



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUCIANA BRANDÃO PAIM MARQUES

FREQUÊNCIA DE DOENÇA DE FABRY EM PACIENTES COM ARTRITE
IDIOPÁTICA JUVENIL (AIJ)

CAMPINAS
2020

LUCIANA BRANDÃO PAIM MARQUES

FREQUÊNCIA DE DOENÇA DE FABRY EM PACIENTES COM ARTRITE
IDIOPÁTICA JUVENIL (AIJ)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Ciências.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
LUCIANA BRANDÃO PAIM MARQUES, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P159f Paim Marques, Luciana Brandão, 1973-
Frequência de doença de Fabry em pacientes com artrite idiopática juvenil (AIJ) / Luciana Brandão Paim Marques. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Simone Appenzeller.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Fabry. 2. Artrite crônica. 3. Artrite juvenil. 4. Alfa galactosidase A. I. Appenzeller, Simone, 1974-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fabry disease frequency in juvenile idiopathic arthritis patients

Palavras-chave em inglês:

Fabry disease

Chronic arthritis

Juvenile arthritis

Alpha galactosidase A

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Simone Appenzeller [Orientador]

Gil Guerra Júnior

Roberto Marini

Flavio Roberto Sztajnbok

André de Souza Cavalcanti

Data de defesa: 21-08-2020

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7800-1076>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4501034569521418>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUCIANA BRANDÃO PAIM MARQUES

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER**
 - 2. PROF. DR. ROBERTO MARINI**
 - 3. PROF. DR. GIL GUERRA JÚNIOR**
 - 4. PROF. DR. ANDRÉ DE SOUZA CAVALCANTI**
 - 5. PROF. DR. FLAVIO ROBERTO SZTAJNBOK**
-

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 21/08/2020

DEDICATÓRIA

- Ao meu marido e companheiro de vida Luiz Otávio Marques, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida, assim como no caminho de alegria e desafios que decidimos trilhar juntos. Que a vida nos dê, cada dia mais sabedoria e mantenha nossa casa aquecida por conversas, risos e muito amor. Você tem o dom de me acalmar, me fazer rir e tornar tudo à sua volta mais leve e feliz. Você é o grande esteio da minha vida até aqui. Simplesmente te amo.

- À minha mãe Maria Lúcia que me ensinou que o estudo é o caminho para a independência e, independência é a condição “si ne qua non” para uma mulher do nosso tempo. Àquela que me mostrou como ser forte e perseguir meus sonhos, mantendo os pés no chão com a retidão necessária para ser uma pessoa “de bem” e “do bem”. Amor eterno Mãe.

- À minha filha Maria Clara. A luz de minha vida. A razão para perseguirmos sempre o melhor. Muito amor sempre minha filha.

- Ao meu pai José Luiz Paim, meu grande incentivador, meu amigo, meu exemplo de vida. Aonde você estiver este título é dedicado a você pai. Um dia estaremos junto de novo.

- Ao Arcanjo Miguel, do mal: libertai-me; do inimigo: livrai-me; das tempestades: socorrei-me; dos perigos: protegei-me; das perseguições: salvai-me! Glorioso São Miguel Arcanjo, pelo poder celeste a vós conferido, és para mim o guerreiro valente e conduzi-me nos caminhos da paz.

AGRADECIMENTOS

À Professora Simone Appenzeller pelo apoio incansável e pelas longas horas dispensadas a este trabalho.

Ao Hospital Infantil Albert Sabin- “Minha casa”.

À Shire Brasil- pelo apoio científico durante este estudo.

À Aureliana Euclides profissional de saúde portadora e mãe de paciente com Doença de Fabry, sua garra e determinação são inspiradoras.

À Fábia Sardinha pelo suporte no Hospital Albert Sabin, na coleta de dados, pela paciência e cuidado dispensados a mim e aos pacientes.

À Professora Dra. Erlane Marques geneticista do Hospital Infantil Albert Sabin. Amiga de longa data, de mente brilhante e coração límpido, sempre abertos ao conhecimento.

À Dra. Islane Verçosa pela oportunidade e confiança de ter aberto a porta de sua “casa”, o CAVIVER para nós. A sua generosidade e seu compromisso são inspiradores. Tens toda a minha admiração.

À Dra. Paula Carneiro, que assim como a Dra. Islane nos dedicou longas manhãs, sempre com o compromisso de fazer o seu melhor, sem nunca perder a ternura e o bom humor.

À Doutora Márcia Maria Souto Maior por sua dedicação inspiradora aos pacientes, ao ensino e pela receptividade sem igual para a realização desse projeto.

RESUMO

Introdução: A doença de Fabry (DF) é um distúrbio de armazenamento lisossômico multissistêmico raro, ligado ao X, que resulta de uma deficiência na enzima alfa-galactosidase A (α Gal-A). A prevalência de DF entre pacientes com diagnóstico estabelecido de artrite idiopática juvenil (AIJ) é desconhecida, e a DF clássica tem início na infância com sintomas inespecíficos leves que podem afetar o sistema musculoesquelético. **Objetivo:** Identificar a frequência de DF em uma coorte de AIJ por sintomas clínicos precoces, títulos de enzimas e genotipagem de GLA. **Materiais:** Foram selecionadas crianças com AIJ de uma coorte do Hospital Infantil terciário. Informações clínicas, laboratoriais e familiares foram registradas. Testes genéticos moleculares para detectar variantes patogênicas no gene *GLA* foram realizados nas pacientes do sexo feminino e análises enzimáticas nos do sexo masculino. **Resultados:** Dos 89 pacientes (56,17% do sexo feminino, início da doença: $8,93 \pm 4,35$ anos), um paciente do sexo masculino (1,12%) apresentou variante patogênica no gene *GLA* (c.1244T>C; p.L415P), um paciente do sexo feminino apresentou variante de significado incerto: c.38C> T (p.Ala13Val). A atividade enzimática da α Gal-A estava ligeiramente diminuída em outros 3 pacientes (3,4%). Dois pacientes apresentavam história e sintomas clínicos sugestivos de DF (dispepsia, hipohidrose, acroparestesia e dispepsia, dificuldade de ganho de peso, história familiar de morte súbita e doença renal em estágio terminal). O terceiro não apresentava sintomas relacionados à DF ou antecedentes familiares sugestivos. Em 26 (48,14%) pacientes também foram identificadas alterações moleculares, sendo em 24 (44,44%) o polimorfismo intrônico de nucleotídeo único (SNP)

c.1000-22C> T (rs2071228) no intron 6, em 16 (61,53%) com a variante c.370-81_- 77del (rs5903184) no intron 2, em 15 (57,69%) pacientes com a variante c.640-16A> G (rs2071397) no intron 4; em 8 (30,76%) deles com c.-10C> T (rs2071225) no 5'UTR exon 1; em 7 (26,92%) pacientes com a variante c.548-125C> G (rs2071396) no intron 3 e, em 4 com a variantes c.-12G> A (rs3027585) 5'UTR exon 1 que isolaram ou combinaram tiveram associação positiva com os sintomas da DF. **Conclusões:** A incidência da DF na presente coorte foi de 1,12%. Também se observou SNP intrônicos associados aos sintomas associados DF em pacientes com AIJ.

Descritores: Doença de Fabry. Artrite Juvenil. Córnea. Genética.

ABSTRACT

Background: Fabry disease (FD) is a rare, X-linked, multisystemic lysosomal storage disorder (LSD) that results from a deficiency in the hydrolase alpha-galactosidase A (α Gal-A). The prevalence of FD among juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients with an established diagnosis is unknown. The classic FD has its onset in childhood with mild non-specific symptoms affecting the musculoskeletal system. **Objective:** The aim was to identify the frequency of FD in a JIA cohort by early clinical symptoms, enzyme titers, and *GLA* genotyping. **Materials:** Children with JIA from a tertiary Children Hospital cohort were selected. Clinical, laboratory, and familiar information were recorded. Molecular genetic testing to detect *GLA* gene mutations was performed in the girls and enzymatic analysis in the boys. **Results:** From 89 patients (56.17% female, disease onset: 8.93 ± 4.35 years), one male (1.12%) patient presented a pathogenic mutation in *GLA* gene (c.1244T>C p.L415P), one female patient had a VUS: c.38C>T (p.Ala13Val) with a positive association with the cornea, The enzymatic activity of α Gal-A was slightly decreased in 3 other (3.4%) patients. Two patients had history and clinical symptoms suggestive of FD (dyspepsia, hypohidrosis, acroparesthesia and dyspepsia, weight gain difficulty, familial history of sudden death, and end-stage renal disease). The third one had no symptoms related to FD or suggestive family history. We also identified in 26 (48.14%) abnormal genetic tests, and the intronic single nucleotide polymorphisms (SNPs) on 24 (44.44%) (c.1000-22C>T (rs2071228) on intron 6, 16 (61,53%) c.370-81_-77del (rs5903184) on intron 2, 15 (57,69%) patients with variant c.640-16A>G (rs2071397) on intron 4; 8 (30,76%) c.-10C>T (rs2071225) on 5'UTR exon 1; 7 (26,92%) patients with c.548-125C>G

(rs2071396) on intron 3, and 4 c.-12G>A (rs3027585) on 5'UTR on exon 1 that isolated or in combination had positive association with FD symptoms. **Conclusions:** The incidence of Fabry disease in our cohort was 1.12%, higher than the described incidence in the literature. We also observed intronic SNP associated with FD symptoms in JIA patients.

Descriptors: Fabry disease. Juvenile arthritis. Cornea. Genetic.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 Subtipos de AIJ -----	26
Tabela 2: Frequência dos subtipos de AIJ -----	36
Tabela 3: Frequência de Medicções utilizadas -----	37
Tabela 4: Frequência de sintomas clínicos -----	38
Tabela 5: Frequência de História familiar -----	39
Tabela 6: Frequência de Alterações Laboratoriais -----	39
Tabela 7: Frequência de sintomas Cardíacos -----	40
Tabela 8: Alterações Oftalmológicas -----	41
Tabela 9: Correlação entre genéticas e sinais clinicos -----	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α Gal-A- Alfa Galactosidase A

5'UTR – Região não codificada 5' ou untranslated region 5'

AAN – Anticorpo Anti Núcleo

AIJ - Artrite Idiopática Juvenil

AINES - Antiinflamatório não esteroideal

AIT- Acidente isquêmico Transitório

Anti-TNF - Anti-Tumor necrosis factor

ARE – Artrite Relacionada à Entesite

AVC - Acidente Vascular Cerebral

CD1d- cluster of differentiation 1.

CE - Células Endoteliais

DAMPs - Damage-associated molecular pattern.

DF - Doença de Fabry

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EA – Espondilite Anquilosante

EL- Esfigolípides

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ES – Esfingolípide(s)

FHDE - Fatores Hiperpolarizantes Derivados do Endotélio

FR - Fator Reumatóide

Gb3 - Globotriaosilceramida

HCVE - Hipertrofia Concêntrica de Ventrículo Esquerdo

HGNC- HUGO Gene Nomenclature Committee

HIAS - Hospital Infantil Albert Sabin

HIC - Haplótipos intrônicos complexos

HLA - Human leukocyte antigen (antígeno Humano leucocitário)

IFI - Imunofluorescência Indireta

IL- Interleucina

ILAR - International League Against Rheumatism (Liga Internacional contra o Reumatismo)

MP- Membrana Plasmática

MTX - Metotrexate

NK - Natural Killers (Assassinos naturais)

NO - Nítric oxide (Óxido Nítrico)

OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase)

PIO - Pressão Intraocular

PolyPhen - Polymorphism Phenotyping

RAE – Redução de Atividade Enzimática

RNA_m- messenger-Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico mensageiro)

RNP - Ribonucleoproteína

SI – Sacroileíte

SIFT- Sorting Intolerant from Tolerant

Sm - Smith

SNP – Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismo singular único)

TFEB - Fator de Transcrição EB (Transcription factor EB)

TLR4- Toll-Like Receptor 4

TNF – Tumor Necrosis factor (Fator de Necrose Tumoral)

VD- Ventrículo Direito

VE- Ventrículo Esquerdo

VEP Ensembl – Variant Effect Predictor Ensembl- banco de dados genético

VUS or VOUS- Variant of uncertain significance (variante de significado incerto).

SUMÁRIO

1. Introdução -----	16
2. Objetivos -----	27
2.1. Objetivo Principal -----	27
2.2. Objetivos Secundários -----	27
3. Material e Métodos -----	28
3.1. Aspectos Éticos -----	28
3.2. Avaliação dos pacientes com Artrite Idiopática Juvenil (A-----	29
3.3. Questionário de Estudo -----	30
3.4. Avaliação Clínica -----	31
3.5. Teste Genético -----	33
3.6. Análise Estatística -----	35
4. Resultados -----	36
5. Discussão -----	48
6. Conclusão -----	59
7. Considerações Finais -----	60
8. Referências -----	61
9. Anexos -----	70

1. INTRODUÇÃO

A doença de Anderson-Fabry ou Doença de Fabry (DF) é uma condição rara, com herança ligada ao X, é uma enfermidade multissistêmica de depósito lisossomal, devida a uma variante no gene *GLA*, que resulta na deficiência da hidrolase alfa-galactosidase A (α -GalA). Sua prevalência ao nascimento é estimada em 1:40.000-170.000 (1). Em uma triagem neonatal encontrou-se uma incidência aumentada de DF 1:3.100 na Itália (2) e 1:1.500 entre nascidos do sexo masculino em Taiwan (3).

Os dermatologistas Johannes Fabry e Williams Anderson foram os primeiros a descrever “angioqueratomas corporis difusos” em 1898 (4, 5), os quais foram reconhecidos inicialmente como uma doença vascular sistêmica, e posteriormente, em 1963, atribuídos à doença de depósito (6) de lipídios (7), logo após a identificação do acúmulo de globotriaosilceramida (Gb3) em diferentes tipos de células (8). Muitos anos mais tarde, foi estabelecida a sua relação com insuficiência ou ausência de α Gal-A, enzima que catalisa a quebra hidrolítica da molécula terminal de galactose da Gb3 (9). A caracterização genética como doença ligada ao X, foi realizada em 1965 (10). O gene *GLA* (*Xq21.3-q22*), foi clonado e sequenciado por Calhoun e colaboradores em 1985 (11) e atualmente existem mais de 850 variantes patogênicas descritas do *GLA* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

Os estudos iniciais no campo das doenças de depósito lisossomal, identificam os lisossomos como organelas originadas do complexo de Golgi, que transportam enzimas hidrolíticas com a função de digerir toda e qualquer substância que é “ingerida” pela célula, por processo de endocitose. O complexo de Golgi, e os lisossomos, estão presentes na maioria das células nucleadas, ou

eucarióticas, o que se reflete no acometimento de diversos órgãos. Assim, o progressivo acúmulo intra e extracelular de glicoesfingolípides como Gb3 e globotriaosilesfingosine (liso-Gb3) em várias estruturas como endotélio vascular, cardiomiócitos, neurônios do gânglio da raiz dorsal e do sistema nervoso autônomo cerebral, todos os tipos de células renais e gastrintestinais causando processo inflamatório e vasculopatia (9, 12).

Samarani et al. em 2018 (13), propuseram um modelo baseado em experimentos “in vitro” para o dano intracelular causado pelo Gb3. Nele células carregadas de sacarose, ativam a formação de novos lisossomos controlada pela translocação nuclear do Fator de Transcrição EB (**Transcription factor EB – TFEB**) (14). O *TFEB* é o principal gene regulador da biogênese lisossomal. Ele codifica o fator de transcrição que coordena a expressão de hidrolases lisossomais, membranas proteicas e genes envolvidos na autofagia. Na biogênese lisossômica, após a depleção de nutrientes e sob condições anormais de armazenamento lisossômico, como nas doenças lisossomais, incluindo a DF, o se transloca do citoplasma para o núcleo, ativando os seus genes-alvo (Fig. 01). A disfunção da autofagia tem sido associada a vários distúrbios genéticos (15).

Após estudos “in vitro”, descobriu-se que esta carga de sacarose também levou à alteração de outros genes que não estão sob o controle direto do *TFEB*, o que sugeria o envolvimento de um conjunto genético mais complexo, coordenado por outros fatores de transcrição. De fato, fibroblastos carregados de sacarose foram identificados pela produção de novos lisossomos, sugerindo uma resposta celular adaptativa contra esta carga extra de sacarose, com o objetivo de remover o material acumulado. No entanto, os lisossomos recém-

formados não pararam o acúmulo da molécula não digerida, pois aqueles que acumularam substratos não degradados não foram mais capazes de reabastecer as células com nutrientes, imitando uma “aparente fome”. Em face desta sobrecarga, as células ativam vias de resgate, como a macro autofagia, esse esforço inútil devido à falta de funcionalidade dos lisossomos. Uma atividade catabólica reduzida dos lisossomos engolidos também foi sugerida por sua incapacidade de degradar esfingolípides (EL) complexos, resultando em seu acúmulo. A alteração no padrão e na composição de EL são características comuns à várias doenças lisossômicas, onde eles se tornam materiais acumulados secundários, independentemente dos substratos principais causadores de doença (16).

Entretanto, no modelo de Saramani et al. em 2018 (13), observou-se que o acúmulo de EL ocorreu não somente nos compartimentos intracelulares, mas também na membrana plasmática (MP). Assim, vários processos parecem interagir e determinar uma composição de EL diferente na superfície da célula. Com base nesses estudos, pode-se inferir que a fusão entre lisossomos e a superfície celular pode modificar a composição final de glicoesfingolípides da MP, pela incorporação de EL não degradados ainda associados às suas enzimas catabólicas (Fig 01), causando dano celular.

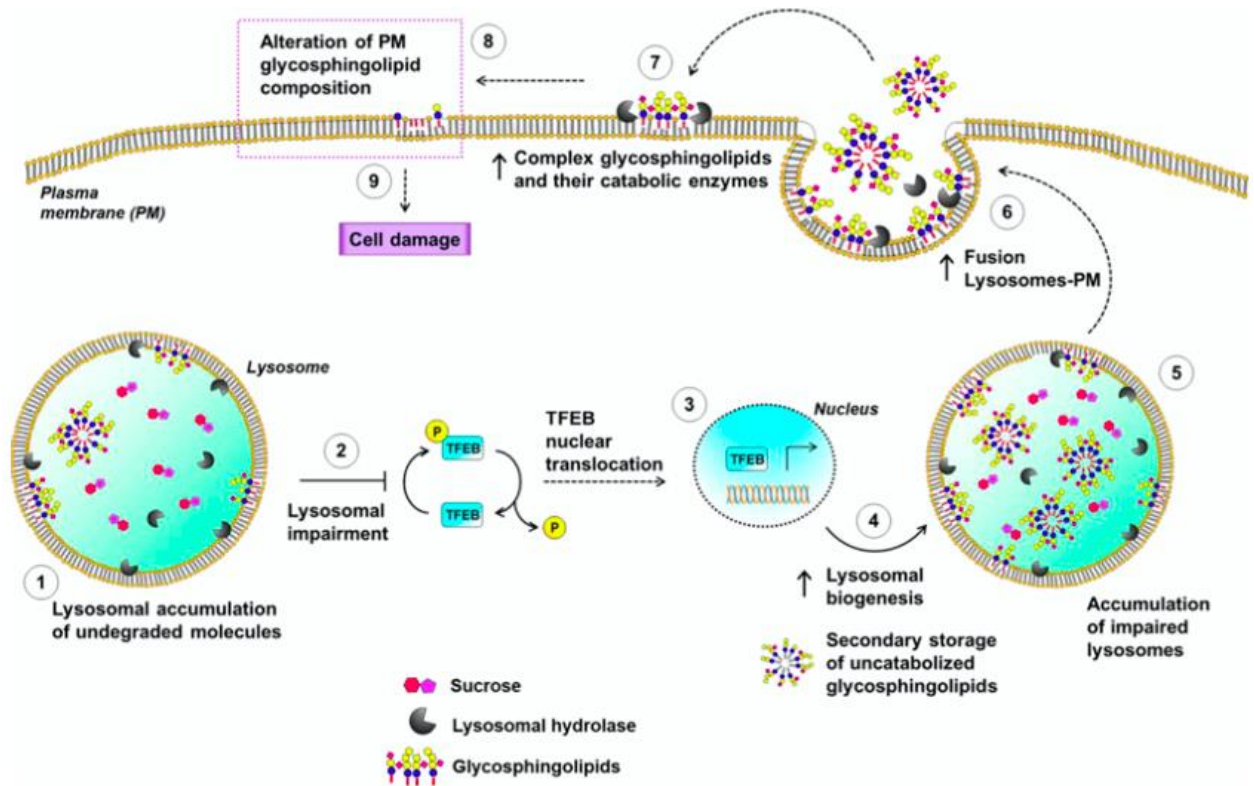


Fig.01: Mecanismo celular ligando o ingurgitamento lisossomal ao início do dano celular, com interferência de lisossomos na membrana plasmática (Saramani et al, 2018).

Em contrapartida, o endotélio também sofre alterações secundárias ao acúmulo de Gb3 e liso-Gb3 circulante. Existem diferentes mecanismos que controlam o funcionamento vascular. Sabemos que o superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o H_2O_2 são considerados radicais livres derivados do oxigênio. Células endoteliais vasculares produzem pequenas quantidades de O_2^- e H_2O_2 que têm função de proteção das células endoteliais em condições fisiológicas (17,18). A formação estritamente controlada de radicais livres medeia as funções fisiológicas da vasculatura, fazendo com que os radicais livres contribuam para a proteção endotelial, mas também fazendo com que causem doenças.

Baseado em estudos com células endoteliais (CE), o relaxamento vascular é mediado por prostaciclina, óxido nítrico (NO) e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE). H_2O_2 é um FHDE que contribui como sinalizador na vasculatura, protegendo a função das CE. Entretanto, o FHDE tem mecanismos complexos que variam com tipo sanguíneo, dentre os quais, o canal de abertura de potássio (K^+) ativado por Cálcio (Ca^{+2}), o K_{Ca} 3.1 (19). O acúmulo de Gb3 estimula a clatrina a internalizar a proteína K_{Ca} 3.1 causando disfunção no relaxamento endotelial, resultando em disfunção do mesmo (20).

Assim, as anormalidades vasculares na DF podem ser explicadas pela redução na vasodilatação-dependente do endotélio induzida pelo Gb3 in vitro (20).

As hipóteses acima discutidas ajudam a visualizar e explicar alterações intra e extracelulares na DF. Mauhin et al. em 2015 (21) descreveram as alterações da resposta imune inata desencadeada pela DF através da variante do gene *GLA*, causadora da deficiência da α Gal-A, levando ao acúmulo de Gb3, com consequente aumento desses esfingolipídios (EL) no citoplasma e em lisossomos. Esses EL, quando não corretamente degradados, são reconhecidos como antígenos pela célula apresentadora de antígenos, se ligam ao receptor toll-like 4 (TLR4), são subsequentemente expostos pela molécula CD1d, que são proteínas MHC classe I, e estão envolvidas na apresentação de antígenos lipídicos aos linfócitos T exterminadores naturais (NK do inglês natural killers) (Fig 02) (22). Após o reconhecimento dos EL por receptores das células T, ocorre uma hiperprodução com alteração de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais o fator de necrose tumoral (TNF), e as interleucinas (IL) 4, 5, 9, 10, 13 e 17 (23). Existe também uma secreção aumentada das IL 10 e 12, por células dendríticas, causada pela hiper-regulação

de CD40 ligante quando do reconhecimento de Gb3 como substância exógena (24).

Consequentemente, o Gb3 parece agir como um ligante endógeno ao TLR4 (25), com seu acúmulo servindo de estímulo inicial para ativação de resposta imune inata envolvendo as vias CDd1 e TRL4, o que induziria desregulação de um subtipo de células NKT e células dendríticas, fonte de estado inflamatório ativado patológico com secreção de citocinas pro-inflamatórias específicas (21). Entretanto, os TRL não estão presentes apenas em células do sistema imune. As células renais (podócitos e tubulares epiteliais) e endoteliais também expressam TLR4 (26, 27).

Em 2012, foi demonstrado que este mesmo metabólito, o Gb3, tem um aumento cumulativo idade-dependente em ratos com variante para a DF (28). Estes dados são o início da nossa compreensão sobre como a ativação do sistema imune pode interferir na evolução da DF com ou sem tratamento.

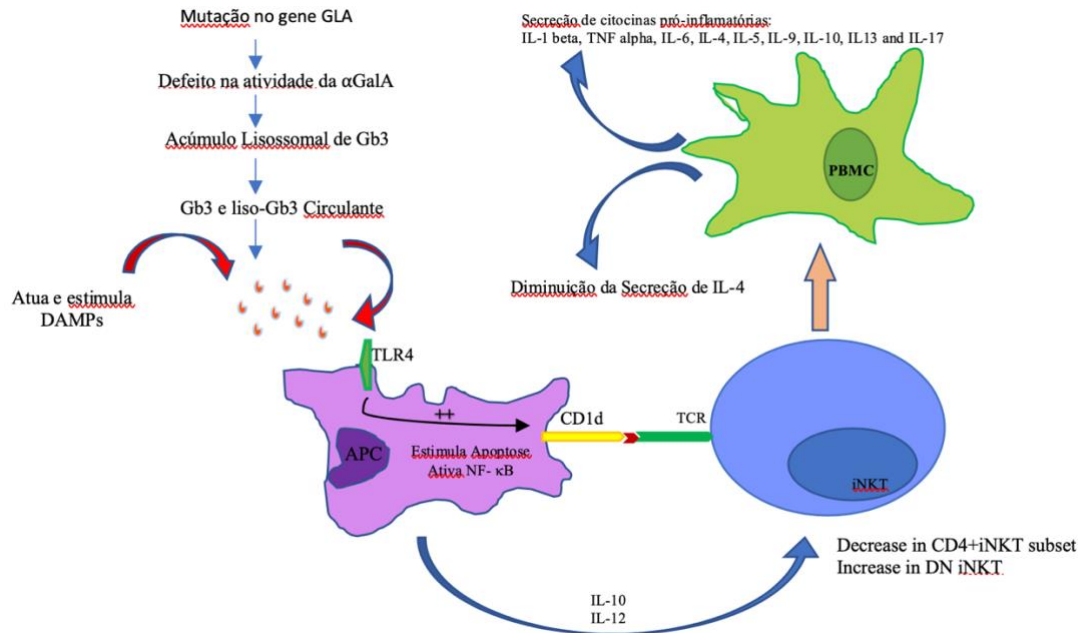


Fig. 2: Modelo proposto para a resposta imune inata observada em DF. APCs- antigen-presenting cells, Gb3 globotriaosilceramida, iNKTs invariants natural killers T cells (Cd4+), PBMCs peripheral blood mononuclear cells, TCR T-cell receptor, TLR4 Toll like receptor 4. (baseada em Mauhin et al., 2015).

A DF apresenta sintomas que incluem acroparestesias, angioqueratomas (dilatações vasculares cuja superfície é hiperqueratótica com espessamento da pele), alterações gastrointestinais como sensação de plenitude gástrica, dores abdominais e diarreia; intolerância ao calor e aos exercícios, anormalidades oculares (córnea Verticilata), perda auditiva, diminuição ou ausência de sudorese.

De vital importância é doença renal consequente da lenta progressão de microalbuminúria para glomeruloesclerose, ao longo da doença, culminando em insuficiência renal terminal e transplante. A DF também cursa com alterações cardíacas (HCVE, arritmias e valvulopatias), assim como anormalidades do sistema nervoso central (SNC) traduzidas por ataque isquêmico transitório (AIT),

acidente vascular cerebral (AVC), e acometimento do sistema vértebrobasilar com doliectasia da basilar e aumento de tortuosidade dos vasos cerebrais (29).

Em Taiwan, foi observada a incidência aumentada da variante IVS4p919G>A do *GLA* em nascidos vivos de ambos os sexos (30), como descrito anteriormente. Por causa dessa descoberta e da comprovação de maior incidência de variantes do *GLA* em testes ao nascimento, despertou-se um maior interesse com relação à natureza não específica das complicações da DF, assim como a ocorrência dessas complicações isoladamente, sem causa determinada. Existe, portanto, a suspeita de que essa diferença encontrada na incidência entre adultos e recém-natos seja referente à real quantidade de pacientes não diagnosticados (31). Sendo assim, a DF deveria ser suspeitada, em pacientes que apresentem acidente vascular cerebral, particularmente pacientes jovens (32), pacientes com insuficiência renal terminal (33), cardiomiopatia hipertrófica (34) e até doenças cardíacas comuns (35) sem causa determinada. Outra população que pode ser considerada de alto risco de exibir maior incidência de DF são pacientes pediátricos com dor crônica (36) também sem causa aparente.

O diagnóstico deve ser realizado através de dosagem enzimática da α Gal-A e do substrato Gb3 nos pacientes do sexo masculino, já que são mais afetados levando em consideração o caráter ligado ao X desta patologia; enquanto as pacientes do sexo feminino devem ser submetidas ao teste genético, por não apresentarem alterações significativas na atividade enzimática.

Na literatura há descrições de sintomas da DF em pacientes na faixa etária pediátrica, assim como, há relatos da presença de Gb3 em rins no período fetal (37) e em placentas de fetos afetados (38), sugerindo o que o acúmulo do EL se inicia já no período pré-natal. Porém, a enfermidade apresenta na infância

sintomas inespecíficos e variáveis com os pacientes do sexo masculino mais sintomáticos e com início de doença mais precoce que no sexo feminino. A dor neuropática periférica (acroparestesias com hiperemia de extremidades e leve edema), febre induzida pela ausência de suor, intolerância ao calor e aos exercícios, dor articular e elevação da velocidade de hemossedimentação podem ser observados nestes pacientes (39).

A Artrite Idiopática Juvenil (AIJ) representa o grupo de artrites crônicas mais comuns da infância, com prevalência de 1/1000 crianças (40). O termo AIJ define um grupo heterogêneo de artrites inflamatórias de etiologia desconhecida com início abaixo dos 16 anos e duração mínima da artrite de 6 semanas; seguida de exclusão de outras causas. Existem 7 subgrupos de AIJ: Sistêmico, Poliarticular fator reumatoide (FR) negativo, poliarticular fator reumatoide (FR) positivo, Oligoarticular, Artrite Relacionada à entesite (ARE), Artrite psoriásica e, Indeterminada. Cada subgrupo tem características específicas e segundo os Critérios da International League Against Rheumatism (ILAR) de 1997, também têm critérios de inclusão e exclusão (40) (Tabela 1).

Os sintomas desta doença variam de acordo com o subtipo, mas os subtipos têm em comum a artrite persistente por mais de 6 semanas e ausência de outros agentes causais (diagnóstico de exclusão). Os pacientes apresentam desde febre de temperatura variada, rash cutâneo difuso, adenomegalias/hepatoesplenomegalia, alterações cardíacas com pericardite, alterações valvares, ou miocárdica; no pulmão pleurite, doença intersticial pulmonar ou hemorragia pulmonar. Como sintomas associados podemos comumente observar a presença de psoríase com splinters hemorrágicos e unha em dedal, sintomas do trato gastrointestinais desde diarreia, dor abdominal,

náusea e vômitos até sintomas sugestivos de doença inflamatória intestinal (Crohn e Colite Ulcerativa). O caráter limitante e destrutivo dessa artrite é característico da AIJ.

Muitos sintomas observados na AIJ são comuns à DF. As dores em extremidades principalmente quando associadas à edema e hiperemia podem ser confundidas com artrite, além da DF também causar artralguas. A dor abdominal, diarreia, sensação de plenitude gástrica, e náuseas são comuns às duas condições e em especial associadas ao tratamento da AIJ. Alterações cardíacas como lesões valvares e distúrbios de condução são também comuns a ambas. Contudo, também existem descrições na literatura de sobreposição da DF com doenças autoimunes.

Na prática, existe uma real dificuldade na identificação desses pacientes, em especial na faixa etária pediátrica onde os sintomas são ainda considerados inespecíficos.

Tendo em vista que sintomas musculoesqueléticos são frequentemente observados em DF e, sendo a AIJ é a doença crônica, inflamatória mais observada na infância, este estudo visa identificar a frequência de DF numa coorte de AIJ baseada em sintomas clínicos precoces, níveis de enzima e genótipo do *GLA*.

Quadro 1: Subtipos de AIJ Segundo critérios do ILAR, 1997. Critérios de inclusão e exclusão.

Subtipo Clínico	Critério de Inclusão	Critério de Exclusão
1.Sistêmico	Artrite crônica + febre 2 semanas 2 de: - Rash evanescente - Adenopatia - Hepatoesplenomegalia	a, b, c, d
2.Oligoarticular	Artrite ≤ 4 articulações: - Persistente: se mante ≤ 4 articulações nos 6 primeiros meses de doença - Estendida: ≥ 5 articulações nos 6 primeiros meses de doença	a, b, c, e
3.Poliarticular FR+	- Artrite ≥ 5 articulações nos 6 primeiros meses de doença - FR +	a, b, c, e
4.Poliarticular FR-	- Artrite ≥ 5 articulações nos 6 primeiros meses de doença - FR -	a, b, c, d, e
5.Artrite Relacionada à Entesite	- Artrite e entesite ou - Artrite ou entesite + 2 de: +Dor na SI ou lombalgia inflamatória +HLAB27+ +Início Meninos > 6anos +HF em parentes 1º grau de SI, EA, ARE, IBD, Sd de Reiter ou uveíte	a, d, e
6.Artrite Psoriásica	- Artrite e psoríase - Artrite e 2 ou +: +Dactilite + “nail pitting” ou onicólise + HF 1º grau com psoríase	b, c, d, e
Indeterminada	- Artrites que não preenchem critérios para nenhuma ou para duas ou mais categorias	

Legenda: HF- História família, EA- Espondilite Anquilosante.

Critérios de exclusão:

- Psoríase ou história de psoríase em paciente ou familiar de 1º grau
 - Artrite em paciente do sexo masculino HLAB27+ com início de doença após os 6 anos de idade.
 - Espondilite Anquilosante (EA), artrite relacionada a entesite (ARE), sacroileíte (SI), doença inflamatória intestinal (DII), Síndrome de Reiter, uveíte anterior aguda no paciente ou em algum parente de 1º grau.
 - Fator Reumatóide (FR) positivo (duas vezes num intervalo de 3 meses)
 - Presença de artrite idiopática Juvenil (AIJ) sistêmica no paciente.
- (Petty RE, et al. *The Journal of Rheumatology*. 1998;25:1991–1994).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal:

- Identificar a frequência da DF numa coorte de AIJ.

5.2. Objetivos Secundários:

- Avaliar a presença de variantes do *GLA* na AIJ

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram convidados a participar do estudo pacientes com AIJ diagnosticados pelos critérios da liga internacional contra o reumatismo (ILAR-1997) (40), em seguimento no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) em Fortaleza (CE), durante o período de dezembro de 2014 a dezembro de 2017.

3.1. Aspectos Éticos

Os responsáveis pela pesquisa respeitaram os compromissos decorrentes de um projeto de busca ativa junto a indivíduos com doença autoimune e seus familiares, sendo estes: assistência médica, tratamento disponível, aconselhamento genético e assessoria aos profissionais colaboradores, assim como aos possíveis portadores de DF.

Foram respeitadas as normas vigentes para Pesquisa em Seres Humanos segundo a resolução do Ministério da Saúde e CONEP (196/96), especialmente relevantes a menores de 18 anos e para projetos na área de Genética Humana e Médica (resolução 340/04). Para os indivíduos que se opuserem a ingressar no projeto, não houve nenhum tipo de penalidade referente ao seu atendimento clínico, acesso a tratamentos disponíveis, ou acesso a qualquer outro tipo de atividade de assistência e/ou de pesquisa que porventura existiam dentro do HIAS.

Todos os resultados disponíveis somente foram veiculados a partir da autorização dos participantes no termo de consentimento, como também o

anonimato destes, foi mantido de acordo com as normas de Pesquisa em Seres Humanos Resolução 196/96 do Ministério da Saúde e CONEP.

O estudo teve aprovação do comitê de ética e pesquisa do HIAS, número: CAAE: 37270414.0.0000.5042, número do Parecer: 916.538, Data da Relatoria: 11/12/2014 (Anexo1). Termo de consentimento livre e esclarecido foram obtidos para todos os participantes e representantes legais, se crianças abaixo 18 anos (Anexo 2). Para os pacientes maiores de 8 anos também foram obtidos termos de assentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

Os pacientes foram submetidos a uma avaliação médica pelo mesmo investigador composta de:

- 1) Anamnese com preenchimento pelo médico de questionário específico (Anexo 4).
- 2) Exame físico completo e articular
- 3) Coleta de sangue para o teste genético
- 4) Coleta de exames laboratoriais

3.2. Avaliação dos pacientes com AIJ

Foram avaliadas características demográficas e clínicas da doença através de cuidadosa revisão de prontuário de cada paciente: idade, sexo, idade ao início da doença, subtipo de AIJ, presença de manifestações articulares e extra articulares.

Dados de exames imunológicas também foram retirados do prontuário médico: Fator Reumatóide (FR) por realizado por método de aglutinação de

látex, anticorpo antinúcleo (AAN) por imunofluorescência indireta (IFI) em células empregando células humanas HEp-2 de carcinoma de laringe como substrato antigênico. Os anticorpos anti-DNA dupla hélice, anti-Smith, anti-ribonucleoproteína (RNP), anti-SSa, Anti-SSb, anti-cardiolipina foram realizados por ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) e antígeno leucocitário Humano (HLA- *Human leukocyte antigen*) B-27 (HLA B27) por reação de cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) em todos os pacientes.

3.3. Questionário de Estudo:

Pacientes com AIJ foram inquiridos sobre sintomas da DF através de um questionário estruturado baseado em sinais e sintomas precoces (41), aplicado pelo médico responsável. Este questionário contém perguntas sobre alterações clínicas (intolerância ao calor, hipo/hiperidrose, fadiga crônica, distensão abdominal, dispepsia, diarreia, sensação de plenitude gástrica, dificuldade de ganho de peso, tinido, disacusia e acroparestesias), achados de exame físico (telangiectasia, angioqueratoma), história médica prévia (AVC, AIT) e história familiar (de AVC, AIT, morte súbita, doença renal terminal ou DF) de cada paciente (Anexo 4).

3.4. Avaliação Clínica:

Todos os pacientes foram avaliados por um reumatologista pediátrico certificado por título de especialista em Pediatria e Reumatologia Pediátrica. Todos os pacientes inscritos no projeto foram submetidos a exame clínico completo, osteo-articular e neurológico realizado na admissão ao estudo.

Pacientes com AIJ foram posteriormente submetidos a uma avaliação oftalmológica realizada por oftalmologista pediátrico certificado com título de especialista nas dependências do Centro de Aperfeiçoamento Visual Ver a Esperança Renascer (CAVIVER), uma ONG, localizada em Fortaleza (CE). Achados positivos foram revistos por um segundo oftalmologista, também certificado. Erros de refração foram mensurados por um keratômetro autorrefrator portátil Retinomax K Plus 2. Acuidade visual corrigida de ambos os olhos foi aferida com a tabela de Snellen (Fig.3a) com letras e números na distância equivalente a 6 metros em crianças maiores de 6 anos. Para crianças não verbais a acuidade visual foi verificada com as tabelas do E de Snellen ou de números (Fig.3b).

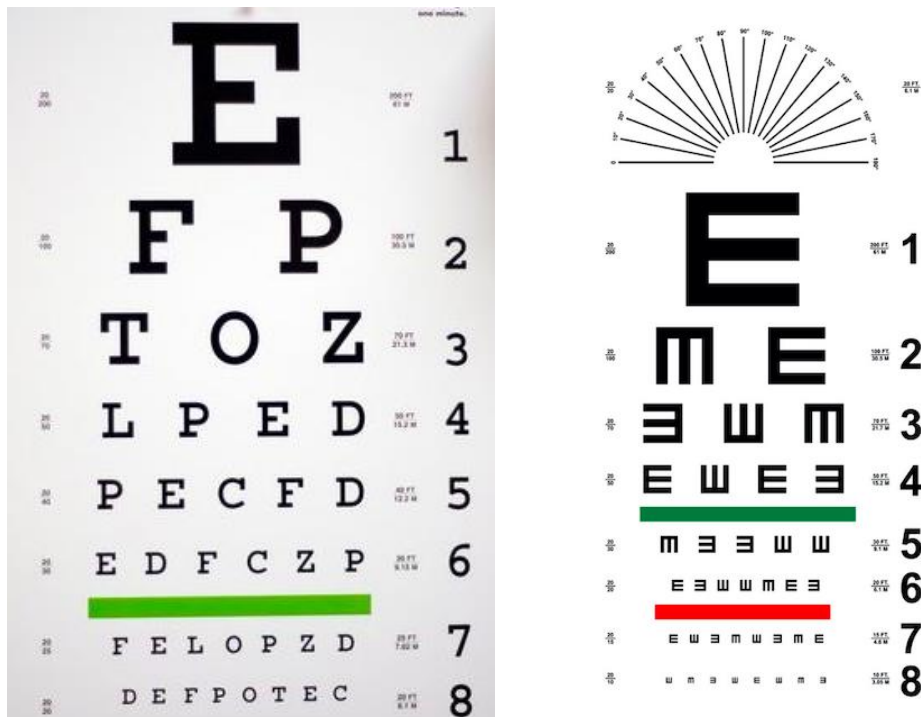


Fig.3a: Tabela de Snellen com letras e números.

3b: Tabelas do E de Snellen ou de números para crianças abaixo de 6 anos de idade.

O segmento anterior (córnea, íris e cristalino) foi avaliado através da biomicroscopia na lâmpada de fenda. O nervo óptico, a mácula e os vasos do polo posterior foram avaliados por oftalmoscopia direta. A pressão intraocular (PIO) foi avaliada por tonometria de aplanção com tonômetro Rebound ICARE, e foram considerados normais valores entre 10 e 20 mmHg. O teste de evaporação do filme lacrimal com fluoresceína foi realizado para avaliar a superfície ocular. A córnea Verticilata foi diagnosticada durante a avaliação da biomicroscopia da córnea.

A avaliação cardíaca foi realizada pela mesma cardiologista Pediátrica no Instituto do Coração da Criança e do Adolescente (ICCA), localizado em, Fortaleza (CE).

Os pacientes foram avaliados por ecocardiograma (ECO) 2D transtorácico com especial atenção à medida de massa de ventrículo esquerdo, diâmetro de aorta e presença de alterações valvares. Distúrbios de condução foram investigados através de Eletrocardiograma (ECG) de 12 canais analisados por cardiologista pediátrico certificado. Todos os ecocardiogramas foram realizados pelo mesmo cardiologista pediátrico para uniformizar os resultados.

A avaliação renal foi realizada com a dosagem da ureia e creatinina séricas, microalbuminúria e sódio urinário na urina de 24 horas realizados no HIAS, como parte da avaliação clínica dos pacientes.

3.5. Teste Genético e Dosagem da α Gal-A e liso-Gb3:

O teste genético teve apoio logístico e financeiro da Shire Brasil e foi realizado no ambulatório de Reumatologia Pediátrica do HIAS, durante ou após a consulta dos pacientes do estudo. O teste foi coletado por uma enfermeira previamente treinada ou pelo médico responsável, após novo assentimento e consentimento informado dos pacientes e responsáveis legais. No procedimento da coleta, o sangue foi coletado através de um furo no dedo com uma agulha estéril e descartável. Cinco gotas de sangue foram colocadas em papel filtro, previamente identificado com dados dos de identificação (nome, endereço, data de nascimento, e-mail, data e hora da coleta, sintomas clínicos) dos pacientes, e dados de identificação (nome, número de CRM, COREM, e-mail e endereço do Hospital onde foi realizado o exame) do médico ou enfermeira responsáveis pela coleta. Após a impregnação do papel de filtro com o sangue, o mesmo foi

deixado para secar ao ar por pelo menos 4 horas, mantidos a temperatura ambiente até a remessa para o laboratório.

Nos pacientes do sexo masculino, a avaliação inicial foi realizada pela medida da atividade enzimática da α Gal-A e da esfingomielase ácida como controle, e pela dosagem da liso-Gb3 por cromatografia líquida de alta performance por espectrometria de massa, nos laboratórios da Centogene (Alemanha). Os valores normais para α Gal-A utilizados foram acima de 2,5 μ mol/l/h e para a liso-Gb3, substrato acumulado, os valores normais foram abaixo de 1,8ng/ml.

Para todas as pacientes do sexo feminino, e apenas para os do sexo masculino com atividade enzimática anormal, foi feita a análise do gene *GLA* (ref: NM_000169.2) por reação de cadeia em polimerase (PCR) e, o sequenciamento de toda região codificante e as junções de emenda exon-intron altamente conservadas. Este teste foi desenvolvido e validado pela Centogene AG para propósitos clínicos. Pacientes com anormalidades genéticas ou α Gal-A abaixo do parâmetro normal tiveram seus parentes de primeiro e segundo grau (pais, avós e irmãos), quando possível, também avaliados para DF com investigação genética apropriada (avaliação dos níveis e atividade da enzima ou identificação de variante genética), e encaminhados para monitoramento genético.

Todas as variantes genéticas encontradas foram analisadas e as alterações clínicas comparadas com a doença de base (AIJ). As variantes foram estudadas em sua patogenicidade através de bancos de dados genéticos como Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPHEN-2), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) e Clinvar pelo seu número de referência (SNP/rs). Softwares como

Polyphen-2, sorting Intolerant from Tolerant (**SIFT**) e MutationTaster que são ferramentas que avaliam um possível impacto de substituição de um amino ácido na estrutura e função de uma proteína humana usando considerações físicas e comparativas diretas também foram consultados.

3.6. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS 20.0 da IBM. Os resultados estão dispostos em números absolutos e porcentagem ou média e desvio padrão (SD). Foram utilizados os testes de quiquadrado ou teste exato de Fisher para comparação variáveis categóricas. As variáveis contínuas foram comparadas por ANOVA. O valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS:

Um total de 89 pacientes com AIJ foram incluídos no estudo. Um pouco mais da metade (56,17%) dos pacientes eram do sexo feminino, com média de idade de $15,81 \pm 3,93$ anos. A média de idade ao início da doença foi de $8,93 \pm 4,35$ anos e o tempo de seguimento foi de $6,69 \pm 3,3$ anos. Nós identificamos a presença maior do subtipo pauciarticular 42 (47,20%) como descrito na tabela 2.

Tabela 2: Frequência dos subtipos de AIJ nos pacientes do estudo:

Subtipo de AIJ	N (%)
Pauciarticular	42 (47,20)
Poliarticular FR Negativo	17 (19,10)
Relacionado à Entesitis	15 (16,85)
Sistêmico	10 (11,20)
Poliarticular FR Positivo	3 (3,37)
Psoriásico	1 (1,12)
Indeterminado	1 (1,12)

Legenda: AIJ= Artrite Idiopática Juvenil, FR= Fator Reumatóide

As medicações mais utilizadas foram MTX 80 (80,88%), AINES 48 (53,93%), leflunomide 18 (20,22%), biológicos 44 (49,43%) e ciclosporina 16 (17,9%). Dentre as medicações biológicas as mais utilizadas foram os Anti-TNF como Etanercept (25,84%), Infliximabe (2,24%) e Adalimumabe (8,98%), seguidos dos anti-IL 6 (7,86%) e anti-IL 1 (4,50%). Os corticosteroides foram usados em 11 (12,35%) pacientes com dose cumulativa média de $10,47 \pm 5,20$ mg de prednisona, o que não confugira dose imunossupressora. As informações

coletadas sobre as medicações utilizadas nos pacientes com AIJ estão contidas nas Tabelas 3.

Tabela 3: Frequência de Medicações utilizadas pelos pacientes de AIJ do estudo:

Medicamentos Utilizados	N (%)
MTX	80 (89,88)
Em uso MTX	56 (62,92)
AINES	48 (53,93)
Leflunomide	18 (20,22)
Ciclosporina	16 (17,97)
Prednisona	11 (12,35)
Em uso Prednisona	2 (2,24)
Dose Cumulativa da Prednisona	10,47 ± 5,20
Azatioprina	2 (2,24)
Biológicos	44 (49,43)
Etanercept	23 (25,84)
Adalimumabe	8 (8,98)
Tocilizumabe	7 (7,86)
Canakinumabe	4 (4,49)
Infliximabe	2 (2,24)

Legenda: MTX- Metotrexate

Os resultados relacionados às queixas clínicas do questionário de DF na AIJ mostraram uma alta incidência de acroparestesias em 47 (52,80%) pacientes, dificuldade de ganho de peso em 30 (33,70%), seguidas de intolerância ao calor em 26 (29,50%), dispepsia em 19 (21,30%) desses pacientes; esses achados e outros sintomas menos frequentes são apresentados na Tabela 4)

Tabela 4: Frequência de Sinais e Sintomas clínicos da DF nos pacientes de AIJ

Sintomas:	N (%)
Acroparestesia	47 (52,80)
Dificuldade de ganho de peso	30 (33,70)
Intolerância ao Calor	26 (29,21)
Hiperidrose	22 (24,71)
Dispepsia	19 (21,34)
Zumbido	18 (20,22)
Neuropatia Periférica	17 (19,10)
Fadiga Crônica	14 (15,73)
Distensão Abdominal	14 (15,73)
Diarreia	11 (12,35)
Disacusia	8 (8,98)
Sensação de Plenitude Gástrica	6 (6,74)
Angioqueratoma	2 (2,24)
Telangiectasia	0 (00)

Sintomas clínicos baseados no protocolo clínico aplicado a todos os pacientes do estudo.

Na avaliação do histórico de familiar, o AVC esteve presente em 38 (42,70%) das famílias dos pacientes do estudo, seguida de morte súbita 22 (24,71%) (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência de História familiar sugestiva de DF nos pacientes com AIJ

História Familiar (HF):	N (%)
AVC	38 (42,69)
Morte Súbita	22 (24,71)
Insuficiência Renal	11 (12,35)
AIT	2 (2,24)
DF	1 (1,12)

Legenda: AVC- acidente vascular cerebral, AIT-ataque isquêmico transitório, DF- Doença de Fabry.

Analisando os exames laboratoriais (Tabela 6), observamos uma frequência de 12,32% de microalbuminúria nesses pacientes, dentre esses o com DF. O anticorpo anti Núcleo (AAN) mostrou-se positivo em 14,60% dos pacientes, enquanto fator reumatoide (FR) e HLA-B27 tiveram positividade em 4,49% e 6,74% respectivamente. Apenas 1 paciente teve anticorpo anti- RNP positivo.

Tabela 6: Frequência de achados laboratoriais nos pacientes de AIJ.

Laboratório	Testados	N (%)
AAN	89	13 (14,60)
Microalbuminúria	66	9 (13,63)
HLA-B27	89	6 (6,74)
FR	89	4 (4,49)
Ac Anti-RNP	89	1 (1,12)

Legenda: AAN- Anticorpo anti-núcleo, HLA- antígeno Humano leucocitário, FR- Fator reumatóide, AC- anticorpo, RNP- ribonucleoproteína

O estudo cardíaco foi realizado em 74 (83,14%) pacientes dos 89 estudados. Apenas uma única avaliadora foi responsável por todos os ecocardiogramas e eletrocardiogramas do estudo. Observamos anormalidades cardíacas em 19 pacientes (25,67%) com AIJ, dos quais 10 (52,63%) eram bloqueio de ramo direito, 3 (15,78%) pacientes com prolapso de valva mitral, 3 (15,78%) com regurgitações valvares (mitral, tricúspide e pulmonar) e outros 3 (15,78%) apresentaram hipertrofia ventricular, sendo um paciente com hipertrofia ventricular direita e 2 pacientes com HCVE (Tabela 7).

Tabela 7: Frequência de Alterações Cardíacas em 19 pacientes com AIJ

Alterações	N (%)	Subtipos
Bloqueio de Ramo direito	10 (52,63)	4 Poliarticulares
		1 Sistêmico
		3 Oligoarticulares
		2 RAE
Hipertrofia Ventricular	3 (15,78)	1 Poliarticular (VE),
	2 concêntricas	1 Sistêmico (VD)
		1 Oligoarticular+ DF (VE)
Prolapso Valva Mitral	3 (15,78)	1 Poliarticular
		2 Oligoarticulares
Regurgitação Valvar:		
- Mitral	1 (11,1)	1 DF + Oligoarticular
- Pulmonar	1 (11,1)	1 Sistêmico
- Tricúspide	1 (11,1)	1 Sistêmico

Legenda: ERA- Relacionado à entesite, VE- Ventrículo esquerdo, VD-Ventrículo direito, DF- Doença de Fabry.

A avaliação oftalmológica evidenciou 18 (20,22%) pacientes com diminuição da acuidade visual dentre elas: miopia e astigmatismo ambas independentes

das duas doenças estudadas. Observou-se em 13 (14,60%) alterações corneanas sendo elas: opacidades de córnea (2), disfunção do filme lacrimal (3), Embriotoxon anterior (1), córnea Verticilata [5 (5,61%)], vasos fantasmas (2). Alterações de câmara anterior: filetes de membrana (2) e íris granulosa (4). Também evidenciamos alterações de cristalino em 4 (4,49%) e um (1,12%) paciente com presença de tufo central de fibra de mielina de 200 micras no fundo de olho (Tabela 8).

Tabela 8: Alterações Oftalmológicas nos pacientes 89 pacientes com AIJ.

Alterações de:	N (%)
Acuidade Visual	18 (20,22%)
Córnea	13 (14,60%)
Câmara Anterior	6 (6,74%)
Presença Córnea Verticilata	5 (5,61%)
Cristalino	4 (4,49%)
Fundo de Olho	1 (1,12%)
Catarata Anterior	00
Catarata Subcapsular	00

Dos 89 pacientes com AIJ, 54 (60,67%) realizaram o teste genético. Destes, detectamos 26 (42,14%) com variações genéticas no *GLA*. Apenas um (1,12%) entre 89 pacientes, portador de AIJ pauciarticular e AAN positivo, do sexo masculino, apresentou diminuição de atividade enzimática de α Gal-A, com níveis elevados de Gb3. Sua avaliação genética evidenciou variante *c1244T>C*;

p.L415P, considerada patogênica, confirmando diagnóstico de DF. O mesmo paciente também apresentava variantes intrônicas do *GLA*, *c.370-81_-77del* (rs5903184) no intron 2, *c.640-16A>G* (rs2071397) no intron 4, *c.1000-22C>T* (rs2071228) no intron 6 e, *c.-10C>T* (rs2071225) em região 5'UTR exon 1. Nosso paciente índice inicialmente realizou reposição enzimática, consideramos AIJ como um erro diagnóstico inicial, e que o paciente teria somente DF. Uma vez iniciada a reposição enzimática, o paciente passou a identificar presença de suor (o qual nunca foi observado até aquele momento) e melhora de parte dos sintomas clínicos (dor muscular, dor abdominal) e dos níveis acumulados de Gb3 (evidenciado em dosagens posteriores ao início da reposição enzimática), exceto da córnea *Verticilata* e das alterações cardíacas. No entanto, seu quadro articular persistiu com artrite crônica em tornozelos. Exames de imagem evidenciaram além do edema articular um espessamento sinovial característico de AIJ. Iniciamos tratamento medicamentoso com Metotrexate (15 mg/semana) ao seu plano terapêutico, com controle do quadro articular em cerca de 4 meses.

Duas outras pacientes, do sexo feminino diagnosticadas com AIJ pauciarticular, apresentaram variantes heterozigóticas do *GLA*. Na primeira paciente foi identificada uma variante exônica, nunca previamente descrita do *GLA c.38C>T; p.Ala13Val*, sem número de referência em bancos genéticos. Ela está localizada em um nucleotídeo não conservado e, uma posição de aminoácido francamente conservado, com pequena diferença físico-química entre os aminoácidos alanina e valina. Análises das variantes por 3 softwares, Polyphen-2, SIFT e MutationTaster, que são ferramentas que avaliam um possível impacto de substituição de um amino ácido na estrutura e função de uma proteína humana usando considerações físicas e comparativas diretas,

predizem esta variante como provavelmente benigna. A paciente também apresentava as seguintes variantes intrônicas do *GLA*, *c.370-81_-77del* (rs5903184) no intron 2, *c.640-16A>G* (rs2071397) no intron 4, *c.1000-22C>T* (rs2071228) no intron 6 e, *c.-10C>T* (rs2071225) em região 5'UTR exon 1, assim como o paciente índice.

Na segunda paciente também portadora de AIJ oligoarticular, uma única variante heterozigótica localizada no exon 1 do *GLA* foi identificada: *c.48T>G* (rs201449986), porém não considerada como tendo significado clínico porque não altera resíduo de aminoácido, e por não estar localizada em sequência de splicing (borda entre exon e íntron). Esta variante foi checada recentemente em 3 bancos genéticos: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Clinvar e HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) e continua descrita como neutra.

Observamos 50 (56.17%) pacientes dos 89 totais, eram do sexo feminino e em 100% delas foi realizado o teste genético, e 39 (43.82%) pacientes eram do sexo masculino, deles, somente 4 pacientes realizaram teste genético devido a diminuição enzimática, tendo apenas um, confirmado o diagnóstico de DF.

O teste genético foi também realizado nos outros 3 sem evidências de alterações. Dois pacientes apresentavam sintomas positivos no questionário de sintomas de DF (hipohidrose, acroparestesia e dispepsia, e dificuldade de ganho de peso), além história familiar de morte súbita e doença renal terminal. O terceiro paciente não tinha nenhum sintoma ou história familiar relacionados à doença.

Um total de 54 (60,67%) pacientes da amostra fizeram o teste genético. Desses, 26 (48,14%) pacientes apresentaram variantes do *GLA* (intrônicas e

exônicas) e 24 (92,30%) dos 26, incluindo o paciente índice, apresentaram múltiplas variantes intrônicas do *GLA*.

As variantes intrônicas mais observadas nestes 26 (48,14%) indivíduos testados foram: 24 (92,30%) evidenciaram *c.1000-22C>T* no intron 6, 16 (61,53%) com a variante *c.370-81_-77del* no intron 2, 15 (57,69%) pacientes com a variante *c.640-16A>G* no intron 4; 8 (30,76%) deles com *c.-10C>T* em 5'UTR exon 1; 7 (26,92%) pacientes com a variante *c.548-125C>G* no intron 3, e 4 com *c.-12G>A* (rs3027585) 5'UTR exon 1.

A análise estatística considerando as alterações e sinais clínicos dos pacientes do estudo com a presença dessas variantes, revelou:

- ***c.1244T>C*** - correlação estatística significativa quando comparada com:
 - Aumento dos níveis de Gb3 ($p= 0,036$)
 - Presença de angioqueratoma ($p= 0,018$)
 - História familiar positiva de DF ($p= 0,018$)
 - História familiar de acidente isquêmico transitório (AIT) ($p= 0,018$)

Também se evidenciou correlações estatísticas positivas entre as seguintes variantes e sintomas de DF:

- ***c.38C>T* (sem referência)**
 - História familiar de AIT ($p=0,036$)
- ***c.-10C>T* (rs2071225)** se correlacionou positivamente com:
 - Dificuldade de ganho de peso ($p= 0,024$)
 - Alteração de acuidade visual ($p= 0,005$)

- Alterações de córnea ($p= 0,012$)
- Alterações de câmara anterior ($p= 0,011$)

- **c.640-16A>G** (rs2071397)
 - Intolerância ao calor ($p =0,022$)
 - Alteração de acuidade visual ($p= 0,046$)
 - Alterações de córnea ($p=0,003$)
 - Alterações de Câmara Anterior ($p=0,006$)

- **c.1000-22C>T** (rs2071228)
 - Intolerância ao calor ($p =0,012$)
 - Alterações de córnea ($p=0,002$)
 - Alterações de Câmara Anterior ($p=0,004$)

- **c.370-81_-77del** (rs5903184)
 - Intolerância ao calor ($p =0,022$)
 - Alteração de acuidade visual ($p= 0,046$)
 - Alterações de córnea ($p=0,003$)
 - Alterações de Câmara Anterior ($p=0,006$)

A presença de haplótipos, como descrito acima, foi de 92,30% dos testes positivos e em 44,44% do total de testes realizados. Também observamos correlação entre haplótipos intrônicos complexos e sintomas:

- *c.-10C>T, c.370-77_-81del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T*- 8 (14,81%) -
Haplótipo 1 isoladamente e associado ao Haplótipo 2 - *c.370-77_-81del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T* em 7 (12,97%) à:
- Alteração de acuidade visual ($p=0,01$)
- Alterações de córnea ($p=0,05$)
- *c.548-125C>G, c.1000-22C>T, c.-12G>A* em 4 (7,40%) Haplótipo 3
associado à:
- Alterações Valvares ($p=0,031$)

Os outros Haplótipos observados não apresentaram associações:

- *c.548-125C>G, c.1000-22C>T* em 2 (3,70%) pacientes; Haplótipo 4
- *c.370-81_-77del, c.548-125C>G, c.640-16A>G, c.1000-22C>T* em 1 (1,85%)
pacientes – Haplótipo 5.

Tabela 9: Correlação estatística ($p < 0.05$) entre variantes genéticas e HIC e sinais clínicos

Sintomas	c.1000-22C>T	c.370-81-77del	c.640-16A>G	c.-10C>T	c1244T>C	c.38C>T	Hap1	Hap2	Hap3
Alt α GalA	0,624	1,000	1,000	0,429	0,073	0,927	1,000	1,000	1,000
Alt GB3	1,000	0,501	0,501	0,240	0,036	0,964	0,448	0,448	1,000
Intolerância ao calor	0,012	0,022	0,022	0,116	0,091	0,091	0,098	0,098	0,325
Fadiga	0,756	1,000	1,000	0,531	0,236	0,764	0,719	0,719	1,000
Zumbido	0,202	1,000	1,000	0,531	0,236	0,764	0,719	0,719	0,234
Disacusia	0,643	1,000	1,000	0,492	0,909	1,000	1,000	1,000	0,325
Acroparestesias	0,278	0,775	0,775	0,437	1,000	0,473	0,764	0,764	0,613
Hiperhidrose	0,222	0,102	0,102	0,624	0,273	0,273	0,493	0,493	1,000
Dist Abdominal	0,745	0,730	0,730	0,519	0,218	0,782	1,000	1,000	1,000
Dispepsia	1,000	0,478	0,478	0,571	0,200	0,800	0,709	0,709	1,000
Diarreia	0,718	0,212	0,212	0,733	0,145	0,145	0,405	0,405	1,000
Dif Ganho de peso	0,775	0,213	0,213	0,024	0,309	0,691	0,322	0,322	1,000
Angioqueratoma	0,436	0,291	0,291	0,127	0,018	0,982	0,255	0,255	1,000
Alt Valvar	0,132	0,419	0,419	0,308	0,186	0,814	0,217	0,217	0,031
Arritmias	1,000	0,602	0,602	0,465	1,000	0,907	0,572	0,572	1,000
Alt Visuais	0,073	0,046	0,046	0,005	0,213	0,787	0,010	0,010	0,521
Alt de Córnea	0,002	0,003	0,003	0,012	0,255	0,401	0,050	0,050	1,000
Cornea Verticilata	0,070	0,208	0,208	0,292	0,064	0,064	1,000	1,000	0,183
Catarata	0,426	1,000	1,000	0,894	1,000	0,979	1,000	1,000	0,064
Alt Câmara ant	0,004	0,006	0,006	0,011	1,000	0,128	0,164	0,164	0,343
HF AVC	0,184	0,565	0,565	0,645	0,436	0,436	0,756	0,756	0,307
HF AIT	0,186	0,081	0,081	0,240	0,036	0,001	0,448	0,448	1,000
HF Morte Súbita	1,000	0,346	0,346	0,586	0,327	0,673	0,510	0,510	1,000
HF IR	0,686	0,660	0,660	0,423	1,000	0,891	1,000	1,000	0,379
HF Fabry	0,436	0,291	0,291	0,127	0,018	0,982	0,255	0,255	1,000

de DF.

Legenda: Ant- Anterior, AIT- ataque isquêmico transitório, Alt- Alteração, AVC- acidente vascular cerebral, Dist- Distensão, Dif- Dificuldade, IR- insuficiência renal, HF- História família.

5. DISCUSSÃO:

A AIJ é um grupo heterogêneo de doenças autoimunes, de causa multifatorial, caracterizado por artropatias crônica. Sua heterogeneidade se reflete em sua dificuldade diagnóstica, por múltiplos órgãos afetados e ausência de exames diagnósticos patognomônicos da doença. A DF é causada por anormalidade no gene *GLA*, ligada ao cromossomo X, que determina uma deficiência da α GalA. Esta enzima é responsável por acelerar a quebra da molécula de Gb3, fazendo com que esse metabólito se acumule progressivamente nos órgãos e tecidos ao longo da vida. O quadro clínico se inicia com dores em queimação nas extremidades (acroparestesias), fadiga, lesões avermelhadas na pele em região do umbigo e pernas (angioqueratomas), córnea Verticillata, progredindo para microalbuminúria até insuficiência renal terminal por glomeruloesclerose secundária a depósito de Gb3 nos rins; dores articulares e ósseas (chegando a osteopenia /osteoporose precoces), hipertrofia ventricular esquerda concêntrica, e alterações neurológicas como neuropatias periféricas, AIT, AVC e dilatação de vasos cerebrais (doliectasia) predominantemente do sistema vértebrobasilar. As características clínicas e genéticas são variadas, e se apresentam com maior gravidade nos pacientes do sexo masculino.

Observamos uma frequência de 1,12% de DF na nossa coorte de AIJ. Não existem muitos estudos epidemiológicos de DF no Brasil, entretanto a frequência observada foi maior que a esperada para nascidos vivos do sexo masculino na população em geral que é de 0,0025% ($p=0,0088$) (42), ressaltando que a nossa amostra foi muito pequena. A etnia das crianças afetadas é uma mistura de caucasianos e nativos Sul-Americanos (indígenas), não incluída nas populações

de alta incidência para a DF (3). Os pacientes foram devidamente informados sobre o tema do trabalho (DF) no dia da consulta, e após assinado os termos de consentimento e assentimento, o questionário clínico era imediatamente aplicado, evitando pesquisas e diminuindo a manipulação de dados mostrando uma prevalência falsamente elevada de sintomas sugestivos da DF na coorte de AIJ.

Pacientes com DF clássica têm completa ausência ou até 30-35% de atividade da α Gal-A (30), assim como aumento em lisossomos de Gb3, que é condição “sine qua non” para o diagnóstico de DF (43). O diagnóstico de DF, em adultos, é realizado pela dosagem da enzima e do metabólito, associado à variante genética patogênica ou biópsia de órgão alvo acometido mostrando depósitos teciduais de Gb3, como biópsia renal.

Por se tratar de uma doença recessiva ligada ao X, em pacientes do sexo feminino, o genótipo heterozigótico pode ter penetrância incompleta. O caráter mais leve da doença proporciona às mulheres atividade residual de enzima, por esta razão a análise genética é padrão ouro para a realização do diagnóstico nas mulheres (44). A atividade enzimática pode ser mensurada em células de sangue periférico ou em teste de gota seca. No nosso estudo, todas as medidas foram realizadas em teste de gota seca. A atividade enzimática varia de paciente para paciente e em um único paciente, de órgão para órgão, fazendo com que os níveis anormais de enzimas sejam diferentes para cada pessoa. Por causa disso, o limiar enzimático de patogenicidade é difícil de definir (45).

Em nossa coorte identificamos 4 (4,5%) pacientes com atividade diminuída dos níveis plasmáticos da atividade da α Gal-A. Três pacientes com AIJ oligoarticular tinham história familiar e sintomas sugestivos de DF; somente um

desses pacientes não apresentava dor com características neuropáticas, lesões de pele e sintomas gastrointestinais. Este paciente nunca sofreu de AVC, miocardiopatia ou doença renal crônica, e sua história familiar não se mostrou relevante para as alterações previamente citadas, em pacientes jovens. Após realização do teste genético somente um dos três pacientes com alteração enzimática confirmou diagnóstico de DF. Os outros dois estão sendo acompanhados para, em avaliações subsequentes sermos capazes de identificar doença clínica.

A α Gal-A defeituosa leva a acúmulo dos substratos Gb3 e liso Gb3 dentro dos lisossomos, atuando como padrões moleculares associados a danos ou DAMPS (Damage-associated molecular pattern) ou aumentando a produção de DAMP, ativando processo inflamatório, induzindo apoptose e secreção de citocinas pró-inflamatórias mediada pelo receptor do tipo Toll 4 ou toll-like receptor (TLR4) do sistema imune inato como IL-1 β e (TNF- α) (25). Estes diferentes mecanismos celulares contribuem para a expressão fenotípica da DF (46). Essas citocinas são traço característico de doenças autoinflamatórias (47).

O reconhecimento dos metabólitos acumulados como antígenos também influenciam as células T exterminadoras naturais ou Natural Killers (NK) na produção e liberação de outras citocinas pro-inflamatórias como interferon-gama (IFN- γ), TNF- α e IL: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-17. Esta cascata inflamatória produz um estímulo contínuo responsável pela manutenção da resposta autoimune explicando as características autoimunes, como a presença de auto anticorpos, e autoinflamatórias na DF. No paciente índice deste estudo, além de sintomas clínicos clássicos de DF (anidrose, acroparestesias, febre, intolerância ao calor e aos exercícios, dor abdominal, dispepsia, alterações cardíacas e

córnea Verticilata), também encontramos anticorpos anti núcleo (AAN) e ribonucleoproteína (RNP), associados à artrite oligoarticular de tornozelos. É importante ressaltar que este acúmulo de substrato (Gb3 e liso-Gbs3) tem ação moduladora da imunidade inata e adaptativa com possível formação de auto anticorpos como descrito anteriormente na introdução e caráter cumulativo, o que justifica o acompanhamento dos outros dois pacientes com alteração enzimática inicial, mesmo sem alterações genéticas identificadas.

Ao analisar os exames laboratoriais na Tabela 6, observamos uma frequência de 12,32% de microalbuminúria nos pacientes com AIJ, incluindo o paciente com DF. Considerando que a AIJ não causa comprometimento renal, este resultado pode ser explicado pelo uso de antiinflamatórios não esteroidais no tratamento da AIJ, o que ocorreu em 48 (53,93%) dos pacientes. No entanto a presença de auto anticorpos na nossa amostra AAN e FR se manteve de acordo com a literatura, assim como a presença do o marcador genético HLAB-27.

A elevada taxa de envolvimento cardíaco na nossa coorte (Tabela 7) esteve muito provavelmente relacionada à AIJ, a qual pode acometer todas as estruturas cardíacas (pericárdio, miocárdio, endocárdio, vasos coronários, válvulas e sistema de condução) (48). Entretanto, a DF também pode causar alterações cardíacas na faixa etária pediátrica, incluindo distúrbios de condução, disfunções valvares, arritmias na infância, progredindo para HCVE em casos mais severos (49). No nosso paciente com DF e AIJ foi observado prolapso de valva mitral e HCVE, característicos da DF. A doença pode se apresentar em intensidades variadas, de acordo com a variante encontrada. Existem variantes do *GLA* associadas a início tardio da doença com predominância de fenótipo cardíaco ou predominantemente cardíaco (50).

O sintoma musculoesquelético mais comumente e precocemente descrito na DF é a acroparestesia, mas outros estudos têm descrito, ao longo dos últimos anos, diferentes apresentações musculoesqueléticas como doença articular crônica e doença óssea (artrites poli, oligo e monoarticulares, gota, osteoporose), artrite degenerativa, artropatias neurológicas como Charcot-Marie-Tooth (51), nódulos de Heberden-símile (52) e também miosite (39). Recentemente a coexistência de DF e doença autoimune tem ganhado visibilidade na literatura médica descrevendo doenças como lúpus eritematoso sistêmico (53, 52), artrite Reumatóide (54), hipotireoidismos autoimune (55), Nefropatia por IgA (56) e poliangite granulomatosa (57) associadas ao quadro de DF.

Em publicação recente, um grupo brasileiro demonstrou 64,8% de erro diagnóstico em pacientes com DF, mais comumente confundidos com doenças reumatológicas, com média de 16 anos para a identificação do diagnóstico correto. Estes erros ou retardos do diagnóstico se deve à alta prevalência (cerca de 97,3%) de sintomas ou doenças reumatológicas associadas à DF. As manifestações musculoesqueléticas mais comumente associadas em pacientes com DF foram: osteopenia, osteoporose, baixa densidade mineral óssea, fibromialgia, linfedema, osteoartropatia neuropática, dor lombar crônica, osteoartrite de joelho e quadris, gota, clindactilia, síndrome do túnel do carpo. O estudo também identificou as variantes *R118C* e *A143T* associadas à manifestações reumatológicas em 68,4% dos pacientes com DF no estado de São Paulo (58).

Tendo em vista a população pediátrica um grupo português estudou uma coorte de 292 pacientes com AIJ e sua associação com DF, após o início do

nosso trabalho, entretanto eles não encontraram nenhuma variante patogênica da doença, porém observaram 4 pacientes com a variante *D313Y*, uma variante rara do *GLA* associada à atividade enzimática diminuída no plasma, mas níveis lisossomais normais, ainda discutida na literatura se patogênica ou não (59). Também foi identificado um paciente com a variante missense *R118C*, encontrada em pacientes do Mediterrâneo, associada à início tardio da DF, numa frequência de 0,34% (1/292) (60).

Na nossa coorte, observamos uma variedade de sintomas clínicos relacionados à DF nos pacientes com AIJ. Cerca de 52,80% dos pacientes relataram acroparestesias, 30% relataram dificuldade de ganho de peso, enquanto 42% das famílias tinham histórico de AVC. Todas essas características podem estar associadas com artrite crônica e seu tratamento, mas também à presença de variantes específicas do *GLA* associadas a essas alterações clínicas.

Como descrito nos resultados, além do paciente índice com uma variante patogênica, observamos duas outras pacientes do sexo feminino heterozigóticas para alterações genéticas exônicas do *GLA*. A primeira com AIJ pauciarticular, apresentou a variante *c.38C>T* (*p.Ala13Val*). Esta alteração, não descrita anteriormente, foi localizada no exon 1, em nucleotídeo não conservado e numa posição de aminoácido fracamente conservada, com pequenas diferenças físico-químicas entre os aminoácidos alanina e valina de acordo com Alamut versão 2.4, que é um aplicativo de software de exploração de variações genômicas que reúne informações genéticas e genômicas de diferentes fontes em somente uma. Análises de software pelo Polyphen-2, Mutation Taster e Align-GVGD predizem esta variante como provavelmente benigna. Ela foi considerada de

significado incerto pela Centogene e pelo banco genético VEP (Variant Effect Predictor) Ensembl, OMIM. Em conclusão, a paciente é portadora de uma variante de significado incerto do gene *GLA*, não suficiente para o diagnóstico da DF, principalmente devido à concentração sérica normal do biomarcador liso-Gb3. Nesta criança porém, foi identificada a presença de córnea verticillata, o que suscita a necessidade de acompanhamento médico para reavaliação futura. Infelizmente, a tenra idade ainda é um obstáculo para estabelecer identificação da DF ou de sintomas Fabry símile, e esses pacientes precisam de extensivo seguimento para determinar de essas alterações são patogênicas ou não, especialmente em pacientes do sexo feminino.

Na segunda paciente, também portadora de com AIJ pauciarticular, foi identificada a variante *c.48T>G* (rs201449986) no exon 1 do *GLA*. Essa alteração, porém, foi considerada neutra pela troca de códons que traduzem o mesmo aminoácido por bancos genéticos como VEP ensembl, OMIM, Clinvar e pelo próprio banco da Centogene. De acordo com “Sequence Project” (<http://evs.washington.edu/EVS/>;) este alelo tem frequência de 1/6728.

No total identificamos 3 variantes exônicas nos nossos pacientes: uma patogênica, uma de significado incerto e, a última considerada neutra, com uma incidência de DF em 1,12% da nossa amostra.

Outro ponto interessante no nosso trabalho foi a elevada frequência de variantes intrônicas nos pacientes com AIJ. Foram identificadas 6 variantes intrônicas, *c.370-81_-77del*, *c.548-125C>G* e *c.548-162A>T*, *c.640-16A>G*, *c.1000-22C>T*, *c.-10C>T* e *c.-12G>A*, que são sequências de DNA, intercaladas aos exons que não são expressadas na proteína final, pois são retirados no processo de splicing), localizadas nos íntrons 2, 3, 4, 6 e na região 5'UTR do

exon 1, respectivamente e com suas frequências na população geral. Esta última, refere-se à uma região não traduzida na molécula do RNA mensageiro (mRNA), e um importante local de ligação, pois se estende até o códon de iniciação, que instaura a síntese proteica. Esta região também é importante para a regulação da translação e transcrição do RNA. Três SNPs *c.370-81_-77del* (rs5903184), *c.-12G>A* (rs3027585) e *c.-10C>T* (rs2071225), presentes no nosso estudo são relativamente comuns à diferentes grupos étnicos, com frequência do alelo menor de cerca de 10% na população britânica (61), e 12% em populações latinas (OMIM), mas também comum aos Portugueses, uma das populações de maior ascendência no Brasil) (62, 63).

Assim como a variante previamente descrita, outros polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) isolados ou em haplótipos complexos intrônicos (HCI) (combinação) também têm sido descritas como associados a sintomas clínicos Fabry símile. À transmissão genética em grupo de variantes intrônicas se denomina Haplótipo ou haplótipos intrônicos complexos. A associação de dois SNPs do gene da α Gal-A *c.1000-22C>T* [rs2071228] e *c.640-16A>G* (rs2071397) foram recentemente descritas à presença de angioqueratomas e acroparestesias em pacientes com cardiomiopatias hipertróficas sem diagnóstico de DF (64). Análises *in vitro* e *in vivo* também demonstraram que polimorfismos na região 5'UTR podem alterar a expressão do gene da α Gal-A, com possível relevância clínica, particularmente em pacientes do sexo masculinos portadores de variantes do *GLA* associadas a elevada redução de atividade enzimática (RAE) (65). O alelo *c.-10T*, encontrado em um terço dos resultados positivos deste estudo, foi previamente associado à diminuição da atividade da α Gal-A em leucócitos (62,63), e também a uma possível correlação

com lesões neurológicas como acidente vascular cerebral, ataque isquêmico transitório, lesão de substância branca e neuropatia de fibras finas (de causa desconhecida), com neuropatia periférica (66), assim como em pacientes com DF (65). Em nosso estudo, esta variante teve uma associação estatística positiva à dificuldade de ganho de peso, alterações de câmara anterior, córnea e de acuidade visual, lembrando que a nossa população é composta de crianças e adolescentes seria necessário um longo período de observação para avaliar os mesmos danos, ressaltando o possível efeito cumulativo do substrato para eventual dano de órgão alvo. O alelo *c.-10T*, se localiza na região não-codificante 5' tem sido associada a uma diminuição da expressão da α Gal-A (63), alterando no gene promotor o local de ligação à proteína nuclear (67). Estudos ainda são necessários para determinar o real papel desta variante no *GLA*, mas dados interessantes recentes sugeriram que níveis reduzidos de atividade da enzima, porém acima do valor considerado como insuficiência para causar DF, podem ser fator de risco na fisiopatogênese da doença de Parkinson (68). Existem inúmeras descrições do alelo *c.-10T* e manifestações Fabry-símile (63).

A variante intrônica mais frequente na nossa coorte foi a *c.1000-22C>T* (rs2071228) em 24 (44,44%) dos 54 pacientes testados. Localizada no intron 6 essa variante é fenotipicamente associada com cardiomiopatia, Fabry, Cardiomiopatia hipertrófica pelo banco VEP ensembl. Esse alelo também está associado a alguns haplótipos intrônicos complexos (HIC) que parecem traduzir alteração enzimática com acúmulo de glicosíngolípides (67). Existem inúmeros relatos de grupos de alelos causando alterações Fabry símle e DF per se. Gervas-Arruga et al, estudaram um HIC (*c.-10C > T*, *c.369 + 990C > A*, *c.370-81_370-77delCAGCC*, *c.640-16A > G*, *c.1000-22C > T*) no gene do *GLA*

associados a acúmulo de glicosfingolípides e sintomas Fabry-símile. Foram avaliados os níveis enzimáticos em células (fibroblastos e leucócitos), no plasma e a expressão quantitativa da enzima. Os resultados sugeriram padrão alterado de expressão do gene estudado, porém sem alteração suficiente de níveis de enzima em plasma, leucócitos e fibroblastos de pele, porém com acúmulo de glicosfingolípides em fibroblastos e em células tubulares renais e glomerulares (67).

Em outro estudo citando o CIH *-10C>T, c.370-77_-81del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T* no GLA, os autores descrevem uma paciente com manifestações sistêmicas, de início precoce de DF portadora deste haplótipo sem a presença de anormalidades exônicas, sugerindo que essas variantes isoladamente, localizadas em região promotora e intrônica regulatória, podem causar DF (69). Em nossa casuística tivemos 8 (14,8%) dos 54 testes realizados que apresentaram este mesmo haplótipo 1 (*-10C>T, c.370-77_-81del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T*), incluindo o paciente com DF e a paciente com a variante de significado incerto que apresentava córnea Verticilata, mas uma vez demonstrando ser mister o acompanhamento da mesma. Dentre os outros HIC observados apenas o haplótipo 3 teve associação positiva com alterações Valvares ($p=0,031$).

Não foi observada associação de acroparestesias/neuropatias periféricas com as HIC, apesar da incidência de cerca de 50% na nossa amostra, lembrando que somente um número limitado de pacientes realizaram o teste genético influenciando à possíveis associações positivas entre as variantes encontradas e os sintomas e sinais clínicos relatados.

Observamos DF como uma doença associada à AIJ em 1,12% da nossa amostra, porém o reduzido número de pacientes deve ser considerado limitação do estudo. Apenas incluímos 50% das nossas crianças com AIJ em acompanhamento, em muito devido a problemas logísticos (ausências nas consultas, avaliação clínica incompleta). Os representantes legais foram informados sobre o tema do estudo, e preencheram o questionário clínico no momento do consentimento, evitando pesquisas sobre o assunto e diminuindo a possibilidade de queixas direcionadas sugestivas de DF. Outra limitação desse estudo foi a não realização de teste genético em todos os pacientes da coorte. Apesar de podermos inferir que pacientes do sexo masculino com níveis enzimáticos normais não apresentam variantes patogênicas exônicas, o mesmo não se aplica às variantes intrônicas ou Haplótipos do *GLA*, os quais também podem interferir nos níveis de atividade da α Gal-A no futuro. Nós também não tivemos acesso aos registros médicos dos familiares dos nossos pacientes para explicar melhor a alta incidência de eventos familiares vasculares.

6. CONCLUSÃO

A frequência de DF nesta coorte de pacientes com AIJ foi de 1,12%.

Entretanto, observamos a presença de variantes do *GLA* em cerca de metade (26 pacientes) dos pacientes testados (54 pacientes), dentre as quais variantes intrônicas. Algumas dessas variantes descritas como causadoras de alterações leves na atividade da α Gal-A porém, insuficientes para causar a DF. Essas variantes estão associadas na literatura a manifestações moderadas isoladas como neuropatias periféricas, AVCs, lesão de substância branca e até associação com a fisiopatologia da doença de Parkinson, porém algumas dessas combinações estão descritas como causadoras de DF. É necessário um alto índice de suspeição para o diagnóstico na infância devido à inespecificidade dos sintomas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os reumatologistas pediátricos devem estar atentos que a DF pode se apresentar com sintomas similares às doenças autoimunes clássicas, mas também podem ser coexistentes. Precisamos ser cuidadosos com pacientes com AIJ e sintomas de “disautonomias” (dor persistente ou difusa em extremidades, gastroparesia, dor abdominal, ausência de suor e arritmias), e ser mais detalhista com história familiar, procurando por infartos, acidente vascular cerebral, morte súbita em idade precoce (<50a), e doença renal terminal levando a transplante. Essas informações são cruciais para o diagnóstico da DF, e a identificação da doença precocemente é uma estratégia custo-efetiva que pode evitar transplante renal e morte precoce (10). No futuro, esperamos ser capazes de realizar atividade enzimática e teste genético em todos os pacientes suspeitos.

8. REFERÊNCIAS:

1. Biegstraaten M, Arngrímsson R, Barbey F, Boks L, Cecchi F, Deegan PB, et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: The European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015;10(1):1-10.
2. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet*. 2006;79:31–40.
3. Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset *GLA* mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat*. 2009;30(10):1397–1405.
4. Anderson WA. A case of angiokeratoma. *Br J Dermatol*. 1898;18: 113-117.
5. Fabry J. Ein Betrag zur Kenntnis der Purpura hamorrhagica nodularis. *Arch Dermatol Syphilol*. 1898;43:187-200.
6. Pompen AW, Ruiter M, Wyers HJ. Angiokeratoma corporis diffusum (universale) Fabry, as a sign of an unknown internal disease; two autopsy reports. *Acta Med Scand*. 1947;128:234-255.
7. Hornbostel H, Scriba K. Excision of skin in diagnosis of Fabry's angiokeratoma with cardio-vasorenal syndrome as phosphatide storage disease. *Klin Wochenschr*. 1953;31:68-69.
8. Sweeley CC, Klionsky BL. Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J Biol Chem*. 1963;238: PC3148.

9. Brady R, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry disease: ceramide trihexosidase deficiency. *N Engl J Med*. 1967;276:1163-1167.
10. Opitz JM, Stiles FC, Wise D, Race RR, Sanger R, Von Gemmingen GR et al. The genetics of angiokeratoma corporis diffusum (Fabry's disease), and its linkage with Xg(a) locus. *Am J Hum Genet*. 1965;17:325-342.
11. Calhoun DH, Bishop DF, Bernstein HS, Quinn M, Hantzopoulos P, Desnick RJ. Fabry disease: isolation of a cDNA clone encoding human alpha-galactosidase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82: 7364-7368.
12. Rozenfeld P, Feriozzi S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. *Mol Genet Metab*. 2017;122(3):19-27. doi:10.1016/j.ymgme.2017.09.004.
13. Samarani M, Loberto N, Soldà G, Straniero L, Asselta R, Duga S et al. A lysosome-plasma membrane-sphingolipid axis linking lysosomal storage to cell growth arrest. *FASEB J*. 2018;32(10):5685-5702. doi:10.1096/fj.201701512RR.
14. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 2009;325:473-477. DOI: 10.1126/science.1174447.
15. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15,550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
16. Walkley SU, Vanier MT. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1793(4):726-36. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.014.

17. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 2000;106:1521–1530.
18. Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H et al. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med.* 2008;205:2053–2063.
19. Dora KA, Gallagher NT, McNeish A, Garland CJ. Modulation of endothelial cell K_{Ca}3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circ Res.* 2008;102:1247–1255.
20. Choi S, Kim JA, Na H-Y, Cho S-E, Park S, Jung S-C et al. Globotriaosylceramide induces lysosomal degradation of endothelial K_{Ca}3.1 in Fabry disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:81–89.
21. Mauhin W, Lidove O, Masat E, Mingozzi F, Mariampillai K, Ziza JM et al. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. *JIMD reports.* 2015;22,1–10.
22. Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med.* 1998;188:1529–1534.
23. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med.* 2002;195:625–636.
24. O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4⁺, CD8 α ⁺ and CD4⁻CD8 α ⁻ invariant natural killer T cells. *PLoS One.* 2011;6(12):e28648.
25. De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA & Rozenfeld PA. Fabry

disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: Role of globotriaosylceramide. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013;109(1): 93–99.

26. Anders H-J, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:854–867

27. Banas MC, Banas B, Hudkins KL, Wietecha TA, Iyoda M, Bock E et al. TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:704–713.

28. Macedo MF, Quinta R, Pereira CS, Sa Miranda MC. Enzyme replacement therapy partially prevents invariant Natural Killer T cell deficiency in the Fabry disease mouse model. *Mol Genet Metab*. 2012;106:83–91.

29. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C, et al. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(3):236-242. doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01309.x.

30. Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Desnick RJ & Hwu WL. Fabry Disease: Incidence of the Common Later-Onset α -Galactosidase A IVS4+919G→A Mutation in Taiwanese Newborns — Superiority of DNA-Based to Enzyme-Based Newborn Screening for Common Mutations. *Molecular Medicine*. 2012;18(5):780–784.

31. Schiffmann R, Ries M. Fabry Disease: A disorder of Childhood Onset. *Pediatr Neurol*. 2016,Nov;64:10-20.

32. Rolfs A, Fazekas F, Grittner U, Dichgans M, Martus P, Holzhausen M et al. Acute cerebrovascular disease in the young: The Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke*. 2013;44:340-349.

33. Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hirose M, Shinzato K, Hattori K et al. Identification of a novel mutation and prevalence study for Fabry disease in Japanese dialysis patients. *Ren Fail.* 2012;34:566-570.
34. Terryn W, Deschoenmakere G, De Keyser J, Meersseman W, Van Biesen W, Wuyts B et al. Prevalence of Fabry disease in a predominantly hypertensive population with left ventricular hypertrophy. *Int J Cardiol.* 2013;167:2555-2560.
35. Schiffmann R, Forni S, Swift C, Brignol N, Wu X, Lockhart DJ et al. Risk of death in heart disease is associated with elevated urinary globotriaosylceramide. *J Am Heart Assoc.* 2014;3:e000394.
36. Kästner B, Behre S, Lutz N, Bürger F, Luntz S, Hinderhofer K et al. Clinical research in vulnerable populations: variability and focus of institutional review boards' responses. *PLoS One.* 2015;10:e0135997.
37. Tsutsumi O, Sato M, Sato K, Sato K, Mizuno M, Sakamoto S. Early prenatal diagnosis of inborn error of metabolism: a case report of a fetus affected with Fabry's disease. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol.* 1985;11:39-45.
38. Vedder AC, Strijland A, vd Bergh Weerman MA, Florquin S, Aerts JM, Hollak CE. Manifestations of Fabry disease in placental tissue. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29:106-111.
39. Chimenti C, Padua L, Pazzaglia C, Morgante E, Centurion C, Antuzzi D et al. Cardiac and skeletal myopathy in Fabry disease: A clinicopathologic correlative study. *Human Pathology* 2012;43(9): 1444–1452.
40. Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P et al. JIA criteria Article ILAR 1997. *The Journal of Rheumatology.* 1998;25:1991–1994.
41. Sestito S, Ceravolo F & Concolino D. Anderson- Fabry Disease in Children.

Current Pharmaceutical Design. 2013;19:6037–6045.

42. Matern D, Gavrilov D, Oglesbee D, Raymond K, Rinaldo P & Tortorelli S. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Seminars in Perinatology.* 2015;39:206–216.

43. Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med.* 1973;81:157–171.

44. Pagnini I, Borsini W, Cecchi F, Sgalambro A, Olivetto I, Frullini A et al. Distal extremity pain as a presenting feature of Fabry's disease. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011;63:390–5.

45. Havndrup O, Christiansen M, Stoevring B, Jensen M, Hoffman-Bang J, Andersen PS et al. Fabry disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy: Genetic screening needed for establishing the diagnosis in women. *European Journal of Heart Failure.* 2010;12(6): 535–540.

46. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(8): 2812–2817.

47. Jesus AA, Canna SW, Liu Y & Goldbach-Mansky R. Molecular Mechanisms in Genetically Defined Autoinflammatory Diseases: Disorders of Amplified Danger Signaling. *Annu Rev Immunol.* 2015;33: 823–874.

48. Koca B, Sahin S, Adrovic A, Barut K, Kasapcopur O. Cardiac involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int.* 2017;37(1):137–142.

49. Germain DP, Fouilhoux A, Decramer S, Tardieu M, Pillet P, Fila M et al. Consensus recommendations for diagnosis, management and treatment of Fabry disease in paediatric patients. *Clin Genet*. 2019;96(2):107–117.
50. Akhtar MM, Elliott PM. Anderson-Fabry disease in heart failure. *Biophys Rev*. 2018;10(4):1107-1119.
51. Thévenot C, Crouzet J, Villiaume J, Avouac B, Le Charpentier Y, Voisin MC. Les manifestations articulaires de la maladie de Fabry. A propos de deux observations. *SEM.HÔP PARIS*. 1992;486–493.
52. Lidove O, Zeller V, Chicheportiche V, Meyssonier V, Sené T, Godot S & Ziza J M. Musculoskeletal manifestations of Fabry disease: A retrospective study. *Joint Bone Spine*. 2016;83(4): 421–426.
53. Rahman P, Gladman DD, Wither JSM. Coexistence de Fabry's disease and Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1998;16: 475–478.
54. Chatre C, Filippi N, Roubille F & Pers Y-M. Heart Involvement in a Woman Treated with Hydroxychloroquine for Systemic Lupus Erythematosus Revealing Fabry Disease. *The Journal of Rheumatology*. 2016;43(5):997–998.
55. Martinez P, Aggio M & Rozenfeld P. High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2007;30(3):365–369.
56. Katsumata N, Ishiguro A & Watanabe H. Fabry disease superimposed on overt autoimmune hypothyroidism. *Clinical Pediatric Endocrinology*. 2011;20(4):95–98.
57. Hanaoka H, Hashiguchi A, Konishi K, Ishii T & Kuwana M. A rare association between Fabry's disease and granulomatosis with polyangiitis: A potential pathogenic link. *BMC Nephrology*. 2014;15(1): 1–5.

58. Rosa Neto NS, Bento J & Pereira R. Higher rate of rheumatic manifestations and delay in diagnosis in Brazilian Fabry disease patients. *Advances in rheumatology (London, England)*. 2020;60(1), 7.
59. Koulousios K, Stylianos K, Pateinakis P, Zamanakou M, Loules G, Manou E et al. Fabry disease due to D313Y and novel *GLA* mutations [published correction appears in *BMJ Open*. 2018 Mar 8;8(3):e017098corr1. *BMJ Open*. 2017;7(10):e017098.
60. Gonçalves MJ, Mourão AF, Martinho A, Simões O, Melo-Gomes J, Salgado M et al. Genetic Screening of Mutations Associated with Fabry Disease in a Nationwide Cohort of Juvenile Idiopathic Arthritis Patients. *Frontiers in Medicine*. 2017;4(12):1–5.
61. Davies JP, Winchester BG, Malcolm S. Sequence variations in the first exon of alpha-galactosidase A. *J Med Genet*. 1993;30(8):658-663. doi:10.1136/jmg.30.8.658.
62. Oliveira JP, Ferreira S, Barceló J, Gaspar P, Carvalho F, Sá Miranda MC et al. Effect of single- nucleotide polymorphisms of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene on enzyme activity, and their frequencies in Portuguese caucasians. *J Inherit Metab Dis*. 2008a;31(Suppl 2):S247–S253.
63. Oliveira JP, Ferreira S, Reguenga C, Carvalho F, Mansson JE. The g.1170C>T polymorphism of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene is associated with decreased enzyme expression—evidence from a family study. *J Inherit Metab Dis*. 2008b;31(Suppl 2):S405–S413.
64. Poliakova AA, Gudkova AYA. Association of acroparesthesias and angiokeratomas with the alpha-galactosidase-A gene polymorphisms in females

with hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 2019;40(1), ehz747.0494. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz747.0494>.

65. Ferreira S, Reguenga C, Oliveira JP. The Modulatory Effects of the Polymorphisms in *GLA* 5'-Untranslated Region Upon Gene Expression Are Cell-Type Specific. *JIMD Rep*. 2015;23:27-34.

66. Schelleckes M, Lenders M, Guske K, Schmitz B, Tanislav C, Ständer S, et al. Cryptogenic stroke and small fiber neuropathy of unknown etiology in patients with alpha-galactosidase A -10T genotype. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014;9:178.

67. Gervas-Arruga J, Cebolla JJ, Irun P, Perez-Lopez J, Plaza L, Roche JC et al. Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the α -galactosidase A (*GLA*) gene. *BMC Genet*. 2015;16:109.

68. Wu G, Huang J, Feng X, Zhang A, Li J, Pang S et al. Decreased expression of lysosomal alpha galactosidase A gene in sporadic Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2011;36(10):1939-1944. doi:10.1007/s11064-011-0516-0.

69. Pisano A, Imbriaco M, Zizzo C, Albeggiani G, Colomba P, Alessandro R, Et al. A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the *GLA* gene: a case report. *BMC Cardiovasc Disord*. 2012;12:39.

9. ANEXOS

ANEXO 1- Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa.

HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE CONDIÇÕES AUTOIMUNES COM A DOENÇA DE FABRY **Pesquisador:** Luciana Brandão Paim Marques
Área Temática: Versão: 3

CAAE: 37270414.0.0000.5042

Instituição Proponente: Hospital Infantil Albert Sabin - CE **Patrocinador**

Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 916.538

Data da Relatoria: 11/12/2014

Apresentação do Projeto: A doença de Fabry (DF) é uma desordem de herança ligada ao X, caracterizada como erro inato de metabolismo decorrente da deficiência da enzima alfa-galactosidase A. Este defeito leva ao acúmulo do substrato globotriaosilceramida nos lisossomos dos diferentes tecidos, causando quadro clínico (Schiffmann, 2000; Gupta, 2005). Os sintomas da doença podem se manifestar desde os primeiros anos de vida, mas em geral, o diagnóstico é realizado por volta da 3ª ou 4ª década. A sintomatologia da DF é variada e inespecífica, englobando alterações no sistema nervoso: acroparestesia (Hoffmann B et al 2007), acidentes vasculares cerebrais, lesão de substância branca, dolicoectasia vértebro-basilar e neuropatias periféricas, alterações auditivas: zumbido, disacusia, córnea verticilata, alterações cardíacas: hipertrofia ventricular concêntrica esquerda (HVCE), alterações valvares, arritmias, morte súbita (Linhart A, 2007, Linhart A et al, 2007, Chimenti 2004, Metha, 2004, Kampmann C 2008, MacDermont et al, 2001, Metha et al. 2009, Hughes DA et al, 2008, Hughes DA et al, 2011), alterações de trato gastrointestinal: distensão abdominal, diarreia, dispepsia, dor abdominal pósprandial, sensação de plenitude, alterações renais. As doenças autoimunes podem apresentar-se de forma semelhante à DF, dificultando o diagnóstico concomitante dessa patologia. Daí, este estudo se propõe a avaliar a frequência de Doença de Fabry (DF) em pacientes pediátricos com diagnóstico de Condições autoimunes. Durante a consultade rotina no ambulatório de reumatologia pediátrica do Hospital Infantil Albert Sabin – Ce, **Endereço:** Rua Tertuliano Sales, 544. **Bairro:** Vila União **CEP:** 60.410-790, **UF:** CE **Município:** FORTALEZA. **Telefone:** (85)3101-4212

Fax: (85)3101-4212. **E-mail:** cep@hias.ce.gov.br HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN - CE

Continuação do Parecer: 916.538

serão identificados pacientes que têm LESJ e AIJ, no período de Nov de 2014 a Nov de 2016. A esses pacientes será solicitada a coleta de sangue em papel filtro para realização de estudos bioquímicos e moleculares para identificação da DF. Para os casos que forem identificados com a DF serão aplicados protocolos clínico, testes de atividade das doenças autoimunes de base e os exames laboratoriais de rotina para acompanhamento da DF. Os testes de atividade das doenças autoimunes utilizados serão: hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa, dosagem de complemento C3, C4 e CH50, anticorpo (AC) antinúcleo (ANA), ac anti DNA, Anti-CCP, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSa, antiSSb, anticardiolipina IgG e IgM, anticoagulante lúpico e beta-2-glicoproteína-1 IgG e IgM, fator reumatoide, função hepática (TGO, TGP, proteínas totais e frações, FA e gama GT), renal (Sumário de urina, proteinúria de 24 horas, ureia e creatinina) e tireoidiana (T4 livre, TSH). Os exames laboratoriais de rotina para acompanhamento da DF são: RM de crânio (com sequência T2 em flair), fundo de olho, avaliação auditiva (audiometria, BERA, potencial evocado auditivo), ecocardiograma com doppler, eletrocardiograma, RM cardíaca, US abdominal. O tamanho da Amostra no Brasil será em torno de 500 pacientes diagnosticados as possíveis alterações da doença já instaladas. Serão avaliados os Prontuários com dados progressos dos pacientes, além de protocolo clínico desenhado especificamente para a pesquisa, Childhood Health questionnaire (CHQ), Systemic Lupus Erythematosus disease activity Index (SLEDAI).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a associação de doença de Fabry (DF) em pacientes pediátricos portadores de Condições autoimunes.

Objetivo Secundário:

- Avaliar manifestações clínicas da DF, nos pacientes que apresentem a associação com Condições autoimunes.
- Avaliar atividade clínica da doença autoimune, com instrumentos específicos de atividade e qualidade de vida nos pacientes com DF.
- Avaliar perfil imunológico dos pacientes diagnosticados com DF.

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544

Bairro: Vila União **CEP:** 60.410-790

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3101-4212 **Fax:** (85)3101-4212 **E-mail:** cep@hias.ce.gov.br



HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN - CE

Continuação do Parecer: 916.538

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Projeto ressalta que a pesquisa apresentará risco mínimo de quebra de sigilo. A coleta de sangue nos sujeitos da pesquisa será o único desconforto, podendo acarretar dor e hematoma local. Os pacientes, segundo a pesquisadora, não correm riscos adicionais. Quanto aos Benefícios, o paciente que for diagnosticado com a doença de Fabry poderá receber a terapia adequada para esta patologia evitando progressão e complicações letais da mesma.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisa relevante por aprofundar conhecimento, na medida que busca a possibilidade de associação entre duas patologias importantes na pediatria, trazendo contribuição para diagnóstico precoce. Oportunamente será utilizado o ambulatório com acesso a referidos pacientes, desde que seja esclarecido e pontuado o financiamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos do projeto e os que serão aplicados aos participantes da pesquisa em parte estão adequados, faltando o termo de assentimento completo, de acordo com a Resolução 466/2012.

Recomendações: Adequar o termo de assentimento à linguagem de crianças e adolescentes, usando termos que possam traduzir os termos científicos de forma compreensível às condições cognitivas dos mesmos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado, sendo necessária a adequação supracitada antes da coleta de dados.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado, com recomendações na reunião do CEP HIAS de 16.12.14.

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544, **Bairro:** Vila União **CEP:** 60.410-790.

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3101-4212 **Fax:** (85)3101-4212 **E-mail:** cep@hias.ce.gov.br .

Página 03 de 04

HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN - CE

Continuação do Parecer: 916.538

FORTALEZA, 16 de Dezembro de 2014

Assinado por:

Regina Lúcia Ribeiro Moreno (Coordenador)

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544

Bairro: Vila União **CEP:** 60.410-790

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3101-4212 **Fax:** (85)3101-4212 **E-mail:** cep@hias.ce.gov.br

Página 04 de 04

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) senhor(a), sua filha está sendo convidada a participar de um estudo denominado: “Associação doenças autoimunes Com A Doença De Fabry (DF).”.

A DF é uma desordem hereditária, que pode se manifestar desde os primeiros anos de vida, mas em geral, o diagnóstico é realizado por volta da 3ª ou 4ª década. Os sintomas são variados e inespecíficos, englobando vários órgãos e sistemas.

Alguns estudos têm mostrado presença de autoanticorpos e coexistência de doenças autoimunes como: lúpus eritematoso sistêmico, Artrite reumatoide e nefropatia.

As doenças autoimunes podem apresentar-se de forma semelhante à DF, dificultando o diagnóstico dessas patologias.

Porque fazer este estudo?

Trata-se de um estudo em crianças e adolescentes com as doenças autoimunes para avaliar se as pacientes com estas doenças podem ser portadoras da DF em associação. A literatura tem mostrado uma larga incidência de autoimunidade nos pacientes com DF.

Como será feito o estudo?

Se concordarem em participar do estudo, as pacientes serão avaliadas clinicamente: com exame físico e testes de atividade e qualidade de vida. Em seguida farão o teste em papel filtro para análise molecular e bioquímica da DF.

Existem riscos para os participantes do estudo?

A dor durante a punção é o único desconforto. Seu filho (a) não corre riscos de sua doença piorar por causa do teste.

Quais os benefícios do estudo?

Para a paciente o benefício é de descobrir se há uma doença genética associada à sua doença autoimune.

Sou obrigado a participar do estudo?

O(a) senhor(a) tem o direito de não autorizar sua filha a participar deste estudo ou mesmo parar de participar em qualquer momento que desejar sem

que isso prejudique a continuidade do seu atendimento de qualquer maneira, ou sofra qualquer tipo de advertência ou retaliação. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na instituição.

A identidade da minha filha será preservada?

Em nenhum momento durante a realização do estudo, ou durante a divulgação dos resultados do estudo, a identidade da sua filha será revelada. Todas as informações serão mantidas em sigilo. Elas serão mantidas anônimas através do uso de um código. Os dados anônimos serão mantidos em segurança, em um computador protegido por senha.

Quem é o responsável pelo estudo?

A principal responsável pelo estudo é a Dra. Luciana Brandão Paim-Marques, que pode ser encontrada no telefone (85) 31014283. Em qualquer época do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. Eu, na qualidade de pesquisadora, assumo o compromisso de utilizar o material coletado somente para esta pesquisa.

Ressarcimento de despesas

Não há despesas pessoais para a participante, em qualquer fase do estudo, incluindo exames, consultas. Sendo a participação voluntária, não terá ressarcimento e nem compensação financeira relacionada à sua participação.

Informações adicionais

Não está prevista nenhuma forma de compensação ou remuneração pela participação no estudo, de acordo com a Lei Brasileira.

Em caso de dúvidas, durante ou após a participação no estudo, você ou qualquer membro de sua família poderá contatar os responsáveis pelo estudo, pessoalmente ou por telefone, com Dra. Luciana Brandão Paim-Marques nos telefones Tel (85) 31014263/ (85) 91782762. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin, para fazer perguntas, sugestões ou denúncias relacionadas a este estudo, pelo telefone (85) 31014283.

Autorização para inclusão no estudo

Eu, _____, após ler este documento pessoalmente, e receber todas as informações necessárias e

ter minhas dúvidas esclarecidas, e tendo conhecimento de todos os meus direitos, incluindo que receberei uma via deste documento, assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador, autorizo voluntariamente a inclusão da minha filha no estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Nome do responsável	Assinatura

nome do investigador	assinatura

ANEXO 3

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidada a participar de um estudo denominado: “*Associação doenças autoimunes com a doença de Fabry (DF)*”. A DF é uma desordem hereditária, que pode se manifestar desde os primeiros anos de vida, mas em geral, o diagnóstico é realizado por volta da 3ª ou 4ª década. Os sintomas são variados e engloba vários órgãos e sistemas. Alguns estudos têm mostrado presença de autoanticorpos e coexistência de doenças autoimunes com DF como : lúpus eritematoso sistêmico, Artrite reumatoide e nefropatia.

Porque fazer este estudo?

Trata-se de um estudo em crianças e adolescentes com as doenças autoimunes (AIJ, LESJ, vasculites e etc...) para avaliar se as pacientes com estas doenças podem, também, ser portadoras da DF. Estudos têm mostrado uma incidência aumentada de autoimunidade nos pacientes com DF.

Como será feito o estudo?

Se concordarem em participar do estudo, as pacientes serão avaliadas clinicamente: com exame físico e testes de atividade e qualidade de vida. Em seguida farão o teste em papel filtro para análise molecular e bioquímica da DF.

Existem riscos para os participantes do estudo?

A dor durante a punção é o único desconforto.

Quais os benefícios do estudo?

Descobrir se há uma doença genética associada à sua doença autoimune.

Sou obrigado a participar do estudo?

Não. Você não tem obrigação de participar. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na instituição.

A minha identidade será revelada?

Em nenhum momento durante a realização do estudo, ou durante a divulgação dos resultados do estudo a sua identidade será revelada. Todas as informações serão mantidas em sigilo.

Quem é o responsável pelo estudo?

A principal responsável pelo estudo é a Dra. Luciana Brandão Paim-Marques, que pode ser encontrada no telefone (85) 31014283. Em qualquer época do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Informações adicionais

Não está prevista nenhuma forma de compensação ou remuneração pela participação no estudo, de acordo com a Lei Brasileira.

Em caso de dúvidas, durante ou após a participação no estudo, você ou qualquer membro de sua família poderá contatar os responsáveis pelo estudo, pessoalmente ou por telefone, com Dra. Luciana Brandão Paim-Marques nos telefones Tel (85) 31014283. Você também poderá entrar em contato com o

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin, para fazer perguntas, sugestões ou denúncias relacionadas a este estudo, pelo telefone (85) 31014283.

Termo de Assentimento

Eu, _____, aceito participar desta pesquisa, entendendo que terei que furar o dedo para coleta de exame em papel filtro.

Fortaleza, _____ de _____ de _____.

Nome do paciente	Assinatura

ANEXO 4

Protocolo Clínico de investigação de Doença de Fabry

Nome do paciente: _____

Núm de Prontuário: _____

Data de Nascimento: _____

Idade: _____ Sexo: ☐ Fem ☐ Masc. Idade de Início dos sintomas

Sintomas clínicos	Não	Sim
Intolerância ao calor	☐	☐
Fadiga Crônica	☐	☐
Zumbido	☐	☐
Disacusia	☐	☐
Acroparestesias	☐	☐
Sinais Clínicos	☐	☐
Córnea Vericilata	☐	☐
Angioqueratomas	☐	☐
Telangiectasias	☐	☐

Alterações Cardíacas. Data:	Não	Sim
Hipert.Ventricular Conc(HVC)	☐	☐
Medida de VE	mm	
Dilatação da aorta	☐	☐
Alteração Valvar	☐	☐
Qual?		
Arritmia	☐	☐
Encurtamento PR	☐	☐
Morte Súbita	☐	☐

Alteração de SNC	Não	Sim
AVC	☐	☐
Outra Alt SNC		
AIT	☐	☐
Alteração de SNP	☐	☐
Neuropatia periférica	☐	☐
QUAL:		
Alterações de RM de Crânio	☐	☐
Lesão de Substância Branca	☐	☐
Dolicoectasia vértebro-basilar	☐	☐
OBS:		

Alterações Gastrointestinais. Data:	Não	Sim
Distensão abdominal	☐	☐
Dispepsia	☐	☐
Diarreia	☐	☐
Sens.plenitude gástrica	☐	☐
Dificuldade ganho de peso	☐	☐

História Familiar	Não	Sim
AVC	☐	☐
AIT	☐	☐
Morte súbita	☐	☐
Alt Renal	☐	☐
FABRY	☐	☐

Alterações Renais. Data:	Não	Sim
Microalbuminúria	_____	
Na Urinário	_____	
IR	☐	☐
Hemodiálise	☐	☐