatr*. 1997; 156(8):650-4.
- Desnick RJ, Dean KJ, Grabowski GA, Bishop DF, Sweeley CC. Enzyme therapy XVII: metabolic and immunologic evaluation of alpha-galactosidase A replacement in Fabry disease. *Birth. Defects Orig. Artic. Ser.* 1980;16(1):393-413.
- Desnick RJ, Bernstein HS, Astrin KH, Bishop DF. Fabry disease: molecular diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. *Enzyme*. 1987;38(1-4):54-64.
- Desnick RJ, Astrin KH, Bishop DF. Fabry disease: molecular genetics of the inherited nephropathy. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 1989;18:113-27.
- Desnick RJ, Sweeley CC. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL & Brown MS (eds): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 5th ed. New York: Mc Graw-Hill, 1982;906-944.
- Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α -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.
- Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain P, Goldman M et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann. Int.e.r Med.* 2003;138:338-46.
- Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Oosterwijk JC, Ober C. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet*. 2004; Aug 30;129A(2):136-43.

- Ellaway CJ, Wilcken E, Christodoulou J. Neonatology for the generalist: Clinical approach to inborn errors of metabolism presenting in the newborn period. *J. Paediatr. Child Health.* 2002;38:511-517.
- Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; Dec;53(6):1186-97.
- Eng CM, Desnick RJ. Molecular basis of Fabry disease: mutations and polymorphisms in the human alpha-galactosidase A gene. *Hum. Mutat.* 1994;3(2):103-11.
- Eng CM, Niehaus DJ, Enriquez AL, Burgert TS, Ludman MD, Desnick RJ. 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 CM, Ashley GA, Burgert TS, Enriquez AL, D'Souza M, Desnick RJ. 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.
- Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, Goldman M, Phelps R, Kim L, Gass A, Winston J, Dikman S, Fallon JT, Brodie S, Stacy CB, Mehta D, Parsons R, Norton K, O'Callaghan M, Desnick RJ. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; Mar;68(3):711-22. Epub 2001 Feb 01.
- Fabry J. Ein Beitrag Zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Habrae). *Arch. Derm. Syph.* 1898; 43: 187-200.
- François J: Heterozygotes for sex-linked trait and Mary Lyon's inactivation theory. XIV. Fabry's dystopic lipidosis. Proc. 3rd Int. Cong. *Hum. Genet.*, Chicago 1967; p. 423 (Johns Hopkins, Baltimore 1967).
- Germain DP, Avan P, Chassaing A, Bonfils P. Patients affected with Fabry disease have an increased incidence of progressive hearing loss and sudden deafness: an

- investigation of twenty-two hemizygous males patients. *BCM Med. Genet.* 2002; 3:10.
- Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J. Mol. Biol.* 2004; Mar 19;337(2):319-35.
- Grewal RP. Psychiatric disorders in patients with Fabry's disease. *Int. J. Psychiatry Med.* 1993;23(3):307-12.
- Ishii S, Sakuraba H, Suzuki Y. Point mutations in the upstream region of the alpha galactosidase A gene exon 6 in an atypical variant of Fabry disease. *Hum Genet.* 1992; Apr;89(1):29-32.
- Jardim L, Vedolin L, Schwartz IV, Burin MG, Cecchin C, Kalakun L, Matte U, Aesse F, Pitta-Pinheiro C, Marconato J, Giugliani R. CNS involvement in Fabry disease: clinical and imaging studies before and after 12 months of enzyme replacement therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2004;27(2):229-40.
- Jolly DJ. The role of the HPRT gene in human disease. *Horiz Biochem Biophys.. In Human Genes and Disease.* 1986;8:123-68;John Wiley & Sons, NY;123-168.
- Kahler SG. Galactosaemia in Chinese [editorial]. *J. Paediatr. Child Health.* 1999;35:339-440.
- Kampmann C, Wiethoff CM, Martin C, Wenzel A, Kampmann R, Whybra C, Miebach E, Beck M Electrocardiographic signs of hypertrophy in fabry disease-associated hypertrophic cardiomyopathy.. *Acta. Paediatr. Suppl.* 2002;91(439):21-7.
- Kobayashi T, Kira J, Shinnoh N, Goto I, Kuroiwa Y. Fabry's disease with partially deficient hydrolysis of ceramide trihexoside. *J. Neurol. Sci.* 1985; Feb;67(2):179-85.
- Kornfeld S, Mellman I.. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1989;5:483-525.
- Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* 1989; Apr 25;17(8):3301-2.

- Kornreich R, Bishop DF, Desnick RJ. Alpha-galactosidase A gene rearrangements causing Fabry disease. Identification of short direct repeats at breakpoints in an Alu-rich gene. *J. Biol. Chem.* 1990; Jun 5;265(16):9319-26.
- Kint JA. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency. *Science.* 1970; Feb 27;167(922):1268-9.
- Lao LM, Kumakiri M, Mima H, Kuwahara H, Ishida H, Ishiguro K, Fujita T, Ueda K. The ultrastructural characteristics of eccrine sweat glands in a Fabry disease patient with hypohidrosis. *J. Dermatol. Sci.* 1998; Nov;18(2):109-17.
- Larralde M, Boggio P, Amartino H, Chamoles N. Fabry disease: a study of 6 hemizygous men and 5 heterozygous women with emphasis on dermatologic manifestations. *Arch. Dermatol.* 2004; Dec;140(12):1440-6.
- Lemansky P, Bishop DF, Desnick RJ, Hasilik A, von Figura K. Synthesis and processing of alpha-galactosidase A in human fibroblasts. Evidence for different mutations in Fabry disease. *J. Biol. Chem.* 1987; Feb 15;262(5):2062-5.
- Levade T, Giordano F, Maret MC, Marguery MC, Bazex J, Salvayre R. Different phenotypic expression of Fabry disease in female homozygotic twins. *J. Inherit Metab. Dis.* 2001; 14:105
- Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature.* 1961;190:372-373.
- Lyon MF. The William Allan Memorial Award Address: X-chromosome inactivation and the localization and expression of X-linked genes. *Am. J. Med. Genet.* 1988; Jan;42:86.
- MacDermot KD, Brown A, Jones Y, Zucherman J. Enzyme replacement therapy reverses the cardiomyopathy of Fabry disease: results of a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Eur. J. Hum. Genet.* 2001; 9 (Suppl 1):92(a).
- MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Natural history of Fabry disease in affected males and obligate carrier females. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2001;24(Suppl. 2):13-14(b).

- Masson C, Cisse I, Simon V, Insalaco P, Audran M. Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine*. 2004; Sep;71(5):381-3.
- Matthews RJ, Anson DS, Peake IR, Bloom AL. Heterogeneity of the factor IX locus innine hemophilia B inhibitor patients. *J. Clin. Invest*. 1987; Mar;79(3):746-53.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999; Jan 20;281(3):249-54.
- Meikle PJ, Ranieri E, Ravenscroft EM, Hua CT, Brooks DA, Hopwood JJ. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 1999;30 Suppl 2:104-10.
- Meikle PJ, Hopwood JJ. Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis. *Eur. J. Pediatr*. 2003; Dec;162 Suppl 1:S34-7. Epub 2003 Nov 11.
- Meroni M, Sessa A, Battini G, Tazzari S, Torri Tarelli L. Kidney involvement in Anderson-Fabry disease. *Contrib. Nephrol*. 1997;122:178-84.
- Mitsias P, Levine SR. Cerebrovascular complications of Fabry's disease. *Ann. Neurol*. 1996; Jul;40(1):8-17.
- Morgan SH, Rudge P, Smith SJ, Bronstein AM, Kendall BE, Holly E, Young EP, Crawford MD, Bannister R. The neurological complications of Anderson-Fabry disease (alpha-galactosidase A deficiency)--investigation of symptomatic and presymptomatic patients. *Q. J. Med*. 1990; May;75(277):491-507.
- Morrone A, Cavicchi C, Bardelli T, Antuzzi D, Parini R, Di Rocco M, Feriozzi S, Gabrielli O, Barone R, Pistone G, Spisni C, Ricci R, Zammarchi E. Fabry disease: molecular studies in Italian patients and X inactivation analysis in manifesting carriers. *J. Med. Genet*. 2003; Aug;40(8):e103.
- Nagao Y, Nakashima H, Fukuhara Y, Shimmoto M, Oshima A, Ikari Y, Mori Y, Sakuraba H, Suzuki Y. Hypertrophic cardiomyopathy in late-onset variant of Fabry

disease with high residual activity of alpha-galactosidase A. *Clin. Genet.* 1991; Mar;39(3):233-7.

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.

Okumiya T, Ishii S, Kase R, Kamei S, Sakuraba H, Suzuki Y. α -galactosidase gene mutations in Fabry disease: heterogeneous expressions of mutant enzyme proteins. *Hum. Genet.* 1995; 95:557-561.

Redonnet-Vernhet I, Ploos van Amstel JK, Jansen RP, Wevers RA, Salvayre R, Levade T. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *J. Med. Genet.* 1996; Aug;33(8):682-8.

Rozen R, Fox J, Fenton WA, Horwich AL, Rosenberg LE. Gene deletion and restriction fragment length polymorphisms at the human ornithine transcarbamylase locus. *Nature.* 1985; Feb 28-Mar 6;313(6005):815-7.

Sakuraba H, Oshima A, Fukuhara Y, Shimmoto M, Nagao Y, Bishop DF, Desnick RJ, Suzuki Y. Identification of point mutations in the alpha-galactosidase A gene in classical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; Nov;47(5):784-9.

Schiffmann R, Murray GJ, Treco D, Daniel P, Sellos-Moura M, Myers M, Quirk JM, Zirzow GC, Borowski M, Loveday K, Anderson T, Gillespie F, Oliver KL, Jeffries NO, Doo E, Liang TJ, Kreps C, Gunter K, Frei K, Crutchfield K, Selden RF, Brady RO. Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000; Jan 4;97(1):365-70.

Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA 3rd, Sabnis S, Moore DF, Weibel T, Balow JE, Brady RO. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001; Jun 6;285(21):2743-9.

Schiller PI, Itin PH. Angiokeratomas: an update. *Dermatology.* 1996;193(4):275-82.

- Scriver CR. Garrod's foresight; our hindsight. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2001; Apr;24(2):93-116.
- Severini MH, Silva CD, Sopelsa A, Coelho JC, Giugliani R. High frequency of type 1 GM1 gangliosidosis in southern Brazil. *Clin Genet.* 1999; Aug;56(2):168-9.
- Shelley ED, Shelley WB, Kurczynski TW. Painful fingers, heat intolerance, and telangiectases of the ear: easily ignored childhood signs of Fabry disease. *Pediatr. Dermatol.* 1995; Sep;12(3):215-9.
- Sheth KJ, Werlin ME, Hodach AE. Gastrointestinal structure and function in Fabry disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1981;76:246.
- Spaeth GL, Frost P. Fabry's disease. Its ocular manifestations. *Arch. Ophthalmol.* 1965; Dec;74(6):760-9.
- Sweeley CC, Klionsky B. Fabry's Disease: Classification as A sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J. Biol. Chem.* 1963; Sep;238:3148-50.
- Tada K, Tateda H, Areshima S et al. Follow-up study of a nation-wide neonatal metabolic screening program in Japan. A collaborative study group of neonatal screening for inborn error of metabolism in Japan. *Eur. J. Padiatr.* 1984;142:204-207.
- Tang NL, Hui J, Law LK, To KF, Mak TW, Cheung KL, Vreken P, Wanders RJ, Fok TF. Overview of common inherited metabolic diseases in a Southern Chinese population of Hong Kong. *Clin. Chim. Acta.* 2001; Nov;313(1-2):195-201.
- Tumer L, Ezgu FS, Hasanoglu A, Dalgic B, Bakkaloglu SA, Memis L, Dursun A. The co-existence of Fabry and celiac diseases: a case report. *Pediatr. Nephrol.* 2004; Jun;19(6):679-81. Epub 2004 Apr 15.
- Vetrie D, Bentley D, Bobrow M, Harris A. Physical mapping shows linkage between the α -galactosidase A gene (GLA) and the DXS178 locus. *Hum. Genet.* 1993;92:95-99.
- von Scheidt W, Eng C M, Fitzmaurice T F, Erdmann E, Hubner G, Olsen EG,

Christomanou H, Kandolf R, Bishop DF, Desnick RJ. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N. Engl. J. Med.* 1991; Feb 7;324(6):395-9.

Wareham KA, Lyon MF, Glenister PH, Williams ED. Age related reactivation of an X-linked gene. *Nature.* 1987; Jun 25-Jul 1;327(6124):725-7.

Wendrich K, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M. Neurological manifestation of Fabry disease in females. *Contrib. Nephrol.* 2001;(136):241-4.

Wherrett JR, Hakomori SI. Characterization of a blood group B glycolipid, accumulating in the pancreas of a patient with Fabry's disease. *J. Biol. Chem.* 1973; May 10;248(9):3046-51.

Whybra C, Wendrich K, Ries M, Gal A, Beck M. Clinical manifestation in female Fabry disease patients. *Contrib. Nephrol.* 2001;(136):245-50.

Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyl-deoxycytidine decreases with age. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:9948-9951.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Detecção de mutações em pacientes brasileiros com Doença de Fabry

Pereira, Fernanda dos Santos⁺

Jardim, Laura Bannach^{*}

Netto, Cristina^{*}

Cecchin, Claudia^{*}

Giugliani, Roberto^{*#}

Matte, Ursula[#]

+ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Mestranda do Curso de Pós-graduação em Clínica Médica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

* Departamento de Genética - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Laboratório de Terapia Gênica – Centro de Pesquisas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Apoio: CAPES, FIPE-HCPA

RESUMO

A Doença de Fabry (DF) é uma desordem lisossomal ligada ao X causada pela deficiência da enzima alfa-galactosidase A, que provoca acúmulo de globotriaosilceramida (Gb3). O gene que codifica essa enzima está localizado no braço longo do cromossomo X, na região Xq21.33-Xq22, chama-se gene GLA e é composto por 12Kb divididos em sete exons. As manifestações clínicas incluem hipohidrose, angioqueratomas, acroparestesias e opacidade corneana. A progressão da doença leva a doenças vasculares secundárias envolvendo rins, coração e sistema nervoso central. A detecção de mulheres portadoras baseada somente na análise enzimática muitas vezes é inconclusiva. Portanto, a análise de mutações é uma ferramenta fundamental para diagnóstico e aconselhamento genético. A heterogeneidade da DF é alta e a maioria das mutações são privadas. Neste estudo nós descrevemos a análise molecular de seis pacientes homens pertencentes a quatro famílias diferentes e suas mães. O seqüenciamento automatizado dos sete exons do gene GLA revelou a presença de três mutações não conhecidas e uma descrita anteriormente em outra família brasileira. Aparentemente, ambas as famílias não são relacionadas, mas estudos futuros utilizando análise de haplótipos esclarecerão esta situação. Uma mãe era portadora, a outra não. Este estudo confirma a heterogeneidade de mutações que causam DF. Isto também destaca a importância da análise molecular para detecção de portadoras e aconselhamento genético.

INTRODUÇÃO

A Doença de Fabry (DF) é um erro inato do metabolismo de glicosfingolipídios causado pela deficiência da enzima alfa-galactosidase A (α -Gal A; EC 3.2.1.22). O gene que codifica esta enzima lisossomal está localizado no braço longo do cromossomo X, na região, na região Xq21.33 – Xq22 (Desnick, *in* Scriver, 2001). O gene contém 12kb e está dividido em sete exons (Kornreich, 1989; Eng *et al*, 1994). A atividade deficiente da α -galactosidase A causa o acúmulo do globotriaosilceramida (Gb3) dentro dos lisossomos das células. As manifestações clínicas incluem hipohidrose, angioqueratomas, acroparestesias e opacidade corneana. A progressão da doença leva a complicações vasculares secundárias envolvendo rins, coração e sistema nervoso central (Ashton-Prolla *et al.*, 1999).

A DF é uma doença ligada ao X e pacientes homens normalmente apresentam os sintomas clássicos da doença, embora mulheres sintomáticas tenham sido descritas (MacDermot, 2001 e Masson *et al*, 2003). Devido à inativação randômica do cromossomo X, a detecção de mulheres baseada exclusivamente na análise enzimática é, muitas vezes, inconclusiva. Portanto, a análise de mutações é uma ferramenta importante para diagnóstico e aconselhamento genético de famílias afetadas, especialmente quando há tratamento específico disponível, como a terapia de reposição enzimática. Contudo, não há mutações comuns descritas nesse gene. Até 2004, mais de 356 mutações foram descritas no site Human Gene Mutation Database (www.uwcm.ac.uk), incluindo mutações de sentido trocado, sem sentido, mutações no sítio de *splicing* e pequenos e grandes rearranjos. Além disso, muitas mutações são privadas, com poucas exceções (Ashton-Prolla *et al.*, 1999).

Nosso serviço é um centro de referência para o diagnóstico de doenças lisossomais no Brasil (Coelho *et al.*, 1997). Neste estudo, nós descrevemos a análise molecular de seis pacientes homens pertencentes a quatro famílias diferentes e suas mães.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes

Os pacientes analisados neste estudo foram aqueles diagnosticados bioquimicamente pelo Serviço de Genética Médica do HCPA até dezembro de 2003 e que estão em terapia de reposição enzimática. Neste trabalho foram analisadas quatro

famílias diferentes em nosso estudo, cada uma com pelo menos homem afetado. No total, seis pacientes homens, bem como duas possíveis portadoras (mães) foram investigadas. Todos os indivíduos tinham diagnóstico bioquímico da alfa-galactosidase A realizada no Laboratório Referência de Erros Inatos do Metabolismo (LREIM) do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento informado antes dos estudos moleculares.

Amplificação por PCR

O DNA foi extraído de amostras de sangue através da técnica de precipitação por sal (Miller et al., 1988). A seqüência genômica dos sete exons do gene GLA foi amplificada utilizando-se os primers descritos na tabela 1. As reações continham um volume final de 50 µl, com 0,2 mM de dNTP, 2.5 mM de MgCl₂, tampão NH₄ 1X, Taq DNA Polimerase 1U, 20 pmoles de cada primer e 100 ng de DNA. Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen. As reações foram feitas em termociclador do tipo Eppendorf Personal Cycler, com 30 ciclos de 45 segundos e temperatura de anelamento variável para cada exon, como demonstrado na tabela 1. A verificação da amplificação dos fragmentos foi realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Seqüenciamento automatizado

Os fragmentos de PCR foram purificados antes do seqüenciamento utilizando-se o kit de purificação Microspin S300 HR Columns (Amersham) seguindo as instruções do fabricante. O seqüenciamento foi efetuado no aparelho ABI310 Genetic Analyser com a utilização do reagente BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Os mesmos primers utilizados no PCR foram usados no seqüenciamento. As seqüências obtidas foram comparadas à seqüência de referência NM_000169 (www.ncbi.nlm.nih.gov). Todas as alterações foram confirmadas pelo seqüenciamento da fita reversa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos 4 famílias com pelo menos um homem afetado com DF. Considerando outros membros afetados e potenciais portadoras, oito indivíduos

foram analisados. Três novas mutações foram encontradas, uma no exon 1 e duas no exon 7. Uma mutação encontrada no exon 1 (30delG) já havia sido descrita em outra família brasileira com DF (Ashton-Prolla et al., 1999). A tabela 2 sumariza as mutações encontradas neste estudo.

A mutação 30delG (figura 1a), foi encontrada em uma família com três homens afetados. A mãe foi detectada como portadora, conforme já era esperado, uma vez que o heredograma desta família apresenta vários indivíduos afetados (figura 1b). Como resultado dessa mudança no quadro de leitura, um códon de terminação prematuro é introduzido no resíduo 120. Essa mutação foi anteriormente descrita por Ashton-Prolla *et al* (1999) em uma grande família brasileira com DF. Aparentemente, ambas as famílias não são relacionadas, mas estudos futuros utilizando análise de haplótipos serão realizados para elucidar esta questão.

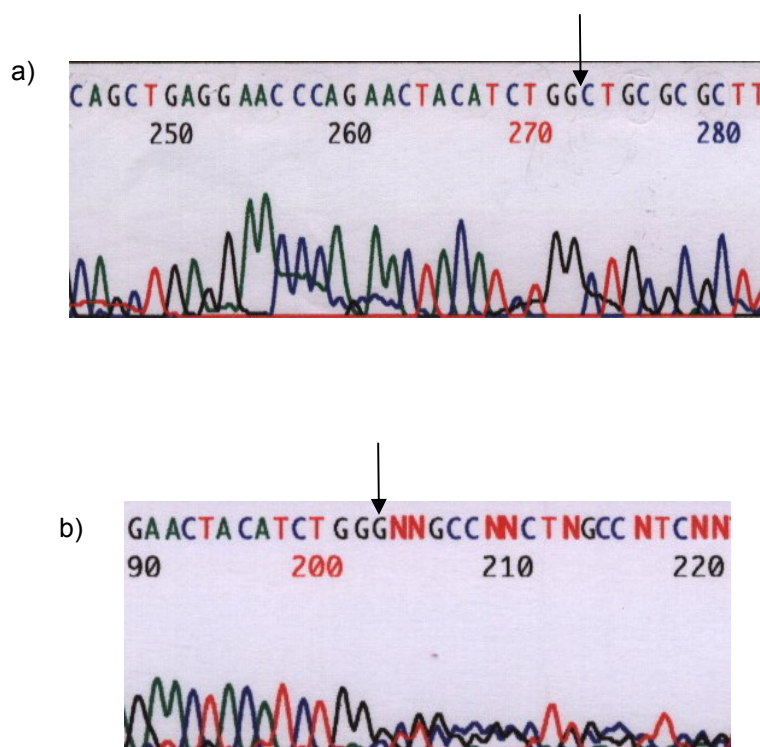


Figura 1. Sequenciamento da fita senso do exon 1, mostrando a mutação 30delG. a) hemizigoto. b) heterozigota (mãe), portadora.

A mutação L36F (figura 2), foi encontrada em uma família com somente um homem afetado. Essa mutação é uma transversão G→T na base 108 do cDNA, que altera o códon que codifica uma Lisina (TTG) para o códon que codifica uma Fenilalanina (TTT). Maiores estudos são necessários para elucidar como esta mutação

pode afetar o processamento da enzima. A análise do DNA da mãe deste paciente não apontou a presença da mutação. O caso índice tem duas irmãs assintomáticas e não há registros de outros familiares afetados. A taxa esperada de novas mutações em genes ligados ao cromossomo X é cerca de 30% (Vogel & Motulski, 1996). Esta família ilustra a importância da análise molecular para detecção de portadoras e aconselhamento genético.

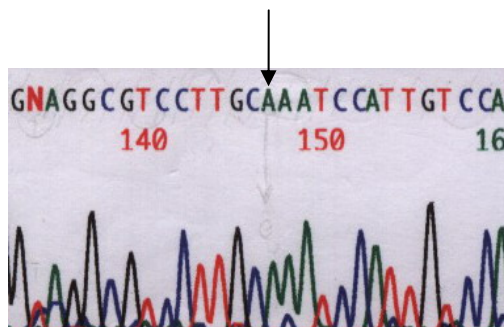


Figura 2. Seqüenciamento da fita antisense do exon 1, mostrando a mutação L36F.

A mutação 345delTC (figura 3), é causada pela deleção de dois pares de bases na posição 1033-1034 do cDNA. Essa alteração no quadro de leitura cria um códon de terminação 28 aminoácidos após a deleção, no resíduo 373. A proteína resultante, se traduzida com êxito, conterà 56 aminoácidos a menos na sua estrutura final. O DNA da mãe deste paciente não estava disponível.

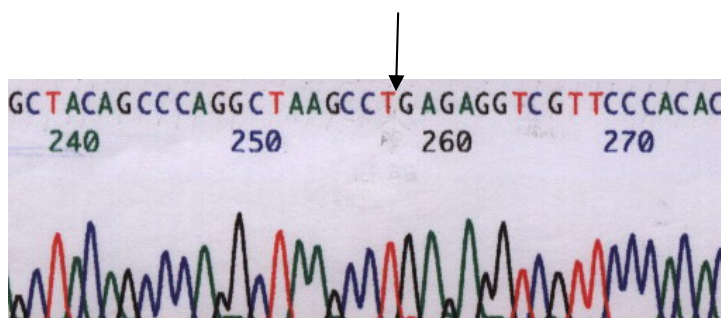


Figura 3. Seqüenciamento da fita antisense do exon 7, mostrando a mutação 345delTC.

A mutação W349X (figura 4) é uma mutação sem sentido, no exon 7, causada pela transição G→A na posição 1046 do cDNA. A proteína, que deveria conter 429 aminoácidos, apresenta um códon de terminação prematura no resíduo 349, faltando 84 aminoácidos para estar completa. Não foi possível obter DNA da mãe desse paciente.

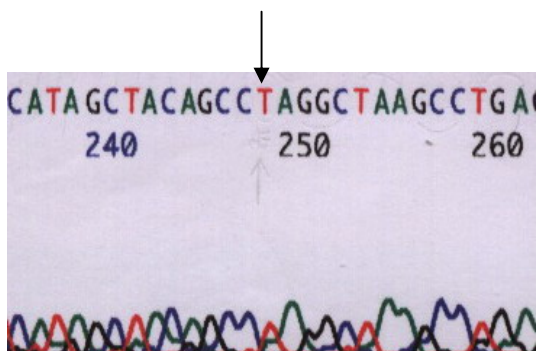


Figura 4. Seqüenciamento da fita antisense do exon 7, mostrando a mutação W349X.

Esse estudo confirma a heterogeneidade de mutações na DF. Isso ressalta a importância da análise molecular para detecção de portadoras e para aconselhamento genético.

BIBLIOGRAFIA DO ARTIGO

- Ashton-Prolla P, Ashley GA, Giugliani R, Pires RF, Desnick RJ, Eng CM. 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.
- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur. J. Pediatr.* 1997; 156(8):650-4.
- Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α -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 CM, Niehaus DJ, Enriquez AL, Burgert TS, Ludman MD, Desnick RJ. 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.
- Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* 1989; Apr 25;17(8):3301-2.
- MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Natural history of Fabry disease in affected males and obligate carrier females. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2001; 24(Suppl. 2):13-14
- Masson C, Cisse I, Simon V, Insalaco P, Audran M. Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine.* 2004; Sep;7(5):381-3
- Vogel F & Motulsky AG. *Human Genetics: problems and approaches*. Springer 3^aed. Springer, 1996.

TABELAS

Tabela 1: Seqüência dos primers, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos obtidos da amplificação dos sete exons do gene GLA.

	Senso	Antisenso	T.A.	Tam.
EXON 1	5'GGATCACTAAGGTGCCGC 3' 207 B	5' AACTGTTCCCGTTGAGACTC 3' 219	55°C	535 bp
EXON 2	5'CTTGTGATTACTACCACACT 3' 218 B	5'AACAAGCTTCTGTACAGAAGTGC 3' 217	48°C	367 bp
EXON 3	5'TAGCTCAGCAGAACTGGGGGATTT 3' 3413	5' GGCTCAGCTACCATGGCCT 3' F3 -	55°C	440 bp
EXON 4	5'TATAGCCCCAGCTGGAAATT 3' TATA	5'GTAAGTAACGTTGGACT 3' 3 B	47°C	250 bp
EXON 5	5'CTCACAAGGATGTTAGT 3' 187 B	5'AGATTTAGGCCCAAGAC 3' 192	48°C	699 bp
EXON 6	5'GGGTCATCTAGGTAACCTTTAAGA 3' Col I	5' AGATTTAGGCCCAAGAC 3' 192	48°C	335 bp
EXON 7	5'ATGAATGCCAACTAAC 3' Col II	5'CAGGAAGTAGTAGTTGG 3' 7 B	48°C	392 bp

T.A.: Temperatura de anelamento

Tabela 2: Caracterização das mutações encontradas neste estudo.

Família	Mutação	Exon	Posição no cDNA^a	Observação
1	30delG	1	30-32 del G	Códon de terminação em L120
2	L36F	1	G108T	Mutação de sentido trocado
3	345delTC	7	1033-1034 del TC	Códon de terminação em G373
4	W349X	7	G1046A	Mutação sem sentido

^a Seqüência do cDNA de acordo com NM_000169 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

ARTIGO EM INGLÊS

Mutation detection of Brazilian patients with Fabry Disease

Pereira, Fernanda dos Santos⁺

Jardim, Laura Bannach^{*}

Netto, Cristina^{*}

Cecchin, Claudia^{*}

Giugliani, Roberto^{*#}

Matte, Ursula[#]

+ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Post-Graduation Program in Clinical Medicine

* Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Medical Genetics Service

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Center for Gene Therapy

Support: CAPES, FIPE-HCPA

ABSTRACT

Fabry disease is a an X-linked lysosomal disorder due to the deficiency of α -galactosidase A that causes storage of globotriaosylceramide (Gb3). The gene coding for this lysosomal enzyme is located at the long arm of X chromosome, on region Xq21.33 – Xq22, called GLA gene and spans 12kb and is divided in seven exons. Clinical manifestations include hypohidrosis, angiokeratomas, acroparesthesias and corneal opacities. Disease progression leads to vascular disease secondary to involvement of kidney, heart and the central nervous system. Detection of female carriers based solely on enzyme assays is often inconclusive. Therefore, mutation analysis is a valuable tool for diagnosis and genetic counseling. However there is high genetic heterogeneity and most mutations are private. In this study we describe the molecular analysis of six male Fabry patients belonging to four different families and their mothers. Automated sequencing of the seven exons of GLA gene revealed the presence of three unknown mutations and one previously described in another Brazilian family. Apparently, both families are not related but further studies using haplotype analysis shall clarify this question. All but one of the studied mothers were carriers. This study confirms the heterogeneity of mutations in Fabry disease. It also highlights the importance of molecular analysis for carrier detection and genetic counseling.

INTRODUCTION

Fabry disease is an inborn error of metabolism of glycosphingolipids due to the deficiency of α -galactosidase A (α -Gal A; EC 3.2.1.22). The gene coding for this lysosomal enzyme is located at the long arm of X chromosome, on region Xq21.33 – Xq22 (Desnick, *in* Scriver, 2001). It spans 12kb and is divided in seven exons (Kornreich, 1989; Eng *et al*, 1994). Reduced activity of α -galactosidase A causes storage of globotriaosylceramide (Gb3) inside cell's lysosomes. Clinical manifestations include hypohidrosis, angiokeratomas, acroparesthesias and corneal opacities. Disease progression leads to vascular disease secondary to involvement of kidney, heart and the central nervous system (Ashton-Prolla *et al.*, 1999).

Fabry disease is an X-linked disorder and male patients usually present with classical symptoms although symptomatic females have been described (MacDermot, 2001 e Masson *et al*, 2003). Due to random X inactivation, detection of female carriers based solely on enzyme assays is often inconclusive. Therefore, mutation analysis is a valuable tool for diagnosis and genetic counseling of affected families, especially in the availability of specific treatment, such as enzyme replacement therapy. However there are no common mutations described in this gene. Up to 2004, more than 356 mutations have been described in the Human Gene Mutation Database (www.uwcm.ac.uk), including missense, nonsense, splice site and small and large rearrangements. Moreover, most mutations are private, with a few exceptions (Ashton-Prolla *et al.*, 1999).

Our service is a reference center for the diagnosis of lysosomal disorders in Brazil (Coelho *et al.*, 1997). In this study we describe the molecular analysis of six male Fabry patients belonging to four different families and their mothers.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Four different families were analyzed in this study, each of them with at least one affected male. In the total, six male patients as well as two possible carriers (mothers) were investigated. All subjects had biochemical analysis of alpha-galactosidase A performed at the Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

This study was approved by the Ethical Research Committee of HCPA and all subjects signed an informed consent form before DNA studies.

PCR Amplification

DNA was extracted from whole blood samples using the salting-out procedure (Miller et al., 1988). The genomic sequence of the seven exons of GLA gene were amplified using the primers described on table 1. Reactions were carried out in a final volume of 50 µl, with 0.2m M dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1X KCl buffer, 1U Taq DNA Polimerase, 20 pmoles of each primer and 100 ng of DNA. All reagents were purchased from Invitrogen. Reactions were performed in Eppendorf Personal Cycler, with 30 cycles of 45 seconds and annealing temperature variable for each exon, as shown on table 1.

Automated Sequencing

PCR fragments were purified using Microspin S300 HR Columns (Amersham), according to manufacturer's instructions prior to sequencing. Sequencing was performed at ABI310 Genetic Analyser using BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). The same primers used for PCR amplification were used for sequencing. The obtained sequences were compared to reference sequence NM000169 (www.ncbi.nlm.nih.gov). Any alterations were confirmed by reverse strand sequencing.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study we analyzed four families with at least one affected member with Fabry disease. Considering other affected members and potential carriers, eight individuals were studied. Three new mutations were found, one in exon 1 and two in exon 7. One mutation found in exon 1 (30delG) had already been described in another Brazilian kindred with Fabry disease (Ashton-Prolla et al., 1999). Table 2 summarizes the mutations found in this study.

Mutation 30delG (figure 1a) was found in a family with three affected males. The mother was found to be carrier, as would be expected (figure 1b). As a result of the frameshift, a premature stop codon is introduced at residue 120. This mutation has been previously described by Ashton-Prolla et al (1999) in a large family with Fabry

disease from Brazil. Apparently, both families are not related but further studies using haplotype analysis shall clarify this question.

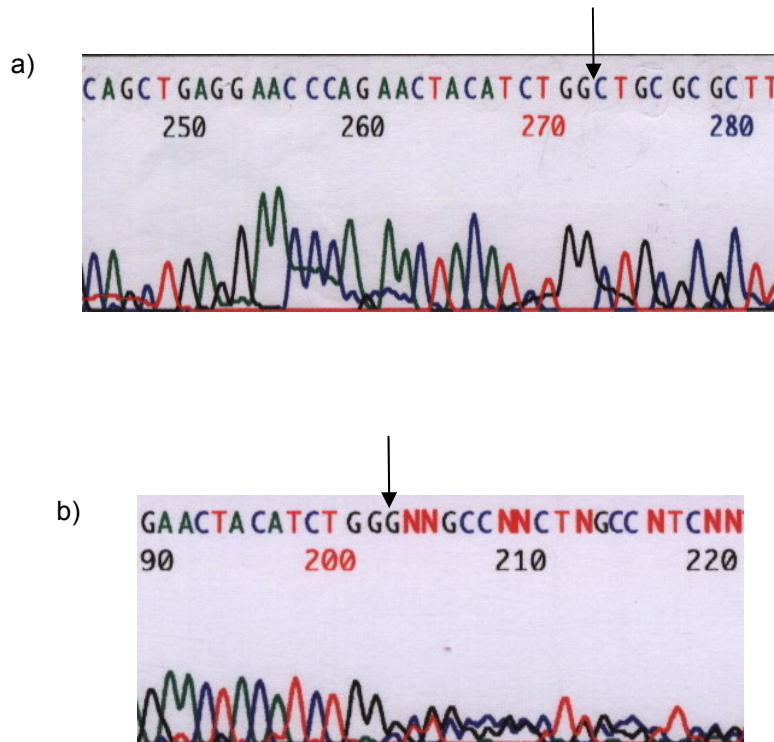


Figure 1. Exon 1 sense strand sequencing, showing the mutation 30delG. a) Hemizygous male. b) Carrier female (mother).

Mutation L36F (figure 2) was found in a family with only one affected male. This mutation is a transversion G→T at base 108 of the cDNA, changing the Lysine codon (TTG) to a Phenylalanine codon (TTT). Further studies are needed to clarify how this mutation may affect enzyme processing. Analysis of the mother's DNA did not show the presence of the mutation. The index case has two asymptomatic sisters and there are no records of other affected relatives. The expected rate of new mutations in X-linked genes is about 30% (Vogel & Motulski,1996). This family illustrates the importance of molecular analysis for carrier detection and genetic counseling.

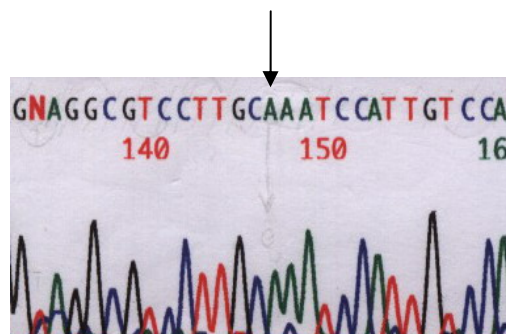


Figure 2. Exon 1 antisense strand sequencing, showing mutation L36F.

Mutation 345delTC (figure 3) is caused by the deletion of two base pairs at position 1033-1034 of the cDNA. This frameshift creates a stop codon 28 amino acids downstream the deletion, at residue 373. The resulting protein, if successfully translated, would lack its final 56 amino acids. The DNA from the patient's mother was not available for analysis.

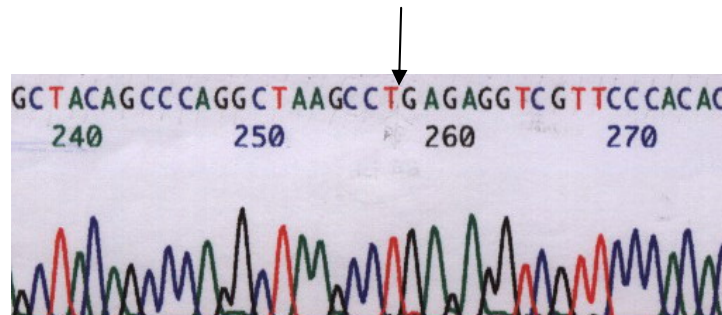


Figure 3. Exon 7 antisense strand sequencing, showing mutation 345delTC.

Mutation W349X (figure 4) is a nonsense mutation in exon 7 caused by the transition G→A at position 1046 of the cDNA. The protein, which should have 429 amino acids presents a premature stop at residue 349, lacking its final 84 amino acids. The DNA from the patient's mother was not available for analysis.



Figure 4. Exon 7 antisense strand sequencing, showing mutation W349X.

This study confirms the heterogeneity of mutations in Fabry disease. It also highlights the importance of molecular analysis for carrier detection and genetic counseling.

REFERENCES

- Ashton-Prolla P, Ashley GA, Giugliani R, Pires RF, Desnick RJ, Eng CM. 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.
- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur. J. Pediatr.* 1997; 156(8):650-4.
- Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α -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 CM, Niehaus DJ, Enriquez AL, Burgert TS, Ludman MD, Desnick RJ. 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.
- Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* 1989 Apr 25;17(8):3301-2.
- MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Natural history of Fabry disease in affected males and obligate carrier females. *J Inherit Metab Dis.* 2001;24(Suppl. 2):13-14
- Masson C, Cisse I, Simon V, Insalaco P, Audran M. Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine.* 2004 Sep;7(5):381-3
- Vogel F & Motulsky AG. *Human Genetics: problems and approaches*. Springer 3^aed. Springer, 1996.

TABLES

Table 1: Primer sequence, annealing temperature and fragment size for amplification of the seven exons of GLA gene.

	Forward	Reverse	A.T.	Size
EXON 1	5'GGATCACTAAGGTGCCGC 3' 207 B	5' AACTGTTCCCGTTGAGACTC 3' 219	55°C	535 bp
EXON 2	5'CTTGTGATTACTACCACACT 3' 218 B	5' AACAAGCTTCTGTACAGAAGTGC 3' 217	48°C	367 bp
EXON 3	5'TAGCTCAGCAGAACTGGGGGATTT 3' 3413	5' GGCTCAGCTACCATGGCCT 3' F3 -	55°C	440 bp
EXON 4	5'TATAGCCCCAGCTGGAAATT 3' TATA	5' GTAAGTAACGTTGGACT 3' 3 B	47°C	250 bp
EXON 5	5'CTCACAAGGATGTTAGT 3' 187 B	5' AGATTTAGGCCCAAGAC 3' 192	48°C	699 bp
EXON 6	5'GGGTCATCTAGGTAACCTTAAGA 3' Col I	5' AGATTTAGGCCCAAGAC 3' 192	48°C	335 bp
EXON 7	5'ATGAATGCCAACTAAC 3' Col II	5' CAGGAAGTAGTAGTTGG 3' 7 B	48°C	392 bp

A. T.: annealing temperature

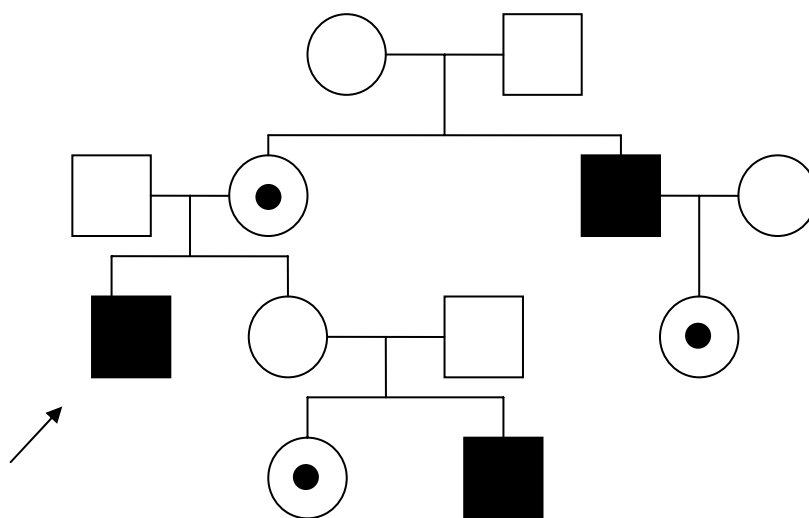
Table 2: Characteristics of the mutations found in this study.

Mutation	Family	Exon	cDNA^a Alteration	Coments
30delG	A	1	30-32 del G	Stop codon at L120
L36F	B	1	G108T	Missense mutation
345delTC	C	7	1033-1034 del TC	Stop codon at G373
W349X	D	7	G1046A	Nonsense mutation

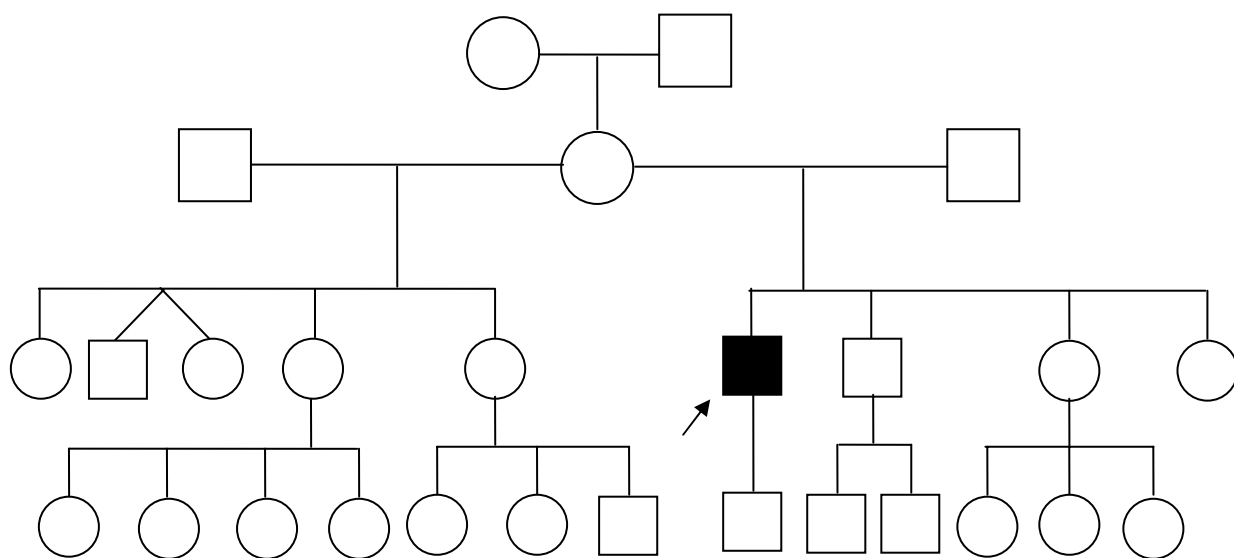
^a cDNA sequence according to NM_000169 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

ANEXOS

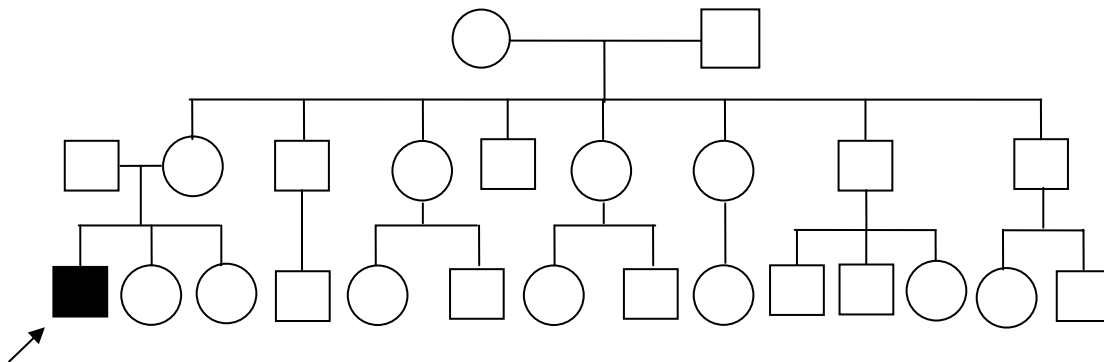
Heredograma e seqüenciamento - família A



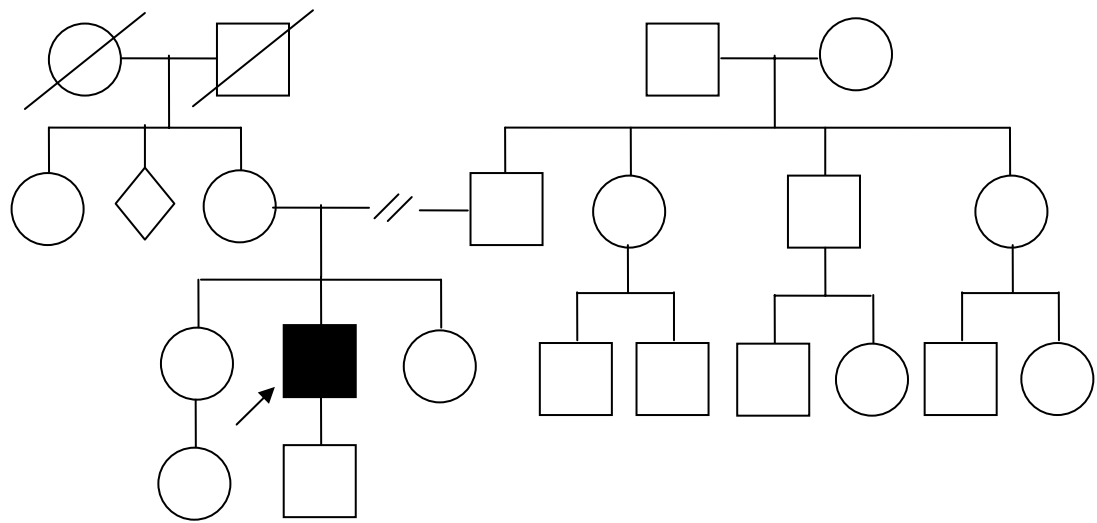
Heredograma e seqüenciamento - família B



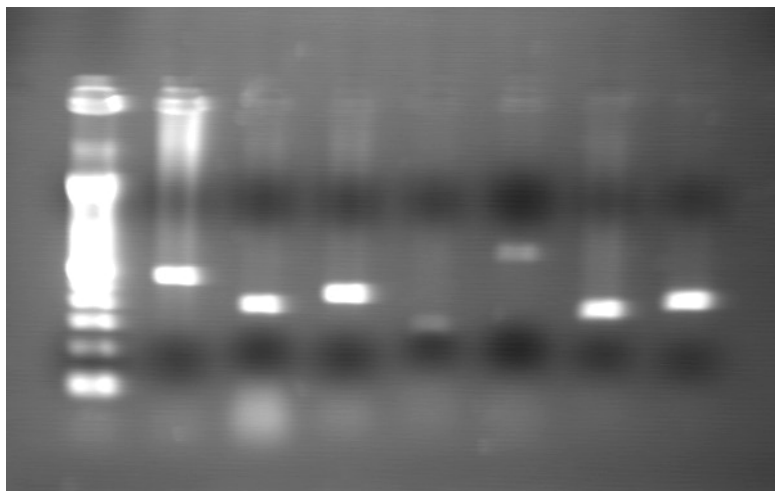
Heredograma e seqüenciamento - família C



Heredograma e seqüenciamento - família D



Amplificação dos sete exons do gene GLA



Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Marcador de 100 pb, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7.