



## Determinação de propriedades bioquímicas da alfa-galactosidase A como ferramenta auxiliar no diagnóstico da doença de Fabry: comparação entre amostras de leucócitos de pacientes com doença de Fabry e indivíduos saudáveis.

Vitória da Costa Moraes<sup>1</sup>, Janice Carneiro Coelho<sup>2</sup>

### Introdução

A Doença de Fabry (DF) é um erro inato do metabolismo com herança ligada ao cromossomo X, causada pela deficiência na enzima alfa-galactosidase A (GLA). A GLA é uma hidrolase lisossômica, responsável pela degradação de glicosfingolipídeos. A deficiência desta enzima provoca o acúmulo progressivo de glicosfingolipídeos, gerando uma série de sintomas como acroparestesia, angioqueratomas, problemas de visão e desenvolvimento de fibrose tecidual irreversível nos rins e coração. O diagnóstico bioquímico de DF é baseado na medida da atividade enzimática da GLA e pode ser difícil em alguns casos, devido à diversidade de fenótipos encontrados e à diferença existente entre indivíduos masculinos (hemizigotos) e femininos (heterozigotos).

### Objetivo

Tendo em vista a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas para este diagnóstico, o objetivo deste estudo foi estabelecer e comparar as propriedades bioquímicas e cinéticas da GLA em amostras de leucócitos de pacientes com DF e indivíduos saudáveis, avaliando a possibilidade de usar estes parâmetros como ferramenta auxiliar no diagnóstico da DF.

### Metodologia

Para obtenção das amostras, foram utilizados 9mL de sangue heparinizado de indivíduos saudáveis e pacientes com DF. A atividade da GLA foi determinada por meio de ensaios fluorimétricos, caracterizando a enzima em termos de: pH ótimo, Km, V<sub>máx</sub> e termoestabilidade.

### Resultados

O pH em que a média da atividade da GLA foi mais alta foi 4,8 em amostras de controles saudáveis e 4,7 em pacientes com DF. Não houve diferença significativa entre a atividade da GLA em pHs adjacentes ( $p < 0,01$ ) (figura 1). O pH utilizado nos demais ensaios foi 4,8. Os valores de Km encontrados para pacientes e controles não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ). A V<sub>máx</sub> da GLA de pacientes com DF foi  $1,344 \pm 0,394$  nmol/h/mg de proteína e a de controles saudáveis foi  $42,67 \pm 25,46$  nmol/h/mg de proteína, sendo a diferença significativa ( $p < 0,01$ ). A pré-incubação a 50 °C por 1 hora foi efetiva para diferenciar pacientes com DF de controles ( $p < 0,01$ ) (figura 2). Após 1 hora de pré-incubação a 50 °C, a enzima dos pacientes manteve aproximadamente 79% de sua atividade enquanto a de indivíduos saudáveis manteve apenas 7,4% da atividade das amostras não submetidas à pré-incubação.

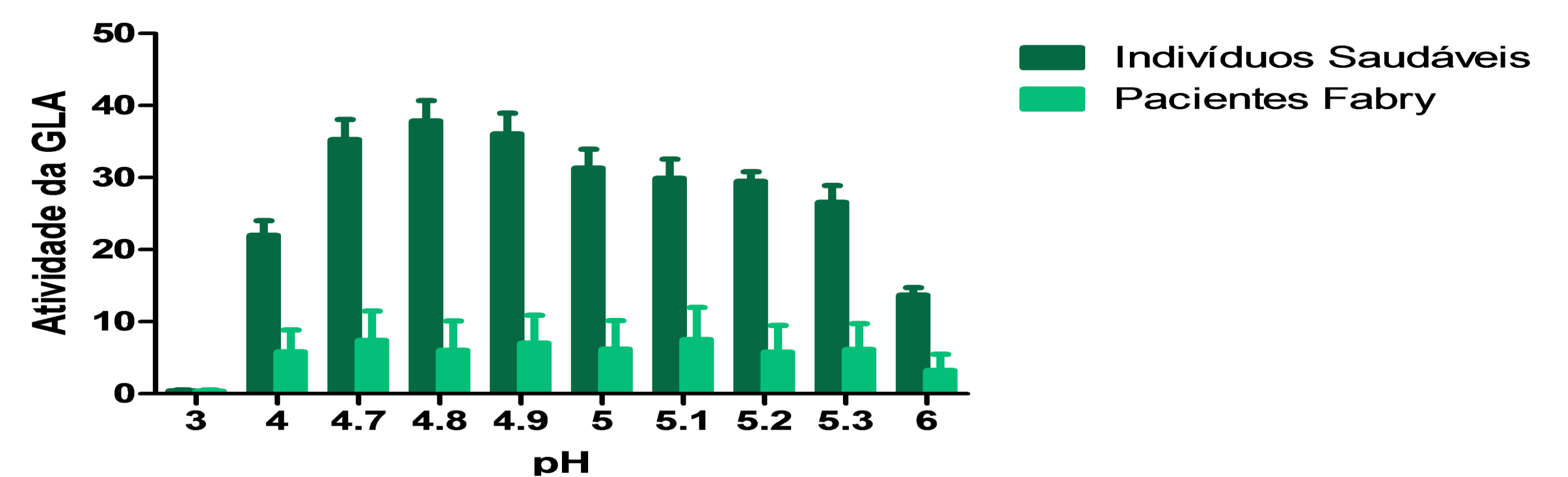


Figura 1. Determinação do pH ótimo para atividade da GLA em leucócitos de controles saudáveis (n=14) e pacientes com Doença de Fabry (n=5). Resultados expressos em média (nmol/h/mg de proteína)  $\pm$  erro padrão.

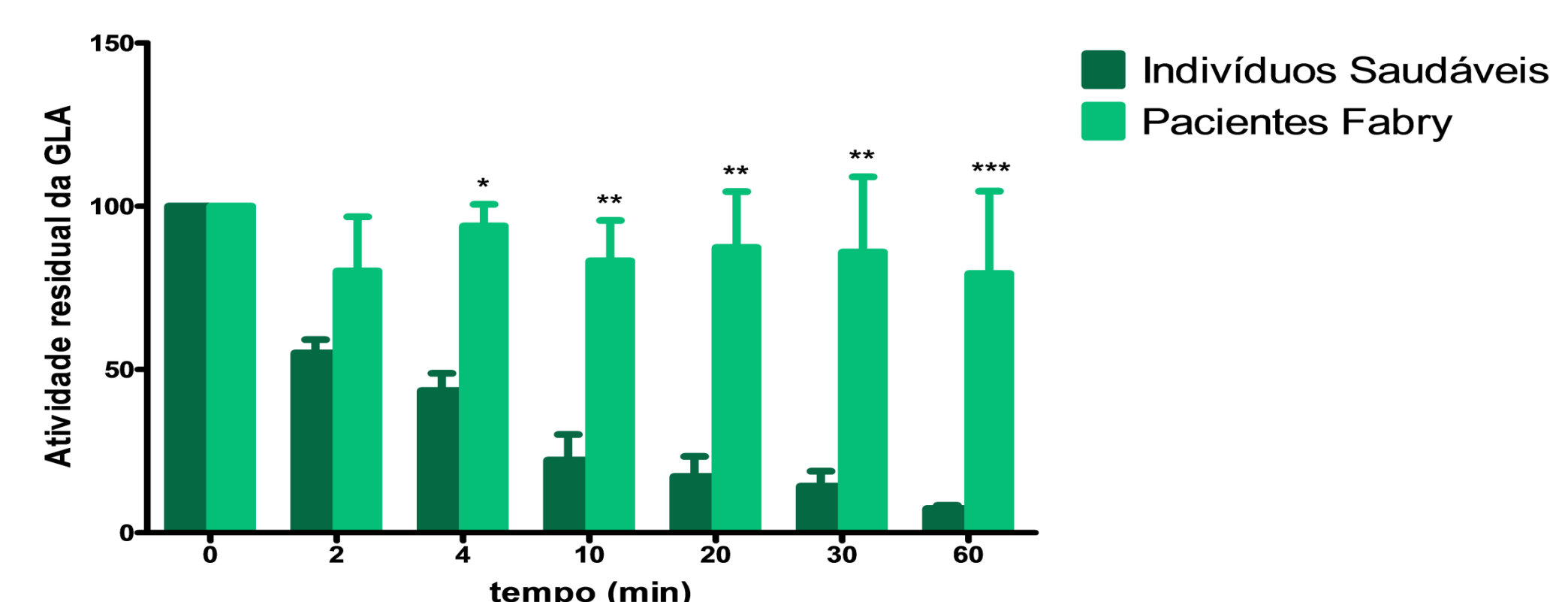


Figura 2. Perfil de inativação por calor da enzima alfa-galactosidase A em leucócitos de controles saudáveis (n=3) e pacientes com DF (n=3) após pré-incubação a 50°C até 60 minutos. Diferença significativa entre os grupos. Resultados expressos em porcentagem da atividade residual comparada com amostras não submetidas à pré-incubação (100% da atividade), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni.

### Conclusão

Os resultados da comparação das propriedades bioquímicas e cinéticas da GLA podem ser usados como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da DF, especialmente em casos de pacientes cuja atividade da GLA se encontra dentro dos limites considerados normais.