



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR  
LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

CAMILA DE BRITTO PARÁ DE ARAGÃO

**CINÉTICA DA ENZIMA ALFA-GALACTOSIDASE A E INVESTIGAÇÃO DE  
DOENÇA DE FABRY EM PACIENTES HEMODIALISADOS**

Belém – PA

2011

2011

Camila de Britto Pará de Aragão

**CINÉTICA DA ENZIMA ALFA-GALACTOSIDASE A E INVESTIGAÇÃO DE  
DOENÇA DE FABRY EM PACIENTES HEMODIALISADOS**

**Dissertação de mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências e  
Biologia Celular, como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
mestre, pela Universidade Federal  
do Pará.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos  
Santana da Silva**

**BELÉM**

**2011**

**CINÉTICA DA ENZIMA ALFA-GALACTOSIDASE A E INVESTIGAÇÃO DE  
DOENÇA DE FABRY EM PACIENTES HEMODIALISADOS**

**Dissertação de mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências e  
Biologia Celular, como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
mestre, pela Universidade Federal  
do Pará.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva**

**Banca examinadora:**

Membros titulares:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira

Prof. Dra. Greice de Lemos Cardoso

Membro suplente:

Prof. Dr. Nazário de Souza Messias Junior

**Aos meus pais Jayme e Lília,**  
que sempre foram minha inspiração  
e sempre serão meu exemplo de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Prof. Luiz Carlos Santana da Silva, querido orientador que sempre me acolheu com muito carinho e despertou em mim a vontade de seguir a carreira acadêmica.
- Aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA, pela parceria e colaboração.
- Ao Prof. José Luiz Martins do Nascimento, que me acolheu como sua orientanda, mesmo que temporariamente.
- Ao Márcio, meu amor e companheiro de todas as horas, que me confortou nos momentos de dificuldade.
- Aos pacientes e voluntários que aceitaram participar deste estudo.

“Aprimorar a paciência  
requer alguém que nos faça mal  
e nos permita praticar a tolerância.”

Dalai Lama

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	13
1.1.2 Equação de Michaelis-Menten.....	13
1.1.3 Equação de Lineweaver-Burk.....	15
1.2 ALFA-GALACTOSIDASE.....	16
1.3 ALFA-GALACTOSIDASE A.....	17
1.3.1 Aspectos bioquímicos.....	17
1.3.2 Aspectos celulares.....	19
1.3.3 Aspectos moleculares.....	20
1.4 DOENÇA DE FABRY.....	21
1.4.1 Achados clínicos.....	21
1.4.2 Diagnóstico Bioquímico.....	24
1.4.3 Diagnóstico molecular.....	24
1.4.4 Tratamento.....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E CASUÍSTICA.....	27
3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	27
3.3 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	28
3.3.1 Padronização do ensaio enzimático em leucócitos.....	28
3.3.2 Padronização do ensaio enzimático em plasma.....	31
3.4 ANÁLISE CINÉTICA DA $\alpha$ -GAL A.....	32
3.4.1 Termoestabilidade.....	33
3.4.2 Determinação do tempo de incubação adequado.....	33

<b>3.4.3 Determinação do pH ótimo (ou faixa) para atividade da <math>\alpha</math>-Gal A.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.4 Determinação da constante de Michaelis-Menten (<math>K_m</math>) a partir de diferentes concentrações do substrato.....</b>	<b>33</b>
3.5 REPRODUTIBILIDADE.....	34
3.6 ESTABILIDADE DA FLUORESCÊNCIA.....	34
3.7 TRIAGEM DOS PACIENTES COM IRC DE CAUSA DESCONHECIDA.....	34
<b>3.7.1 Aspectos Éticos.....</b>	<b>34</b>
<b>3.7.2 Riscos e benefícios do estudo.....</b>	<b>35</b>
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>3.8.1 Dados do estudo cinético.....</b>	<b>36</b>
<b>3.8.2 Dados clínico-laboratoriais.....</b>	<b>36</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCLO ENZIMÁTICO PARA $\alpha$ -Gal A E IMPLANTAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA. ....	37
<b>4.1.1 Padronização do ensaio enzimático no plasma.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2 Padronização do ensaio enzimático em leucócitos.....</b>	<b>38</b>
4.2 ANÁLISE CINÉTICA EM PLASMA.....	38
<b>4.2.1 Termoestabilidade.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.2 Determinação do tempo de incubação adequado.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.3 Determinação do comportamento da <math>\alpha</math>-Gal A em diferentes pH.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.4 Curva de substrato: Determinação do <math>K_m</math> e da <math>V_{m\acute{a}x}</math>.....</b>	<b>42</b>
4.3 REPRODUTIBILIDADE.....	43
4.4 ESTABILIDADE DA FLUORESCÊNCIA APÓS O TÉRMINO DO ENSAIO ENZIMÁTICO.....	44
4.5 PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS.....	44
<b>4.5.1 Análise dos questionário.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5.2 Atividade enzimática de <math>\alpha</math>-Gal A no plasma de indivíduos com IRC de causa indeterminada.....</b>	<b>48</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO ENZIMÁTICO PARA A $\alpha$ -GAL A.....	49
5.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	51
5.3 RERODUTIBILIDADE.....	53
5.4 ESTABILIDADE DA FLUORESCÊNCIA.....	54

5.5 INDIVÍDUOS COM IRC.....	54
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>8 APÊNDICES.....</b>	<b>65</b>
8.1 APÊNDICE A: CARTA CONVITE.....	65
8.2 APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..	67
8.3 APÊNDICE C: QUESTIONÁRIO.....	69
8.4 APÊNDICE D: MODELO DE LAUDO.....	70
8.5 APÊNDICE E: VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS PADRONIZAÇÕES DO ENSAIO PARA $\alpha$ -GAL A.....	71
8.6 APÊNDICE F: VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS INDIVÍDUOS COM IRC.....	72
8.7 APÊNDICE G: VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CURVA DE SUBSTRATO.....	73
8.8 APÊNDICE H: ARTIGO ORIGINAL SUBMETIDO À REVISTA CLINICAL BIOCHEMISTRY.....	74
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>83</b>
9.1 ANEXO A: PROTOCOLOS LABORATORIAIS.....	83
<b>9.1.1 Ensaio enzimático da <math>\alpha</math>-Gal A em leucócitos.....</b>	<b>83</b>
<b>9.1.2 Padronização do ensaio enzimático em plasma (Morgan, <i>et al.</i>, 1990).....</b>	<b>87</b>
9.2. ANEXO B: TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ.....	89
9.3 ANEXO C: DECLARAÇÃO DE ACEITE DO HOSPITAL DE CLÍNICAS GASPAR VIANNA.....	90
9.4 ANEXO D: DECLARAÇÃO DE ACEITE DO HOSPITAL OPHIR LOYOLA...	91

## RESUMO

A Alfa-galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A) humana é uma enzima lisossômica que quando deficiente causa a doença de Fabry. A doença de Fabry é uma esfingolipidose cuja principal causa de morbi-mortalidade é a insuficiência renal crônica (IRC). O objetivo deste estudo foi a implantação de um protocolo laboratorial que permita o diagnóstico da doença de Fabry em plasma e leucócitos, além da análise das características cinéticas da enzima  $\alpha$ -Gal A em plasma e busca ativa da doença em 25 indivíduos com IRC de causa desconhecida. Também foram avaliadas a reprodutibilidade e a estabilidade do método enzimático. A padronização dos ensaios foi realizada com o substrato fluorescente 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo. A reprodutibilidade foi avaliada utilizando amostras de plasma aliqüotadas a 4°C, -20°C e -70°C, analisadas uma vez ao mês por 6 meses e a estabilidade da fluorescência por até 24 horas após o término do ensaio enzimático. A padronização permitiu a implantação de valores de referência da  $\alpha$ -Gal A para o estado do Pará, de 4 a 28 nmoles/h/mL (plasma) e de 20 a 96 nmoles/h/mg proteína (leucócitos). A enzima  $\alpha$ -Gal A se mostrou termolábil, visto que com apenas 1 minuto de pré-incubação das amostras a 60°C, sua atividade decaiu 71,09%. Com relação ao tempo de incubação, a atividade enzimática apresentou uma disposição linear crescente entre 15 a 180 minutos de incubação. A  $\alpha$ -Gal A apresentou maior atividade no pH 4,8, o  $K_m$  encontrado para a  $\alpha$ -Gal A foi de 1,007 mM e a  $V_{m\acute{a}x}$  foi 30,9 nmoles/h/mL. A melhor temperatura de armazenamento de plasma até o ensaio enzimático é -20°C, onde foi observada menor variação em um período máximo de 6 meses. O método enzimático utilizado é estável, mesmo após 24 horas do término do ensaio, em temperatura ambiente. Com relação aos pacientes com IRC de causa desconhecida, todos apresentaram valor de atividade da  $\alpha$ -Gal A dentro dos parâmetros de referência e, portanto, nenhum foi diagnosticado com doença de Fabry. O entendimento da cinética da  $\alpha$ -Gal A e do seu comportamento *in vitro* possibilita um melhor diagnóstico laboratorial da doença de Fabry gerando dados para futuras comparações com indivíduos afetados por mutações nesta enzima.

**Palavras-chave:** Cinética enzimática, alfa-galactosidase A, doença de Fabry, hemodiálise

## ABSTRACT

Human alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A) is a lysosomal enzyme which is deficient in Fabry disease. Fabry disease is a sphingolipidosis which chronic kidney failure (CKF) is the most important cause of morbidity and mortality. The aim of this study was the establishment of a laboratorial protocol that allows the diagnosis of Fabry's disease in plasma and leukocytes, the analysis of  $\alpha$ -Gal A kinetic features in plasma and searching for potential Fabry patients in 25 individual with unknown CKF. Reproducibility and fluorescence stability of the enzymatic method were also evaluated. The assay standardization was realized with the fluorescent substrate 4-methylumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopyranoside. Reproducibility was evaluated using plasma samples stored at a 4°C, -20°C and -70°C, the assay was performed once a month until 6 months and fluorescence stability was evaluated until 24 hours after the end of the assay. The standardization allowed the establishment of value references to  $\alpha$ -Gal A in Pará State, from 4 to 28 nmoles/h/mL (plasma) and 20 to 96 nmoles/h/mg protein (leukocytes).  $\alpha$ -Gal A enzyme was thermolabile and 1 minute of preincubation at 60°C was sufficient to decrease 71.09% of its entire activity. The activity of the  $\alpha$ -Gal A enzyme increased progressively according to incubation time, between 15 and 180 minutes. Its activity was better at pH 4,8, the  $K_m$  value for the  $\alpha$ -Gal A enzyme was 1.007 mM, and maximum reaction velocity was 30.9 nmoles/h/mL. The best storage temperature for plasma samples was -20°C that showed less variation until 6 months. The enzyme method is stable and even after 24 hours, at room temperature, the fluorescence remained the same. All CKF patients with unknown cause presented  $\alpha$ -Gal A activity between normal values, therefore neither was diagnosed with Fabry disease. Understanding the kinetics of the  $\alpha$ -Gal A enzyme and its *in vitro* behavior will contribute to improvements in the laboratory diagnosis of Fabry disease, and provide a diagnostic baseline for the analysis of individuals affected by mutations in this enzyme.

**Key words:** Enzyme kinetics, alpha-galactosidase A, Fabry disease, hemodialysis

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\alpha$ -Gal A	Alfa-Galactosidase A
$\alpha$ -Gal B	Alfa-Galactosidase B
ACD	Ácido Cítrico Dextrose
AE	Átrio esquerdo
AVC	Acidente Vascular Cerebral
cDNA	DNA codificante
CREIM	Centro de Referência em Erros Inatos do Metabolismo
DLD	Doenças Lisossômicas de Depósito
Gb3	Globotriosilceramida
GLA	Gene codificante da alfa-Galactosidase A
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HBV	Virus da Hepatite B
HCGV	Hospital de Clínicas Gaspar Vianna
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCV	Virus da Hepatite C
HOL	Hospital Ophir Loyola
IRC	Insuficiência Renal Crônica
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
LEIM	Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
M6P	Manose-6-fosfato
MU	Metilumbeliferona
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PI	Piauí
QM	Coeficiente médio
RN	Rio Grande do Norte
RS	Rio Grande do Sul
SGM	Serviço de Genética Médica
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VE	Ventrículo esquerdo
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação gráfica do comportamento de uma enzima que obedece leis de Michaelis-Menten e sua equação.....	14
<b>Figura 2:</b> Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk.....	15
<b>Figura 3:</b> Reação catalisada pela $\alpha$ -Gal.....	17
<b>Figura 4:</b> (a) Monômero da enzima $\alpha$ -galactosidase A. (b) e (c) Dímeros de $\alpha$ -galactosidase.....	18
<b>Figura 5:</b> Seqüência de eventos na biossíntese e tráfego da $\alpha$ -Gal A.....	19
<b>Figura 6:</b> Curva de termoestabilidade.....	39
<b>Figura 7:</b> Atividade enzimática em função do tempo de incubação.....	40
<b>Figura 8:</b> Atividade enzimática em diferentes pH.....	41
<b>Figura 9:</b> Curva de Michaelis-Menten, onde a concentração do substrato [S] que corresponde ao $K_m$ da $\alpha$ -Gal A é igual a 1,007 mM.....	42
<b>Figura 10:</b> Representação gráfica da curva de Lineweaver-Burk.....	42
<b>Figura 11:</b> Atividade da $\alpha$ -Gal A durante 6 meses nas amostras armazenadas em diferentes temperaturas.....	43
<b>Figura 12:</b> Estabilidade da fluorescência até 24 horas após o término do ensaio.....	44
<b>Figura 13:</b> Casos semelhantes na família.....	47
<b>Figura 14:</b> Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes além da IRC..	47
<b>Figura 15:</b> Atividade enzimática dos indivíduos com IRC de causa indeterminada.....	48
<b>Figura 16:</b> Perfil enzimático em plasma dos 50 indivíduos hígidos voluntários...	49
<b>Figura 17:</b> Perfil enzimático em leucócitos de 30 indivíduos hígidos voluntários	50

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Análise descritiva dos valores de $\alpha$ -Gal A em plasma nos indivíduos do grupo controle.....	37
<b>Tabela 2</b> – Análise descritiva dos valores de $\alpha$ -Gal A em homens e mulheres.....	37
<b>Tabela 3</b> – Análise descritiva dos valores de $\alpha$ -Gal A em leucócitos nos indivíduos do grupo controle.....	38
<b>Tabela 4</b> – Análise descritiva dos valores de $\alpha$ -Gal A em homens e mulheres.....	38
<b>Tabela 5</b> – Análise descritiva dos valores de $\alpha$ -Gal A para pré-incubação a 60 °C.....	39
<b>Tabela 6</b> – Análise descritiva dos valores de $\alpha$ -Gal A em função do tempo de incubação.....	40
<b>Tabela 7</b> - Médias e desvios padrões da atividade enzimática, em nmoles/h/mL, em diferentes pH.....	41
<b>Tabela 8</b> – Médias dos valores encontrados na avaliação de reprodutibilidade.....	43
<b>Tabela 9</b> – Descrição dos dados coletados através de questionários dos indivíduos com IRC.....	46
<b>Tabela 10</b> - Análise descritiva dos valores de $\alpha$ -Gal A no plasma de indivíduos hemodialisados.....	48

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para catalisar uma reação química, a enzima se liga ao substrato e forma um complexo enzima-substrato. A reação ocorre em uma região relativamente pequena, o sítio catalítico ou sítio ativo, que em geral é uma fenda ou fissura na enzima formada por uma ou mais regiões da cadeia polipeptídica. Dentro do sítio ativo, co-fatores e grupos funcionais de cadeia polipeptídica participam na transformação das moléculas ligadas do substrato em produtos (Smith, *et al.*, 2007).

Se a atividade da grande maioria das enzimas for plotada como um gráfico de uma função, pode-se observar que ela cresce conforme o pH que se aproxima do pH fisiológico e decresce quanto mais se afasta dele (Marks, *et al.*, 1996, Nelson e Cox, 2000). O pH ótimo depende do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da seqüência em que estão organizados, ou seja, depende da sua estrutura primária (Marzzoco e Torres, 1999).

Como ocorre com a maioria das reações químicas, a velocidade da reação enzimática, que a 0°C apresenta valores próximos de zero, é favorecida pelo aumento da temperatura. O gradativo aumento da velocidade só se verifica enquanto a enzima conservar a sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das proteínas globulares – enzimas inclusive – são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações conformacionais na molécula, acarretando a perda do poder de catálise. As alterações referentes a amplas variações de pH e temperatura são pertinentes ao estudo da atividade enzimática *in vitro* (Marzzoco e Torres, 1999).

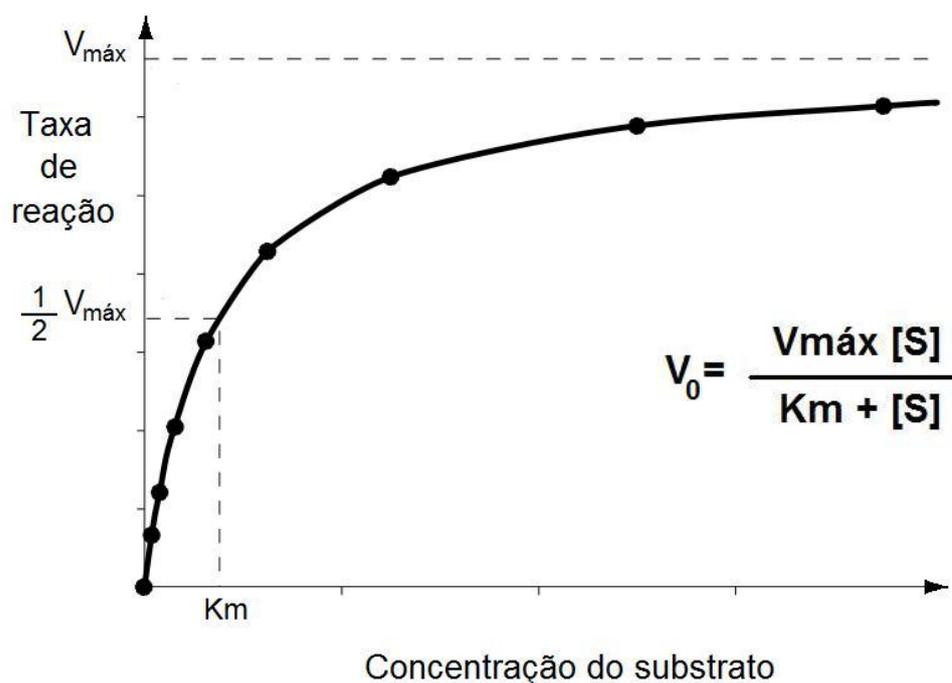
### 1.1.2 Equação de Michaelis-Menten

A velocidade da atividade das enzimas depende da concentração do substrato. Esta dependência pode regular as vias metabólicas se o estoque de substrato variar de acordo com a necessidade de cada via. As equações da

cinética enzimática permitem descrever de forma quantitativa as enzimas de acordo com a sua dependência da concentração do substrato (Berg *et al.*, 2008).

O modo mais simples de investigar a velocidade da reação é acompanhar o aumento do produto da reação em função do tempo e o grau de formação do produto é determinado em função do tempo para uma série de concentrações de substrato (Berg *et al.*, 2008).

A equação de Michaelis-Menten relaciona a velocidade inicial ( $V_0$ ) de uma reação catalisada por uma enzima à concentração do substrato ( $[S]$ ) e dois parâmetros,  $K_m$  e  $V_{máx}$ .  $V_{máx}$  é a velocidade que a reação adquire quando se tem uma quantidade infinita de substrato e o  $K_m$  é a concentração do substrato no qual a velocidade inicial equivale à metade da  $V_{máx}$ , como pode ser observado na Figura 1 (Marks, *et al.*, 1996; Nelson e Cox, 2000; Berg *et al.*, 2008).



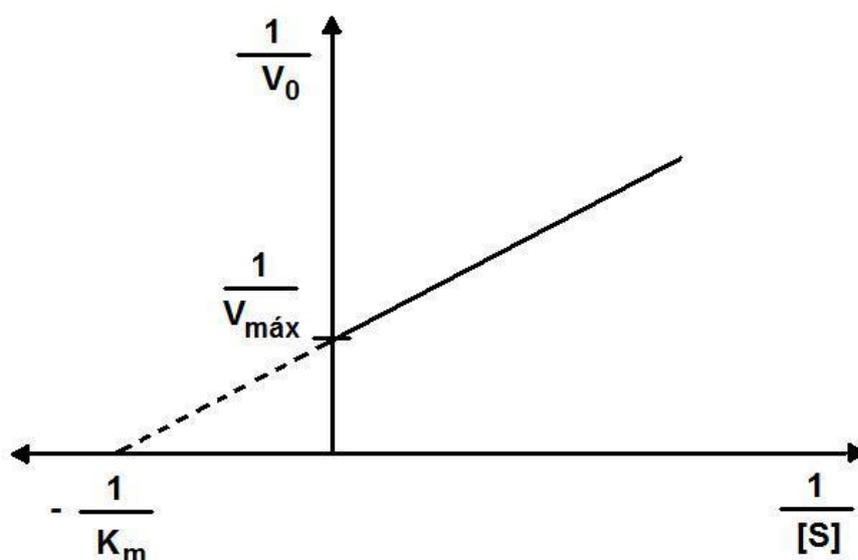
**Figura 1:** Representação gráfica do comportamento de uma enzima que obedece às leis de Michaelis-Menten e sua equação.

### 1.1.3 Equação de Lineweaver-Burk

A equação de Michaelis-Menten é a equação de uma hipérbole retangular, portanto, rigorosamente, os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  nunca são atingidos. Este fato dificulta a determinação precisa de  $K_m$ , ainda mais levando em conta que boas aproximações dos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  devem ser obtidas com concentrações tão altas de substrato que são, às vezes, experimentalmente difíceis de conseguir. Isto pode ser resolvido através da transformação algébrica da equação de Michaelis-Menten, formulada por Lineweaver-Burk, gerando uma equação de reta (Nelson e Cox, 2000; Berg *et al.*, 2008) que é descrita a seguir:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Esta inversão algébrica permite a determinação do valor de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  sem que seja necessário determinar experimentalmente o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  (Nelson e Cox, 2000; Berg *et al.*, 2008). A representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk pode ser observada na Figura 2.

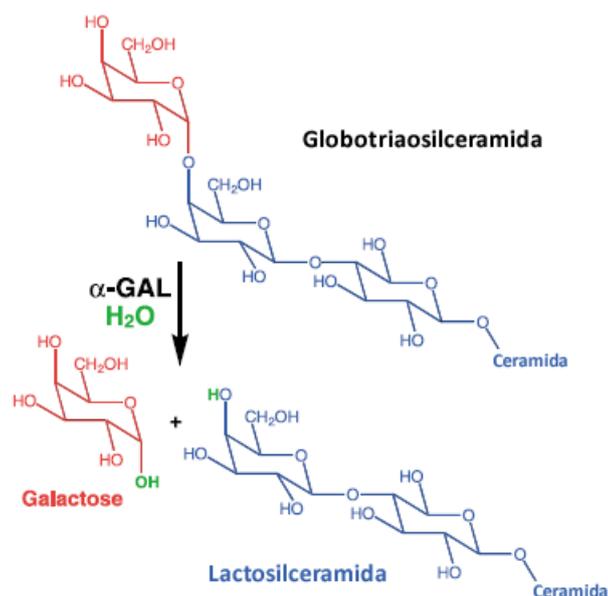


**Figura 2:** Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk.

## 1.2 ALFA-GALACTOSIDASE

A  $\alpha$ -Gal ( $\alpha$ -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.22) catalisa a remoção da galactose de oligossacarídeos, glicoproteínas, e glicolipídios durante o catabolismo de macromoléculas. A  $\alpha$ -Gal se liga a um substrato contendo uma galactose terminal clivando a ligação glicosídica (Figura 3), (Germain *et al.*, 2002; Garman e Garboczi, 2004 ; Martinez *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007). Existem duas isoenzimas da  $\alpha$ -Gal, a A e a B, que são codificadas por genes separados mas evolutivamente relacionados (Scriver, *et al.*, 2001). As isoenzimas fornecem uma maneira de variar a regulação da mesma reação em locais ou tempo diferentes. Estas são enzimas parálogas dentro de um mesmo organismo que catalisam a mesma reação, mas diferem levemente em estrutura e mais obviamente em valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$ , bem como em propriedades de regulação. Com frequência, as isoenzimas são expressas em tecidos ou organelas diferentes, ou em estágios diferentes do desenvolvimento (Berg *et al.*, 2008).

A  $\alpha$ -Gal B ( $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidase, EC 3.2.1.49, também conhecida como  $\alpha$ -NAGAL) compartilha 46% de semelhança em sua cadeia polipeptídica com a  $\alpha$ -Gal A e seus sítios ativos compartilham 11 dos 13 aminoácidos (Tomasic *et al.*, 2010). A  $\alpha$ -Gal B é codificada pelo gene NAGA, que está localizado no cromossomo 22q13.1-13.2 (Blanchon, *et al.*, 2002). A deficiência de  $\alpha$ -Gal B leva à doença de Schindler, cujos fenótipos estão divididos em três classes. O tipo I é uma desordem neurodegenerativa infantil grave, o tipo II, se manifesta na idade adulta e leva a alterações cognitivas e angioqueratomas, e o tipo III inclui uma série de sintomas, como convulsões, autismo e/ou cardiomiopatia (Clark e Garman, 2009).

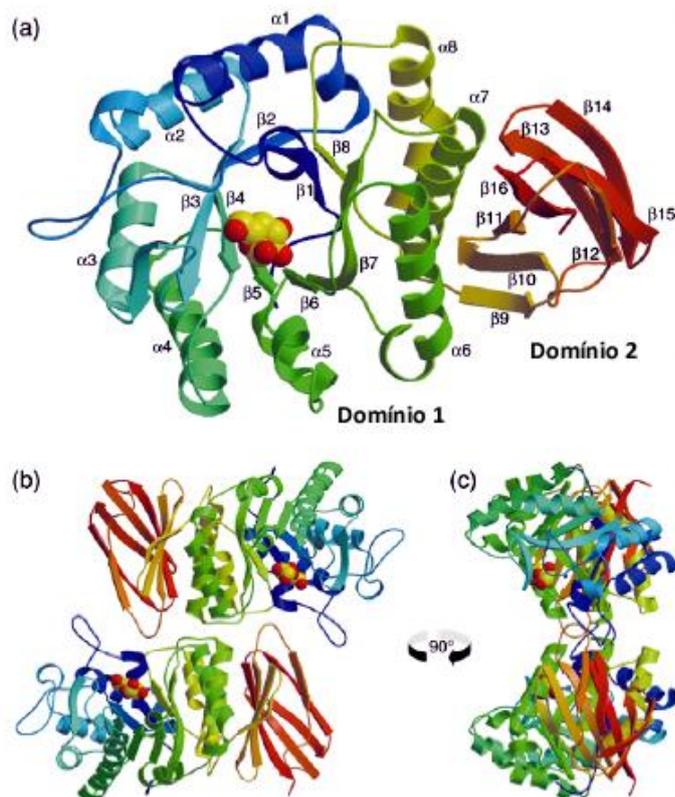


**Figura 3:** Reação catalisada pela  $\alpha$ -Gal (adaptado de Garman e Garboczi, 2004).

### 1.3 ALFA-GALACTOSIDASE A

#### 1.3.1 Aspectos bioquímicos

A Alfa-galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A) humana (Figura 4) é uma enzima lisossômica de aproximadamente 101 kDa em sua estrutura homodimérica (Schiffman *et al.*, 2000; Scriver, *et al.*, 2001). O monômero da  $\alpha$ -Gal A possui 429 resíduos de aminoácidos (Pereira *et al.*, 2007) e é composto de dois domínios: um domínio catalítico  $\beta/\alpha$  (domínio 1) e um domínio C-terminal regulatório, contendo 8 folhas  $\beta$ -pregueadas antiparalelas (domínio 2). O domínio 1 se estende do resíduo de aminoácido 32 ao 330 e contém o sítio ativo formado pela ponta C-terminal da folha  $\beta$  no centro do barril. O domínio 2 compreende os resíduos 331 ao 429 (Garman e Garboczi, 2004).



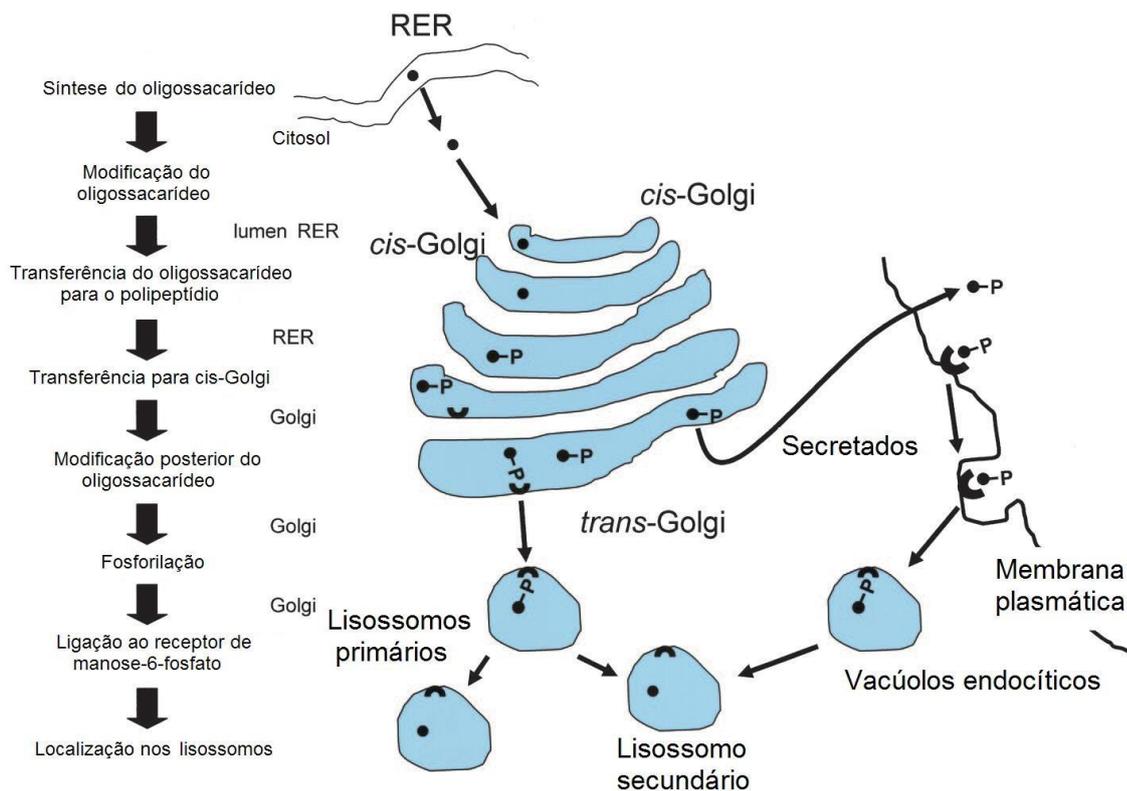
**Figura 4:** (a) Monômero da enzima  $\alpha$ -galactosidase A. A região N está colorida de azul e a região C terminal está colorida de vermelho. O sítio ativo da enzima está localizado no domínio 1 no centro das folhas  $\beta$  pregueadas dentro do barril  $(\beta/\alpha)_8$ , enquanto que o domínio 2 possui folhas  $\beta$  pregueadas antiparalelas. O ligante de galactose está mostrado nos átomos vermelhos e amarelos. (b) e (c) Dímeros de  $\alpha$ -galactosidase (Garman e Garboczi, 2004).

A  $\alpha$ -Gal A é responsável pela quebra da globotriosilceramida (Gb3) e outros glicoesfingolípídeos no interior dos lisossomos (Schiffman *et al.*, 2000; Scriver *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2007; Pereira, *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2007) Estes glicoesfingolípídeos possuem um resíduo terminal  $\alpha$ -galactosil e são componentes de grande parte das membranas celulares (Desnick e Brady, 2004; Kotnik *et al.*, 2005; Utsumi *et al.*, 2005; Auray-Blais *et al.*, 2006). A enzima é uma glicoproteína que contém de 5 a 15% de asparagina e cadeias de oligossacarídeos de manose (Scriver, *et al.*, 2001) e pode se apresentar de várias formas, sendo estas diferindo entre si na quantidade de ácido siálico nas cadeias de carboidrato (Clarke, 2007).

### 1.3.2 Aspectos celulares

O polipeptídeo primário sofre o processo de glicosilação no retículo endoplasmático e modificação do oligossacarídeo, incluindo a fosforilação de resíduos de manose necessários para o endereçamento da  $\alpha$ -Gal A para o seu sítio de ação no lisossomo (Schiffman *et al.*, 2000; Clarke, 2007).

O resíduo de manose-6-fosfato (M6P) se liga a um receptor específico no aparato de Golgi e em seguida é direcionado a compartimentos pré-lisossômicos. Enzimas que escapam desta via são secretadas pela célula através de uma via secretória constitutiva e são recapturadas pelos receptores de M6P na superfície celular que devolvem a  $\alpha$ -Gal A ao lisossomo através da via endocítica (Figura 5) (Schiffman *et al.*, 2000; Clarke, 2007).



**Figura 5:** Seqüência de eventos na biossíntese e tráfego da  $\alpha$ -Gal A. Moléculas de  $\alpha$ -Gal A nascentes estão mostradas como círculos sólidos. P= fosforilação de resíduos de manose; RER= Retículo endoplasmático rugoso (adaptado de Clarke, 2007).

Muitos estudos demonstram que algumas mutações no gene codificador da  $\alpha$ -Gal A (*GLA*) resultam na desestabilização, agregação, e degradação prematura de uma enzima mutante cataliticamente ativa. Estratégias direcionadas para prevenção da degradação prematura da proteína mutante através de chaperonas que estabilizam essa proteína têm demonstrado um aumento substancial na atividade residual da  $\alpha$ -Gal A (Clarke, 2007).

As chaperonas farmacológicas são capazes de se ligar à enzima recém-sintetizada, permitindo o tráfego apropriado para o lisossomo e melhorando a sua estabilidade. Estudos clínicos da terapia com chaperonas farmacológicas para a doença de Fabry, bem como para outras doenças lisossômicas de depósito (DLD), já iniciaram, no entanto, somente foram publicados dados para poucas proteínas mutantes. As chaperonas, no entanto, possuem pouco ou nenhum efeito sobre enzimas originadas por mutações sem sentido ou mudança na matriz de leitura, que geram um códon de parada prematuro, e podem ser mais benéficas para aquelas proteínas que sofreram troca de um único aminoácido (Shin *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2009).

Uma das chaperonas farmacológicas conhecidas para a  $\alpha$ -Gal A é o carboidrato 1-deoxigalactonojirimicina (DGJ, também conhecido como migalastat), um análogo do terminal de galactose do GB3 que pode se ligar ao sítio ativo da enzima de forma seletiva e reversível, tanto na  $\alpha$ -Gal A selvagem quanto na mutante. A ligação do DGJ estabiliza a estrutura da enzima aumentando a habilidade da enzima recém-formada de passar pelo sistema de controle de qualidade do retículo endoplasmático e do tráfego lisossomal, reduzindo o acúmulo de GB3 tanto em células de cultura quanto *in vivo* (Wu *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Aspectos moleculares

O gene *GLA* é composto de 12 kb divididos em 7 éxons e está localizado na região Xq21.33-Xq22 do braço longo do cromossomo X (Masson, *et al.*, 2003, Jardim *et al.*, 2006, Pereira, *et al.*, 2007). Mais de 450 mutações já foram identificadas neste gene, incluindo mutações de ponto, de sentido trocado, sem sentido, pequenas deleções/inserções e rearranjos (Masson *et*

*al.*, 2003; Shin *et al.*, 2007; Filoni *et al.*, 2010). Mutações no gene *GLA* causam a doença de Fabry, uma DLD de herança ligada ao cromossomo X pertencente ao grupo das esfingolipidoses (Schiffman *et al.*, 2000; Scriver *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2007; Pereira, *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2007).

#### 1.4 DOENÇA DE FABRY

A doença de Fabry (OMIM 301500) é causada pela deficiência da  $\alpha$ -Gal A, o que leva ao acúmulo progressivo de Gb3 no plasma e nos lisossomos da maioria das células no organismo (Desnick e Brady, 2004; Kotnik *et al.*, 2005; Utsumi *et al.*, 2005; Auray-Blais *et al.*, 2006).

Depois da doença de Gaucher, a doença de Fabry é a segunda DLD mais frequente (Mohrenschlager, 2004, Cordeiro *et al.*, 2007; Pereira, *et al.*, 2007). No entanto essa frequência é muito variável de população para população, podendo ser de 1:40.000 a 1:117.000 na população geral (Porsch, *et al.*, 2008). Na Itália, por exemplo, a prevalência chega a 1 para cada 3.100 recém-nascidos e em Taiwan chega a 1 para cada 1.500 recém-nascidos do sexo masculino (Germain, 2010). A maioria dos casos dessa afecção foi descrita em caucasianos, mas ela é considerada pan-étnica, com descrição em casos de hemizigotos africanos, hispânicos, asiáticos, norte americanos e europeus (Desnick *et al.*, 2001).

##### 1.4.1 Achados clínicos

A doença de Fabry pode apresentar dois fenótipos. O fenótipo clássico (ou grave) não apresenta atividade da  $\alpha$ -Gal A detectável nos tecidos, causando uma doença multissistêmica, enquanto que o fenótipo leve apresenta atividade residual da  $\alpha$ -Gal A e os seus sintomas estão restritos a anormalidades renais ou cardíacas a partir da sexta década de vida (Germain *et al.*, 2002; Garman e Garboczi, 2004; Kotnik *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2007).

A expressão do fenótipo clínico em mulheres heterozigotas portadoras é variável, sendo algumas assintomáticas e outras manifestando sintomas

graves da doença, incluindo o envolvimento renal, como observado nos pacientes clássicos do sexo masculino (Schiffman *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2007).

Na primeira década de vida, as dores neuropáticas típicas começam nas mãos e nos pés e se irradiam para o resto dos membros (acroparestesia). Esses episódios de dor são chamados “crises de Fabry” que podem durar de minutos a semanas, sendo apresentado por 80% a 90% dos pacientes que possuem o fenótipo clássico (Desnick e Brady, 2004).

A presença de angioqueratomas, um tipo de manifestação cutânea, é o sintoma clínico mais característico e é decorrente do depósito de glicosíngolipídios nas células endoteliais dos vasos cutâneos, causando seu inchaço e aumento da pressão nessa região. Hipohidrose ou anidrose podem aparecer durante a infância ou adolescência e é decorrente do acúmulo do Gb3 nas células das glândulas sudoríparas e em vasos sanguíneos associados (Martínez *et al.*, 2004).

Os angioqueratomas surgem na infância ou na adolescência e são caracterizados por pequenas manchas palpáveis de coloração vermelha a púrpura, que são mais comumente encontradas entre o umbigo e o joelho (Desnick e Brady, 2004).

A disfunção renal crônica (IRC) é a causa mais frequente de morbidade na doença de Fabry, sendo a falência renal a principal causa de morte. A deterioração gradual da função renal e a hipertensão arterial normalmente ocorrem entre a terceira e a quinta décadas de vida, mas podem se manifestar antes deste período. Dessa forma, pode ser necessária a realização de diálise ou transplante de rins em pacientes com insuficiência renal crônica diagnosticados tardiamente (Schiffman *et al.*, 2000; Warnock, 2005; Porsch, 2008). A IRC é considerada uma doença complexa que leva à perda, normalmente lenta e progressiva, da capacidade excretora dos rins, ou seja, ocorre uma redução progressiva da filtração glomerular que é o mecanismo principal para excretar metabólitos tóxicos do organismo. Os principais sinais de IRC são HAS, anemia, alterações hidroeletrólíticas, acidose, proteinúria, entre outros (Bezerra e Santos, 2008; Grimoldi *et al.*, 2008).

Os tratamentos disponíveis nas doenças renais terminais são: a diálise peritoneal ambulatorial contínua, diálise peritoneal automatizada, diálise

peritoneal intermitente, hemodiálise e o transplante renal. (Martins e Cesarino, 2005). Uma das principais causas de morbi-mortalidade em pacientes com IRC são as doenças cardiovasculares, principalmente naqueles pacientes que fazem diálise (Levin, 2003).

No ano de 2010, 92.091 pacientes realizaram diálise em todo o Brasil, (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2010) sendo a hemodiálise o tipo de tratamento mais usado (89,4%) (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2008). Estudos brasileiros com pacientes hemodialisados, do sexo masculino, cuja IRC não possuía causa aparente, mostraram uma prevalência de 0,52% da doença de Fabry no Rio Grande do Norte, enquanto que no Rio Grande do Sul foi encontrada uma prevalência de 0,36% (Marinho *et al.*, 2007; Porsch, *et al.*, 2008).

O envolvimento cardíaco também é freqüente e a gravidade aumenta no decorrer da idade. Os sinais e sintomas cardíacos se devem ao acúmulo do Gb3 nos miócitos e fibrócitos das válvulas cardíacas e no marca passo cardíaco. O achado mais comum no exame por ultrassonografia é a hipertrofia do ventrículo esquerdo não associada a disfunções sistólicas ou diastólicas (Martínez *et al.*, 2004).

Manifestações cerebrovasculares aumentam com a idade e consistem em trombose, ataque isquêmico transitório, isquemia e aneurismas na artéria basilar, convulsões, hemiplegia, hemianestesia, afasia, distúrbios do labirinto ou hemorragia cerebral. Estes achados decorrem de lesões multifocais em pequenos vasos sanguíneos (Martínez *et al.*, 2004).

Os achados oftalmológicos incluem alterações conjuntivais (dilatação e tortuosidade vasculares, irregularidade no calibre e aneurisma), alterações retinianas e do cristalino, e a mais comum (encontrada em quase todos os homens hemizigotos e em cerca de 70% a 90% das mulheres heterozigotas) é a córnea verticilata, que é descrita como opacidades amareladas caracterizadas por uma ou mais linhas irradiando de um ponto próximo ao centro da córnea, sem comprometer a acuidade visual (Cordeiro *et al.*, 2007).

Outros achados também podem ser encontrados na doença de Fabry, como obstrução pulmonar, linfedema, alterações gastrointestinais, esqueléticas e musculares (Martínez *et al.*, 2004).

### 1.4.2 Diagnóstico Bioquímico

Todos os hemizigotos suspeitos de doença de Fabry devem ser confirmados bioquimicamente através da demonstração da deficiência da atividade da  $\alpha$ -Gal A no plasma ou soro, leucócitos, lágrimas, biópsias de tecido ou cultura de fibroblastos ou linfoblastos, podendo ser diagnosticada também durante a gestação por cultura de células fetais e de fluidos amnióticos obtidos por amniocentese e por análise de vilosidades coriônicas (Scriver *et al.*, 2001). Existem também novas técnicas capazes de dosar o Gb3 total em amostras de urina e analisadas por cromatografia líquida, imunofluorescência e espectrometria de massa em tandem (Utsumi *et al.*, 2005; Auray-Blais *et al.*, 2006).

Recentemente, amostras em papel filtro vêm sendo utilizadas para a realização do ensaio enzimático para a  $\alpha$ -Gal A bem como para outras DLD (Jardim *et al.*, 2006; Lukacs *et al.*, 2007).

### 1.4.3 Diagnóstico Molecular

Testes moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento direto do gene são necessários para detectar mulheres portadoras, visto que a atividade da  $\alpha$ -Gal A em heterozigotas muitas vezes se apresenta em níveis normais. O isolamento e seqüenciamento do DNA codificante (cDNA) e da sequência genômica da  $\alpha$ -Gal A tem facilitado a caracterização das mutações causadoras da doença de Fabry, facilitando o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal (Germain *et al.*, 2002).

### 1.4.4 Tratamento

Até o advento da terapia de reposição enzimática, a doença de Fabry era tratada com medidas paliativas. Na maioria dos pacientes, a acroparestesia pode ser controlada com analgésicos. Agentes anticoagulantes orais são

recomendados em casos especialmente suscetíveis a acidentes vasculares cerebrais (Peters *et al.*, 2001).

Medidas gerais, como controle da hipertensão arterial sistêmica (HAS) e restrição da ingestão protéica podem se recomendadas. Porém, nenhuma dessas medidas tem impacto significativo sobre a progressão da doença e a melhoria na qualidade de vida do paciente. Essas medidas não são eficazes, uma vez que não evitam o acúmulo progressivo do substrato Gb3 que constitui a principal causa da doença de Fabry (Peters *et al.*, 2001).

Outros tratamentos sintomáticos incluem o uso de carbamazepina para a dor neuropática, terapia a laser para as manifestações cutâneas e diálise e transplante de rins para os casos de falência renal (Martínez *et al.*, 2004).

Estudos clínicos de fase I, II, III e IV mostraram que as enzimas recombinantes  $\alpha$ -Galactosidase (Replagal<sup>®</sup>) e  $\beta$ -Galactosidase (Fabrazyme<sup>®</sup>) são as opções terapêuticas mais específicas para o tratamento da Doença de Fabry. Após o início da terapia de reposição enzimática 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 (Boissier, 2001).

Estas duas glicoproteínas recombinantes (Replagal<sup>®</sup> e Fabrazyme<sup>®</sup>) possuem seqüências de aminoácidos idênticas, mas são produzidas em diferentes linhagens celulares, resultando em uma glicosilação diferente no sítio de ligação do carboidrato. A glicoproteína Replagal<sup>®</sup> é produzida em uma linhagem celular humana geneticamente manipulada, enquanto que a Fabrazyme<sup>®</sup> é produzida em uma linhagem celular de ovários de hamster chinês (Garman e Garboczi, 2004).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Implantação de um protocolo laboratorial que permita o diagnóstico da doença de Fabry em plasma e leucócitos, visando o estudo das características cinéticas da enzima  $\alpha$ -Gal A em plasma e busca ativa da doença em indivíduos com IRC.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o ensaio enzimático para a enzima  $\alpha$ -Gal A em plasma e leucócitos em uma amostra de indivíduos sadios voluntários;
- Realizar um estudo cinético da enzima  $\alpha$ -Gal A em plasma de indivíduos hígidos;
- Avaliar a reprodutibilidade e a estabilidade do método fluorimétrico.
- Investigar a atividade da enzima  $\alpha$ -Gal A em pacientes com insuficiência renal crônica

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E CASUÍSTICA

As amostras estudadas foram compostas por 50 indivíduos para a padronização da técnica em plasma, 30 para padronização em leucócitos e 20 para a análise cinética, sendo todos esses hígidos, que concordaram em participar do estudo voluntariamente, sendo o número de homens e mulheres em igual proporção. Foram também estudados 25 pacientes do sexo masculino, maiores de 18 anos com IRC de causa indeterminada e em tratamento de hemodiálise provenientes do Hospital de Clínicas Gaspar Vianna (HCGV) e do Hospital Ophir Loyola (HOL), da cidade de Belém-PA. Estes pacientes foram selecionados com a ajuda dos médicos nefrologistas responsáveis por cada setor de hemodiálise além de contar com a seleção e avaliação dos prontuários médicos de cada paciente. Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico definido, como diabetes, lúpus e glomerulonefrites. Os indivíduos que apresentaram estes critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo através de contato por carta (Apêndice A). As declarações de aceite das instituições citadas estão nos Anexos C e D. Também foi realizado um questionário clínico (Apêndice C) em seguida, a coleta das amostras.

#### 3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a padronização, tanto em plasma quanto em leucócitos, foram coletados 10 mL de sangue venoso em seringa. Para cada etapa do estudo cinético, foram coletados 20 mL de sangue e para o grupo com IRC foram coletados 10mL de sangue para separação de plasma, sendo este último visando somente a triagem dos pacientes. Os leucócitos e plasma foram armazenados à temperatura de  $-20^{\circ}$  C até o momento do ensaio enzimático para  $\alpha$ -Gal A (com exceção àquelas utilizadas para o estudo de reprodutibilidade) e todas as amostras foram coletadas com heparina.

### 3.3 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Todos os protocolos laboratoriais estão descritos integralmente no anexo A.

#### 3.3.1 Padronização do ensaio enzimático em leucócitos

Para a análise enzimática em leucócitos é necessário separá-los do sangue total e em seguida lisar as membranas celulares a fim de liberar o conteúdo intracelular para a mensuração da enzima.

##### **A) Separação e lise de leucócitos (Skoog e Beck, 1956).**

Inicialmente é preparada uma solução de separação de leucócitos, composta de ácido cítrico dextrose (ACD), dextran 6% e glicose 5%

➤ Procedimento:

Misturar por inversão 10mL de sangue heparinizado e 10 mL da mistura para separação de leucócitos e aguardar a sedimentação dos eritrócitos por 45 a 60 minutos. Transferir o sobrenadante para um tubo de centrífuga cônico plástico, gelado, e centrifugar a 2000 RPM por 10 minutos a 4°C. A partir deste momento, as amostras devem ser mantidas imersas em gelo.

Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e fazer sucessivas lavagens com NaCl 0,9%, água destilada gelada e NaCl 3,6% seguidas de centrifugação a 3000 RPM por 5 minutos a 4°C, até a formação de um pellet livre de eritrócitos. Esse pellet deve ser dissolvido em água destilada gelada e armazenado a -40°C.

➤ Lise de leucócitos:

Lisar as amostras em sonicador (Bandelin Sonopuls). O ultrassom é capaz de lisar as membranas celulares, liberando seu conteúdo intracelular e permitindo assim a mensuração da atividade enzimática lisossomal.

**B) Dosagem de proteínas (adaptado de Lowry *et al*, 1951).**

A dosagem de proteínas é necessária para nivelar os valores de proteínas inerentes a cada indivíduo a fim de gerar um valor de atividade enzimática em função do valor total de proteínas.

➤ Reagentes:

- a) Folin Ciocalteau
- b) Reativo Alcalino de Cobre:
  - 1. 10mL de carbonato de sódio 2% com NaOH 0,1M;
  - 2. 0,1mL de sulfato de cobre 1%;
  - 3. 0,1mL de tartarato de sódio e potássio.
- c) Albumina de soro bovino

➤ Procedimento:

Em um tubo de ensaio, colocar 20µL da solução de leucócitos e adicionar água destilada para completar o volume de 500 µL. Fazer uma curva de albumina contendo 5 pontos de concentração (20%; 40%; 60%; 80% e 100%) e o branco (0%).

Adicionar 1,5 mL de reativo alcalino de cobre em todos os tubos (testes e pontos da curva) sob agitação em vortex. Cronometrar 10 minutos a partir do primeiro tubo. Depois de decorrido o tempo, adicionar rapidamente e sob agitação em vortex, 150 µL de Folin. Cronometrar 30 minutos a partir do primeiro tubo. Ler a absorbância em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000 UV) a 750nm, zerando com água destilada.

➤ Cálculos:

Coeficiente médio (QM) = Concentração / Absorbância - Branco

Concentração ( $\mu\text{g}$  de proteína/100 $\mu\text{L}$ ) = QM x Absorbância x 5

### **C) Curva de Metilumbeliferona (MU)**

A curva de MU é utilizada como um padrão, visto que as concentrações da MU são obtidas, para a geração de um coeficiente médio (QM) que é utilizado posteriormente para calcular a quantidade de substrato clivado pela enzima.

Os pontos de concentração de MU utilizados na curva são:

- a. Branco (Br);
- b. 0,5 nmol;
- c. 1 nmol;
- d. 2 nmoles;
- e. 3 nmoles.

Os pontos são dissolvidos em tampão Glicina-NaOH 0,5M em pH 10,3 além do tubo branco.

Os pontos da curva são obtidos a partir de espectrofluorímetro (Spectrumlab F95) com comprimento de onda 365nm (excitação) e 450nm (emissão), no momento do ensaio enzimático em leucócitos.

➤ Cálculos:

Cálculo do QM: Concentração MU / (Fluorescência – Br).

### **D) Ensaio enzimático**

O fundamento da técnica se baseia na clivagem do substrato artificial pela enzima, liberando um radical fluorescente que pode ser quantificado. A reação se dá em pH ácido, pelo fato da  $\alpha$ -Gal A ser uma enzima lisossômica, e a reação é interrompida quando adicionado um tampão alcalino.

➤ Procedimento:

Dissolver 1,69 mg do substrato artificial 4-metilumbeliferil-alfa-D-galactopiranosídeo em 1 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,8, com aquecimento . O procedimento está descrito no quadro 1.

**Quadro 1** – Procedimento laboratorial para o ensaio enzimático de  $\alpha$ -Gal A em leucócitos

	Teste	Branco do Teste
Amostra	20 $\mu$ L	-
Água destilada	-	20
Substrato	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L
Incubar a 37°C por 2 horas.		
Tampão Glicina-NaOH 0,5 M pH 10,3	1,5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L
Ler fluorescência em espectrofluorímetro (Spectrumlab F95): comprimento de onda 365nm (excitação) e 450nm (emissão). Usar a curva de 4-metilumbeliferona.		

**Cálculo**

$$\text{nmoles/h/mg proteína} = \Delta F \times Q_m \times 2500 / \text{proteína}$$

**3.3.2 Padronização do ensaio enzimático em plasma**

O fundamento da técnica é o mesmo do protocolo para leucócitos, no entanto, como se trata de plasma, é necessário fazer uso de um inibidor para a isoenzima  $\alpha$ -Gal B, para que não haja interferentes desta enzima na quantidade de substrato clivado (Morgan, *et al.*, 1990).

➤ Procedimento:

Dissolver 3,38 mg do substrato 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,5 M de pH 4,8, com aquecimento. Em seguida adicionar 44,2 mg do inibidor para a  $\alpha$ -Gal B (N-aceti-D-galactosamina). O procedimento está descrito no quadro 2.

**Quadro 2** – Procedimento laboratorial para o ensaio enzimático de  $\alpha$ -Gal A em plasma

	Teste	Branco do Teste
Amostra	100 $\mu$ L	-
Substrato com inibidor	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incubar a 30°C por 2 horas.		
Parar a reação com 1 mL de tampão glicina 1 M pH 10,4. Adicionar 100 $\mu$ L de amostra nos brancos.		
Preparar padrão e branco do padrão para cada amostra.		
Branco do padrão	Padrão	
200 $\mu$ L de água	200 $\mu$ L de metilumbeliferona	
0,9 mL de glicina	0,9 mL de glicina	
100 $\mu$ L de plasma	100 $\mu$ L de plasma	
Ler fluorescência em espectrofluorímetro (Spectrumlab F95): comprimento de onda 365nm (excitação) e 450nm (emissão).		

**Cálculo**

$$\text{Padrão} - \text{Br padrão} = \Delta P$$

$$Q_m = [\text{MU}] / \Delta P$$

$$\Delta T \times Q_m \times 5 = \text{nmoles/h/mL}$$

3.4 ANÁLISE CINÉTICA DA  $\alpha$ -GAL A

Todas as dosagens foram realizadas em plasma e em duplicata, com exceção do item 3.5.

### **3.4.1 Termoestabilidade**

Foram utilizadas 3 amostras ( $\approx$  9 mL de plasma para cada amostra) que foram aliqüotadas em 0,8 mL. Uma aliqüota foi o controle e as restantes passaram por um processo de pré-incubação a 60°C, nos seguintes períodos de tempo: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

### **3.4.2 Determinação do tempo de incubação adequado**

Foram utilizadas 3 amostras ( $\approx$  5 mL de plasma para cada amostra) que foram aliqüotadas em 0,8 mL. Uma aliqüota foi o controle e as restantes, durante o ensaio enzimático, passaram por diferentes períodos de tempo de incubação com o substrato. Foram eles: 15 minutos, 30 minutos, 1, 1,5, 2, 2,5 horas.

### **3.4.3 Determinação do pH ótimo (ou faixa) para atividade da $\alpha$ -Gal A**

Foram utilizadas amostras de 5 indivíduos ( $\approx$  7 mL de plasma para cada amostra). Estas amostras foram aliqüotadas em 0,8 mL. O substrato e o inibidor foram dissolvidos em soluções com os seguintes pH: 2; 3,8; 4,3; 4,8; 5,3; 5,8; 6,3 e 7.

### **3.4.4 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) a partir de diferentes concentrações do substrato**

Foram utilizadas amostras de 5 indivíduos ( $\approx$  7 mL de plasma para cada amostra). Estas amostras foram aliqüotadas em 0,8 mL e cada aliqüota foi utilizada para uma diferente concentração do substrato. As seguintes concentrações testadas foram obtidas através de diluições seriadas: 15,6 $\mu$ M, 31 $\mu$ M, 62,5 $\mu$ M, 0,125mM, 0,25mM, 0,5mM, 1mM e 2mM.

### 3.5 REPRODUTIBILIDADE

Foram utilizadas amostras de 3 indivíduos ( $\approx$  9 mL de plasma para cada amostra). O ensaio enzimático foi realizado logo após a coleta, e em seguida as amostras foram divididas e armazenadas em alíquotas de 0,4 mL de 3 formas diferentes: geladeira (4°C), freezer -20°C e freezer -70°C. A cada mês foi realizado o ensaio enzimático, por um período de 6 meses.

### 3.6 ESTABILIDADE DA FLUORESCÊNCIA

Foram utilizadas amostras de 3 indivíduos e o ensaio enzimático foi realizado de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.2. Foi realizada a leitura imediatamente após o término da reação, e a cada 1 hora por um período de 6 horas. Outra leitura foi realizada 24 horas depois. Os ensaios foram mantidos em temperatura ambiente durante as medições.

### 3.7 TRIAGEM DOS PACIENTES COM IRC DE CAUSA DESCONHECIDA

#### 3.7.1 Aspectos Éticos

Este trabalho leva em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça, o que está de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Para tanto, a avaliação ética desta pesquisa se baseia em quatro pontos fundamentais: qualificação da equipe de pesquisadores e do próprio projeto; na avaliação da relação risco-benefício; no consentimento livre e esclarecido e na avaliação prévia por um Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 6.1).

A explicação detalhada dos objetivos do estudo foi realizada por médicos envolvidos no projeto ou pelo próprio pesquisador, através de um contato pessoal e uma carta convite com esclarecimento de todas as dúvidas levantadas pelo paciente ou seu responsável. Caso o convite para participação neste estudo por parte do paciente fosse aceito, seria fornecido o termo de

consentimento livre e esclarecido (Apêndice B), antes da coleta de qualquer material biológico.

O material biológico coletado foi utilizado apenas neste estudo. Ele ficou armazenado sob a responsabilidade do pesquisador responsável (coordenador do estudo) no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA, sendo este também responsável pela utilização do material.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi aplicado um questionário (Apêndice C) e realizada a coleta de sangue heparinizado. Estes procedimentos foram feitos durante uma das sessões de hemodiálise realizadas semanalmente pelos pacientes. Após o ensaio enzimático para a  $\alpha$ -Gal A, os laudos com os resultados (Apêndice D) foram entregues aos médicos responsáveis.

### **3.7.2 Riscos e benefícios do estudo**

A coleta da amostra biológica (punção venosa de sangue periférico) representa um risco mínimo para o paciente, visto que é um procedimento rotineiramente empregado para a análise de substâncias no sangue.

Caso houvesse resultados indicativos ou duvidosos de doença de Fabry, os médicos e pacientes seriam alertados sobre a hipótese diagnóstica e seria coletada nova amostra de sangue heparinizado para a confirmação diagnóstica em leucócitos. Estes casos seriam encaminhados para análise clínica, aconselhamento genético e informações sobre o tratamento adequado.

Como já citado anteriormente, o tratamento mais utilizado para a doença de Fabry é a terapia de reposição enzimática através da infusão por via intravenosa de enzimas recombinantes que suprem a falta da enzima fisiológica. As enzimas alfa-Algasidase (Replagal<sup>®</sup>) e a beta-Algasidase (Fabrazyme<sup>®</sup>) são as enzimas disponíveis para a terapia de reposição enzimática em pacientes com diagnóstico de Doença de Fabry.

## 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 3.8.1 Dados do estudo cinético

Para comparação de variações nas curvas de termoestabilidade, tempo de incubação, estabilidade da fluorescência e reprodutibilidade, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) do software Bioestat 5.0.

A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da reação foram determinadas através da equação de Lineweaver-Burk, utilizando o software GraphPad Prism 5.03.

### 3.8.2 Dados clínico-laboratoriais

Foram utilizados os testes “t” de *Student* (para comparação entre grupo controle e grupo teste), teste exato de Fisher (para comparação entre diferentes valores de referência) e teste do qui-quadrado (para comparação entre os gêneros) do software Bioestat 5.0 (Ayres *et al.*, 2003), com nível de significância igual a  $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$ . Dados de estatística descritiva foram realizados no software Microsoft Excel 2007. Para estabelecer os valores de referência foram utilizadas a média mais dois desvios padrões, com arredondamento.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCLO ENZIMÁTICO PARA $\alpha$ -Gal A E IMPLANTAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de todas as dosagens resultantes da padronização do ensaio enzimático para  $\alpha$ -Gal A, tanto em plasma como em leucócitos, estão listados no Apêndice E.

#### 4.1.1 Padronização do ensaio enzimático no plasma

O grupo controle contou com a participação de 25 homens e 25 mulheres, com idade entre 18 e 39 anos. A tabela 1 apresenta uma análise descritiva dos resultados da atividade enzimática da  $\alpha$ -Gal A e a tabela 2 apresenta a análise descritiva da dosagem enzimática obtida em homens e mulheres. O valor de referência estabelecido foi de 4 a 28 nmoles/h/mL e não houve diferença estatística entre os gêneros ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1** – Análise descritiva dos valores de  $\alpha$ -Gal A em plasma nos indivíduos do grupo controle.

<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>2 DP</b>
9,72	41,81	15,98	5,77	11,54

Valores expressos em nmoles/h/mL. DP (desvio padrão).

**Tabela 2** – Análise descritiva dos valores de  $\alpha$ -Gal A em homens e mulheres

	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Homens (25)</b>	9,74	23,95	15,57	3,59
<b>Mulheres (25)</b>	9,72	41,81	17,52	7,30

Valores expressos em nmoles/h/mL

#### 4.1.2 Padronização do ensaio enzimático em leucócitos

Foram analisadas amostras de 15 homens e 15 mulheres, com idade entre 18 e 40 anos. Os valores de proteínas encontrados foram de 214,53 a 571,71  $\mu\text{g}$  de proteína/100  $\mu\text{L}$ , com média de  $375,46 \pm 113,09$ . A tabela 3 apresenta uma análise descritiva geral dos resultados da atividade enzimática da  $\alpha$ -Gal A e a tabela 4 apresenta a análise descritiva da dosagem enzimática obtida em homens e mulheres. O valor de referência estabelecido foi de 20 a 96 nmoles/h/mg proteína e os valores foram estatisticamente diferentes entre os gêneros ( $P < 0,01$ ).

**Tabela 3** – Análise descritiva dos valores de  $\alpha$ -Gal A em leucócitos nos indivíduos do grupo controle.

<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>2 DP</b>
27,78	113,62	57,77	19,08	38,16

Valores expressos em nmoles/h/mg de proteína. DP (desvio padrão).

**Tabela 4** – Análise descritiva dos valores de  $\alpha$ -Gal A em homens e mulheres

	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Homens (15)</b>	27,78	79,22	59,14	13,20
<b>Mulheres (15)</b>	30,26	113,62	56,39	24,00

Valores expressos em nmoles/h/mg de proteína

## 4.2 ANÁLISE CINÉTICA EM PLASMA

### 4.2.1 Termoestabilidade

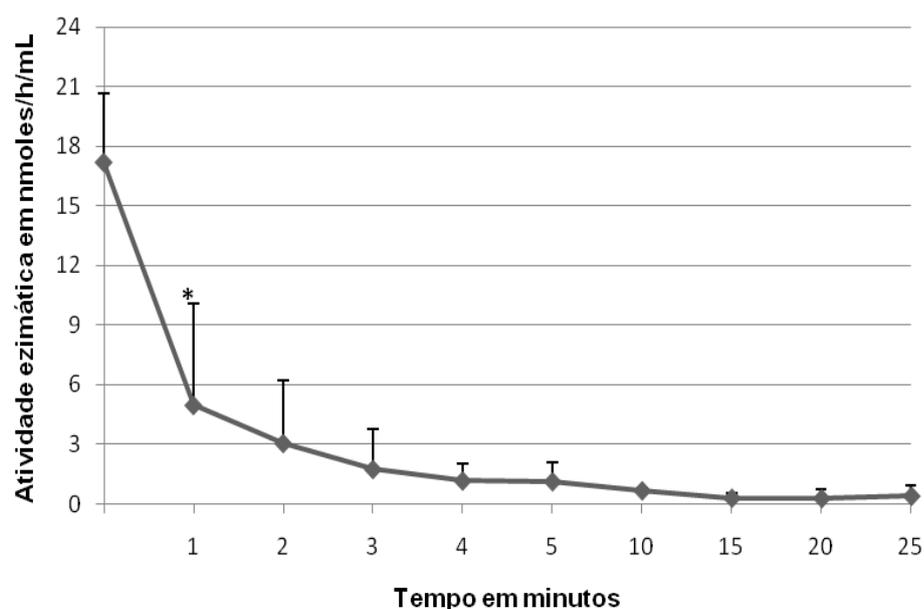
Os resultados, expressos em nmoles/h/mL estão listados na tabela 5 em média e desvio padrão.

A enzima demonstrou ser termolábil, visto que com 1 minuto de incubação a 60°C, a atividade enzimática apresentou 71,09% de queda com relação ao seu valor inicial (Figura 6).

**Tabela 5** – Análise descritiva dos valores de  $\alpha$ -Gal A para pré-incubação a 60°C

Tempo de pré-incubação*	Média	Desvio Padrão	% de decaimento da atividade enzimática
0	17,19	3,48	-
1	4,97	5,10	71,09
2	3,06	3,13	82,20
3	1,75	2,01	89,82
4	1,17	0,83	93,19
5	1,14	0,95	93,37
10	0,68	0,14	96,04
15	0,31	0,26	98,20
20	0,29	0,43	98,31
25	0,41	0,50	97,61

\*Tempo expresso em minutos e valores expressos em nmoles/h/mL



**Figura 6:** Curva de termoestabilidade. \* Estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao tempo 0.

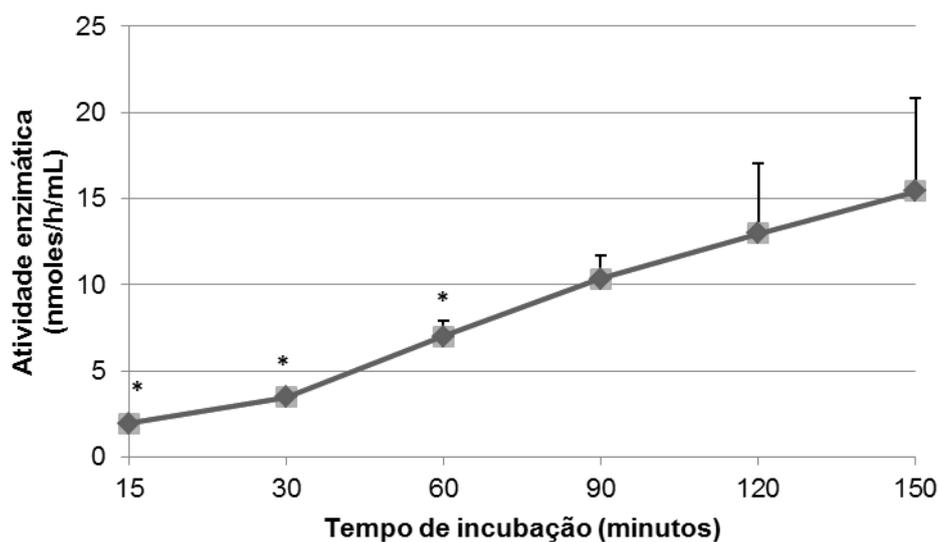
#### 4.2.2 Determinação do tempo de incubação adequado

A tabela 6 apresenta as médias e o desvio padrão e a Figura 7 demonstra graficamente os valores de atividade enzimática em função do tempo de incubação do ensaio enzimático.

**Tabela 6** – Análise descritiva dos valores de  $\alpha$ -Gal A, em nmoles/h/mL, em função do tempo de incubação.

Incubação*	Média	Desvio Padrão
15	1,96	0,46
30	3,46	0,55
60	7,00	0,90
90	10,33	1,34
120	12,99	4,09
150	15,43	5,43

\*Tempo expresso em minutos



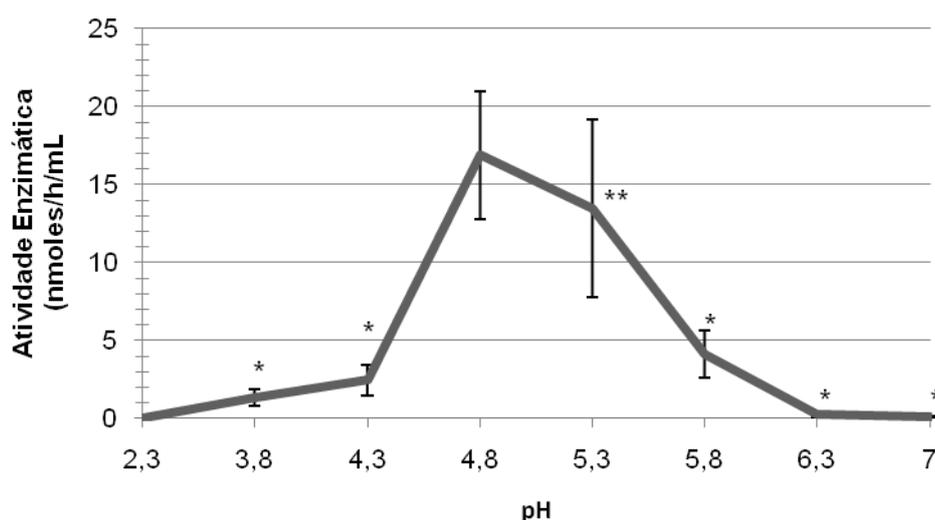
**Figura 7:** Atividade enzimática em função do tempo de incubação. \*  $p < 0,01$  quando comparado ao tempo descrito no protocolo (120 minutos).

#### 4.2.3 Determinação do comportamento da $\alpha$ -Gal A em diferentes pH

A enzima  $\alpha$ -Gal A se mostrou sensível a variações de pH. Sua atividade ótima se deu no pH 4,8 sendo, neste ponto, estatisticamente diferente de todos os outros pH testados (Figura 8). A tabela 7 apresenta as médias e os desvios padrões das 5 amostras analisadas em duplicata.

**Tabela 7** - Médias e desvios padrões da atividade enzimática, em nmoles/h/mL, em diferentes pH.

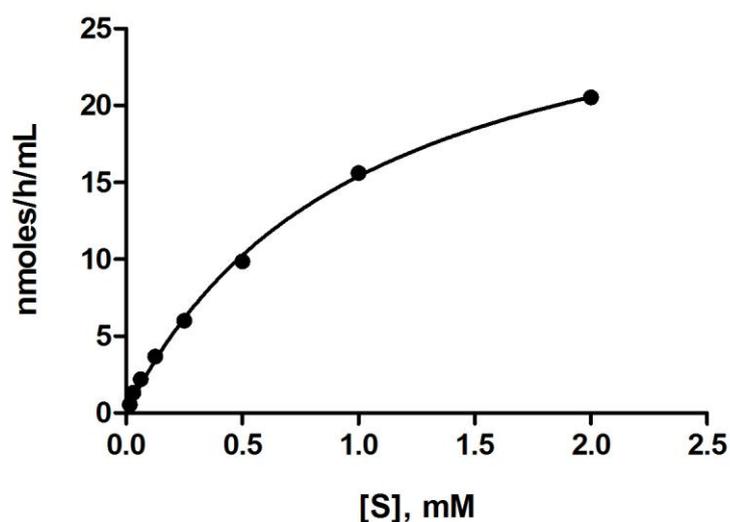
pH	Média	Desvio Padrão
2,3	0	0
3,8	1,33	0,52
4,3	2,47	0,96
4,8	16,89	4,11
5,3	13,46	5,69
5,8	4,13	1,51
6,3	0,26	0,18
7,0	0,1	0,1



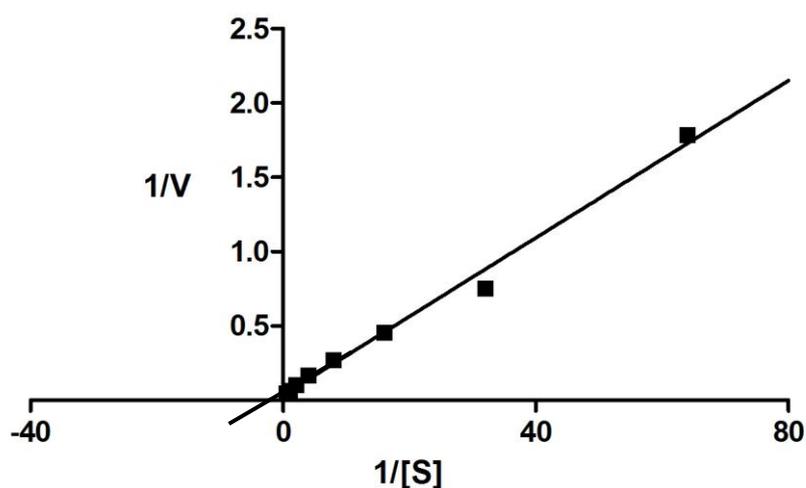
**Figura 8:** Atividade enzimática em diferentes pH. \* $p < 0,01$  quando comparado topo (pH 4,8). \*\* $p < 0,05$  quando comparado ao valor máximo mostrado no gráfico (pH 4,8).

#### 4.2.4 Curva de substrato: Determinação do $K_m$ e da $V_{m\acute{a}x}$

A enzima  $\alpha$ -Gal A apresentou um  $K_m$  igual a 1,007 mM e sua velocidade máxima de reação é de 30,9 nmoles/h/mL, como podem ser observados nas figuras 9 e 10, curva de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, respectivamente. Os valores de atividade enzimática estão listados no Apêndice G.



**Figura 9:** Curva de Michaelis-Menten, onde a concentração do substrato [S] que corresponde ao  $K_m$  da  $\alpha$ -Gal A é igual a 1,007 mM



**Figura 10:** Representação gráfica da curva de Lineweaver-Burk. O gráfico cruza o eixo Y no ponto que representa  $1/V_{m\acute{a}x}$  (0,0324) e o eixo X no ponto que representa  $-1/K_m$  (-0,993).

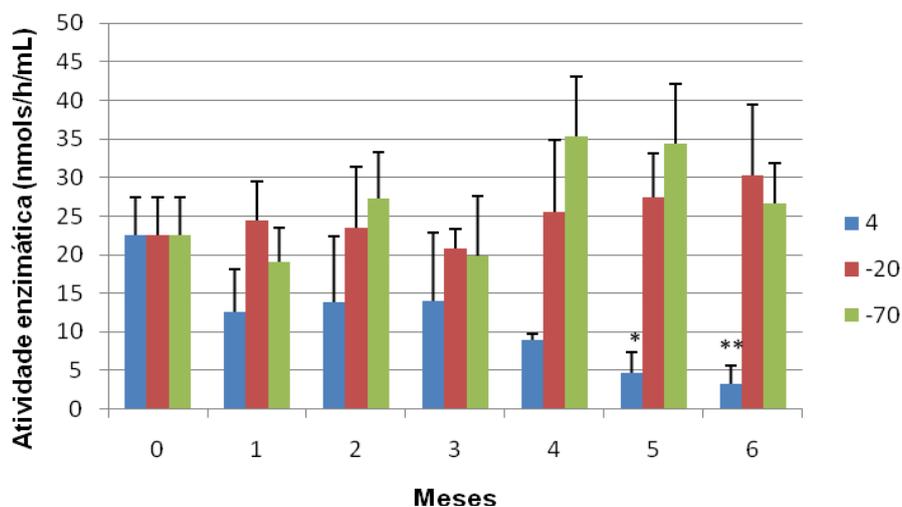
### 4.3 REPRODUTIBILIDADE

Foi observado que no quinto e sexto mês, houve uma queda significativa na atividade enzimática nas amostras armazenadas a 4 °C. A tabela 8 apresenta as médias e o desvios padrões dos valores encontrados e a figura 11 representa graficamente as médias e os desvios padrões dos valores de  $\alpha$ -Gal A logo após a coleta de sangue (tempo 0) e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses após esta coleta quando armazenadas em diferentes temperaturas (4°C, -20 °C e -70 °C).

**Tabela 8-** Médias e desvios padrões dos valores encontrados na avaliação de reprodutibilidade

Meses	4°C	-20°C	-70°C
0	22,49 ± 4,87	22,49 ± 4,87	22,49 ± 4,87
1	12,64 ± 5,49	24,36 ± 5,18	19,07 ± 4,39
2	13,78 ± 8,53	23,43 ± 8,02	27,21 ± 6,10
3	14,02 ± 8,84	20,81 ± 2,47	19,80 ± 7,75
4	8,93 ± 0,84	25,58 ± 9,25	35,39 ± 7,64
5	4,62 ± 2,81	27,47 ± 5,57	34,34 ± 7,74
6	3,33 ± 2,32	30,33 ± 9,03	26,59 ± 5,31

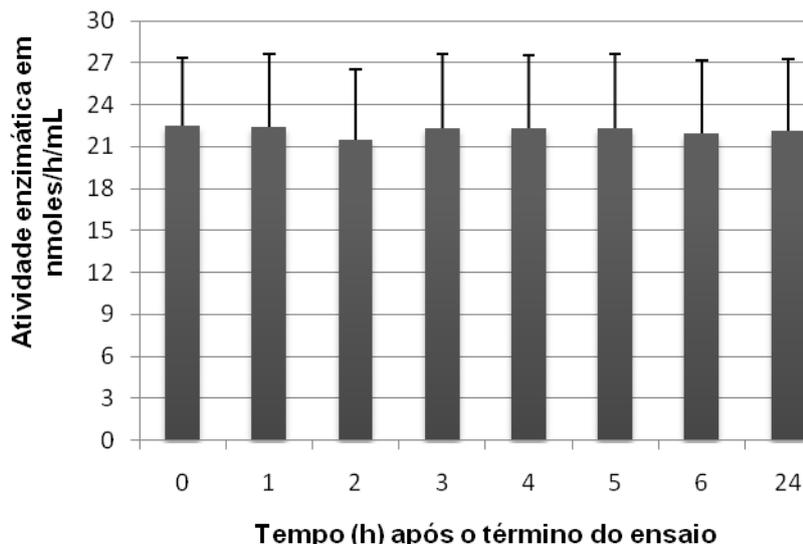
Valores expressos em nmoles/h/mL.



**Figura 11:** Atividade da  $\alpha$ -Gal A durante 6 meses nas amostras armazenadas em diferentes temperaturas. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao tempo 0. \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao tempo 0.

#### 4.4 ESTABILIDADE DA FLUORESCÊNCIA APÓS O TÉRMINO DO ENSAIO ENZIMÁTICO

As médias dos resultados obtidos foram de  $21,47 \pm 4,87$  a  $22,49 \pm 5,08$  nmoles/h/mL em um período total de 24 horas após o término do ensaio enzimático. Os resultados podem ser observados na Figura 12. Não houve diferença estatística entre os dados obtidos.



**Figura 12:** Estabilidade da fluorescência até 24 horas após o término do ensaio.

#### 4.5 PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS

Existem atualmente 63 pacientes em tratamento de hemodiálise no HCGV e 79 no HOL. Dentre os pacientes que preenchem os critérios de inclusão do estudo e que aceitaram participar do estudo, foram avaliados 25 indivíduos.

##### 4.5.1 Análise dos questionários

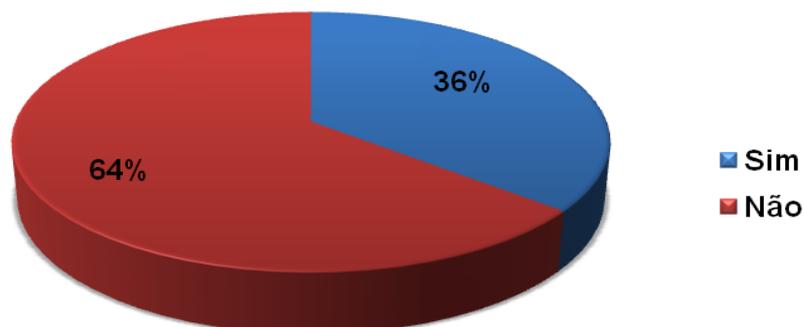
A idade dos 25 indivíduos variou de 18 a 78 anos (média de  $43,13 \pm 16,13$  anos) e a idade de início dos sintomas variou de 3 a 77 anos (média de  $29,17 \pm 18,38$  anos).

Apenas um indivíduo ainda estava em vias de iniciar a terapia hemodialítica e 9 indivíduos (36%) relataram possuir casos clínicos semelhantes na família (Figura 13). As manifestações clínicas mais freqüentemente encontradas foram hipertensão arterial sistêmica (64%), astenia (32%), edema (32%), alterações cardíacas (28%) e cefaléia (20%), como podem ser observadas na Figura 14. Nenhum indivíduo apresentou angioqueratomas. Os dados obtidos pelos questionários podem ser observados na tabela 9.

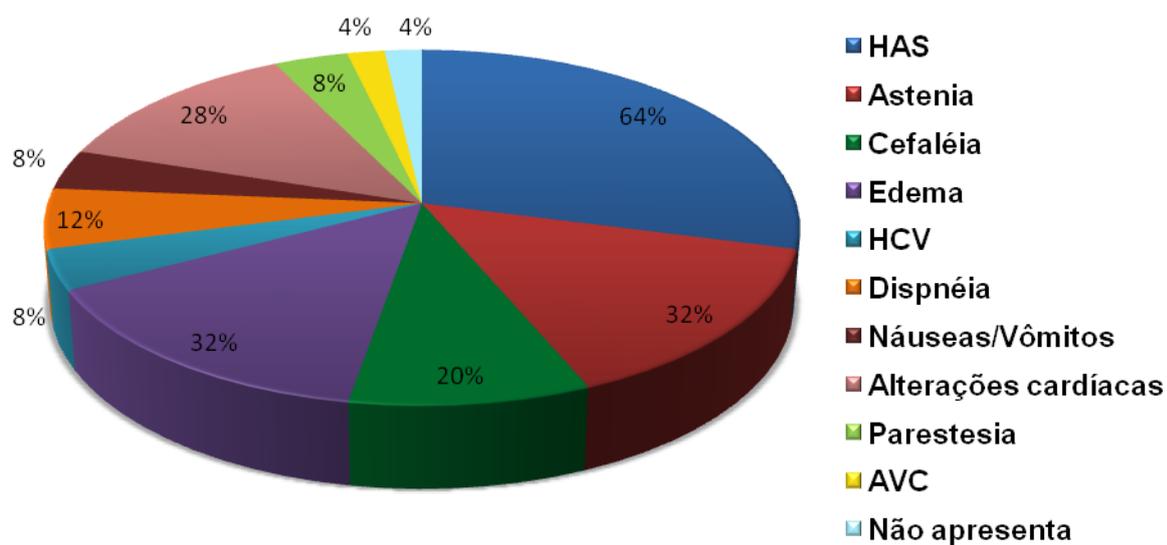
**Tabela 9** – Descrição dos dados coletados a partir dos questionários e fichas clínicas dos indivíduos com IRC.

Idade	Idade de Início dos Sintomas	Casos Semelhantes na Família	Angioqueratomas	Alterações Cardíacas	Outro tipo de manifestação
32	31	Sim	Não	Não	Não
33	27	Não	Não	Arritmias	Parestesias nas mãos, cefaléia, palidez, astenia, palpitações
46	40	Não	Não	Não	HAS e catarata
28	28	Não	Não	Não	Astenia, anemia
30	12	Não	Não	Não	HAS, edema, astenia, anemia, HBV
67	7	Sim	Não	Não	Dor lombar, tontura, náuseas, vômitos
20	15	Não	Não	Não	HAS, febre, cefaléia, edema
18	11	Não	Não	Não	Edema
39	17	Não	Não	Arritmias	HAS, dificuldade visual, anemia
58	3	Sim	Não	Não	HAS, astenia, palidez, mal estar
41	4	Não	Não	Miocardiópatia dilatada	HAS, AVC, edema, parestesia
26	26	Não	Não	Não	Catarata, astenia, dormência nos pés, vômitos, edema
68	42	Sim	Não	Palpitações e arritmia	HAS, nefroesclerose hipertensiva
35	27	Não	Não	Não	HAS, edema
26	22	Não	Não	Hipertrofia de VE <sup>5</sup>	HAS
37	6	Não	Não	Arritmia, pericardite	HAS, HCV
48	NI	Sim	Não	Cardiomegalia	Febre, edema, cefaleia
51	48	Sim	Não	Não	HAS, visão turva
59	52	Sim	Não	Hipertrofia miocárdica leve	HAS, cefaléia, artralgia nos pés
45	42	Não	Não	Não	HAS, obesidade, anemia
38	34	Não	Não	Leve hipertrofia de VE <sup>5</sup> e AE <sup>6</sup>	HAS, edema, astenia, dispneia
46	35	Não	Não	Não	HAS, astenia, falta de ar
54	53	Sim	Não	Não	Falta de ar
61	41	Não	Não	Não	Cálculo renal, cefaléia, dores no corpo, manchas no corpo
78	77	Sim	Não	Não	HAS, HCV, astenia, parkinsonismo, depressão

HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica); HBV (Vírus da Hepatite B); AVC (Acidente Vascular Cerebral); HCV (Vírus da Hepatite C); VE (Ventrículo esquerdo); AE (Átrio esquerdo); NI (Não informado).



**Figura 13:** Casos semelhantes na família.



**Figura 14:** Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes além da IRC.

Outras manifestações encontradas foram catarata, hepatite B, anemia, palidez, palpitações, obesidade, tontura, mal estar, febre, dores no corpo, manchas na pele, parkinsonismo, depressão, dificuldade visual, dormência e artralgia nos pés.

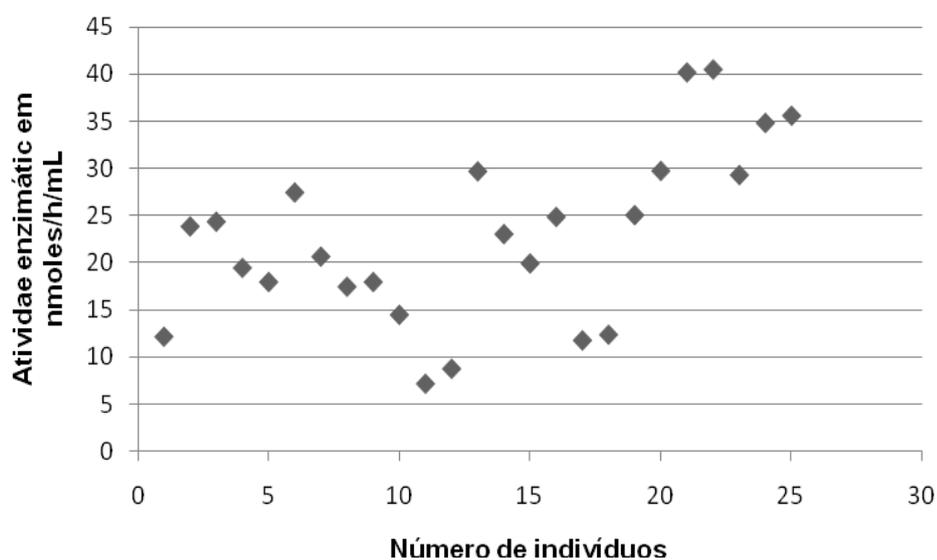
#### 4.5.2 Atividade enzimática de $\alpha$ -Gal A no plasma de indivíduos com IRC de causa indeterminada

Os valores de todas as dosagens dos indivíduos com IRC estão listados no Apêndice F. A tabela 10 apresenta a análise descritiva dos resultados de atividade enzimática e a Figura 15 representa graficamente estes resultados

**Tabela 10** – Análise descritiva dos valores de  $\alpha$ -Gal A no plasma de indivíduos hemodialisados.

Mín.	Máx.	Média	Desvio Padrão
7,11	40,45	22,69	9,25

Os resultados encontrados não diferiram estatisticamente do grupo controle, se enquadrando dentro ou acima dos valores de referência (4 a 28 nmoles/h/mL)



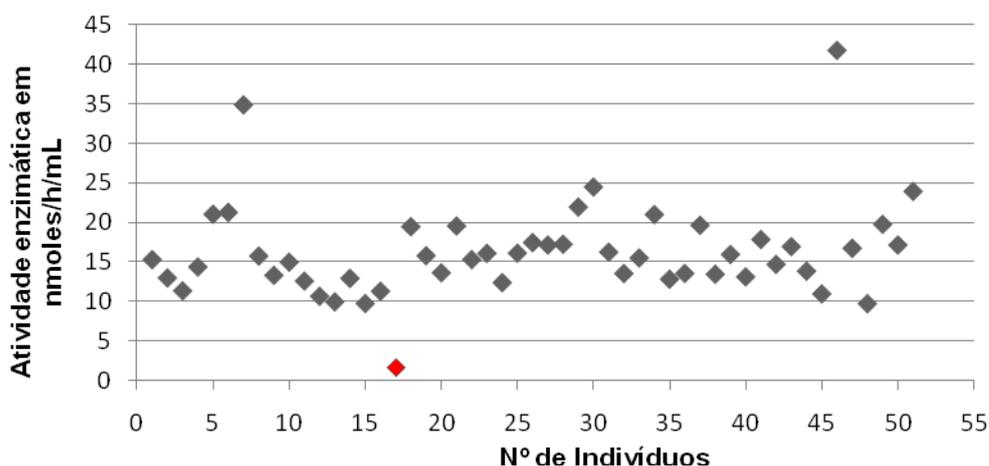
**Figura 15:** Atividade enzimática dos indivíduos com IRC de causa indeterminada.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO ENZIMÁTICO PARA A $\alpha$ -GAL A

A padronização do ensaio enzimático no plasma e em leucócitos para a  $\alpha$ -Gal A tem sido processada em apenas dois centros de investigação de doenças metabólicas hereditárias: Centro de Referência em Erros Inatos do Metabolismo (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  $\alpha$ -Gal A foi padronizado no LEIM da UFPA e já pode ser aplicado na investigação da doença de Fabry em nossa região.

A análise do perfil enzimático em plasma dos 50 indivíduos hígidos permitiu a padronização da referida técnica e a implantação de valores de referências para a população local (4 a 28 nmoles/h/mL). Estes valores não diferiram estatisticamente ( $p > 0,01$ ) dos padronizados no SGM/HCPA (4 a 22 nmoles/h/mL). A Figura 16 apresenta os valores obtidos no presente estudo.



**Figura 16:** Perfil enzimático em plasma dos 50 indivíduos hígidos voluntários

No grupo controle foi encontrado um indivíduo com atividade enzimática baixa (1,66 nmoles/h/mL) que poderia ser indicativo de doença de Fabry (indivíduo 17, em vermelho na Figura 16). Para evitar limitação na interpretação

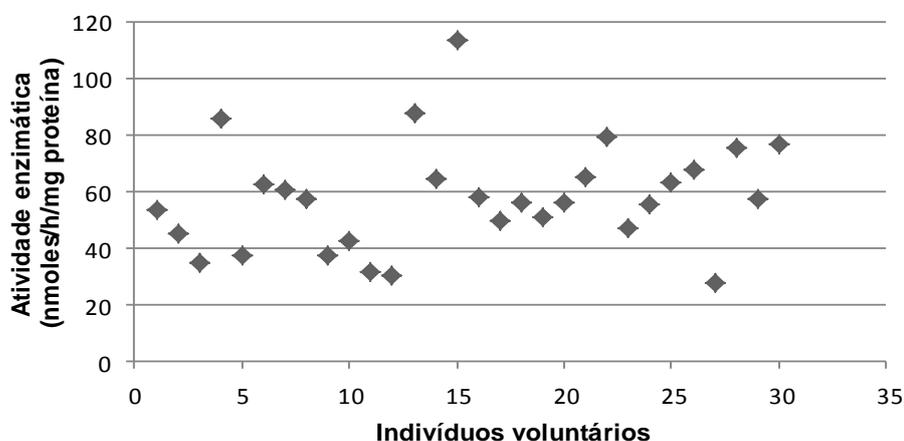
dos dados, este indivíduo foi excluído do grupo de padronização da técnica e outro indivíduo foi adicionado.

Em relação a este caso, foi feita uma nova coleta de sangue heparinizado, sendo a amostra enviada ao Centro de Referência em Erros Inatos do Metabolismo (CREIM, UNIFESP) para confirmação diagnóstica em leucócitos, uma vez que o padrão ouro para a investigação de doença de Fabry é a dosagem em leucócitos, material este que permite a investigação enzimática diretamente no lisossomo.

Este indivíduo obteve o resultado de 8,0 nmoles/h/mg proteína, valor este que aparentemente se encontra dentro dos valores de referência para leucócitos utilizados neste laboratório (acima de 1,4 nmoles/h/mg proteína). Deve-se considerar ainda que a amostra chegou ao laboratório hemolisada, o que pode interferir no ensaio enzimático. Ademais, no SGM/HCPA o valor de referência para leucócitos é de 26 a 53 nmoles/h/mg proteína, deixando dúvidas ainda quanto ao real diagnóstico.

Uma nova amostra foi enviada ao SGM/HCPA, para análise em leucócitos, obtendo valor dentro do normal, no entanto o valor em plasma também se apresentou baixo, validando o valor encontrado neste estudo.

Com relação à padronização em leucócitos, o valor de referência estabelecido para a população do estado do Pará foi de 20 a 96 nmoles/h/mg proteína. No SGM/HCPA, o valor de referência para leucócitos é de 26 a 53 nmoles/h/mg de proteína. Não houve diferença estatística ( $p > 0,01$ ) entre estes valores. A distribuição gráfica dos valores de  $\alpha$ -Gal A em leucócitos pode ser observada na Figura 17.



**Figura 17:** Perfil enzimático em leucócitos de 30 indivíduos hígidos voluntários.

## 5.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A enzima  $\alpha$ -Gal A se mostrou termolábil, visto que com apenas 1 minuto de pré-incubação das amostras, sua atividade decaiu 71,09%. Coelho *et al.* (1999) fizeram um estudo semelhante com a enzima  $\beta$ -galactosidase, uma outra enzima lisossômica, em fibroblastos e leucócitos de indivíduos saudáveis, e perceberam que esta enzima necessita de 80 minutos a 42°C para perder 79% de sua atividade.

Com relação ao tempo de incubação, a atividade enzimática apresentou uma disposição linear crescente, e mesmo com 30 minutos adicionais de incubação, a atividade ainda é maior, mesmo esse aumento não sendo significativo. Isso pode ser devido ao fato de que, mesmo no período de 2 horas e meia, ainda há substrato a ser clivado pela enzima.

É importante ressaltar que o número reduzido de amostras utilizadas para a avaliação da cinética enzimática, bem como para a validação do ensaio enzimático, gerou, em alguns casos, um aumento no desvio padrão, que seria reduzido quanto maior fosse a quantidade de amostras utilizadas. Essa quantidade limitada de amostras se deve ao alto custo do procedimento, bem como a grande quantidade de pontos a serem avaliados e que, em sua grande maioria, também foram realizados em duplicata. Com relação ao estudo de reprodutibilidade, deve-se lembrar que cada amostra foi coletada de um único indivíduo em uma única oportunidade, dessa forma, a quantidade de amostra biológica coletada (total de 20 mL) impossibilita a realização de duplicata.

A atividade da  $\alpha$ -Gal A se apresentou de forma bem heterogênea nos pH testados. O pH em que ela obteve o máximo de atividade foi o 4,8, diferindo estatisticamente de todos os outros pH testados. Este achado é semelhante ao descrito por Bishop e Desnick (1981) que purificaram esta enzima de baço e constataram uma melhor atividade em pH 4,6, utilizando o mesmo substrato. Os dados também são similares aos de Ishii e colaboradores (2007), onde em uma linhagem celular foi observado que a  $\alpha$ -Gal A apresentou uma faixa de pH ótimo entre 4 e 4,5.

O  $K_m$  encontrado para a  $\alpha$ -Gal A foi de 1,007 mM, para enzima testada em plasma humano. Dean e Sweeley (1979) encontraram, para esta enzima, um  $K_m$  igual a 2,9 mM e Ishii e colaboradores (2007) encontraram um  $K_m$  igual

a 2,8 mM, no entanto, para o primeiro estudo, apesar de ter sido utilizado o mesmo substrato (4-UM- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo), a enzima utilizada foi purificada de fígado humano, sendo realizado um protocolo experimental diferente, e no segundo foi utilizada uma cultura celular. Além do mais, sabe-se que as enzimas podem agir de formas distintas em diferentes tecidos humanos, o que também justifica a diferença encontrada no valor de  $K_m$ . Vale ressaltar também que estes experimentos avaliam a interação da enzima com um substrato artificial, utilizado na rotina laboratorial, e sendo assim, não representa fielmente a cinética da enzima em sua forma fisiológica. Para tal seria necessário utilizar o substrato natural da enzima, a globotriosilceramida (GB3).

A avaliação da cinética da enzima  $\alpha$ -Gal A possibilita a compreensão do comportamento da mesma e permite que, posteriormente, os dados encontrados sejam comparados a estudos semelhantes em amostras de pacientes com a doença de Fabry, facilitando a compreensão dos aspectos bioquímicos da doença, visto que as mutações na  $\alpha$ -Gal A podem interferir no sítio ativo da enzima ou afetar a sua conformação bioquímica (Garman e Garboczi, 2004), o que, conseqüentemente, afetará os parâmetros cinéticos da enzima. Estudos cinéticos, associados a parâmetros clínicos, são de grande valia, principalmente na área de doenças metabólicas, pois dessa forma é possível estabelecer um elo entre a bioquímica da doença e a clínica. Alguns estudos já seguem essa linhas, como o de Wajner *et al.* (2004), que descreveram alterações cinéticas na enzima quitotriosidase, que é um marcador bioquímico para as doenças de Gaucher e Niemann-Pick, que também pertencem ao grupo das DLD, onde foi observado que a quitotriosidase apresentou um  $K_m$  significativamente menor e mais termoestável para indivíduos saudáveis quando comparadas com pacientes com doença de Gaucher e Niemann-Pick.

Segundo Shi *et al.* (2009), estudos sobre a atividade residual da  $\alpha$ -Gal A em suas formas mutantes revelam que muitas dessas enzimas mutantes possuíam propriedades cinéticas semelhantes ao tipo selvagem, mas eram significativamente menos estáveis. Esses fatos sugerem que a deficiência enzimática desses mutantes é causada principalmente por mau dobramento e/ou incapacidade de chegar aos lisossomos. É possível que a enzima mutante

seja retida no retículo endoplasmático após a sua síntese e seja degradada prematuramente.

### 5.3 REPRODUTIBILIDADE

Até o quarto mês, a temperatura de armazenamento da amostra pareceu não interferir significativamente na atividade enzimática e somente no quinto e sexto mês foi observado um decaimento significativo de atividade enzimática nas amostras armazenadas a 4°C. Ao observar a Figura 18 como um todo (que é a representação linear da Figura 11) é possível verificar que a média das amostras armazenadas a -20°C é a que apresenta menos variações no decorrer do tempo.

Não foram encontrados estudos semelhantes na literatura que avaliassem a melhor forma de armazenar amostras biológicas até o momento do ensaio, e apesar de só ter sido encontrada significância estatística nos meses 5 e 6 das amostras armazenadas a 4°C, é possível perceber que a partir do momento em que a amostra é coletada, ela está susceptível a sofrer pequenas variações na atividade enzimática. Este fato pode não parecer relevante à primeira vista, mas deve ser levado em consideração em amostras cujo resultado seja inconclusivo por apresentar valores limítrofes, o que pode mascarar um falso positivo ou falso negativo. Dessa forma, é aconselhável que o ensaio enzimático para  $\alpha$ -Gal A seja realizado tão logo seja coletada a amostra.

### 5.4 ESTABILIDADE DA FLUORESCÊNCIA

Com relação à estabilidade da fluorescência, é possível afirmar que este método é estável, mesmo após 24 horas do término do ensaio enzimático e mantida em temperatura ambiente. A maior variação ocorreu na segunda hora, em que a fluorescência caiu 4,54%, mas na terceira hora ela volta a subir, chegando a 98,22% da fluorescência inicial após 24 horas. Este achado é muito importante quando se analisa sob a ótica da rotina laboratorial, pois

quaisquer interferentes nesta rotina não irão acarretar em resultado incorreto da fluorescência e não necessitando assim repetir todo o procedimento descrito no protocolo. Vale ressaltar que estes dados são originais, visto que não foram encontrados na literatura estudos que pudessem ser comparados.

## 5.5 INDIVÍDUOS COM IRC

Quanto aos questionários aplicados aos pacientes em hemodiálise, foi observado que apesar de 9 pacientes dos 25 estudados apresentarem casos semelhantes na família de IRC de causa indeterminada, além de outros sintomas semelhantes aos encontrados na doença de Fabry, como HAS, arritmias cardíacas dentre outros, nenhum deles apresentou atividade enzimática baixa, que seria compatível com o diagnóstico da doença.

Os sintomas mais freqüentes foram hipertensão arterial sistêmica (64%), astenia (32%), edema (32%), alterações cardíacas (28%) e cefaléia (20%). Estes dados estão em concordância com os descritos por Castro (1996), já que a HAS é uma das principais responsáveis pela morbimortalidade observada nos pacientes com IRC e aproximadamente 80% dos indivíduos admitidos para diálise apresentam HAS. A astenia se deve ao fato de que, indivíduos com IRC adquirem anemia (Grimoldi *et al.*, 2008) devido à deficiência de eritropoetina (Ribeiro-Alves e Gordan, 2007). Já o edema, principalmente o generalizado (anasarca), é um dos sintomas causados, dentre outras doenças, pela IRC, devido à retenção de água e eletrólitos (Kirsztain, 2008).

Existe um fenótipo leve da doença de Fabry em que o indivíduo apresenta atividade residual da  $\alpha$ -Gal A e as manifestações clínicas se restringem a anormalidades cardíacas ou renais a partir da sexta década de vida (Garman e Garboczi 2004; Kotnik *et al.*, 2005, Spada *et al.*, 2006). No entanto, no presente estudo não foi observado nenhum valor que pudesse ser sugestivo deste fenótipo.

Segundo Civallero *et al.* (2006), a doença de Fabry, bem como diversas outras DLD, pode ser diagnosticada através da análise enzimática em papel filtro, onde se utiliza uma quantidade de amostra biológica bem menor e

o custo do diagnóstico também é menor, pela reduzida quantidade de reagentes que é utilizada. Além disso, a amostra em papel filtro é mais estável e pode resistir por meses em temperatura ambiente, podendo ainda ser mais precisa que a análise em leucócitos no diagnóstico de mulheres heterozigotas que apresentem a doença de Fabry (Lukacs *et al.*, 2007).

No estado do Pará, este método está sendo implantado, e será útil para a realização de triagem em massa de indivíduos pertencentes a grupos de risco, como os do presente estudo. No caso da doença de Fabry, o diagnóstico precoce e a implantação imediata do tratamento impedirão a instalação dos principais sintomas além de evitar a ocorrência de danos irreversíveis.

Além do mais, este método em papel filtro possibilita a realização de triagem neonatal. Spada *et al.* (2006) utilizaram este método para triar 37.104 recém-nascidos do sexo masculino e encontraram 12 indivíduos, ou 1 em cada 3.100, com deficiência de  $\alpha$ -Gal A.

Partindo destes dados, é imprescindível que, posteriormente, haja a inclusão de mais pacientes com IRC de causa indeterminada, já que a doença de Fabry é uma doença rara. Porsch *et al.* (2008) triaram 558 pacientes homens, com doença renal em estágio terminal de causa indeterminada através do método de papel filtro e encontraram 2 casos de doença de Fabry, que tiveram o diagnóstico confirmado através do ensaio enzimático em plasma. Marinho *et al.* (2007), ao estudar 191 homens com IRC, encontraram 1 caso de doença de Fabry. Vale *et al.* (2008), avaliaram 351 homens com IRC e 2 casos foram confirmados. Estes estudos foram conduzidos nos estados do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte (RN) e PiauÍ (PI), respectivamente. No estado do Pará, é a primeira vez em que se faz esta busca ativa de portadores da doença da Fabry com protocolo laboratorial sendo realizado no próprio estado, visto que nos estudos de RN e PI, as amostras foram enviadas para UNIFESP, onde foi realizado o ensaio enzimático.

## 6 CONCLUSÃO

A padronização do ensaio enzimático para  $\alpha$ -Gal A em plasma se mostrou muito eficaz e foi capaz de identificar um indivíduo com atividade enzimática baixa (porém não compatível com o diagnóstico de doença de Fabry) que foi confirmada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínica de Porto Alegre, que é referência no país.

A atividade enzimática da  $\alpha$ -Gal A em plasma não diferiu entre o grupo controle e o grupo teste ( $p > 0,05$ ).

A padronização do ensaio enzimático da  $\alpha$ -Gal A em plasma e leucócitos permitiu a implantação de valores de referência para o estado do Pará, que vão de 4 a 28 nmoles/h/mL (plasma) e 20 a 96 nmoles/h/mg de proteína (leucócitos).

A enzima  $\alpha$ -Gal A se mostrou termolábil, pois com 1 minuto de pré-incubação das amostras a 60°C, a atividade foi reduzida a 28,91% de sua atividade total, e com 25 minutos, a 2,39% da atividade total.

Com relação ao tempo de incubação, mesmo no período de 2 horas e meia, ainda há substrato a ser clivado pela enzima. No entanto, pode-se sugerir como tempo de incubação adequado entre 1,5 hora e 2,5 horas.

A  $\alpha$ -Gal A se mostrou muito sensível a variações de pH, e o pH ótimo de funcionamento desta enzima é de 4,8.

A enzima obedece às leis de Michalis-Menten e o  $K_m$  encontrado foi de 1,007 mM, sendo a velocidade máxima da reação igual a 30,9 nmoles/h/mL. Dessa forma, o ensaio enzimático em plasma, que é utilizado para fins diagnósticos, testa a enzima em sua capacidade ótima de funcionamento, visto que concentração de substrato utilizada é de 1 mM, bem próxima ao seu  $K_m$ .

As melhores temperaturas para armazenamento das amostras de sangue são -20 °C e -70 °C, com destaque para a primeira, uma vez que nesta ocorre uma menor variação entre os valores de atividade enzimática. Apenas no 5° e 6° mês as amostras armazenadas a 4 °C foram estatisticamente diferentes das amostras controle.

A fluorescência do ensaio em plasma é estável, podendo ser lida em espectrofluorímetro mesmo após 24 horas depois do término do ensaio enzimático.

No grupo com IRC indeterminada, não foi encontrado nenhum indivíduo com atividade enzimática baixa que pudesse ser compatível com a doença de Fabry, por mais que estes indivíduos apresentassem alguns dos sintomas comuns a esta doença, como HAS, edema, astenia, alterações cardíacas, entre outros.

## 7 REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**, Rio de Janeiro, 6ª ed., editora Guanabara Koogan, cap. 8, 2008.
- BEZERRA, K.V; SANTOS, J.L.F. Daily life of patients with chronic renal failure receiving hemodialysis treatment. **Rev Latino-am Enfermagem**, **16(4)**:686-91. 2008.
- BISHOP, D.F.; DESNICK, R.J. Affinity purification of alpha-galactosidase A from human spleen, placenta, and plasma with elimination of pyrogenic contamination. Properties of the purified splenic enzyme compared to other forms. **J Biol Chem** **10**:1307-16. 1981.
- BLANCHON, Y.C.; GAY, C.; GIBERT, G.; LAURAS, B.. A case of N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler disease) associated with autism. **Journal of Autism and Development Disorders**, **32(2)**:145-146. 2002.
- BOISSIER MC. Ethical aspects of gene therapy in rheumatology. **Joint Bone Spine**; **68**:109–11. 2001.
- CASTRO, M.C.M. Revisão/Atualização em Hipertensão Arterial: Hipertensão Arterial na Insuficiência Renal Crônica. **J. Bras. Nefrol.** **18(2)**:169-174. 1996.
- 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.
- CLARKE, J.T.R. Narrative review: Fabry disease. **Ann Intern Med**, **146**:425-433. 2007.
- CLARK, N. E.; GARMAN, S.C. The 1.9 Å structure of human  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase: The molecular basis of Schindler and Kanzaki disease. **Journal of Molecular Biology**, **393**:435-447. 2009.

- COELHO, J.C.; SOPELSA, A.M.I; TOBO, P.R.; SEVERINI, M.H.A.; SILVA, C.D.; GIUGLIANI, R. Biochemical studies on leukocytes and fibroblast human  $\beta$ -galactosidase. **Clinical Biochemistry**, **32(3)**:167-170. 1999.
- CORDEIRO, C.A.; ORÉFICE, F.; LASMAR, E.P.; SANTOS, H.H.; VALADARES, E.R. Córnea verticilata –marcador clinico da doença de Fabry: relato de caso. **Arq Bras Oftalmol**, **70(4)**:701-705. 2007.
- DEAN, K.J.; SWEELEY, C.C. Studies on human liver  $\alpha$ -Galactosidases – Purification of  $\alpha$ -Galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, **254**: 9994-10000. 1979.
- DESNICK, R.J.; BISHOP, D. Fabry disease:  $\alpha$ -galactosidase A deficiency and Schindler disease:  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The Metabolic Basis of of Inherited Disease**, 8<sup>a</sup> ed, New York: McGraw-Hill, Inc. 2001.
- DESNICK, R.J.; BRADY, R.O. Fabry Disease in Childhood. **The Journal of Pediatrics**, **144**:20-26. 2004.
- FILONI, C.; CACIOTTI, A.; CARRARESI, L.; CAVICCHI, C.; PARINI, R.; ANTUZZI, D.; ZAMPETTI, A.; FERIOZZI, S.; POISETTI, P.; GARMAN, S.C.; GUERRINI, R.; ZAMMARCHI, E.; DONATI, M. A.; MORRONE, A. Functional studies of new GLA gene mutations leading to conformational fabry disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1802**:247-252. 2010.
- GARMAN, S.C.; GARBOCZI, D.N. The Molecular Defect Leading to Fabry Disease: Structure of Human  $\alpha$ -Galactosidase. **Journal of Molecular Biology** **337**:319–335. 2004.
- GERMAIN, D.P. Fabry Disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, **5**:30.2010.
- GERMAIN, D.P.; SHABBEER, J.; COTIGNY,S.; DESNICK, R.J. Fabry disease: twenty novel  $\alpha$ -Galactosidase A mutation and genotype-phenotype correlations in classic and variant phenotypes. **Molecular Medicine**, **8(6)**:306-312. 2002.
- GRIMOLDI, I.A.; BRIONES, L.M.; FERRARIS, J.R.; RILO, L.R.; SOJO, E.; TURCONI, A.; WAINBERG, E.; ZALBA, J.; SEPLIARSKY, A.; ALCONCHER, L.; LASO, M.C.; SIERRO, A.; AYUB, J.; CALETTI, M.G.; COCCIA, P.

- Enfermedad renal crónica, diálisis y transplante. Estudio multicéntrico: 1996-2003. **Arch Argent Pediatr** **106(6)**: 552-559. 2008.
- ISHII, S.; CHANG, H.H.; KAWASAKI, K.; YASUDA, K.; WU, H.L.; GARMAN, S.C.; FAN, J.Q. Mutant  $\alpha$ -galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. **Biochem. J.** **406**, 285-295. 2007.
- 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.
- JOHNSON, A.; RAFF, L.; WALTER, R. **Biologia Molecular da Célula 4ª Ed.** 739p. 2004.
- KIRSZTAIN, G.M. Avaliação prática do paciente com edema. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, **30(3)**: 171. 2008.
- KOTNIK, J.; KOTINIK, F.; DESNICK, R. J. Fabry disease. A case report. **Acta Dermatoven APA**, **14**:15-19. 2005.
- LEVIN, A. **Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease** prior to dialysis. **Seminars in Dialysis**, **16(2)**: 101-105. 2003.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**:265. 1951.
- LUKACS, Z.; HARTUNG, R.; BECK, M.; KEIL, A.; MENGEL, E. Direct comparison of enzyme measurements from dried blood and leukocytes from male and female Fabry disease patients. **J Inherit Metab Dis**, **30**:614. 2007.
- MALHOTRA, O.P.; DEY, P.M. Purification and physical properties of sweet-almond  $\alpha$ -Galactosidase. **Biochem. J.** **103**:508-513. 1966.
- MARINHO, L.A.L.; RÉGO, J.F.M.; RAMOS, T.C.O; ALVES, T.M.S. Prevalência de doença de Fabry em pacientes portadores de doença renal crônica submetidos à hemodiálise em Natal-RN. **J Bras Nefrol**, **29(4)**:235-239. 2007.

- MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basic Medical Biochemistry, a clinical approach**, Philadelphia, EUA, Editora Lippincott Williams & Wilkins, cap. 9.1996.
- MARTIN, L.; STURGESS, A.; SILLENCE, D.; MURRELL, D. Fabry disease in a heterozygote presenting hand ischaemia and painful acroparaesthesia. **Australasian Journal of Dermatology**, **48**: 40-42.2007.
- 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.
- MARTINEZ, P.; AGGIO, M.; ROZENFELD, P. High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients. **J Inherit Metab Dis**, **30**:365-369. 2007.
- MARTINS, M.R.I.; CESARINO, C.B. Qualidade de vida de pessoas com doença renal crônica em tratamento hemodialítico. **Rev Latino-am Enfermagem** **13(5)** : 670-6. 2005.
- MASSON, C.; CISSÉ, I.; SIMON, V.; INSALACO, P.; AUDRAN, M. Fabry disease: a review. **Joint Bone Spine**, **71**:381–383. 2003.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**, São Paulo, Brasil, 2ª ed., editora Guanabara Koogan, cap. 5. 1999.
- MOHRENSCHLAGER, M.; HENKEL, V.; RING, J. Fabry disease: more than angiokeratomas. **Arch Dermatol**, **140**:1526-1528. 2004.
- 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.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3ª ed, New York, EUA, Editora Worth Publishers, cap. 8. 2000.
- 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.

- PETERS, FPJ.; VERMEULEN, A.; KHO, TL. Andersen-Fabry's disease: alpha galactosidase deficiency. **Lancet**, **357**(9250): 138-140. 2001.
- PORSCH, D.B.; NUNES, A.C.F.; MILANI, V.; ROSSATO, L.B.; MATTOS, C.B.; TSAO, M.; NETTO, C.; BURINS, M.; PEREIRA, F.; MATTE, U.; GIUGLIANI, R.; BARROS, E.J.G. Fabry disease in hemodialysis patients in southern brazil: prevalence study and clinical report. **Renal failure**, **30**:825-830. 2008.
- RIBEIRO-ALVES, M.A.; GORDAN, P.A. Diagnóstico de anemia em pacientes portadores de doença renal crônica. **J Bras Nefrol** **29**(4): 4-6. 2007.
- SCHIFFMANN, R.; MURRAY, G. J.; TRECO, D.; DANIEL, P.; SELLOSMOURA, M.; MYERS, M.; QUIRK, J. M.; ZIRZOW, G. C.; BOROWSKI, M.; LOVEDAY, K.; ANDERSON, T.; GILLESPIE, F.; OLIVER, K. L.; JEFFRIES, N. O.; DOO, E.; LIANG, T. J.; KREPS, C.; GUNTER, K.; FREI, K.; CRUTCHFIELD, K.; SELDEN, R. F.; BRADY, R. O. Infusion of  $\alpha$ -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. **Medical Sciences**, **97**:365-370. 2000.
- SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8<sup>a</sup> ed, New York, EUA, McGraw-Hill, Inc. 2001.
- SHI, Z.D.; MOTABAR, O.; GOLDIN, E.LIU, K.; SOUTHALL, N.; SIDRANSKY, E.; AUSTIN, C.P.; GRIFFITHS, G.L.; ZHENG, W. Synthesis and characterization of a new fluorogenic substrate for alpha-galactosidase. **Anal Bioanal Chem**, **394**: 1903-1909. 2009.
- SHIN, S.-H.; MURRAY, G.J.; KLUEPFEL-STAHN, S.; COONEY, A.M.; QUIRK, J.M.; SCHIFFMANN, R.; BRADY, R.O.; KANESKI, C.R. Screening for pharmacological chaperones in Fabry disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **359**:168-173. 2007.
- SKOOG, W.A.; BECK, W.S. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. **Blood**, **11**:436. 1956.
- SMITH, C.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks, Uma Abordagem Clínica**, Porto Alegre, 2<sup>a</sup> ed., editora Artmed, cap. 8. 2007.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo de Diálise SBN**. 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo de Diálise SBN 2010.**

Disponível em <http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?censo>. Acesso em: 14/10/2011.

UTSUMI, K.; MITSUHASHI, F.; ASAH, K.; SAKURAZAWA, M.; ARII, K. KOMABA, Y.; KATSUMATA, T.; KATSURA, K.-I.; KASE, R.; KATAYAMA, Y. Enzyme replacement therapy for Fabry disease: Morphologic and histochemical changes in the urinary sediments. **Clinica Chimica Acta**, **360**:103-107. 2005.

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

TOMASIC, I.B.; METCALF, M.C.; GUCE, A.I.; CLARK, N.E.; GARMAN, S.C. Interconversion of the specificities of human lysosomal enzymes associated with Fabry and Schindler diseases. **The Journal of Biological Chemistry**, **285(28)**:21560-21566. 2010.

VALE, N.F.D.; SILVA, A.B.R.; VERAS, A.B.; MONTEIRO, F.M.R.; SOUSA, J.L.M.; BEZERRA, V.L.; MARTINS, A.M.; D'ALMEIDA, V.; CASTRO, J.A.F.; NETO, J.T.M.; MELO, A.O.R.; MONTE, S.J.H. Diagnóstico da doença de Fabry em indivíduos submetidos à hemodiálise no estado do Piauí: O papel do exame de triagem e estudo de casos. **J Bras Nefrol**, **30(4)**:259-63. 2008.

WAJNER, A.; MICHELIN, K.; BURIN, M.G.; PIRES, R.F.; PEREIRA, M.L.S.; GIUGLIANI, R.; COELHO, J.C. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. **Clinical Biochemistry**, **37**:893-897. 2004.

WARNOCK, D.G.; Fabry disease: diagnosis and management, with emphasis on the renal manifestations. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, **14**:87-95. 2005.

WU, X.; KATZ, E.; VALLE, M.C.D.; MASCIOLI, K.; FLANAGAN, J.J.; CASTELLI, J.P.; SCHIFFMANN, R.; BOUDES, P.; LOCKHART, D.J.; VALENZANO, K.J.; BENJAMIN, E.R. A Pharmacogenetic Approach to Identify Mutant Forms of  $\alpha$ -Galactosidase A that Respond to a

Pharmacological Chaperone for Fabry Disease. **Human Mutation**,  
**32**(8):965-977. 2011.

## 8 APÊNDICES

### 8.1 APÊNDICE A: CARTA CONVITE

Prezado paciente e familiares,

Venho através desta, convidá-lo a participar do estudo **“Triagem bioquímica da alfa galactosidase A em indivíduos com sinais e sintomas semelhantes aos descritos na doença de Fabry”** que será desenvolvido no Laboratório de Erros Inatos de Metabolismo da Universidade Federal do Pará durante o ano de 2007.

Este estudo está sendo proposto pela primeira vez na região norte e visa a identificação de casos da doença de Fabry em indivíduos tratados no Hospital de Clínicas Gaspar Vianna e Hospital Ophir Loyola.

A doença de Fabry é uma doença hereditária metabólica rara causada pela deficiência de uma enzima chamada Alfa galactosidase A. Sua manifestação ocorre de forma lenta e progressiva e afeta particularmente indivíduos do sexo masculino, já que a sua transmissão se dá através de mutações que ocorrem no cromossomo X. Os principais sintomas deste erro inato do metabolismo seguem abaixo:

- Dor crônica acompanhada de formigamento, principalmente nas mãos e nos pés (acroparestesias);
- Lesões puntiformes avermelhadas na pele (angioqueratomas);
- Problemas gastrointestinais (dor, vômitos, diarreia);
- Insuficiência renal: indicada devido a proteinúria, hematúria e lipidúria;
- Alterações cardíacas (aumento do volume cardíaco, válvulas cardíacas defeituosas, arritmias, ataque cardíaco, insuficiência cardíaca);
- Acidentes cerebrovasculares (derrame, acidente vascular cerebral);
- Distrofia da córnea e cristalino;

- Intolerância ao exercício físico, ao frio e/ou calor devido à diminuição ou ausência de transpiração.

Esses sinais e sintomas aparecem geralmente na infância e tornam-se mais graves à medida que o paciente envelhece, sendo os mais presentes na doença de Fabry os angioqueratomas e a insuficiência renal precoce.

É importante ressaltar que já existe tratamento para a doença de Fabry com terapia de reposição enzimática através das enzimas recombinantes  $\alpha$ -Algasidase (Replagal<sup>®</sup>) e Algasidase- $\beta$  (Fabrazyme<sup>®</sup>). Após o início da terapia de reposição enzimática observa-se uma redução significativa dos sintomas dessa doença evitando dessa forma as complicações renais, cardiovasculares e os danos ao sistema nervoso.

Declaro estar ciente do que foi exposto e concordo em participar do estudo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Responsável/Paciente:

---

**Pesquisador:**

---

**Camila de Britto Pontes Rodrigues Pará**

Endereço: Tv. 14 de Abril, 1571/901. Tel.: (91) 3229 0102 / (91) 8816  
4866

**Orientador:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva**

Endereço: Rua Caripunas, 3660/201. Tel: (91) 3229 6452 / (91) 9986  
6137

**Médico Responsável:** \_\_\_\_\_

**Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM)**

Campus Universitário do Guamá, Rua Augusta Corrêa, 01, Centro de Ciências Biológicas,  
Departamento de Fisiologia, 2º andar. Tel.: (91) 3201 8030

## 8.2 APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A doença de Fabry é uma doença genética metabólica onde há um acúmulo lisossômico da substância globotriosilceramida (Gb3), substrato da enzima alfa-galactosidase A ( $\alpha$ -galA) que está deficiente nesta doença. Os genes desta enzima estão localizados no cromossomo X. Dessa forma, mães portadoras do gene afetado têm 50% de chance de ter um filho com a doença e 50% de chance de ter uma filha portadora do gene em um de seus cromossomos X.

Esta doença possui incidência de 1 para cada 40000 meninos recém-nascidos e suas principais manifestações clínicas são decorrentes do depósito do substrato da  $\alpha$ -galA nos tecidos corpóreos. As formas clássicas da doença de Fabry iniciam na infância e adolescência e incluem crises periódicas de dor principalmente nas mãos e nos pés acompanhada de formigamento (acroparestesia), lesões cutâneas vasculares (angioqueratomas), pouca ou nenhuma transpiração (hipoidrose ou anidrose), podendo causar febres freqüentes, superaquecimento com exercícios físicos e intolerância ao clima quente, opacidade de córnea e cristalino, diminuição da função renal podendo levar à insuficiência renal, problemas no sistema nervoso central tais como tontura, cefaléia, acidente vascular cerebral ou derrame precoce, além de alterações cardíacas, pulmonares e digestivos, como diarreia e náuseas.

O presente trabalho tem como objetivo dosar a atividade da enzima alfa-galactosidase A em indivíduos que apresentem os seguintes critérios clínicos de inclusão: presença de angioqueratomas e/ou disfunção renal e/ou acroparestesia e/ou alterações cardíacas. Desta forma, um questionário será realizado a fim de obter informações relevantes sobre o histórico clínico do paciente e será solicitado 10 mL de sangue periférico, obtido por punção venosa para a dosagem enzimática da  $\alpha$ -galA, representando um risco mínimo que é rotineiramente empregado para a análise de substâncias no sangue. O material armazenado permanecerá aos cuidados do pesquisador responsável pelo estudo, sendo outro acesso permitido somente com a autorização do sujeito da pesquisa ou, na falta deste, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará se for o caso de pesquisas futuras.

Fui igualmente informado que os riscos e o desconforto para a realização dos testes é mínimo e os resultados destes são confidenciais e utilizados exclusivamente para fins do objeto do trabalho, sendo resguardado o sigilo, o caráter confidencial das informações, o direito às informações a qualquer momento, bem como da liberdade de não participar ou desistir do estudo.

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Nome do Participante:**

---

**Pesquisador:**

---

**Camila de Britto Pontes Rodrigues Pará**

Endereço: Tv. 14 de Abril, 1571/901. Tel.: (91) 3229 0102 / (91) 8816  
4866

**Orientador:**

---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva**

Endereço: Rua Caripunas, 3660/201. Tel: (91) 3229 6452 / (91) 9986  
6137

**Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM)**

Campus Universitário do Guamá, Rua Augusta Corrêa, 01, Centro de Ciências Biologias,  
Departamento de Fisiologia, 2º andar. Tel.: (91) 3201 8030

**Médico Responsável:**

---

## 8.3 APÊNDICE C: QUESTIONÁRIO

01- Nome

---

02- Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

03- Idade: \_\_\_\_\_

04 - Naturalidade: \_\_\_\_\_

05- Endereço: \_\_\_\_\_

06-Telefone: \_\_\_\_\_

07- Idade de início dos sintomas: \_\_\_\_\_

08- História Clínica

---

---

---

---

---

---

09- Casos semelhantes na família sim ( ) não ( )

Grau de parentesco - \_\_\_\_\_

10- Presença de angioqueratomas sim ( ) não ( )

Se sim, em que região? \_\_\_\_\_

11- Disfunção renal sim ( ) não ( )

13- Possui alterações cardíacas? sim ( ) não ( )

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

12- Outro tipo de manifestação sim ( ) não ( )

Qual? \_\_\_\_\_

14- Realiza algum tratamento especial? sim ( ) não ( )

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

15- Uso de medicação sim ( ) não ( )

Qual? \_\_\_\_\_

16- Heredograma

## 8.4 APÊNDICE D: MODELO DE LAUDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO**

---

**TESTE DE TRIAGEM BIOQUÍMICA PARA DOENÇA DE FABRY****MATERIAL:** Plasma**MÉTODO:** Fluorimétrico**Resultado:** nmoles/h/mL**Valores de Referência**

LEIM/PA: 4 a 28 nmoles/h/mL

**Observações:** Valores normais encontrados no plasma não excluem a doença de Fabry. O diagnóstico confirmatório se dá pela dosagem enzimática da alfa Galactosidase A em leucócitos.

---

**Responsável: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva**

Lab. de Erros Inatos do Metabolismo  
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA  
Av. Augusto Corrêa n. 01, Bairro Guamá  
CEP.: 66075-900 / Belém – PA  
Telefone: 0xx91 3201 8030 e-mail: lcass@ufpa.br

8.5 APÊNDICE E: VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS PADRONIZAÇÕES DO ENSAIO PARA  $\alpha$ -GAL A

Plasma (nmoles/h/mL)				Leucócitos (nmoles/h/mg proteína)					
N	Homens	N	Mulheres	N	Homens	Proteína	N	Mulheres	Proteína
1	12,98	26	15,3	1	58,32	275,49	16	53,54	384,87
2	11,35	27	14,37	2	49,73	550,39	17	45,39	242,88
3	21,05	28	21,28	3	56,37	571,71	18	34,85	236,24
4	15,76	29	34,91	4	50,81	459,74	19	85,90	431,39
5	14,98	30	13,31	5	55,88	543,87	20	37,58	439,25
6	10,65	31	12,59	6	65,31	417,42	21	62,74	298,47
7	12,93	32	9,94	7	79,22	426,00	22	60,86	361,31
8	9,74	33	11,29	8	47,34	276,44	23	57,20	494,23
9	19,47	34	15,8	9	55,32	269,09	24	37,49	427,16
10	19,56	35	13,63	10	63,36	214,53	25	42,45	477,31
11	15,31	36	12,39	11	68,07	304,64	26	31,51	555,72
12	16,1	37	16,12	12	27,78	441,32	27	30,16	377,98
13	15,51	38	17,46	13	75,66	347,67	28	87,67	232,24
14	12,82	39	17,15	14	57,24	445,80	29	64,88	247,64
15	13,55	40	17,25	15	76,70	342,22	30	113,62	170,63
16	19,65	41	21,96						
17	13,45	42	24,5						
18	13,11	43	16,25						
19	17,85	44	13,54						
20	14,7	45	21,01						
21	16,95	46	15,95						
22	10,96	47	13,84						
23	19,77	48	41,81						
24	17,15	49	16,74						
25	23,95	50	9,72						

**8.6 APÊNDICE F: VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS INDIVÍDUOS COM IRC**

<b>Indivíduo</b>	<b>Atividade enzimática em plasma (nmoles/h/mL)</b>
1	12,1
2	23,8
3	24,3
4	19,4
5	17,9
6	27,4
7	20,6
8	17,4
9	17,9
10	14,42
11	7,11
12	8,7
13	29,64
14	22,98
15	19,87
16	24,81
17	11,7
18	12,31
19	24,99
20	29,69
21	40,14
22	40,45
23	29,25
24	34,78
25	35,55

### 8.7 APÊNDICE G: VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CURVA DE SUBSTRATO

<b>Indivíduo</b>	<b>Concentração do substrato</b>	<b>Média (nmoles/h/mL)</b>
<b>1</b>	15,6 µM	<b>0,41</b>
	31 µM	<b>0,76</b>
	62,5 µM	<b>1,47</b>
	0,125 mM	<b>2,89</b>
	0,25 mM	<b>5,32</b>
	0,5 mM	<b>8,75</b>
	1mM	<b>13,89</b>
	2mM	<b>20,43</b>
<b>2</b>	15,6 µM	<b>0,64</b>
	31 µM	<b>1,4</b>
	62,5 µM	<b>2,44</b>
	0,125 mM	<b>4,35</b>
	0,25 mM	<b>6,51</b>
	0,5 mM	<b>10,72</b>
	1mM	<b>16,84</b>
	2mM	<b>21,33</b>
<b>3</b>	15,6 µM	<b>0,70</b>
	31 µM	<b>1,06</b>
	62,5 µM	<b>1,86</b>
	0,125 mM	<b>3,28</b>
	0,25 mM	<b>5,87</b>
	0,5 mM	<b>10,49</b>
	1mM	<b>16,20</b>
	2mM	<b>20,98</b>
<b>4</b>	15,6 µM	<b>0,72</b>
	31 µM	<b>2,44</b>
	62,5 µM	<b>3,38</b>
	0,125 mM	<b>5,18</b>
	0,25 mM	<b>6,83</b>
	0,5 mM	<b>10,23</b>
	1mM	<b>16,42</b>
	2mM	<b>21,18</b>
<b>5</b>	15,6 µM	<b>0,35</b>
	31 µM	<b>0,99</b>
	62,5 µM	<b>1,78</b>
	0,125 mM	<b>2,64</b>
	0,25 mM	<b>5,51</b>
	0,5 mM	<b>9,09</b>
	1mM	<b>14,68</b>
	2mM	<b>18,76</b>

## 8.8 APÊNDICE H: ARTIGO ORIGINAL SUBMETIDO À REVISTA CLINICAL BIOCHEMISTRY

### KINETIC STUDY OF PLASMATIC ALPHA-GALACTOSIDASE A: CRITICAL VARIABLES FOR THE DIAGNOSIS OF FABRY'S DISEASE

Pará-de-Aragão, C.B.<sup>1</sup>; Messias Jr, N. S.<sup>1</sup>; Santana-da-Silva, L.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Innate Errors of the Metabolism, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brazil.

\*Corresponding author: Laboratory of Innate Errors of the Metabolism, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa nº 1, Belém-Pará, 66075-110, Brazil. Tel.: +55 91 3201 8030. E-mail: lcss@ufpa.br (Santana-da-Silva, L.C.)

#### Abstract

**Objectives:** The aim of this study was to understand the kinetic characteristics of  $\alpha$ -Galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A) and establish parameters for quality control. **Design and methods:** The kinetic features were defined based on the analysis of plasma, using fluorimetric procedures. The reproducibility of the procedures and fluorescence stability were also evaluated. **Results:** Enzyme activity decreased 71.09% after 1 minute of pre-incubation at 60°C. The enzyme-substrate reaction time increased linearly between 15 min and 180 min. Optimum pH was 4.8, with  $K_m = 1.007$  mM and  $V_{max} = 30.9$  nmoles/h/mL. The plasma samples stored at -20°C were the most stable, and the fluorescence varied little during the first 24 hours. **Conclusions:** Understanding the kinetics of the  $\alpha$ -Gal A enzyme and its *in vitro* behavior will contribute to improvements in the laboratory diagnosis of Fabry's disease, and provide a diagnostic baseline for the analysis of individuals affected by mutations of this enzyme.

**Key-words:** Enzymatic kinetics, Alpha-galactosidase A, Michaelis-Menten, Fabry's disease

#### 1. Introduction

Human Alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A; EC 3.2.1.22) is a lysosomal enzyme with a homodimeric structure of approximately 101 kDa [1,2], which is responsible for catalyzing the galactose of oligosaccharides, glycoproteins, and glycolipids during the catabolism of macromolecules [3,4], with globotriaosylceramide (GB3) being the principal substrate cleaved[4,5]. The cDNA of the GLA gene codifies a precursor protein of ~50 KDa and 429 amino acid residues [4] which is cleaved proteolytically in its mature lysosomal form[6]. Each monomere is composed of two domains: a  $\beta/\alpha$  catalytic domain (domain 1) and a regulatory C-terminal domain, containing eight antiparallel  $\beta$ -pleated leaves (domain 2). Domain 1 extends from residual amino acid 32 to 330, and contains the active site formed by the C-terminal ending of the  $\beta$  leaf of the center of the barrel. Domain 2 encompasses residuals 331 through 429[7].

The  $\alpha$ -Gal A enzyme is codified by the GLA gene located in the Xq21.33-Xq22 region of the X chromosome[8]. The 12-Kb GLA gene is divided into seven exons[4]. More than 450 mutations have already been recorded in this gene[6], including point, missense, and nonsense mutations, as well as small deletions, insertions and rearrangements[9,5]. Around 60% of the mutations of the GLA gene are of the missense type, and may be located at both active sites and in the protein structure [6]. These

mutations cause Fabry's disease (OMIM 301500), an X-linked lysosomal storage disease (LSD) of the sphingolipidose group[5]. In addition to  $\alpha$ -Gal A, there is also  $\alpha$ -Gal B, an isoenzyme codified by a distinct, but evolutionarily-related gene[2].

Fabry's disease (OMIM 301500) is caused by a deficiency of  $\alpha$ -Gal A, which results in a progressive accumulation of GB3 in the plasma and lysosomes of most of the organism's cells, causing a multisystemic breakdown [10,11] with a classic phenotype that includes excruciating pain and paresthesia of the limbs, diffuse angiokeratomas, hypohidrosis during infancy and/or adolescence, opacity of the cornea and kidney failure[12]. Fabry's disease is the second most common LSD, with an estimated frequency of one case per 40,000-60,000 males[13,4].

In the present study, the kinetic characteristics of the plasmatic  $\alpha$ -Gal A enzyme were analyzed in order to provide a better understanding of the enzyme's biochemistry. The study also evaluated the current approach to the diagnosis of Fabry's disease.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Samples

Heparinized whole blood samples were obtained from peripheral veins. The plasma was separated by centrifuging the samples at 3000 rpm for 5 minutes, and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the enzymatic assays were conducted (except for the samples used for the assessment of reproducibility). The samples were collected from healthy volunteers. This study was approved by the research ethics committee of the Santa Casa de Misericórdia do Pará Hospital in Belém.

### 2.2 Enzyme assays

The plasma assays were conducted according to the procedure of Morgan [14], using the artificial fluorescent 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside substrate and the  $\alpha$ -Gal B inhibitor, N-acetyl-D-galactosamine. The solution for diagnosis contains 3.38 mg of the substrate and 44.2 mg of the inhibitor, dissolved in 0.5 M sodium acetate buffer, with a pH of 4.8 and a final volume of 1 mL. This mixture is divided between a white tube and a test tube, with the plasma sample being placed in the latter. These tubes are incubated at  $30^{\circ}\text{C}$  for 2 hours, and then interrupted with 1 M glycine buffer, with a pH of 10.4. The plasma is then added to the white tube. Two other tubes, one standard and one blank standard, were prepared in order to obtain the mean coefficient based on a known concentration of 4-methylumbelliferyl. The fluorescence of the assay was measured in a Spectrumlab F95 spectrofluorimeter. The 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside, 4-methylumbelliferyl, and N-acetylgalactosamine were all obtained from Sigma-Aldrich, and the other reagents from Merck.

### 2.3 Kinetic study

In order to evaluate the thermal stability of the enzyme, three 400  $\mu\text{L}$  aliquots of the plasma samples were treated at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 or 25 minutes, prior to the enzyme assay. In order to analyze the behavior of the enzyme after different incubation times, the enzyme assay was conducted after 15 minutes, 30 minutes, 1 h, 1.5 h, 2 h or 2.5 h of incubation, once again using 3 samples and aliquots of 400  $\mu\text{L}$ .

The pH range for the optimal performance of  $\alpha$ -Gal A was determined using five plasma samples, with a 0.5 M sodium acetate buffer substrate and pH varying from 2 to 7. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the reaction were determined by plotting curves

representing different concentrations of the substrate, varying from 15.625 to 2,000  $\mu\text{M}$ , obtained from progressive dilution, with five samples being tested.

#### 2.4 Quality control of the enzyme assays

The reproducibility of the assay was tested by analyzing aliquots of 3 samples that were stored at 4°C, -20°C, and -70°C. Enzyme assays were conducted immediately following the collection of samples, and after 1, 2, 3, 4, 5, and 6 months of storage.

The stability of the fluorescence was also analyzed by taking spectrofluorimeter readings of the enzyme assays of three different samples immediately following the assay, then every hour for 6 hours, and finally, after 24 hours. All procedures were run in duplicate, with the exception of the reproducibility test.

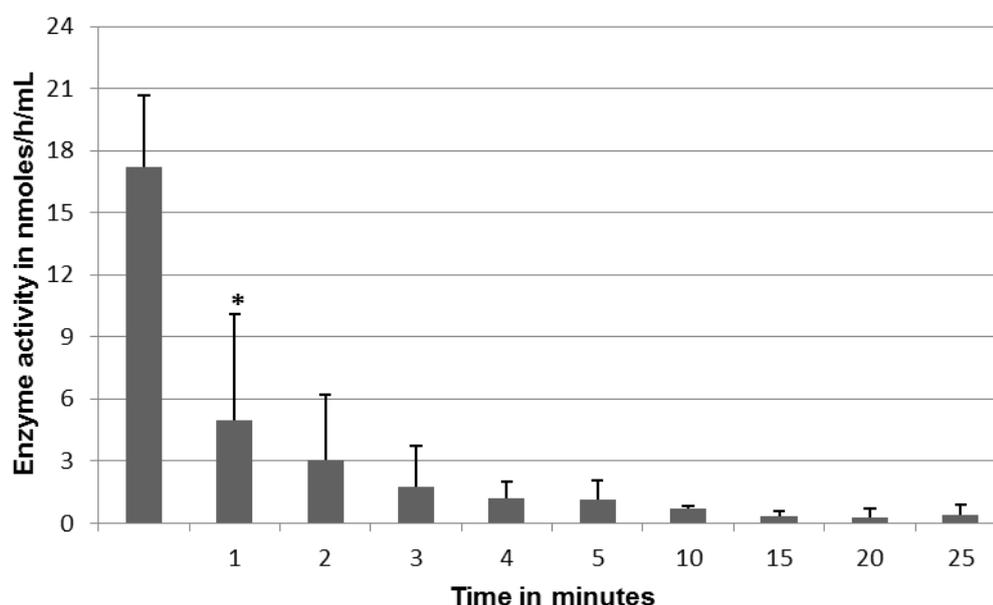
#### 2.5 Statistical analysis

The variation in thermostability, incubation time, stability of fluorescence, and reproducibility was analyzed using a one-way Analysis of Variance (ANOVA), run in the BioEstat 5.0 software[15], with a significance level of  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ . The Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and maximum velocity of the reaction ( $V_{max}$ ) were determined using the Lineweaver-Burk equation in the GraphPad Prism 5.03 software package.

### 3. Results

#### 3.1 Thermostability

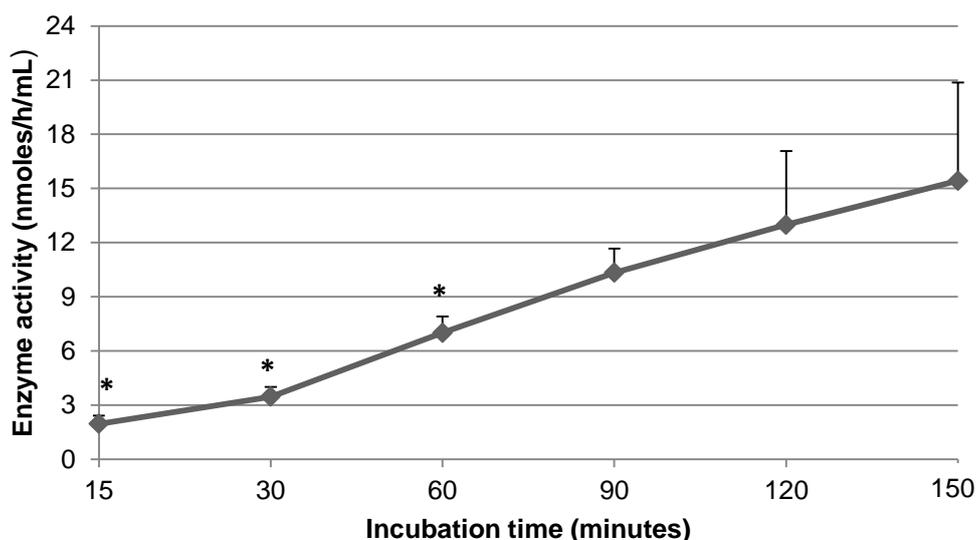
The enzyme was thermolabile, with a 71.09% reduction in activity from initial levels after 1 minute of pre-incubation at 60°C (Figure 1). After 15 minutes of pre-incubation, activity was only 2% of the original level.



**Fig. 1:** Thermostability of  $\alpha$ -Gal A enzyme activity. Values are means with standard deviations for 3 samples. \*  $p < 0.05$ .

#### 3.2 Incubation time

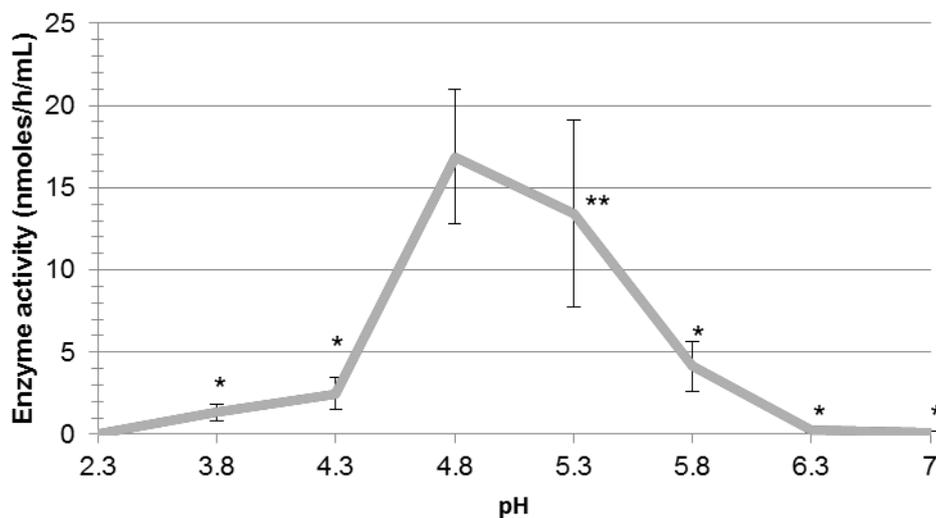
The activity of the  $\alpha$ -Gal A enzyme increased progressively according to incubation time (Figure 2).



**Fig. 2:** Activity of the  $\alpha$ -Gal A enzyme according to incubation time. Values are means with standard deviations for 3 samples.\*  $p < 0.01$  for comparison with the value recorded at the standard incubation time for diagnosis (120 minutes) described in the original protocol.

### 3.3 Optimum pH range

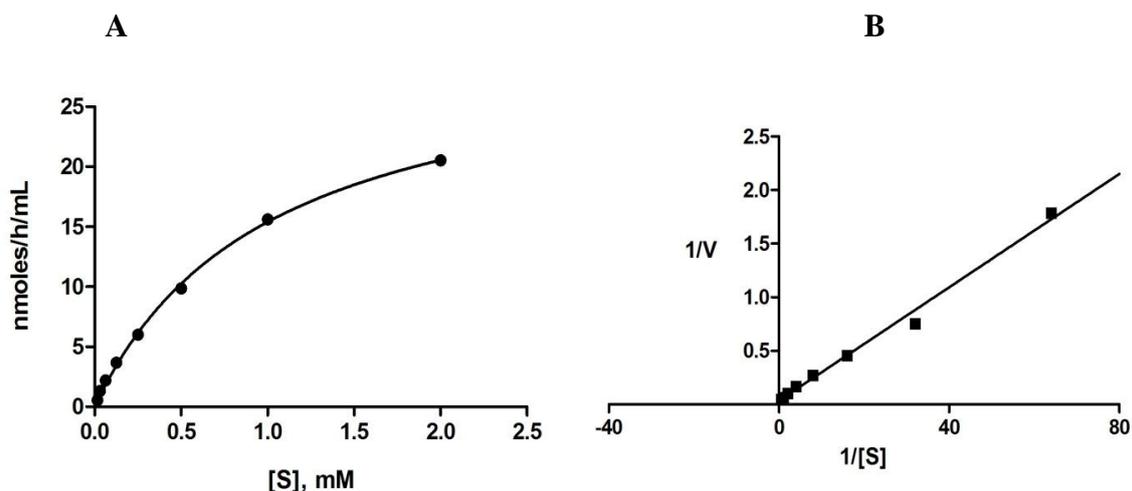
The  $\alpha$ -Gal A enzyme is extremely sensitive to variations in pH. Optimum pH was 4.8, and activity levels were significantly different at all other values (Figure 3).



**Fig. 3:** Mean and standard deviation of  $\alpha$ -Gal A enzyme activity at different pH values. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.05$  when compared to peak activity (at pH 4.8).

### 3.4 $K_m$ and $V_{max}$ values

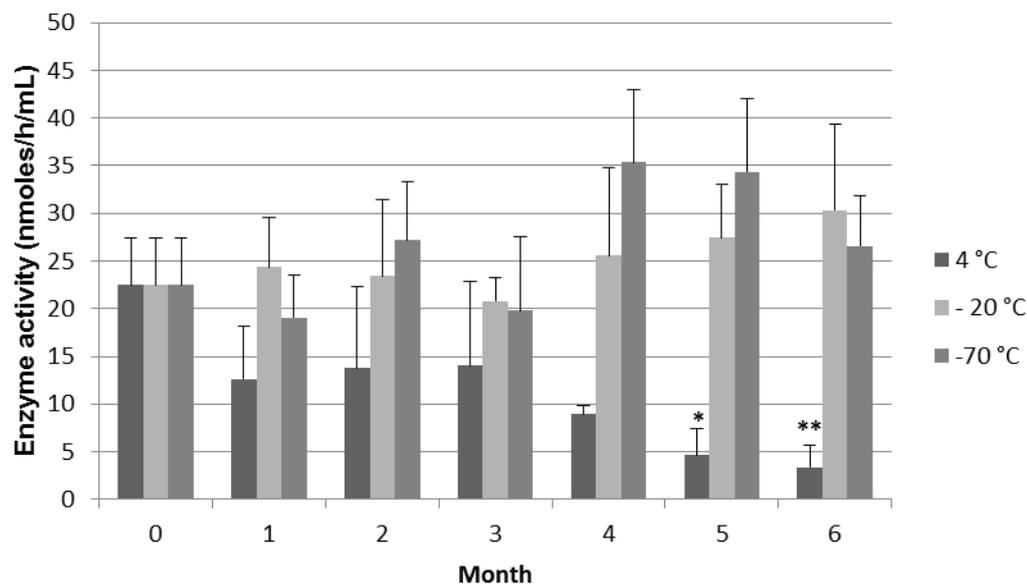
The  $K_m$  value for the  $\alpha$ -Gal A enzyme was 1.007 mM, and maximum reaction velocity was 30.9 nmoles/h/mL (Figure 4).



**Fig. 4:** Michaelis-Menten (A) and Lineweaver-Burk (B) curves for the plasmatic activity of the  $\alpha$ -Gal A enzyme in the artificial 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside substrate with the  $\alpha$ -Gal B inhibitor N-acetyl-D-galactosamine. In B, the value at which the curve crosses the y axis (0.0324) represents  $1/V_{max}$ , while that at which it crosses the x axis (-0.993) represents  $-1/K_m$ .

### 3.5 Reproducibility

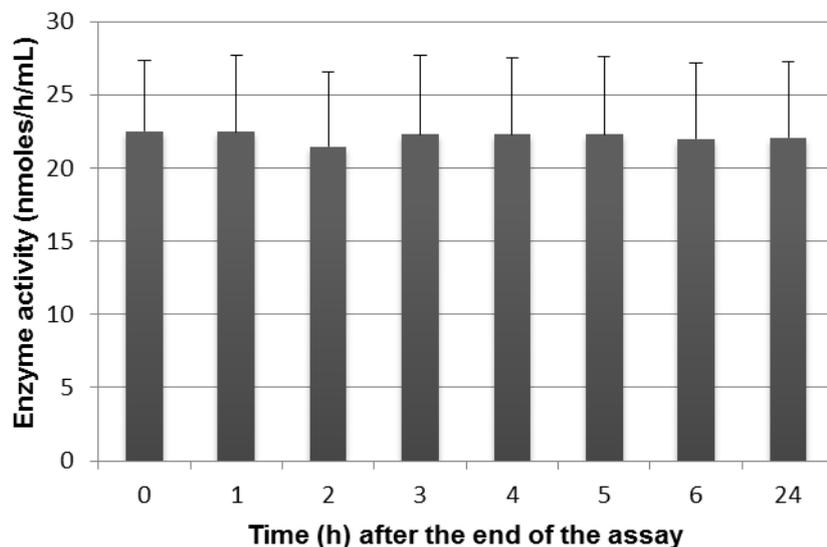
There was a significant decrease in the activity of the samples of the enzyme stored at 4°C after five or six months of storage (Figure 5). However, no change in activity levels was recorded in any month for samples stored at -20°C or -70°C.



**Fig. 5:** Activity of the  $\alpha$ -Gal A enzyme (mean and standard deviation) recorded each month following storage of the samples at 4°C, -20°C, and -70°C. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  for comparison with the baseline value (0 months) for the respective temperature.

### 3.6 Stability of fluorescence

As measured by the fluorescence of the samples, mean enzyme activity varied between  $21.47 \pm 4.87$  and  $22.49 \pm 5.08$  nmoles/h/mL over the 24-hour period following the end of the assay (Figure 6). The differences between values were negligible (non-significant), indicating that fluorescence remained stable for up to 24 hours following the assay.



**Fig. 6:** Mean ( $\pm$  SD) fluorescence at different intervals following the enzyme assays.

## 4. Discussion

### 4.1 Kinetic analysis

The  $\alpha$ -Gal A enzyme was extremely thermolabile, given that its activity decreased by 71.09% after just one minute of pre-incubation of the samples. In a similar study of a second lysosomal enzyme,  $\beta$ -galactosidase, obtained from the fibroblasts and leucocytes of healthy individuals, Coelho *et al.* [16] found that it took 80 minutes of incubation at  $42^\circ\text{C}$  to provoke a 79% reduction in activity.

The activity of the enzyme increased progressively with increasing incubation time, even after the standard time recommended for diagnosis (120 minutes), although in this case, the difference was not significant. This may reflect the fact that, even after two and a half hours, there is still some substrate available for cleavage by the enzyme.

The activity of  $\alpha$ -Gal A varied considerably at different pH values, with a marked peak at pH 4.8. Activity at all other pH values was significantly lower, and was practically null at the extreme values tested (2.3 and  $> 6.3$ ). This result is similar to that obtained by Bishop & Desnick [17], who purified the enzyme from the spleen, and recorded optimal activity at pH 4.6, in the same substrate used here.

The value for  $K_m$  recorded in the present study was 1.007 mM, much lower than that reported by Dean & Sweeley [18], i.e. 2.9 mM, for the same enzyme and substrate (4-UM- $\alpha$ -D-galactopyranoside). In this previous study, however, the enzyme was purified from liver samples, and a different experimental protocol was followed. Enzymes extracted from different types of human tissue are known to behave distinctly, and this may have contributed to the differences in the values of  $K_m$ . In addition, it is important to bear in mind that these experiments focus on the interaction of the enzyme with an artificial substrate in the laboratory, and thus may not reproduce reliably the

kinetics of the enzyme in its natural, physiological form. The use of the enzyme's natural substrate, globotriaosylceramide (GB3) would be necessary to confirm this.

The evaluation of the kinetics of the  $\alpha$ -Gal A enzyme provide an important baseline for the understanding of its behavior, and in particular for eventual comparisons with similar analyses of samples obtained from patients with Fabry's disease. This will provide important insights into the biochemical features of the disease, given that mutations of the GLA gene may interfere with the active site of the  $\alpha$ -Gal A enzyme or affect its biochemical conformation [7], which would, in turn, affect the kinetic parameters of the enzyme. Kinetic studies, associated with clinical parameters, are extremely valuable for the understanding of metabolic diseases, given the possibility of establishing a link between the biochemistry of the disorder and the symptoms presented by the patient. Some recent studies have contributed to the development of this approach. For example, Wajner *et al.* [19] described kinetic alterations in the enzyme quitotriosidase, which is a biochemical marker for Gaucher's disease and Niemann-Pick disease, which are both of the LSD group. In this case, the  $K_m$  of the enzyme was significantly lower in healthy subjects in comparison with both Gaucher and Niemann-Pick patients. The enzyme was also more thermostable in healthy individuals.

A number of studies have shown that the residual activity of mutant forms of  $\alpha$ -Gal A presents kinetic properties similar to those of the wild type, but were significantly less stable [20]. This indicates that the enzymatic deficiency of these mutants is caused primarily by the malformation of the protein folds and/or its incapacity to reach the lysosomes. It is also possible that the mutant enzyme is retained in the endoplasmatic reticulum after synthesis, where it is degraded prematurely.

#### 4.2 Quality control of the enzyme assay

The storage temperature of the samples did not interfere in the activity of the enzyme until the fifth month, when a significant decrease in the activity of the samples stored at 4°C was recorded. No previous studies have analyzed the best storage conditions for biological samples of this type and, while significant variation was only observed in some months at 4°C, it is clear that all the samples were susceptible to certain fluctuations in their enzyme activity. While this may not seem particularly relevant, it is important to remember that samples which present inconclusive results due to marginal values may mask false positive or false negative results (principally in the case of heterozygote women). In this case, the immediate processing and testing of the  $\alpha$ -Gal A enzyme would be the recommended procedure.

It is possible to confirm that the fluorescence of the samples was extremely stable. The greatest variation was observed in the second hour, when the fluorescence decreased 4.54%, although it increased again during the subsequent hour, and after 24 hours, it was still 98.22% of the initial level. This finding is extremely important from the perspective of routine laboratory mishaps, such as a loss of electrical power, given that minor interruptions to the analysis would apparently not have any major effect on the results or require the repetition of the experimental protocol. It is important to note that these findings are the first of their kind, as no comparable studies were found in the literature.

This is the first kinetic study of the  $\alpha$ -Gal A enzyme from plasma using the same procedures as the diagnostic test, with original data on quality control. The understanding of the kinetic parameters of the enzyme and its *in vitro* behavior will be important for the improvement of the diagnosis of Fabry's disease in the laboratory, as

well as providing a baseline for future analyses of the kinetics of the  $\alpha$ -Gal A of individuals affected by mutations of this enzyme.

## 5. Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Capacitação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), and Instituto Nacional de Genética Médica Populacional / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 6. References

1. SCHIFFMANN, R.; MURRAY, G. J.; TRECO, D.; DANIEL, P.; SELLOSMOURA, M.; MYERS, M.; QUIRK, J. M.; ZIRZOW, G. C.; BOROWSKI, M.; LOVEDAY, K.; ANDERSON, T.; GILLESPIE, F.; OLIVER, K. L.; JEFFRIES, N. O.; DOO, E.; LIANG, T. J.; KREPS, C.; GUNTER, K.; FREI, K.; CRUTCHFIELD, K.; SELDEN, R. F.; BRADY, R. O. Infusion of  $\alpha$ -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. **Medical Sciences**, **97**:365-370. 2000.
2. SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8<sup>a</sup> ed, New York, EUA, McGraw-Hill, Inc. 2001.
3. MARTINEZ, P.; AGGIO, M.; ROZENFELD, P. High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients. **J Inherit Metab Dis**, **30**:365-369. 2007.
4. 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.
5. SHIN, S.-H.; MURRAY, G.J.; KLUEPFEL-STAHN, S.; COONEY, A.M.; QUIRK, J.M.; SCHIFFMANN, R.; BRADY, R.O.; KANESKI, C.R. Screening for pharmacological chaperones in Fabry disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **359**:168-173. 2007.
6. FILONI, C.; CACIOTTI, A.; CARRARESI, L.; CAVICCHI, C.; PARINI, R.; ANTUZZI, D.; ZAMPETTI, A.; FERIOZZI, S.; POISETTI, P.; GARMAN, S.C.; GUERRINI, R.; ZAMMARCHI, E.; DONATI, M. A.; MORRONE, A. Functional studies of new GLA gene mutations leading to conformational fabry disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1802**:247-252. 2010.
7. GARMAN, S.C.; GARBOCZI, D.N. The Molecular Defect Leading to Fabry Disease: Structure of Human  $\alpha$ -Galactosidase. **Journal of Molecular Biology** **337**:319–335. 2004.
8. 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.
9. MASSON, C.; CISSÉ, I.; SIMON, V.; INSALACO, P.; AUDRAN, M. Fabry disease: a review. **Joint Bone Spine**, **71**:381–383. 2003.
10. DESNICK, R.J.; BRADY, R.O. Fabry Disease in Childhood. **The Journal of Pediatrics**, **144**:20-26. 2004.

11. KOTNIK, J.; KOTINIK, F.; DESNICK, R. J. Fabry disease. A case report. **Acta Dermatoven APA**, **14**:15-19. 2005.
12. PORSCHE, D.B.; NUNES, A.C.F.; MILANI, V.; ROSSATO, L.B.; MATTOS, C.B.; TSAO, M.; NETTO, C.; BURINS, M.; PEREIRA, F.; MATTE, U.; GIUGLIANI, R.; BARROS, E.J.G. Fabry disease in hemodialysis patients in southern brazil: prevalence study and clinical report. **Renal failure**, **30**:825-830. 2008.
13. CORDEIRO, C.A.; ORÉFICE, F.; LASMAR, E.P.; SANTOS, H.H.; VALADARES, E.R. Córnea verticilata –marcador clinico da doença de Fabry: relato de caso. **Arq Bras Oftalmol**, **70**(4):701-705. 2007.
14. 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.
15. 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.
16. COELHO, J.C.; SOPELSA, A.M.I; TOBO, P.R.; SEVERINI, M.H.A.; SILVA, C.D.; GIUGLIANI, R. Biochemical studies on leukocytes and fibroblast human  $\beta$ -galactosidase. **Clinical Biochemistry**, **32**(3):167-170. 1999.
17. BISHOP, D.F.; DESNICK, R.J. Affinity purification of alpha-galactosidase A from human spleen, placenta, and plasma with elimination of pyrogenic contamination. Properties of the purified splenic enzyme compared to other forms. **J Biol Chem** **10**:1307-16. 1981.
18. DEAN, K.J.; SWEELEY, C.C. Studies on human liver  $\alpha$ -Galactosidases – Purification of  $\alpha$ -Galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, **254**: 9994-10000. 1979.
19. WAJNER, A.; MICHELIN, K.; BURIN, M.G.; PIRES, R.F.; PEREIRA, M.L.S.; GIUGLIANI, R.; COELHO, J.C. Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases. **Clinical Biochemistry**, **37**:893-897. 2004.
20. SHI, Z.D.; MOTABAR, O.; GOLDIN, E.LIU, K.; SOUTHALL, N.; SIDRANSKY, E.; AUSTIN, C.P.; GRIFFITHS, G.L.; ZHENG, W. Synthesis and characterization of a new fluorogenic substrate for alpha-galactosidase. **Anal Bioanal Chem**, **394**: 1903-1909. 2009.

## 9 ANEXOS

### 9.1 ANEXO A: PROTOCOLOS LABORATORIAIS

#### 9.1.1 Ensaio enzimático da $\alpha$ -Gal A em leucócitos

##### A) Separação e lise de leucócitos (Skoog e Beck, 1956).

➤ Reagentes:

- a) Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9%: Dissolver 0,9g de NaCl em 100mL de água destilada.
- b) Ácido Cítrico Dextrose (ACD): Adicionar 4,5g de glicose, 4,4g de citrato de sódio e 1,46g de ácido cítrico em 200 mL de NaCl 0,9%.
- c) Dextran 6%: Dissolver 30g de dextran em 500mL de NaCl 0,9%.
- d) Glicose 5%: Dissolver 17,5g de glicose em 350mL de NaCl 0,9%.
- e) NaCl 3,6%: Dissolver 1,8g de NaCl em 50mL de água destilada.
- f) Fórmula para preparar a mistura para separação de leucócitos: 150mL de ACD + 500mL de Dextran 6% + 350mL de glicose 5%.

A mistura é armazenada em alíquotas de 10mL a -20°C.

➤ Procedimento:

Transferir 10mL de sangue heparinizado e adicionar 10 mL da mistura para separação de leucócitos. Misturar por inversão e aguardar a sedimentação dos eritrócitos por 45 a 60 minutos. Transferir o sobrenadante para um tubo de centrífuga cônico plástico, gelado, e centrifugar a 200 RPM por 10 minutos a 4°C. A partir deste momento, as amostras devem ser mantidas imersas em gelo.

Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e adicionar 0,8mL de NaCl 0,9%. Ressuspender os leucócitos com vortex. Adicionar 2,4mL de água destilada gelada, misturar com vortex e deixar 90 segundos no gelo. Adicionar 0,8mL de NaCl 3,6%, misturar e centrifugar a 3000 RPM por 5 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e, se ainda houver eritrócitos no pellet, repetir a operação descrita no parágrafo anterior.

Se ainda houver eritrócitos no pellet, estes poderão ser removidos com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Adicionar de 500 $\mu$ L a 1mL de água destilada gelada no pellet, ressuspender em vortex e armazenar em freezer a -40°C.

➤ Lise de leucócitos:

Lisar as amostras em sonicador (Bandelin Sonopuls) com 2 pulsos de 10 segundos, intensidade 50, deixando a amostra 1 minuto em banho de gelo entre cada pulso.

## **B) Dosagem de proteínas (adaptado de Lowry *et al*, 1951).**

➤ Reagentes:

- d) Carbonato de sódio 2% com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M: Pesar 4g de NaOH e 20g de carbonato de sódio e dissolver em 1L de água destilada. Armazenar a 4°C.
- e) Sulfato de cobre 1%: Dissolver 1g de sulfato de cobre em 100mL de água destilada.
- f) Tartarato de sódio e potássio 2%: Dissolver 2g de tartarato de sódio e potássio em 100 mL de água destilada.
- g) Folin Ciocalteau: Diluir 1mL em 1,4mL de água destilada, no momento do uso.
- h) Reativo Alcalino de Cobre: Deve ser preparado no momento do uso mantendo a seguinte proporção:
  - 1. 10mL de carbonato de sódio 2% com NaOH 0,1M;
  - 2. 0,1mL de sulfato de cobre 1%;
  - 3. 0,1mL de tartarato de sódio e potássio.
- i) Albumina de soro bovino: Dissolver 2mg em 10mL de água destilada. Manter a 4°C.

➤ Procedimento:

Em um tubo de ensaio, colocar 20µL da solução de leucócitos e adicionar água destilada para completar o volume de 500 µL. Fazer uma curva de albumina contendo 5 pontos mais o branco de acordo com o quadro a seguir:

**Quadro 3 – Curva de albumina**

<b>Concentração</b>	<b>Volume de albumina (µL)</b>	<b>Volume de água (µL)</b>
Br	-	500
20	100	400
40	200	300
60	300	200
80	400	100
100	500	-

Adicionar 1,5 mL de reativo alcalino de cobre em todos os tubos (testes e pontos da curva) sob agitação em vortex. Cronometrar 10 minutos a partir do primeiro tubo. Após decorrido o tempo, adicionar rapidamente e sob agitação em vortex, 150 µL de Folin. Cronometrar 30 minutos a partir do primeiro tubo. Ler a absorvância em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000 UV) a 750nm, zerando com água destilada.

➤ Cálculos:

Coeficiente médio (QM) = Concentração / Absorvância - Branco

Concentração (µg de proteína/100µL) = QM x Absorvância x 5

### **C) Curva de Metilumbeliferona (MU)**

Esta curva é utilizada como um padrão, visto que as concentrações da MU são conhecidas, para a geração de um coeficiente médio que é utilizado posteriormente para calcular a quantidade de substrato clivado pela enzima.

➤ Reagentes:

- MU 25 mM: Dissolver 49,5mg de metilumbeliferona em 10mL de água destilada. Armazenar a -20°C.
- MU 250 µM: Retirar 100 µL de MU 25 mM e completar até 10 mL de água destilada. Armazenar a -20°C.

➤ Pontos da curva:

- 0,5 nmol: 100 µL de MU 250 µM e completar até 10 mL de água destilada.
- 1 nmol: 200 µL de MU 250 µM e completar até 10 mL de água destilada.
- 2 nmoles: 400 µL de MU 250 µM e completar até 10 mL de água destilada.
- 3 nmoles: 600 µL de MU 250 µM e completar até 10 mL de água destilada.

Os pontos são aliqotados (400 µL) e armazenados a -20°C.

➤ Curva

**Quadro 4 – Procedimento para a realização da curva de MU**

<b>Concentração</b>	<b>Ponto de curva (µL)</b>	<b>Tampão Glicina-NaOH 0,5 M pH 10,3 (mL)</b>
Br	-	3
0,5	400	2,6
1	400	2,6
2	400	2,6
3	400	2,6

Ler em espectrofluorímetro (Spectrumlab F95) com comprimento de onda 365nm (excitação) e 450nm (emissão), no momento do ensaio enzimático em leucócitos. O cálculo do QM se dá pela Concentração / (Fluorescência – Br).

### D) Ensaio enzimático em leucócitos

Dissolver 1,69 mg do substrato 4-metilumbeliferil-alfa-D-galactopiranosídeo em 1 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,8, com aquecimento. O procedimento está descrito no quadro 5.

**Quadro 5** – Procedimento laboratorial para o ensaio enzimático de  $\alpha$ -Gal A em leucócitos

	Teste	Branco do Teste
Amostra	20 $\mu$ L	-
Água destilada	-	20
Substrato	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L
Incubar a 37°C por 2 horas.		
Tampão Glicina-NaOH 0,5 M pH 10,3	1,5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L
Ler fluorescência em espectrofluorímetro (Spectrumlab F95): comprimento de onda 365nm (excitação) e 450nm (emissão). Usar a curva de 4-metilumbeliferona.		

#### Cálculo

$\text{Nmoles/h/mg proteína} = \Delta F \times Q_m \times 2500 / \text{proteína}$

**Valor de referência:** 20 – 96 nmoles/h/mg proteína

#### 9.1.2 Padronização do ensaio enzimático em plasma (Morgan, *et al.*, 1990)

Dissolver 3,38 mg do substrato 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,5 M de pH 4,8, com aquecimento. Em seguida adicionar 44,2 mg do inibidor para a  $\alpha$ -Gal B (N-aceti-D-galactosamina). O procedimento está descrito no quadro 6.

**Quadro 6** – Procedimento laboratorial para o ensaio enzimático de  $\alpha$ -Gal A em plasma

	Teste	Branco do Teste
Amostra	100 $\mu$ L	-
Substrato com inibidor	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incubar a 30°C por 2 horas.		
Parar a reação com 1 mL de tampão glicina 1 M pH 10,4. Adicionar 100 $\mu$ L de amostra nos brancos.		
Preparar padrão e branco do padrão para cada amostra.		
Branco do padrão	Padrão	
200 $\mu$ L de água	200 $\mu$ L de metilumbeliferona	
0,9 mL de glicina	0,9 mL de glicina	
100 $\mu$ L de plasma	100 $\mu$ L de plasma	
Ler fluorescência em espectrofluorímetro (Spectrumlab F95): comprimento de onda 365nm (excitação) e 450nm (emissão).		

**Cálculo**

$$\text{Padrão} - \text{Br padrão} = \Delta P$$

$$Q_m = [\text{MU}] / \Delta P$$

$$\Delta T \times Q_m \times 5 = \text{nmoles/h/mL}$$

**Valor de referência:** 4 – 28 nmoles/h/mL

9.2 ANEXO B: TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ  
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**TERMO DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 10 de junho de 2007 o projeto de pesquisa intitulado **“TRIAGEM BIOQUÍMICA DA ALFA GALACTOSIDASE A EM INDIVÍDUOS COM SINAIS E SINTOMAS SEMELHANTES AOS DESCRITOS NA DOENÇA DE FABRY”** de autoria da discente CAMILA DE BRITTO PONTES RODRIGUES PARÁ, orientada pelo Prof.Doutor LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA, obtendo **APROVAÇÃO** com autorização para desenvolvê-lo, na UFPa.

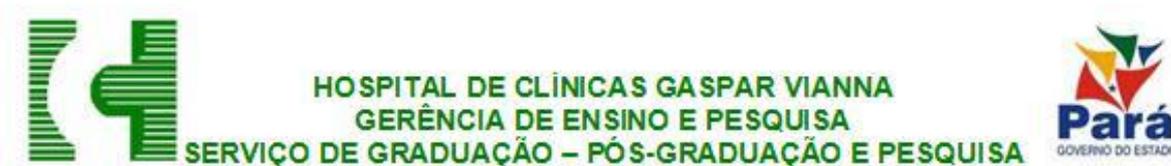
Belém, 26 de junho de 2007.

Informo ainda, que V. As. Deverá apresentar relatório semestral (previsto para 01/12/07), anual e/ ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto ( item VII.13.d. da Resolução nº 196/96 – CNS / MS).

Atenciosamente,

*Simone R. S. Silva Conde*  
*Clinica Médica Doenças Hereditárias*  
*CRM: 4791*  
*Simone Conde*  
Dra. Simone Conde  
Coordenadora do CEP

### 9.3 ANEXO C: DECLARAÇÃO DE ACEITE DO HOSPITAL DE CLÍNICAS GASPAR VIANNA

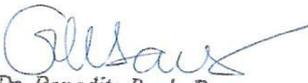


## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins em nome da **Fundação Pública Estadual Hospital de Clínicas Gaspar Vianna**, ter conhecimento do Anteprojeto de Pesquisa: **“Triagem Bioquímica da alfa galactosidase A em pacientes com sinais e sintomas semelhantes aos descritos na Doença de Fabry”**, de autoria de Camila de Britto Pontes Rodrigues Pará, tendo o mesmo recebido aceite para seu desenvolvimento nesta instituição, durante o período preestabelecido pelo cronograma.

Informamos que a publicação dos resultados da referida pesquisa só poderão ser publicados mediante autorização da Fundação Pública Hospital de Clínicas Gaspar Vianna a qual deverá ser obrigatoriamente citada como local de realização do trabalho.

Belém, 09 de novembro de 2007

  
Prof. Dr. Benedito Paulo Bezerra  
Gerente de Ensino e Pesquisa da FHCV

 Gerente de Ensino e Pesquisa da FHCV

## 9.4 ANEXO D: DECLARAÇÃO DE ACEITE DO HOSPITAL OPHIR LOYOLA



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE .  
HOSPITAL OPHIR LOYOLA



DIRETORIA DE ENSINO E PESQUISA  
DEPARTAMENTO DE ENSINO E PESQUISA  
DIVISÃO DE PESQUISA E PREVENÇÃO DE CÂNCER  
AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA

Belém, 29 de julho de 2008

À  
Sra. Sílvia R. da Cruz  
Chefia da Nefrologia do HOL

Sra. Chefe,

Apresentamos os pesquisadores Luiz Carlos Santana da Silva (pesquisador responsável), Camila de Britto Pontes Rodrigues Pará, Gustavo Monteiro Viana, Rosalba Teixeira Bastos e Ana Cristina de Lima Figueiredo Duarte, os mesmos, estão autorizados a realizar pesquisa de dados, no período de **30/07/08 à 30/12/08** para o Projeto intitulado “ **Triagem Bioquímica de Alfa Galactosidase A em Indivíduos com sinais e sintomas semelhantes aos descritos na doença de Fabry**”. O mesmo está de acordo com a Resolução nº 196/96 e foi aprovado pelo **Comitê de Ética em Pesquisa/ Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, em 06/06/2007** . Esclarecemos que o projeto acima citado, obedeceu todos os trâmites legais dentro desta Instituição culminado nesta autorização.

Certos de Vossa atenção colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários.

Atenciosamente,

*Luciene das Graças Araújo*  
Chefia da Div. Pesquisa e Prev. Câncer/ DEP/HOL