

INVESTIGAÇÃO DE DOENÇA DE FABRY EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA¹

FABRY DISEASE INVESTIGATION ON CHRONIC KIDNEY FAILURE PATIENTS

Camila de Britto Pontes Rodrigues PARÁ², Gustavo Monteiro VIANA³, Clebson Pantoja PIMENTEL³, Ana Cristina de Lima Figueiredo DUARTE⁴, Rosalba Teixeira BASTOS⁴ e Luiz Carlos Santana da SILVA⁵

Objetivos: implantação de um protocolo clínico-laboratorial que permita o diagnóstico da doença de Fabry (DF). **Método:** estudo longitudinal retrospectivo e realizado no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2008. Para a padronização da técnica foi coletado 10ml de sangue heparinizado de 50 indivíduos hígidos voluntários. O grupo de estudo contou com a participação de 11 pacientes do sexo masculino, maiores de 18 anos, com insuficiência renal crônica (IRC) de causa desconhecida e em processo de hemodiálise no Hospital de Clínicas Gaspar Vianna. Deste grupo, foi coletado 10ml de sangue heparinizado e aplicado um questionário clínico. Para todos os indivíduos foi feito o ensaio enzimático para a α -Gal A. Os dados foram analisados no Software Bioestat 4.0. **Resultados:** o valor de referência variou de 9,72 a 41,81 nmoles/h/ml, não houve diferença estatística entre os gêneros. No grupo teste, os resultados variaram de 12,1 a 27,4 nmoles/h/ml e o achado clínico mais comum foi a hipertensão arterial sistêmica (HAS). Um indivíduo do grupo controle apresentou baixa atividade enzimática. **Conclusões:** a dosagem da α -Gal A em plasma apresentou valores semelhantes aos encontrados na literatura (4 a 22 nmoles/h/mL) e foi capaz de identificar um indivíduo com baixa atividade enzimática. Não foi encontrado nenhum caso de DF no grupo com IRC.

Descritores: Doença de Fabry, insuficiência renal crônica, alfa-galactosidase A, hemodiálise, erros inatos do metabolismo.

INTRODUÇÃO

A doença de Fabry (DF) é um erro inato do metabolismo pertencente ao grupo de doenças lisossômicas de depósito (DLD) da classe das esfingolipidoses. Pacientes com a DF têm deficiência de alfa-galactosidase A (α -Gal A), uma enzima lisossômica responsável pela quebra de globotriosilceramida (Gb3) e outros glicoesfingolipídeos. A deficiência da α -Gal A leva ao acúmulo progressivo de Gb3 no plasma e nos lisossomos da maioria das células no organismo.^{1,2,3,4,5}

A DF é herdada por herança recessiva ligada ao X, e seu gene está localizado na região q22 deste cromossomo^{6,7} onde já foram descritas mais de 400 mutações.^{6,2}

No fenótipo clássico da DF, é possível observar atividade enzimática da α -Gal A quase nula nos tecidos, e gera manifestações já na infância.^{8,2,9}

Dentre as manifestações mais frequentes estão hipohidrose/anidrose, angioqueratomas e acroparesesias, estabelecidas já no início da puberdade, e na fase adulta, envolvimento cardiovascular e insuficiência renal, podendo levar a falência renal, sendo esta última principal causa de óbito em pacientes não diagnosticados.^{10, 6, 1, 5} O diagnóstico confirmatório da DF se dá pela dosagem da α -Gal A em plasma e leucócitos.

Até o advento da terapia de reposição enzimática (TRE), a DF era tratada com medidas paliativas, o que,

¹ Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA)

² Biomédica, Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, UFPA

³ Biomédico, Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, UFPA

⁴ Médica Nefrologista do Hospital de Clínicas Gaspar Vianna

⁵ Biomédico, Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

no entanto, não elimina a causa da doença.¹¹ A TRE é a opção terapêutica mais específica para o tratamento da DF. Após o início da TRE observa-se uma redução significativa dos sintomas dessa doença e a redução do Gb3 acumulado, evitando dessa forma as complicações renais, cardiovasculares e os danos ao sistema nervoso.¹²

OBJETIVO

Busca-se investigar a DF em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) através do ensaio enzimático da α -Gal A em plasma.

MÉTODO

Estudo longitudinal retrospectivo, realizado no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2008.

Casuística

O grupo controle foi composto por 50 indivíduos (25 homens e 25 mulheres) entre 17 e 39 anos de idade, hígidos e voluntários para a padronização da técnica laboratorial. O grupo de estudo foi composto de 11 pacientes do sexo masculino, maiores de 18 anos, com IRC de causa desconhecida e em processo de diálise, provenientes do Hospital de Clínicas Gaspar Vianna. Estes indivíduos foram convidados a participar do estudo através de contato por carta e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará em 26 de junho de 2007.

Procedimento

De todos os indivíduos foram coletados 10ml de sangue com heparina e as amostras foram centrifugadas para a obtenção de plasma e posterior realização do ensaio enzimático. Para os pacientes com IRC, foi ainda aplicado um questionário clínico que informasse a história clínica do paciente, a presença

ou não de casos semelhantes de IRC na família, presença ou não de angioqueratomas, alterações cardíacas ou outros sintomas que pudessem indicar a DF.

O ensaio enzimático utilizado foi o descrito por Morgan et al. (1990)¹³, onde se utiliza o substrato fluorescente 4 – metilumbeliferil – α – D – galactopiranosídeo e o inibidor para a α -Gal B, a N-acetilgalactosamina em tampão acetato de sódio 0,5 M de pH 4,8. As amostras foram analisadas em espectrofluorímetro com comprimento de onda de emissão de 365 nm e excitação de 450 nm. Os resultados da α -Gal A foram expressos em nmoles/h/mL.

Análise Estatística

Para a análise dos resultados e comparação de dados, foram utilizados os testes qui-quadrado e o “t” de Student do software Bioestat 4.0¹⁴ com nível de significância igual a $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores obtidos através da padronização da técnica dos 50 indivíduos sadios variaram de 9,72 a 41,81 nmoles/h/mL (média 15,98 \pm 5,77). Não houve diferença significativa entre os gêneros. A figura 1 mostra a distribuição destes valores.

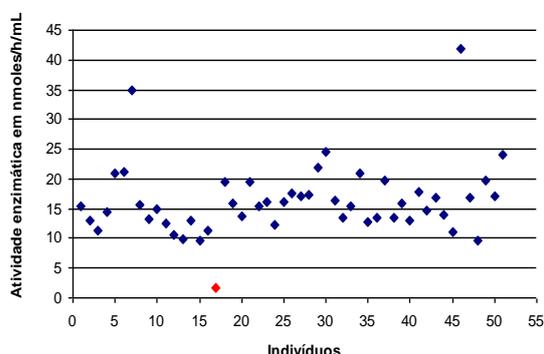


Figura 1: Atividade enzimática em nmoles/h/mL em 25 homens e 25 mulheres hígidos voluntários ($p > 0,05$ – teste do qui-quadrado).

Com relação ao grupo de pacientes com IRC, a atividade enzimática variou de 12,1 a 27,4 nmoles/h/mL (Figura 2). Não houve diferença significativa entre os dois grupos. Os principais sintomas apresentados pelos pacientes com IRC estão representados na tabela 1.

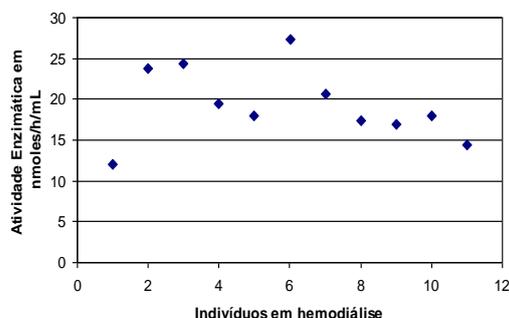


Figura 2: Atividade enzimática em nmoles/h/mL de 11 pacientes, do sexo masculino, com IRC de causa desconhecida provenientes do Hospital de Clínicas Gaspar Vianna no ano de 2007 ($p > 0,05$ – teste t de Student).

DISCUSSÃO

A padronização do ensaio enzimático em plasma para a α -Gal A tem sido processada em apenas dois centros de investigação de doenças metabólicas hereditárias: Centro de Referência em Erros Inatos do Metabolismo (CREIM - UNIFESP) e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA-RS). Este trabalho aponta para a importância de implantar tecnologias de diagnóstico de doenças genéticas na região norte.

Dentro desta ótica, o ensaio enzimático para a α -Gal A foi padronizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA e já pode ser aplicado na investigação da DF na região norte.

A análise do perfil enzimático dos 50 indivíduos hígidos permitiu a padronização da referida técnica e a implantação de valores de referências para a população local (9,72 a 41,81 nmoles/h/mL).

Tabela 1: Principais sintomas apresentados pelos pacientes além da IRC.

Sintoma	Frequência absoluta	Frequência relativa* (%)
Hipertensão arterial sistêmica	6	54,5
Astenia	5	45,5
Edema	5	45,5
Arritmias cardíacas	2	18,2
Alterações visuais	3	27,3
Não apresentavam	1	9,1
Outros**	10	90,9

*A frequência relativa total excede 100% pelo fato de que a maioria dos pacientes apresentava mais de um sintoma.

**Outros sintomas: Parestesias, convulsões, palidez, náuseas/vômitos, cefaléia, anemia.

Estes valores não diferiram estatisticamente dos padronizados no SGM/HCPA (4 a 22 nmoles/h/mL). No grupo controle foi encontrado um indivíduo com atividade enzimática baixa (1,66 nmoles/h/mL) que poderia ser indicativo de DF (indivíduo 17, figura 1). Para evitar limitação na interpretação dos dados, este indivíduo foi excluído do grupo de padronização da técnica e outro indivíduo foi adicionado.

Em relação a este caso, foi feita uma nova coleta de sangue heparinizado, sendo a amostra enviada ao CREIM, UNIFESP e para o SGM/HCPA-RS a fim de se proceder a confirmação diagnóstica em leucócitos, sendo este o padrão ouro para a investigação de DF. Este material biológico permite a investigação da atividade enzimática diretamente no lisossomo.

Este indivíduo obteve o resultado dentro dos valores de referência para leucócitos, no entanto, os valores de plasma foram semelhantes aos encontrados neste estudo.

Quanto aos questionários aplicados aos pacientes em hemodiálise, foi observado que apesar de 4 pacientes dos 11 estudados possuírem casos semelhantes na família de IRC de causa desconhecida, além de outros sintomas semelhantes aos encontrados na DF, como hipertensão arterial sistêmica e arritmias cardíacas, nenhum deles apresentou atividade enzimática baixa.

Segundo Civallero et al. (2006)¹⁵, a DF, bem como diversas outras DLD, pode ser diagnosticada através da análise enzimática em papel filtro, onde se utiliza uma quantidade de amostra biológica menor e o custo do diagnóstico também é baixo, pela reduzida quantidade de reagentes que é utilizada. Dessa forma, deve-se considerar a inclusão dos testes para DLD em papel filtro no Programa Nacional de Triagem Neonatal, já que as DLD quando combinadas apresentam uma frequência significativa (1:5.000 nascimentos, segundo Meikle et al., 2006)¹⁶ além de que muitas delas apresentam tratamento.

Auray-Blais et al. (2007)⁴ sugerem a utilização do papel filtro em programas de triagem neonatal para a determinação do Gb3 urinário em recém-nascidos e em populações de alto-risco.

No caso da DF, o diagnóstico precoce e a implantação do tratamento o quanto antes impedirão a instalação dos principais sintomas além de evitar a ocorrência de danos irreversíveis.

Segundo Desnick e Brady (2004)¹, a terapia de reposição enzimática mostrou diminuir as dores (acroparestesias), reverter as respostas cerebrovasculares anormais e diminuiu significativamente o acúmulo de globotriosilceramida no plasma e no endotélio capilar do coração, rins e da pele, órgãos mais afetados pela DF.

CONCLUSÕES

A dosagem da α -Gal A em plasma é considerada apenas um teste de triagem, visto que valores normais no plasma não excluem a doença. No entanto, esta avaliação se mostrou muito eficaz, pois conseguiu identificar um indivíduo com baixa atividade enzimática, mesmo sem possuir a DF.

Investigações futuras serão realizadas, a fim de se incluir neste estudo outros centros de referência em hemodiálise e continuar assim a busca por potenciais portadores da DF.

Não foi encontrado nenhum valor abaixo do valor de referência no grupo teste, embora 36,4% possuírem casos semelhantes na família de IRC além de outros sintomas semelhantes aos encontrados na DF, como arritmias cardíacas, edema, astenia, dentre outros.

A atividade enzimática da α -Gal A não diferiu entre homens e mulheres sadios ($p > 0,05$ – teste do qui-quadrado) e nem entre o grupo controle e o grupo teste ($p > 0,05$ – teste t de *Student*).

SUMMARY

FABRY DISEASE INVESTIGATION ON CHRONIC KIDNEY FAILURE PATIENTS

Camila de Britto Pontes Rodrigues PARÁ; Gustavo Monteiro VIANA; Clebson Pantoja PIMENTEL; Ana Cristina de Lima Figueiredo DUARTE; Rosalba Teixeira BASTOS; Luiz Carlos SANTANA-DA-SILVA

Objectives: introduction a clinical and laboratorial protocol which allows Fabry disease (FD) diagnosis. **Method:** this is a retrospective longitudinal study and data were collected since january 2007 until january 2008. To technic standardize, 10ml of heparin blood sample from 50 healthy volunteers individuals were collected. The test group was composed by 11 male patients, older than 18 years old, with unknown chronic kidney failure (CKF) on hemodialysis treatment on Hospital de Clínicas Gaspar Vianna. From this group, it was also collected 10mL of heparin blood sample and it was applied a clinical questionnaire. For all individuals, the α -Galactosidase A (α -Gal A) enzymatic assay was done. Data were analysed on Bioestat 4.0 Software. **Results:** the reference values varied from 9,72 to 41,81 nmoles/h/mL, there was no statistical difference between genders. On the test group, the results varied from 12,1 to 27,4 nmoles/h/mL and the most common clinical manifestation was systemic arterial hypertension (SAH). One individual from control group presented low enzymatic activity. **Conclusions:** the plasma α -Gal A dosage presented values similar to those found on literature (4 to 22 nmoles/h/mL) and it was capable of identify an individual with low enzymatic activity. In this study, no DF case was found on CKF group.

Key-Words: Fabry disease, chronic kidney failure, alpha-galactosidase A, hemodialysis, inborn errors of metabolism.

REFERÊNCIAS

1. DESNICK, R.J.; BRADY, R.O. Fabry Disease in Childhood. *The Journal of Pediatrics*, 144:20-26. 2004.
2. KOTNIK, J.; KOTINIK, F; DESNICK, R. J. Fabry disease. A case report. *Acta Dermatoven APA*, 14:15-19. 2005.
3. UTSUMI, K.; MITSUHASHI, F.; ASAH, K.; SAKURAZAWA, M.; ARII, K. KOMABA, Y.; KATSUMATA, T.; KATSURA, K.-I.; KASE, R.;
4. AURAY-BLAIS, C.; CYR, D.; MILLS, K.; GIGUÈRE, R.; Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30:106. 2006.
5. SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8^a ed, New York: McGraw-Hill, Inc. 2001.
6. MASSON, C.; CISSÉ, I.; SIMON, V., INSALACO, P.; AUDRAN, M. Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine*, 71:381–383. 2004.
7. JARDIM, L.B.; AESSE, F.; VEDOLIN, L.M.; PITTA-PINHEIRO, C.; MARCONATO, J.; BURIN, M.G.; CECCHIN, C.; NETTO, C.B.O.; MATTE, U.S.; PEREIRA, F.; KALAKUN, L.; GIUGLIANI, R. White matter lesions in Fabry disease before and after enzyme replacement therapy. *Arq Neuropsiquiatr*, 64(3-B):711-717. 2006.
8. GARMAN, S.C.; GARBOCZI, D.N. The Molecular Defect Leading to Fabry Disease: Structure of Human α -Galactosidase. *Journal of Molecular Biology* 337:319–335. 2004.
9. PEREIRA, F.S.; JARDIM, L.B.; NETTO, C.B.; BURIN, M.G.; CECCHIN, C.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U.S. Genomic analysis of Brazilian patients with Fabry disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40:1599-1604. 2007.
10. MARTÍNEZ, N.A.; HERNÁNDEZ, F.J.B.; CONSUEGRA, J.G.; RODRÍGUEZ, M.L.; GUERRERO, L.G.; GÓMEZ-CEREZO, J.; ESTEBAN, V.C.; RODRÍGUEZ, J.J.V. Fabry's disease: long-term study of a family. *European Journal of Internal Medicine*, 15:210–215. 2004.
11. PETERS, F.P.J.; VERMEULEN, A.; KHO, T.L. Andersen-Fabry's disease: alpha galactosidase deficiency. *Lancet*, 357(9250): 138-140. 2001.
12. BOISSIER MC. Ethical aspects of gene therapy in rheumatology. *Joint Bone Spine*;68:109–11. 2001.

13. MORGAN, S.H.; RUDGE, P.; SMITH, S.J.; BRONSTEIN, A.M., KENDALL, B.E., HOLLY, E.; YOUNG, E.P.; CRAWFURD, M.D., BANNISTER, R. The neurological complications of Anderson-Fabry disease (alpha-galactosidase A deficiency) -investigation of symptomatic and presymptomatic patients. *Q. J. Med* **75**:491-507. 1990.
14. AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. *Bioestat. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Belém, PA, Brasil. 2003.
15. CIVALLERO, G.; MICHELIN, K.; MARI, J. de; VIAPIANA, M.; BURIN, M.; COELHO, J.C.; GIUGLIANI, R. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta* **372**:98-102. 2006.
16. MEIKLE, P.J.; GRASBY, D.J.; DEAN, C.J., LANG, D.L.; BOCKMANN, M.; WHITTLE, A.M.; FIETZ, M.J.; SIMONSEN, H.; FULLER, M.; BROOKS, D.A.; HOPWOOD, J.J. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, **88**:307-314. 2006.

Endereço para correspondência:

Camila de Britto Pontes Rodrigues PARÁ
Rua Augusto Corrêa, 01, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
CEP: 66075-110 - Belém-Pará
Fone: (91) 3201-8030
E-mail: milaparah@yahoo.com.br

Recebido em 11.07.08 aprovado em 05.11.09