

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

**Detecção de Doença de Fabry em Amostras de
Sangue Impregnadas em Papel Filtro e sua
Possível Aplicação em Programas de Triagem**

MARILYN TSAO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil, 2007

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

**Detecção de Doença de Fabry em Amostras de
Sangue Impregnadas em Papel Filtro e sua
Possível aplicação em Programas de Triagem**

MARILYN TSAO

Orientador: Roberto Giugliani

Co-orientadora: Maira Burin

“A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre”

Porto Alegre, Brasil, 2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T877d

Tsao, Marilyn.

Detecção de doença de Fabry em amostras de sangue impregnadas em papel filtro e sua possível aplicação em programas de triagem / Marilyn Tsao – Porto Alegre, 2007.
43 f.: il.

Dissertação. (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Pediatria, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Co-orientadora: Dra. Maira Graeff Burin

1. Doença de Fabry. 2. Alfa-galactosidase A. 3. Doença lisossômica de depósito. 4. Triagem neonatal.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Dr. Roberto Giugliani, e a minha co-orientadora, Dra. Maira Graeff Burin, por sempre incentivarem e acreditarem na minha capacidade e no meu trabalho.

Agradeço meu marido, Alexandre, por todo apoio incondicional e muita paciência em todas as horas, pelo amor e carinho de sempre.

A minha grande família: mãe e pai, Marisa e Julia, Lisete e Adão, Andréa, Fernanda e Manish, Patrícia e Érika, e Bia por saber que posso contar com eles em todas as horas.

Meus grandes e melhores amigos, a Cúpula: Marícia, Martin, Ardala e Ricardo, não tenho palavras para expressar toda a amizade entre nós desde os tempos da faculdade.

Agradeço toda a equipe do Laboratório de Referência de Erros Inatos do Metabolismo: Janice, Kris, Fernanda, Juarez, Alessandro, Jurema, Marilda, Régis, Kátia e Bruna pelo apoio e incentivo.

Aos meus novos colegas do Centro de Ciências da Saúde de Uruguaiana UNIPAMPA/UFSM pela compreensão, apoio e incentivo para a finalização deste projeto.

E aos amigos do coração, que sem o apoio e incentivo, talvez eu não tivesse condições de ter terminado mais esta etapa: Cássia, Dani, Diógenes, Andressa, Fernanda, Samy, Bernardo, Rochas, Hugo, Fran, Vera, Patrícia, Claudia,...

Sumário

| | |
|--|----|
| Introdução..... | 1 |
| A Doença de Fabry..... | 1 |
| O diagnóstico..... | 7 |
| O tratamento de reposição enzimática..... | 9 |
| Justificativa..... | 10 |
| Objetivos..... | 10 |
| Materiais e Métodos..... | 11 |
| Grupos controles..... | 11 |
| Análise dos resultados..... | 11 |
| População-alvo para o cálculo da prevalência..... | 12 |
| Amostras de sangue impregnadas em papel filtro..... | 12 |
| Separação de plasma e leucócitos..... | 13 |
| Dosagem de proteína..... | 13 |
| Medida da atividade da α -galactosidase A em sangue impregnado em papel filtro..... | 14 |
| Medida da atividade da α -galactosidase A em plasma..... | 15 |
| Medida da atividade da α -galactosidase A em leucócitos..... | 15 |
| Procedimento..... | 16 |
| Resultados e Discussão..... | 18 |
| Acurácia..... | 20 |
| Sensibilidade e especificidade..... | 21 |
| Valores preditivos positivo e negativo..... | 21 |
| Prevalência..... | 22 |
| Conclusões..... | 25 |
| Referências Bibliográficas..... | 27 |

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------------------------|--|
| α-gal A | α -galactosidase A |
| ABS | Absorbância |
| ACD | Ácido Cítrico Dextrose |
| CTH | Trihexoside Ceramida |
| DF | Doença de Fabry |
| Gb-3 | Globotriaosilceramida |
| GLA | Gene da enzima α -galactosidase A |
| IC | Intervalo de Confiança |
| Kb | <i>Kilo base</i> - quilo base |
| SIPF | Sangue impregnado em papel filtro |
| TRE | Terapia de reposição enzimática |
| VPN | Valor Preditivo Negativo |
| VPP | Valor Preditivo Positivo |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Cromossomo X. Gene GLA localizado no cromossomo X, região Xq21.33-Xq22, codifica enzima α -galactosidase A | 02 |
| Figura 2: Globotriaosilceramida (Gb-3) (galactosil(α 1 \rightarrow 4)galactosil(β 1 \rightarrow 4)glucosil(β 1 \rightarrow 1')ceramida)..... | 03 |
| Figura 3: Angioqueratomas..... | 04 |
| Figura 4: Cornea verticillata..... | 05 |

Lista de tabela

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Resultados obtidos a partir da atividade enzimática da α -galactosidase A em sangue impregnado em papel filtro e plasma de 22 controles positivos e 124 controles negativos..... | 20 |
|---|----|

Lista de fluxogramas

Fluxograma 1: Procedimento para estabelecer os valores de referência das atividades enzimáticas de α -galactosidase A em sangue impregnado em papel filtro e plasma, bem como definir o ponto de corte para a coleta de amostras em sangue impregnado em papel filtro..16

Fluxograma 2: Procedimento de triagem em pacientes brasileiros em tratamento de hemodiálise para investigação da doença de Fabry.....17

Fluxograma 3: Resultados da prevalência seguindo o protocolo de triagem em pacientes brasileiros em tratamento de hemodiálise para investigação da doença de Fabry.....24

Lista de gráficos

Gráfico 1: Boxplot Papel Filtro. Comparação das atividades enzimáticas da α -galactosidase A em amostra de sangue impregnado em papel filtro de 22 controles positivos e 124 controles negativos.....18

Gráfico 2: Boxplot Plasma. Comparação das atividades enzimáticas da α -galactosidase A em amostra de plasma de 22 controles positivos e 124 controles negativos.....19

Resumo

A doença de Fabry é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da enzima α -galactosidase A. Esta proteína é codificada por um gene localizado na região Xq21.33-Xq22, sendo uma doença lisossômica de depósito ligada ao cromossomo X. É uma doença rara, com frequência estimada de 1 caso para 40.000 indivíduos masculinos. Os sinais clínicos são causados pelo acúmulo de glicosfingolípídeos, predominantemente globotriaosilceramida. O acúmulo de globotriaosilceramida leva a complicações vasculares e insuficiência renal, entre outros sinais e sintomas. Apesar de ser uma doença ligada ao X, a doença de Fabry pode afetar mulheres e apresenta uma grande variabilidade na expressão clínica, o que dificulta o diagnóstico da doença e causa uma subestimativa da sua prevalência.

Este estudo teve como objetivo principal avaliar a acurácia do ensaio enzimático da α -galactosidase A em amostras de sangue impregnado em papel filtro. Este método, que pode ser usado em triagens populacionais para a doença de Fabry, foi comparado com o método padrão de confirmação diagnóstica, a medida da atividade da α -galactosidase A em plasma. O objetivo secundário foi estimar através desse método a frequência da doença de Fabry em pacientes brasileiros, do sexo masculino, que estavam recebendo hemodiálise.

Para avaliar a acurácia do método, foram estudados 22 controles positivos e 124 controles negativos. Verificamos uma sensibilidade de 100%, especificidade de 90,3% (IC95%: 84,1 a 94,7%), valor preditivo positivo de 64,7% (IC95%: 48,6 a 80,2%) e valor preditivo negativo de 100%. No estudo de prevalência da doença de Fabry em pacientes em tratamento com hemodiálise, foram incluídos 1712 pacientes do sexo masculino, com confirmação do diagnóstico em três casos (frequência de 0,18% - IC95% 0,05 a 0,48% - quase 100 vezes superior a estimada na população em geral).

Concluimos que a medida da atividade da α -galactosidase A em amostra de sangue impregnado em papel filtro apresenta acurácia suficiente para ser utilizado na triagem de pacientes com suspeita de doença de Fabry, incluindo triagem de grupos de alto risco como é o caso dos pacientes em hemodiálise.

Abstract

Fabry disease is an inborn error of metabolism caused by the deficiency of α -galactosidase A. This protein is encoded by a gene mapped on the Xq21.33-Xq22 region, being an X-linked lysosomal storage disorder. It is a rare disease, with an estimated incidence of 1 case in each 40.000 males. Clinical features are caused by the accumulation of a glycosphingolipids, predominantly globotriaosylceramide. The accumulation of globotriaosylceramide leads to vascular complications and renal insufficiency, among other signs and symptoms. Despite being X-linked, Fabry disease can affect women, and has a great variability in clinical expression, which brings difficulty to the diagnosis and leads to underestimates of its prevalence.

This study had the main objective of establishing the accuracy of the assay of α -galactosidase A activity in dried blood filter paper samples. This method, which could be used in screening for Fabry disease, was compared to the standard diagnostic method, the assay of α -galactosidase A activity in plasma samples. The secondary objective was to estimate, with this method, the prevalence of Fabry disease in a sample of Brazilian males patients receiving hemodialysis.

To evaluate the accuracy of the method, it was studied 22 patients with Fabry disease and 124 controls without Fabry disease. On the accuracy studies we observed a sensitivity of 100%, specificity of 90.3% (CI95%: 84.1 to 94.7%), positive predictive value of 64.7% (CI95%: 48.6 to 80.2%) and negative predictive value of 100%. On the study of prevalence of Fabry disease in male patients in hemodialysis, we found three affected cases among 1712 patients investigated. The prevalence on this group of patients was estimated as 0.18% (CI95%: 0.05 a 0.48%) – almost 100 times the expected in the general population.

From these results, we conclude that the assay of α -galactosidase A activity in dried blood filter paper has enough accuracy to be used in the screening of Fabry disease, including the screening of high-risk groups patients as the ones on hemodialysis.

Introdução

A Doença de Fabry

A doença de Fabry é ligada ao cromossomo X e foi primeiramente descrita em 1897 por Willian Anderson, na Inglaterra, e Johannes Fabry, na Alemanha. Ambos os dermatologistas, independentemente, descreveram pacientes com *angiokeratoma corporis diffusium*, lesões de pele de cor vermelho-púrpura, que reconhecemos como característica desta doença (Fabry H, 2001).

O paciente de Anderson tinha 39 anos de idade quando foi visto pela primeira vez em dezembro de 1897 e apresentava proteinúria, deformidade nas extremidades, varicose e linfedema. Aos 11 anos, o paciente desenvolveu exantema dos joelhos até as coxas, tronco e extremidades, alcançando extensão máxima aos 17 anos.

Fabry viu seu primeiro paciente em abril de 1897. Na época o paciente tinha 13 anos de idade, mas 4 anos antes começou a desenvolver erupções cutâneas do joelho esquerdo que se espalhou para coxa e tronco. Fabry acompanhou este paciente por 30 anos, relatando a presença de albuminúria, lesões de pele, presença de dilatação de pequenas veias, e terminou classificando este caso como *angiokeratoma corporis diffusium* (Fabry H, 2001 e Desnick RJ, et al, 2001).

Muitos autores contribuíram para a descrição clínica da doença. Steiner e Voerner (1909), e Gunther (1913), citado por Desnick (2001), descreveram homens hemizigotos com anidrose e intermitente acroparestesia que era agravada pelo clima quente ou frio. Weicksel (1925), citado por Desnick (2001), descreveu a opacidade da córnea característica, e anormalidades vasculares na conjuntiva e retina (Desnick RJ, et al, 2001).

Em 1947, Pompen e colaboradores, citado por Desnick (2001) foram os primeiros a relatarem achados da autópsia de dois irmãos que morreram por insuficiência renal. A observação mais significativa foi a presença de vacúolos anormais em vasos sanguíneos. Com base nesses achados, foi sugerido que esta doença se tratava de uma doença de depósito. Mais tarde, Scriba (1950), citado por Desnick (2001) estabeleceu a natureza lipídica do depósito.

Embora existisse a suspeita de que esta doença fosse hereditária, somente em 1965 Opitz et al., citado por Desnick (2001), documentaram a herança ligada ao cromossomo X, pela análise do heredograma (Desnick RJ, et al, 2001).

A doença de Fabry (DF) é um erro inato do metabolismo dos glicoesfingolipídeos. Esta doença é resultado da deficiência na hidrolase lisossomal α -galactosidase A (α -gal A) (Pastores, GM, Lien, YH, 2002). É uma doença lisossômica de depósito com envolvimento multissistêmico devido ao acúmulo de glicoesfingolipídeos neutros.

O defeito enzimático é transmitido por um gene ligado ao cromossomo X. O gene GLA, localizado na região Xq21.33-Xq22, possui aproximadamente 13kb e 7 exons, e foi completamente sequenciado (Kornreich R, et al, 1989).

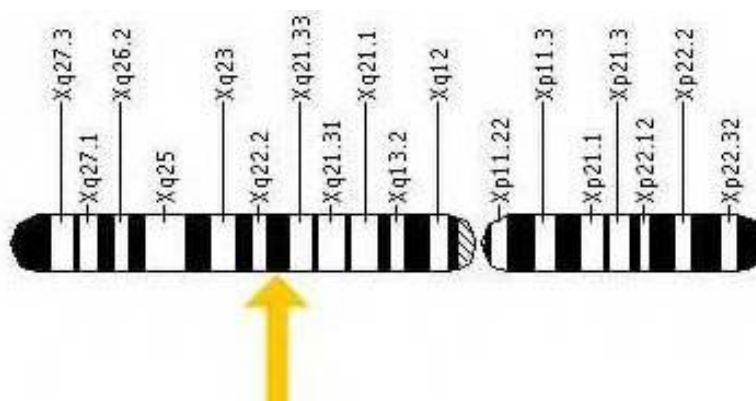


Figura 1: Cromossomo X. Gene GLA localizado no cromossomo X, região Xq21.33-Xq22, codifica enzima α -galactosidase A.

Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=glA>

Os homens hemizigotos para a mutação no gene GLA apresentam a doença, já as mulheres heterozigotas para a mutação no mesmo gene podem apresentar sinais moderados ou até graves. Esta diferença na manifestação clínica pode ser explicada pela Hipótese de Lyon.

A Hipótese de Lyon explica que ocorre a inativação aleatória de um dos cromossomos X no início da embriogênese. Esta inativação é permanente para todas as células somáticas descendentes das mulheres. Isso garante que homens e mulheres tenham apenas um cromossomo X ativo para haver a compensação de dose, ou seja, haverá sempre apenas um

produto de cada gene, tanto nos homens como nas mulheres (Borges-Osório MR, Robinson WM, 2001).

Os glicosíngolípídeos são componentes da membrana plasmática que são degradados no lisossomo (Perrot A, et al, 2002). O glicosíngolípídeo acumulado mais comum nos lisossomos de tecidos viscerais e no fluido corpóreo é a globotriaosilceramida (Gb-3), ou trihexosídeo ceramida (CTH) (Desnick RJ, et al, 2001) (Figura 2). O catabolismo destes compostos requer várias enzimas de hidrólise, incluindo a α -gal A. A deficiência desta hidrolase leva ao acúmulo do substrato globotriaosilceramida nas células. Os depósitos são armazenados em corpos de várias vesículas ou em massas intracitoplasmáticas resultando na disfunção celular ou degeneração (Perrot A, et al, 2002).

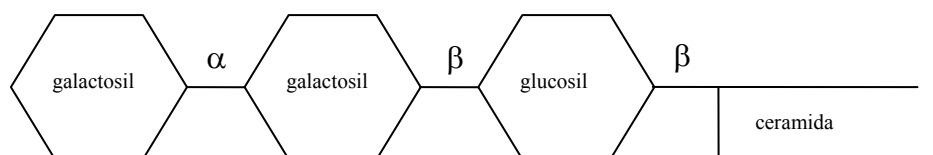


Figura 2: Globotriaosilceramida (Gb-3).

(galactosil(α 1→4)galactosil(β 1→4)glucosil(β 1→1')ceramida)

Na doença de Fabry o acúmulo progressivo nos lisossomos do endotélio vascular leva a exacerbação da manifestação clínica podendo resultar em isquemia e infarto. O acúmulo de glicosíngolípídeo atinge células periteliais e músculo liso do sistema cardiovascular e renal (Desnick RJ, et al, 2001). As cardiopatias e a insuficiência renal são predominantemente responsáveis pela mortalidade em pacientes com a doença de Fabry (Perrot A, et al, 2002).

O acúmulo progressivo do glicosíngolípídeo no endotélio vascular leva às principais manifestações clínicas nos hemizigotos masculinos. Os primeiros sinais clínicos, usualmente aparecem na infância ou na adolescência, caracterizando a doença de Fabry como uma afecção de interesse para o pediatra. As manifestações precoces incluem dor nas extremidades (acroparestesias), aparecimento de lesões cutâneas (angioqueratomas) e hipoidrose. Em alguns casos os sinais e sintomas podem ser mais tardios, aparecendo somente após a segunda ou terceira década de vida (Desnick RJ, et al, 2001).

O sintoma mais debilitante da doença de Fabry é a dor. Ocorrem episódios de crises de dor crônica ou desconforto constante. As crises de dor ocorrem geralmente na infância ou no início da adolescência e é um sinal clínico precoce da doença (Desnick RJ, et al, 2001). O padrão típico é a acroparestesia ou sensação de queimação nas palmas das mãos e plantas dos pés (Masson C, et al, 2004), podendo irradiar para zonas mais próximas e demais zonas do corpo, podendo durar desde alguns minutos até vários dias. As dores podem ser facilmente confundidas com reumatismo, e devido à irradiação para os músculos do abdômen, a dor aguda pode ser confundida ainda com apendicite ou cólicas renais (Desnick RJ, et al, 2001).

Os pacientes com a doença de Fabry podem apresentar lesões de pele. Quando a lesão das células do endotélio vascular da pele é extensa, observa-se o surgimento de angioqueratomas (figura 3). Os angioqueratomas, característicos da manifestação cutânea da doença de Fabry, geralmente tornam-se evidentes entre as idades de 5 e 10 anos (Möhrenschlager M, et al, 2004). Estas alterações de pele ocorrem devido ao acúmulo de glicosfingolípídeos não degradados, especialmente no epitélio vascular, e são pequenas manchas vermelhas escuras, com relevo que não perdem a cor quando pressionadas. As lesões ocorrem especialmente entre o umbigo e os joelhos, e apresentam uma tendência a simetria bilateral (Desnick RJ, et al, 2001). A presença de angioqueratoma é altamente sugestiva para doença de Fabry, porém não é específica, já que podem ocorrer em outras doenças de depósito, e a sua ausência não descarta o diagnóstico para a doença de Fabry (Masson C, et al, 2004). O acúmulo progressivo de lipídeos nos vasos sanguíneos da pele resulta num aumento progressivo do número de lesões com a idade.



Figura 3: Angioqueratomas.

Fonte: Genzyme – www.genzyme.com.br

Outros sinais clínicos incluem a hipoidrose ou anidrose (Masson C, et al, 2004), é a perspiração anormalmente diminuída ou ausente. A hipoidrose ocorre devido ao depósito de Gb-3 nas glândulas sudoríparas, causa febres freqüentes, superaquecimento do corpo em função de exercícios físicos e observa-se intolerância ao calor.

Mudanças oculares geralmente surgem na segunda década de vida (Nguyen TT, et al, 2005). As anormalidades oculares aparecem em praticamente todos os pacientes com a doença de Fabry. O envolvimento ocular é acentuado na córnea, cristalino, conjuntiva e retina (Desnick RJ, et al, 2001). Depósitos na córnea com arranjo radial são visíveis pelo exame com lâmpada de fenda. Este padrão de depósito é conhecido como cornea verticillata (Figura 4) e não leva a perda de visão (Pastores, GM, Lien, YH, 2002).



Figura 4: Cornea verticillata.

Fonte: <http://dro.hs.columbia.edu/vortexk2.htm>

O envolvimento cardíaco é freqüente na doença de Fabry (Perrot A, et al, 2002). Há deposição progressiva de glicosfingolípídeos nas células do miocárdio, nas válvulas e nos vasos coronários, sendo principal causa de doenças cardíacas como bloqueio átrio-ventricular completo, insuficiência mitral, hipertrofia do ventrículo esquerdo e isquemia do miocárdio. Os pacientes ainda podem apresentar aumento da susceptibilidade de infarto do coração, irregularidades do batimento cardíaco e taquicardia supraventricular. Verifica-se a deposição do glicosfingolípídeo primeiramente no miocárdio (Desnick RJ, et al, 2001). A presença de hipertrofia ventricular esquerda e mudanças valvulares estão relacionadas com a gravidade da doença. Alterações da válvula mitral, protrusão dos folhetos das válvulas ou prolapso são mais observadas em pacientes jovens, enquanto anormalidades adicionais da aorta aparecem posteriormente (Perrot A, et al, 2002).

No envolvimento do sistema nervoso central (SNC) destaca-se o acidente vascular cerebral precoce (Fellgiebel A, et al, 2006). Outras manifestações cerebrovasculares que resultam do envolvimento de pequenos vasos podem levar a trombose, ataques de isquemia, aneurisma, ataques de epilepsia e afasia. Os sintomas mais freqüentes são paralisia da metade do corpo, tontura e vertigem, visão dupla de objetos, disartria, nistagmo, náusea e vômito, dor de cabeça, ataxia (Desnick RJ, et al, 2001). Alterações no sistema nervoso central ocorrem entre os 40 e 50 anos de idade em alguns pacientes.

As manifestações renais resultam do acúmulo progressivo de Gb-3 nos podócitos, endotélio glomerular, epitélio da alça de Henle e do túbulo distal, endotélio arterial, células do músculo liso e células intersticiais. O depósito no endotélio vascular renal é progressivo e associado com fibrose intersticial e glomeruloesclerose (Kotanko P, et al, 2004). Os sinais clínicos mais comuns que encontramos são proteinúria, alterações na função tubular renal, poliúria, microhematúria e lipidúria. Essas lesões podem ser de leve, com proteinúria discreta, ou grave, com perda progressiva da função renal, evoluindo para insuficiência renal crônica em muitos pacientes.

Muitos pacientes com doença renal terminal em programas de hemodiálise não têm o diagnóstico da doença de Fabry reconhecido, sendo, na maioria das vezes, erroneamente considerados como pacientes com insuficiência renal, sem diagnóstico definido (Spada M, Pagliardini S, 2002).

A doença de Fabry é rara e a incidência estimada é cerca de 1 caso para 40.000 indivíduos masculinos (Desnick RJ, et al, 2001). Porém, por apresentar uma variabilidade da expressão clínica, os sinais e sintomas clínicos não são sempre reconhecidos como doença de Fabry, o que pode resultar na subestimação da prevalência desta doença (Linthorst GE, et al, 2003). É uma doença pan-étnica sendo que pacientes representantes de diferentes grupos étnicos incluindo caucasianos, africanos, hispânicos, índios americanos e asiáticos já foram observados (Desnick RJ, et al, 2001).

O diagnóstico da doença de Fabry é importante não só para o paciente, mas também para o tratamento e aconselhamento genético de seus familiares. Uma variante renal da doença foi identificada em 1,2% de pacientes japoneses do sexo masculino com insuficiência renal crônica em hemodiálise, que não haviam sido previamente diagnosticados com a doença de Fabry (Nakao S, et al, 2003). Um estudo na Áustria, envolvendo nove províncias revelou que a prevalência da doença de Fabry entre pacientes em tratamento de hemodiálise foi de 0,161% (Kotanko P, et al, 2004). Na Itália, outro estudo obteve a prevalência de 0,22% entre pacientes que recebem hemodiálise para a doença de Fabry (Spada M, Pagliardini S, 2002).

Os resultados acima são de pacientes que não tiveram o diagnóstico prévio da doença de Fabry. Isso mostra a importância de programas de triagem populacional para o diagnóstico dessa doença, mesmo que tardio, em pacientes que apresentem sinais cardíacos, renais ou alterações do SNC. Alguns autores sugerem que programas de triagem neonatal, também são de grande valia, para que a doença de Fabry seja detectada antes da presença de sinais e sintomas (Spada M, et al, 2006), uma vez que esta doença já possui tratamento através de terapia de reposição enzimática.

O diagnóstico

O diagnóstico clínico da doença de Fabry é dificultado devido ao envolvimento de vários órgãos e devido à natureza não específica dos sintomas. Portanto, é de fundamental importância a cooperação de especialistas de diversas áreas para que o diagnóstico seja obtido.

A doença de Fabry pode ser diagnosticada pela observação da baixa atividade da α -gal A em plasma e/ou leucócitos, ou pela identificação da mutação no gene GAL (Linthorst GE, et al, 2005).

O procedimento bioquímico para a confirmação do diagnóstico clínico da doença de Fabry pode ser a medida da atividade enzimática para α -gal A em plasma (Poepl AG, et al,

2005), soro, leucócitos, lágrimas, biópsia de tecidos, ou cultura em fibroblastos ou linfoblastos (Desnick RJ, et al, 2001).

Pacientes com a doença de Fabry geralmente apresentam atividade não detectável, ou atividade residual de 5 a 35% da atividade da enzima quando realizados com substrato sintético 4-methylumbelliferyl- α -D-galactopyranoside. O N-acetyl-D-galactosamine é usado como inibidor da atividade da α -N-acetilgalactosaminidase, ou α -galactosidase B, por técnica espectrofluorométrica (Desnick RJ, et al, 2001), pois esta é a enzima envolvida na doença de Schindler, o que poderia mascarar um resultado positivo.

Mulheres heterozigotas podem ser identificadas por apresentarem valores intermediários da atividade enzimática da α -gal A, porém, esta atividade pode variar desde zero até a normalidade em função da lionização do cromossomo X. A investigação bioquímica não é suficiente para estabelecer o diagnóstico final da doença de Fabry em mulheres heterozigotas, sendo necessária a análise molecular para a confirmação. A detecção de mulheres portadoras pode ser identificada, com confiança, por meio de análise de mutação no DNA (Linthorst GE, et al, 2003).

A análise molecular pode ser realizada através do uso de endonucleases de restrição ou seqüenciamento direto dos exons desse gene, o que permite o diagnóstico preciso de heterozigotas nas famílias com alterações específicas (Desnick RJ, et al, 2001). A análise molecular permite identificar a mutação específica de cada família com a doença de Fabry, contribuindo para o exato diagnóstico de outros membros, desde portadoras até afetados. Até o momento, foram identificadas mais 400 mutações no gene da α -gal A (GLA), sendo que 57% são mutações sem sentido e não há uma que seja predominante (Perrot A, et al, 2002). A maioria das mutações são privadas, ou seja, ocorrendo em uma ou poucas famílias (Ishii, S, et al, 2007). A doença de Fabry tem uma grande heterogeneidade molecular, porém os dinucleotídeos CpG constituem *hot spots* para mutações no gene GLA (Ashton-Prolla, P, et al, 2000). A identificação das mutações é realizada por técnicas de seqüenciamento, endonucleases de restrição para mutações-específicas, ou ainda, oligonucleotídeos investigando o gene seqüenciado. As análises moleculares demonstraram uma grande variedade nas alterações moleculares que podem causar a doença de Fabry; aproximadamente 57% são mutações missense nos alelos, 11% mutações nonsense, 18% deleção parcial do gene, 6% inserções e outros 6% de defeitos no RNA devido a erros de splicing (Pastores GM, Lien YH, 2002).

Pacientes com doença de Fabry possuem grandes quantidades acumuladas de Gb-3 no organismo. O método da cromatografia em camada delgada tem como objetivo auxiliar o diagnóstico, além de acompanhar o tratamento de TRE. As vantagens deste método é que utiliza amostra de urina, sendo assim uma forma de detecção não invasiva, e por ser uma análise qualitativa é mais barata. Este teste pode servir como triagem para a detecção de pacientes com a doença de Fabry. No acompanhamento do tratamento de TRE pode observar-se a diminuição do Gb-3 do organismo, assim demonstrar a eliminação de Gb-3 durante o tratamento (Folch J, et al, 1956).

Existe ainda um método que faz uso de amostras de sangue impregnadas em papel filtro (SIPF), que tem sido aplicado em triagens populacionais. Esta técnica é mais fácil, rápida e barata comparando-se ao ensaio em plasma e/ou leucócitos (Chamoles NA, Blanco M, 2001).

O tratamento de reposição enzimática

O tratamento para a doença de Fabry é possível atualmente através da terapia de reposição enzimática (TRE). Com o diagnóstico definido, o tratamento com enzima recombinante pode melhorar a qualidade de vida destes indivíduos. Embora a doença seja ligada ao X, muitas mulheres heterozigotas apresentam sintomas clínicos da doença e também podem se beneficiar do tratamento.

Existem duas enzimas disponíveis, algasidase- α (Replagal®, Transkaryotic Therapies Inc., Cambridge, USA), produzida pela engenharia genética a partir de linhagens de células humanas, e algasidase- β (Fabrazyme®, Genzyme Inc., Cambridge, USA), que é produzida a partir de linhagem de células de ovário de hamster chinês. Estudos com a TRE de ambas as enzimas demonstraram que nas fases I, II e III os compostos são eficazes no catabolismo dos depósitos de lipídeos, aliviam a dor, são bem toleráveis e melhoram a qualidade de vida dos pacientes com a doença de Fabry (Pastores GM, Lien YH, 2002 e Perrot A, et al, 2002).

A European Agency for Evaluation of Medical Products (EMA) aprovou o tratamento com Fabrazyme® e Replagal® em agosto de 2001. Em abril de 2003, a US Food and Drug Administration (FDA) aprovou somente Fabrazyme (Desnick RJ, 2004).

A estratégia de tratamento consiste em iniciar a TRE o mais cedo possível o que previne o desenvolvimento de complicações renais, cardíacas e neurológicas. Em pacientes com a doença de Fabry, que tem diagnóstico tardio, o tratamento é usado para diminuir o acúmulo de glicosíngolipídeos no rim, coração e sistema nervoso (Pastores GM, Lien YH,

2002). A intervenção precoce do tratamento de reposição enzimática pode ser mais benéfica do que a intervenção tardia, pois o acúmulo de substratos pode causar danos irreversíveis aos órgãos (Banikazemi M, et al, 2007).

Justificativa

A disponibilidade de um tratamento específico, somada à possibilidade de investigação familiar e aconselhamento genético, especialmente por se tratar de doença ligada ao cromossomo X, torna esta condição uma forte candidata a programas de triagem pelo menos em grupos de maior risco. Um requisito importante para a triagem mais ampla é a disponibilidade de amostras que possam ser facilmente coletadas, transportadas e analisadas. Como a doença não tem marcadores clínicos específicos, muitas vezes progride silenciosamente e quase sempre leva à insuficiência renal. Um grupo que se mostra um alvo muito importante para este tipo de triagem são os pacientes que realizam hemodiálise, que em grande parte não possuem um diagnóstico etiológico definido.

Um estudo neste grupo de pacientes poderia ser um piloto para triagens populacionais mais amplas, com o emprego de amostras de SIPF, o que permitiria inclusive sua incorporação futura em programas de triagem neonatal.

Tendo em vista que o tratamento de TRE está aprovado e vem sendo utilizado amplamente nesta doença, a identificação mais precoce de pacientes pode ter benefícios diretos para os afetados e para os familiares.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a acurácia da medida da atividade da α -gal A em SIPF, para ser potencialmente aplicada em programas de triagem para a doença de Fabry. Os resultados foram comparados com o procedimento usual para o diagnóstico da doença, que é a medida da atividade enzimática da α -gal A em amostras de plasma.

O objetivo secundário do trabalho foi estimar, com o emprego desse método, a frequência da doença de Fabry em pacientes brasileiros que estavam recebendo tratamento de hemodiálise e que não tinham diagnóstico etiológico definido.

Materiais e Métodos

Grupos controle

No grupo controle positivo foram incluídos 22 pacientes com diagnóstico previamente confirmado da doença de Fabry, nos quais realizou-se a medida da atividade da α -gal A em SIPF e plasma.

No grupo controle negativo foram incluídos 124 indivíduos sem a doença de Fabry e que estavam recebendo hemodiálise. Após verificar, por observações pessoais anteriores no Laboratório de Referência de Erros Inatos do Metabolismo, que a atividade da enzima é menor nesses pacientes. Assim decidiu-se estabelecer os valores de referência da medida da atividade da α -gal A em SIPF e plasma neste grupo.

Os valores de referência foram estabelecidos a partir da medida da atividade da α -gal A em SIPF e plasma dos controles negativos. A partir dos valores de referência foi estabelecido o ponto de corte, abaixo do qual seria realizada a coleta (SIPF e plasma).

Análise dos resultados

Para avaliar a acurácia da medida da atividade da α -gal A em SIPF foram aplicados cálculos estatísticos para obter resultados de sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, comparando os dois grupos controles (positivo e negativo).

População-alvo para o cálculo da prevalência

Foram analisadas 1712 amostras de SIPF de pacientes brasileiros em tratamento de hemodiálise, sem diagnóstico definido, do sexo masculino, entre 15 e 60 anos. Participaram do estudo três estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Paraná e Rio de Janeiro.

Dos pacientes que tiveram atividade abaixo do ponto de corte foram solicitadas novas amostras de SIPF. Quando a baixa atividade era confirmada, requisitou-se 10 mL de sangue heparinizado para nova confirmação em plasma e leucócitos.

Todos os pacientes participantes deste estudo estavam de acordo quanto aos propósitos do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA) sob número 05-215.

Amostras de sangue impregnadas em papel filtro

As amostras de sangue dos controles negativos e da população-alvo em tratamento de hemodiálise foram coletadas durante a sessão de hemodiálise, entre os primeiros 30 minutos e 1 hora, por se mostrar o momento mais adequado tanto para o paciente como para a equipe do projeto. Do grupo controle negativo foram coletados 5 mL de sangue e, primeiramente, foram aplicadas algumas gotas de sangue no papel filtro e deixou-se secar por 3 a 4 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram armazenadas em saco plástico e em temperatura de 4°C, em geladeira. No restante do sangue, foi adicionado anticoagulante heparina para a separação do plasma. Da população-alvo foram coletadas algumas gotas de sangue e aplicadas no papel filtro. Foi usado o mesmo procedimento para secagem e armazenamento das amostras do grupo controle.

Foram coletados 5 mL de sangue dos controles positivos (pacientes com o diagnóstico da doença de Fabry). As amostras de SIPF e plasma seguiram o mesmo protocolo dos controles negativos.

Separação de plasma e leucócitos

Para a separação de plasma, o sangue heparinizado foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. Separou-se o plasma em tubo tipo eppendorf e armazenou-se em freezer a -20°C .

Para a separação de leucócitos, foram solicitadas amostras de 10 mL de sangue total heparinizado. Adicionou-se o mesmo volume da mistura com ácido cítrico dextrose (ACD), dextran 6% e glicose 5% ao sangue e deixou-se em repouso por, no máximo, 2 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, foi transferido o sobrenadante para um tubo cônico plástico e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos à 4°C . Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o restante é o sedimento de leucócitos.

Foi iniciada a lavagem do sedimento de leucócitos adicionando cloreto de sódio 0,9%, os leucócitos foram ressuspensos sob agitação. Foi adicionada água destilada gelada com auxílio do agitador de tubos e deixou-se em repouso por 90 segundos no gelo. Em seguida, adicionou-se cloreto de sódio 3,6%, e após agitação centrifuga-se a 3.000 rpm por 3 minutos a temperatura de 4°C .

Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e caso o sedimento de leucócitos contivesse muitos eritrócitos, repetiu-se a operação de lavagem. Após esse procedimento, o sedimento de leucócitos foi armazenado à -20°C , até o momento da análise.

Dosagem de proteína

No momento do ensaio enzimático foi adicionada água destilada ao sedimento de leucócitos e mantiveram-se as amostras sempre em gelo. Em seguida, foi utilizado o desintegrador ultrassônico, com uma potência de 7,5 a 10%, o que equivale a aproximadamente 45 Watts, em 2 ciclos de 25 segundos com intervalo de 30 segundos em gelo. Esse procedimento foi utilizado para romper a membrana dos lisossomos.

Para a dosagem de proteína descrita por Lowry OH, et al (1951), foi utilizado uma curva de albumina de soro bovino com concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 μg proteína / 100 μL . Para as amostras, foram utilizados 20 μL da solução de leucócitos e adicionada água destilada para completar o volume de 500 μL . Em todos os tubos, foi adicionado o Reativo

Alcalino de Cobre, composto de carbonato de sódio 2% com hidróxido de sódio 0,1 M, sulfato de cobre 5.H₂O 1% e tartarato de sódio e potássio 2%, sob movimentação do agitador de tubos. Deixou-se em repouso por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado Folin Ciocalteau e deixado em repouso por 30 minutos. A unidade de concentração de proteína utilizada foi de μg proteína / 100 μL . A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 750 nm.

Medida da atividade da α -galactosidase A em sangue impregnado em papel filtro

Para a medida da atividade da α -gal A em SIPF utilizou-se método espectrofluorométrico descrito por Chamoles NA, et al (2001). Colocou-se um picote com 3 mm de diâmetro (5,5 μL de sangue) em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e adicionou-se 20 μL do inibidor N-acetil-D-galactosamina 0,25 M, para inibir a atividade cruzada da enzima α -galactosidase B, e 100 μL do substrato 4-metilumbeliferil- α -D-galactosideo 5 mM diluído em tampão citrato fosfato 0,15 M pH 4,4. No tubo branco, colocou-se um picote de papel filtro com 3 mm de diâmetro sem sangue, procedeu-se como descrito acima e foi adicionado 600 μL de etilenodiamina 0,1 M pH 11,4. Incubou-se por 20 horas à 37°C num banho de água com agitação. Para parar a reação utilizou-se 600 μL de etilenodiamina 0,1 M pH 11,4 em todos os tubos, exceto no branco. Em seguida, centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos, a 3.000 rpm.

A leitura da fluorescência foi realizada em aparelho de espectrofluorômetro, excitação 365nm – emissão 450nm. Utilizou-se uma curva padrão de 4-metilumbeliferil com concentrações de 2,5 a 15 μM , adicionou-se 540 μL de etilenodiamina 0,1 M pH 11,4 a cada ponto da curva padrão. A unidade utilizada para expressar a atividade enzimática foi de nmol/h/mL.

Medida da atividade da α -galactosidase A em plasma

Para o ensaio enzimático da α -gal A em amostra de plasma, utilizou-se o método espectrofluorométrico descrito por Morgan SH, et al (1990).

Foi utilizado uma mistura de substrato 4-metilumbeliferil- α -D-galactosideo 10 mM com inibidor N-acetil-D-galactosamina 2 M em tampão acetato de sódio 0,5 M pH 4,8. Foi incubado um tubo teste com 100 μ L de plasma e um tubo branco sem amostra. Foi adicionado 100 μ L da mistura de substrato/inibidor em todos os tubos e incubou-se por 2 horas a 30°C. Parou-se a reação com tampão glicina 1 M pH 10,4 e adicionou-se 100 μ L de plasma no tubo branco. Foi utilizado o mesmo padrão de 4-metilumbeliferona descrito acima, adicionando-se aos 200 μ L da curva padrão, 100 μ L de plasma. Como branco do padrão foi utilizado 200 μ L de água, e em ambos os tubos 900 μ L de tampão glicina.

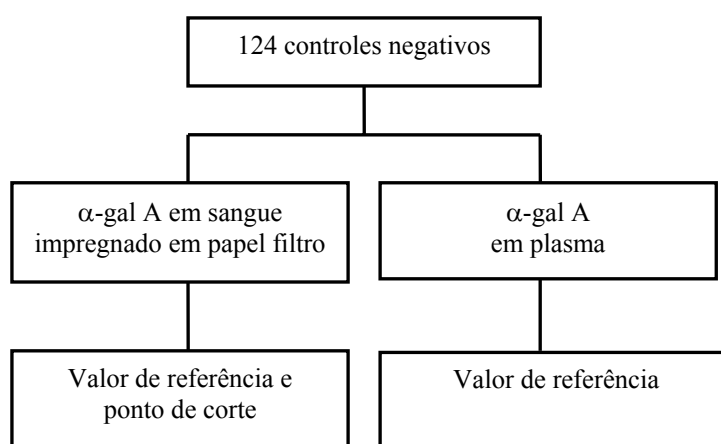
A leitura da fluorescência foi realizada em aparelho de espectrofluorômetro, excitação 365nm – emissão 450nm. A unidade utilizada para expressar a atividade enzimática foi nmol/h/mL.

Medida da atividade da α -galactosidase A em leucócitos

Para o ensaio enzimático da α -gal A em leucócitos, utilizou-se uma técnica espectrofluorométrica descrita por Skoog WA e Beck WS (1953) e Desnick RJ, et al (1973). Utilizou-se para o ensaio, 20 μ L de leucócitos da amostra e os brancos, 20 μ L de água destilada. Em seguida foi adicionado 120 μ L de substrato 4-metilumbeliferil- α -D-galactosideo 5 mM diluído em tampão citrato fosfato 50 mM pH 4,8. Incubou-se por 2 horas a 37°C. Após o período de incubação adicionou-se 1,5 mL de tampão glicina 0,5 M pH 10,3. A unidade utilizada para expressar a atividade enzimática foi de nmol/h/mL.

Procedimento

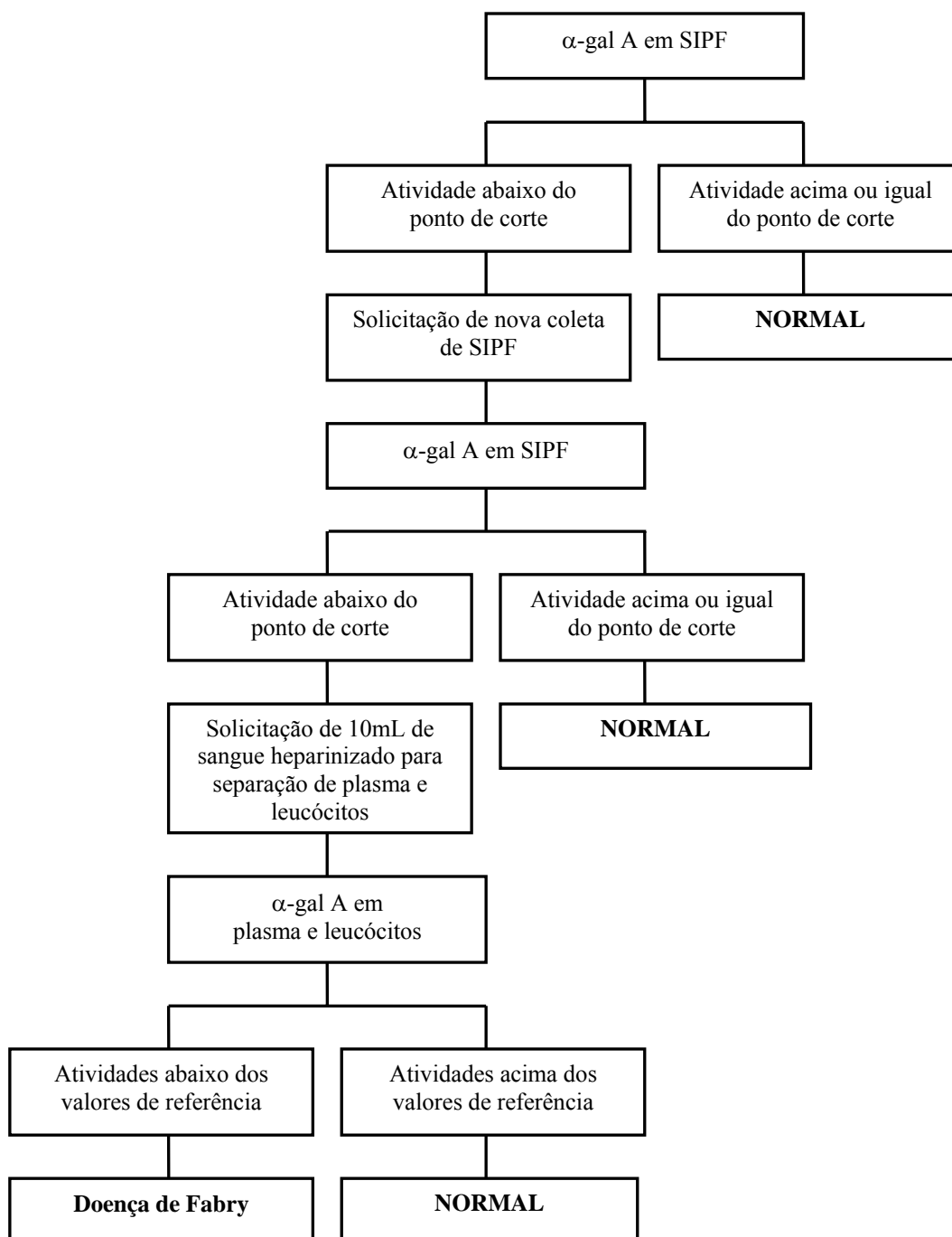
Nos 22 controles positivos e nos 124 controles negativos foram realizadas as medidas das atividades da α -gal A em SIPF e plasma. Com os resultados foram obtidos os valores de referência e estabeleceu-se o ponto de corte para as recoletas (Fluxograma 1).



Fluxograma 1: Procedimento para estabelecer os valores de referência das atividades enzimáticas de α -galactosidase A em sangue impregnado em papel filtro e plasma, bem como definir o ponto de corte para a recoleta de amostras em sangue impregnado em papel filtro.

Na população-alvo, os 1712 pacientes brasileiros em tratamento de hemodiálise, foi realizada a medida da atividade da α -gal A em SIPF. Para aqueles pacientes que apresentaram atividade abaixo do ponto de corte foi solicitada nova coleta de amostra de SIPF.

Caso o resultado se repetisse nesse novo material, foi requisitado 10 mL de sangue heparinizado para dosagens de α -gal A em plasma e leucócitos para a confirmação, ou não, do diagnóstico da doença de Fabry (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Protocolo de triagem em pacientes brasileiros em tratamento de hemodiálise para investigação da doença de Fabry.

Resultados e Discussão

Primeiramente, foi feito um gráfico boxplot comparando os controles positivos e negativos, utilizando-se o programa SPSS versão 14. Os resultados da atividade enzimática da α -gal A em SIPF de 22 controles positivos possuem uma mediana de 0,48 nmoles/h/mL. Os resultados da atividade enzimática da α -gal A em SIPF de 124 controles negativos indicou uma mediana de 2,6 nmoles/h/mL (Gráfico 1).

Com os resultados obtidos no grupo controle negativo, foi determinado o ponto de corte a partir da curva ROC, pelo programa SPSS versão 14, em 1,5 nmol/h/mL para a atividade enzimática de α -gal A em SIPF. O intervalo de referência foi estabelecido como sendo de 2,0 a 14 nmol/h/mL.

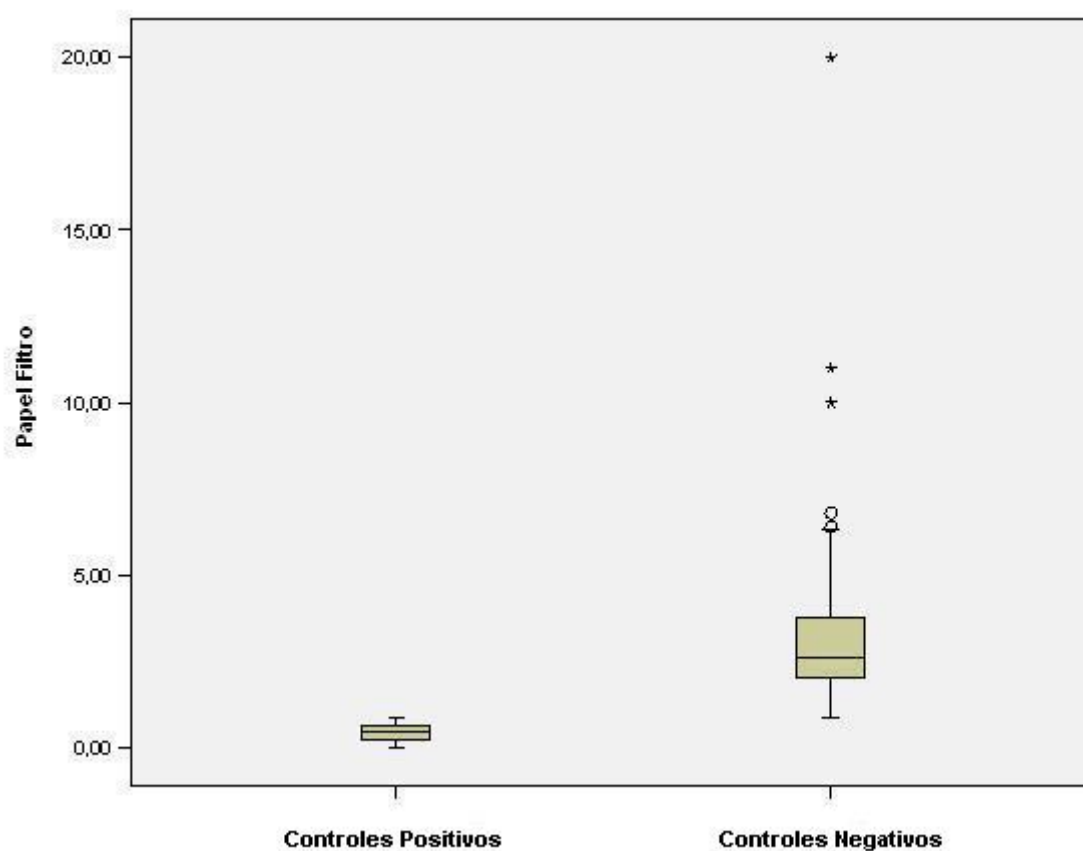


Gráfico 1: Boxplot Papel Filtro. Comparação das atividades enzimáticas da α -galactosidase A em amostra de sangue impregnado em papel filtro de 22 controles positivos e 124 controles negativos.

Os resultados da atividade da enzima da α -gal A em plasma de 22 controles positivos indicaram uma mediana de 0,056 nmol/h/mL. Os resultados da atividade enzimática da α -gal A em plasma de 124 controles negativos indicaram uma mediana de 6,1 nmoles/h/mL (Gráfico 2). O intervalo de referência foi estabelecido de 3,3 a 22 nmoles/h/mL.

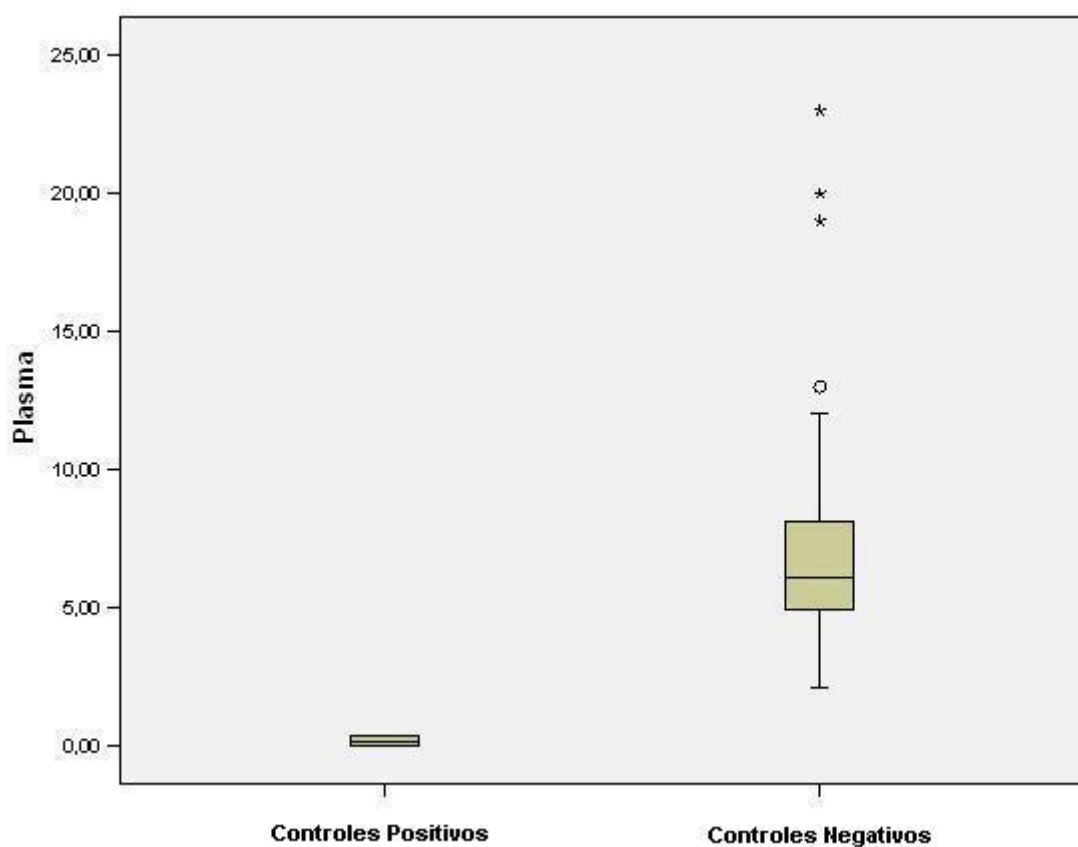


Gráfico 2: Boxplot Plasma. Comparação das atividades enzimáticas da α -galactosidase A em amostra de plasma de 22 controles positivos e 124 controles negativos.

Acurácia

Para obtenção dos resultados referentes a avaliação da acurácia da medida da atividade da α -gal A em SIPF para triagem para doença de Fabry, foram utilizados os dados a partir das atividades enzimáticas de α -gal A em SIPF e plasma dos 22 controles positivos e dos 124 controles negativos.

Para avaliar a acurácia da atividade enzimática da α -gal A em SIPF, para triagem de pacientes com a doença de Fabry, comparou-se este método com o procedimento usual para o diagnóstico da doença (medida da atividade de α -gal A em amostra de plasma). Os resultados foram analisados quanto à sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Dos 124 controles negativos, 12 indivíduos e todos os 22 controles positivos, apresentaram atividade abaixo do ponto de corte (1,5), na medida da atividade enzimática da α -gal A em SIPF. Os 112 controles negativos restantes tiveram atividade acima do ponto de corte (Tabela 1).

| | | Teste Alvo Atividade enzimática da α -gal A em SIPF | | Total |
|---|-------------------------------------|--|-------------------------------------|-------|
| | | Positivo ($<1,5$ nmol/h/mL) | Negativo ($\geq 1,5$ nmol/h/mL) | |
| Teste Diagnóstico Atividade enzimática da α -gal A em plasma | Positivo ($<3,3$ nmol/h/mL) | 22 a | 0 c | 22 |
| | Negativo ($\geq 3,3$ nmol/h/mL) | 12 b | 112 d | 124 |
| Total | | 34 | 112 | 146 |

Tabela 1: Resultados obtidos a partir da atividade enzimática da α -galactosidase A em sangue impregnado em papel filtro e plasma de 22 controles positivos e 124 controles negativos. Verdadeiros-positivos (a), Falsos-positivos (b), Falsos-negativos (c), Verdadeiros-negativos (d).

Sensibilidade e especificidade

Foi utilizado o programa PEPI versão 4.0, sendo obtido um resultado de sensibilidade de 100% e de especificidade de 90,3% (para IC95%: 84,1 a 94,7%), para o ponto de corte de atividade enzimática de 1,5nmol/h/L em amostras de SIPF. Isso demonstra que o teste é 100% sensível, mas teve como falsos positivos de 8,7% (para IC95%: 5,3 a 15,9%) das amostras.

Valores preditivos positivo e negativo

Foi utilizado o programa PEPI versão 4.0, foi obtido o resultado do valor preditivo positivo de 64,7% (para IC95%: 48,6 a 80,2%) e o resultado do valor preditivo negativo de 100%. O VPP pode apresentar-se diminuída devido a baixa prevalência da doença na população (Kotanko P, et al, 2004), como é o caso da doença de Fabry.

Estes resultados indicam que o ensaio enzimático da α -gal A em SIPF é 100% sensível, ou seja, todos os pacientes com a doença de Fabry serão identificados. No entanto, num intervalo de 19,8 a 51,4% detectam-se falso-positivos, tendo a necessidade de repetir a coleta e o ensaio enzimático em plasma para a obtenção do diagnóstico final da doença de Fabry.

Para evitar resultados falsos positivos, testes de triagem não deveriam ser aplicados na população em geral (Kotanko P, et al, 2004). E sim, serem aplicados em grupos de alto risco como é o caso dos pacientes em tratamento de hemodiálise.

Em alguns países da Europa e América Latina questiona-se a possibilidade da medida da atividade enzimática em amostras de SIPF serem utilizadas como método de diagnóstico. O presente estudo mostra a necessidade da confirmação diagnóstica pelos métodos tradicionais em amostra de plasma e/ou leucócitos, ou também pela análise de mutação. Visto que neste trabalho observou-se 12 controles negativos com atividade abaixo do ponto de corte, ou seja, 9,7% de falsos-positivos pela medida da atividade enzimática em SIPF.

O estudo de Kotanko P, et al (2004), na Áustria, foi realizado a triagem com amostra em SIPF e confirmada pela medida da atividade da α -gal A em leucócitos e análise de mutação. Na Itália, Spada M, et al (2006) realizaram a medida da atividade da α -gal A em amostras de SIPF e confirmaram pela medida da atividade da α -gal A em amostra de plasma e análise de mutações.

Estes resultados mostram que a medida da atividade da α -gal A em SIPF é forte candidata a fazer parte de testes de triagem populacional para a doença de Fabry.

Prevalência

Para o estudo da prevalência avaliou-se por esta triagem 1712 pacientes em tratamento de hemodiálise sem diagnóstico definido, foram avaliados para a doença de Fabry pelo ensaio enzimático da α -gal A em SIPF, proveniente de três estados brasileiros: Rio Grande do Sul (807 pacientes), Paraná (395 pacientes) e Rio de Janeiro (510 pacientes).

Obteve-se 52 resultados da atividade da enzima α -gal A em SIPF abaixo do ponto de corte de $1,5\mu\text{mol/h/L}$, que foram chamados para coleta, e destes, três pacientes tiveram o diagnóstico da doença de Fabry confirmada pela medida da atividade da α -gal A em plasma e em leucócitos. Dois dos pacientes diagnosticados eram provenientes do Rio Grande do Sul e um do Rio de Janeiro. Observa-se que dentre os 52 pacientes, 48 resultaram em falsos positivos (2,8%). Este resultado é menor do que o obtido na avaliação da acurácia.

O primeiro paciente diagnosticado era do Rio Grande do Sul. Na época da coleta estava com 47 anos, iniciou tratamento de hemodiálise aos 41 anos. Não apresentava angioqueratomas nem acroparestesias, porém apresentava insuficiência renal crônica em fase terminal, nefrosclerose, cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, aneurisma. Este paciente foi a óbito aos 48 anos. Apresentou atividade da α -gal em A em SIPF de $0,30\mu\text{mol/h/L}$ e em plasma de $0,006\text{nmol/h/mL}$.

O segundo paciente diagnosticado, também do Rio Grande do Sul, estava com 46 anos na época da coleta e iniciou o tratamento de hemodiálise aos 45 anos. Este paciente apresentava sinais clínicos característicos da doença de Fabry como angioqueratomas no abdome, acroparestesia existente há mais de 15 anos, hipoidrose, hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência renal crônica em estágio terminal.

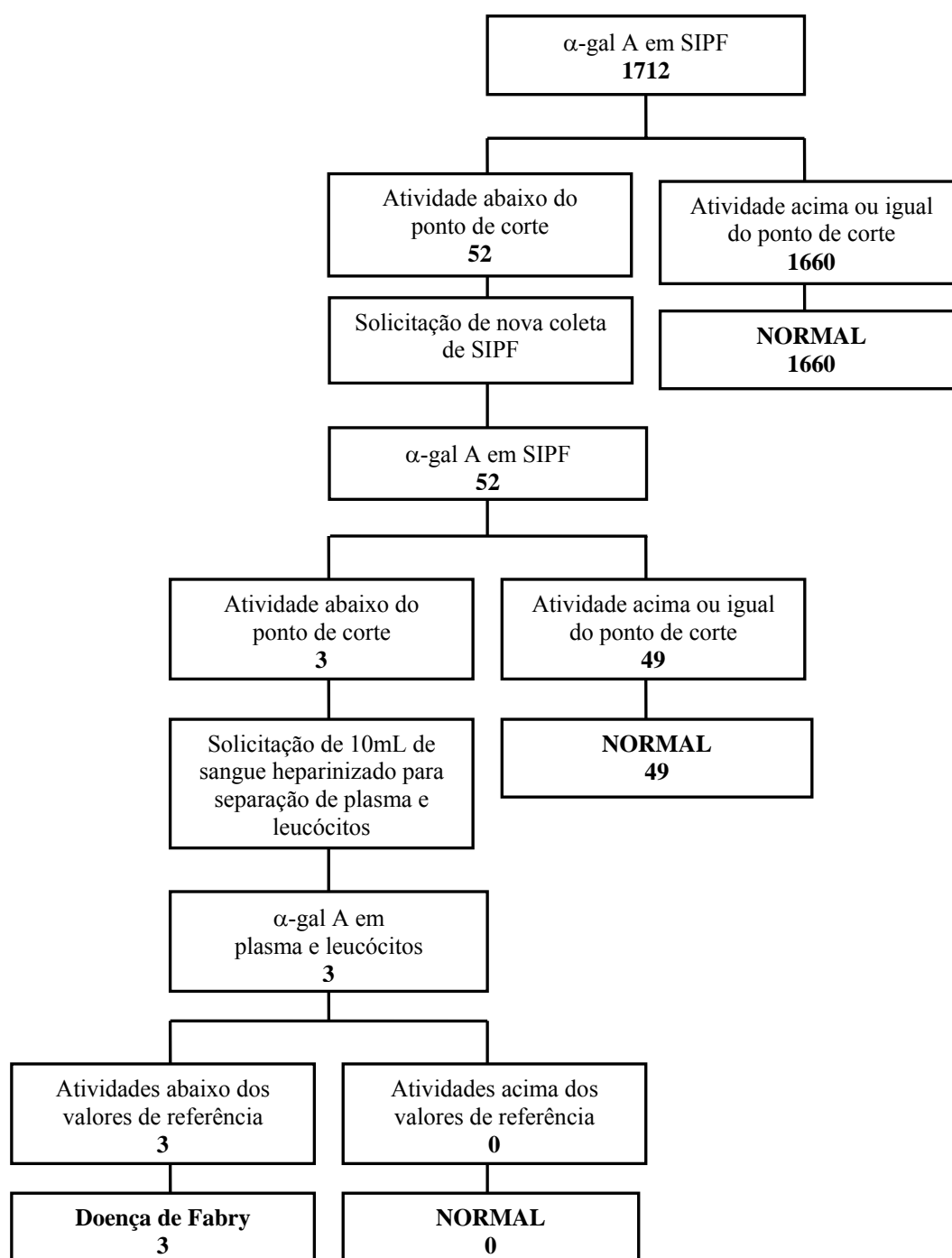
Este caso demonstra a necessidade dos pacientes serem melhor avaliados pela clínica que apresentam, levando ao diagnóstico precoce e início do tratamento sem que haja comprometimento irreversível dos órgãos envolvidos.

Os dados clínicos do terceiro paciente, proveniente do Rio de Janeiro, não puderam ser obtidos.

O resultado da prevalência foi de 0,18% (IC95%: 0,05 a 0,48%), utilizando o programa PEPI versão 4.0. Este resultado está de acordo com os relatos de Kotanko (2004) e Spada (2002). Além de ser quase 100 vezes superior à estimada na população em geral e demonstra que existem pacientes recebendo hemodiálise ainda sem o diagnóstico da doença de Fabry. Estes resultados demonstram que esta doença está sendo subestimada. Este estudo

denota a importância de ferramentas de diagnóstico, como o ensaio enzimático da α -gal A em SIPF, que funciona como uma boa alternativa em triagens populacionais para a identificação de pacientes com a doença de Fabry e encaminhamento para o tratamento adequado.

Este estudo teve participação de apenas três estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Paraná e Rio de Janeiro. Porém, como a doença de Fabry é uma doença considerada pan-étnica, acreditamos que os resultados possam ser representativos do que ocorre no Brasil de uma maneira geral.



Fluxograma 3: Resultados da prevalência seguindo o protocolo de triagem em pacientes brasileiros em tratamento de hemodiálise para investigação da doença de Fabry.

Conclusões

Os resultados obtidos a partir deste projeto permitem concluir que a medida da atividade da α -gal A em amostras de SIFP apresenta acurácia suficiente para ser empregada como método de triagem da doença de Fabry.

Este método mostrou alta sensibilidade, requisito importante para técnicas de triagem populacional, sem ter apresentado nenhum falso negativo. Seu emprego em uma amostra de pacientes com insuficiência renal crônica indicou que o método é eficiente, permitindo detectar uma proporção de casos quase 100 vezes maior que a esperada para a população em geral.

Perspectivas

Este trabalho abre a perspectivas de aplicação deste método em amostras de sangue impregnadas em papel filtro tanto para triagem em grupo de alto risco quanto para triagem neonatal, por ser uma técnica fácil, rápida e barata, e que tem o transporte simplificado.

Tendo em vista que hoje existe um tratamento específico para a doença de Fabry e que muitos pacientes estão sem diagnóstico, o desenvolvimento de um método simples, prático, barato e confiável para a sua triagem é altamente positivo. A identificação de um paciente pode gerar a identificação de novos casos na família, os quais podem se beneficiar de um tratamento mais precoce e do aconselhamento genético.

Referência Bibliográfica

Ashton-Prolla, P, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *Journal of investigative medicine*. 2000; 48(4): 22-35.

Banikazemi M, Bultas J, Waldeck S, Wilcox WR, Whitley CB, McDonald M, *et al*. Algasidase-Beta therapy for advanced Fabry Disease. *Annals of Internal Medicine*. 2007;146:77-86.

Borges-Osório MR, Robinson WM. *Genética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2001.

Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clinica Chimica Acta*. 2001; 308:195-6.

Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2004;27:385-410.

Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1973; 81:157-71.

Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M, *et al.* Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Annals of Internal Medicine*. 2003;138:338-46.

Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3733-74.

Fabry H. An historical overview of Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2001; Suppl. 2:3-7.

Fellgiebel A, Müller MJ, Ginsberg L. CNS manifestations of Fabry's disease. *Lancet Neurology*. 2006; 5:791-5.

Folch J, Lee M, Stanley S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957;226:497-509.

Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, Fan JQ. Patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochemical Journal*, immediate publication. 2007.

Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide sequence of the human α -galactosidase A gene. *Nucleic Acids Research*. 1989; 17:3301-2.

Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, Paschke E, Voigtländer T, Auinger M, *et al.* Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004; 15:1323-9.

Linthorst GE, Hollak CEM, Korevaar JC, Manen JG, Aerts JMFG, Boeschoten EW. α -Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2003; 18:1581-4.

Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JMFG, Hollak CEM. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clinica Chimica Acta*. 2005; 353:201-3.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent . *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;193:265-75.

Masson C, Cissé I, Simon V, Insalaco P, Audran M. Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine*. 2004; 71:381-3.

Möhrenschlager M, Henkel V, Ring J. Fabry disease more than angiokeratomas. *Archives of Dermatology*. 2004; 140:1526-8.

Morgan SH, Rudge P, Smith SJM, Bronstein AM, Kendall BE, Holly E, *et al.* The neurological complications of Anderson-Fabry Disease (α -galactosidase A deficiency) - investigation of symptomatic and presymptomatic patients. *The Quarterly Journal of Medicine*. 1990; 75:491-507.

Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A, *et al.* Fabry disease: Detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype. *Kidney International*. 2003; 64:801-7.

Newman TB, Browner WS, Cummings SR. Delineando estudos de testes medicos. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB; trad. Duncan MS, Peres AR. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica*. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.205-24.

Nguyen TT, Gin T, Nicholls K, Low M, Galamos J, Crawford A. Ophthalmological manifestations of Fabry disease: a survey of patients at the Royal Melbourne Fabry Disease Treatment Centre. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2005; 33:164-8.

Pastores GM, Lien, YH. Biochemical and Molecular Genetic Basis of Fabry Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002; 13:S130-3.

Perrot A, Osterziel KJ, Beck M, Dietz R, Kampmann C. Fabry Disease: focus on cardiac manifestations and molecular mechanisms. *Herz*. 2002; 27:699-702.

Poepl AG, Murray GJ, Medin JA. Enhanced filter paper enzyme assay for high-throughput population screening for Fabry disease. *Analytical Biochemistry*. 2005;337:161-3.

Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood*. 1956; 11:436-54.

Spada M, Pagliardini S. Screening for Fabry disease in end-stage nephropathies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2002; 25[Suppl 1]:113.

Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, *et al.* High incidence of late-onset Fabry Disease revealed by newborn screening. *American Journal of Human Genetics*. 2006; 79:31-40.