



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**CASSIANO AUGUSTO BRAGA SILVA**

**Avaliação da efetividade de um método alternativo para  
rastreamento da doença de Fabry entre a população  
feminina portadora de doença renal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Modelli de Andrade

**Botucatu  
2023**

CASSIANO AUGUSTO BRAGA SILVA

**Avaliação da efetividade de um método alternativo  
para rastreamento da doença de Fabry entre a  
população feminina portadora de doença renal**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutor em Fisiopatologia em Clínica  
Médica.

Orientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Modelli de Andrade

Botucatu  
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Silva, Cassiano Augusto Braga.

Avaliação da efetividade de um método alternativo para rastreamento da doença de Fabry entre a população feminina portadora de doença renal / Cassiano Augusto Braga Silva. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luis Gustavo Modelli de Andrade

Capes: 40101002

1. Doença de Fabry. 2. Insuficiência renal crônica.  
3. Enzimas. 4. Marcadores bioquímicos. 5. Programas de Rastreamento.

Palavras-chave: Doença de Fabry; Doença renal crônica; Enzima  $\alpha$ -GAL; Lyso-GL3; Rastreamento.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE CASSIANO AUGUSTO BRAGA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 08 dias do mês de dezembro do ano de 2023, às 10:00 horas, no(a) Sala 2 de Reuniões do Prédio da Administração da FMB/Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de CASSIANO AUGUSTO BRAGA SILVA, intitulada **Avaliação da efetividade de um método alternativo para rastreamento da doença de Fabry entre a população feminina portadora de doença renal**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIS GUSTAVO MODELLI DE ANDRADE (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. OSVALDO MEREGE VIEIRA NETO (Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Ribeirão Preto - Usp, Profa. Dra. MARIA HELENA VAISBICH GUIMARÃES (Participação Virtual) do(a) Instituto da Criança / HC/FM/São Paulo - Usp, Profa. Dra. MARLENE ANTONIA DOS REIS (Participação Virtual) do(a) Setor de Patologia Geral / Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LUIS GUSTAVO MODELLI DE ANDRADE



*Dedico este trabalho a todas as pessoas que direta ou indiretamente fazem ou fizeram parte de minha vida.*

*Em especial, à minha esposa Lillian, companheira e cúmplice de todas as horas, aos meus filhos Lucca e Pedro (em breve entre nós), meus maiores professores, e aos meus pais, os maiores incentivadores e meus grandes exemplos.*

*A todos acima, o meu eterno amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Luis Gustavo Modelli de Andrade, pela parceria verdadeira, e por acreditar desde o início na realização desse trabalho.

Aos colegas médicos das clínicas participantes.

A todas as pacientes que fizeram parte deste estudo.

À Sanofi, pelo financiamento dos exames.

Aos professores da pós-graduação da Universidade Estadual Paulista, que fizeram de meu Doutorado uma etapa muito enriquecedora.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Merege Vieira Neto, grande amigo e exemplo, e o maior responsável pela minha formação na Nefrologia.

À Profa. Dra. Maria Helena Vaisbich, grande incentivadora, e eterna companheira no COMDORA, e quem eu aprendi a admirar pelo entusiasmo e dedicação para com todos.

À Profa. Dra. Marlene Antônia dos Reis, pelo carinho de sempre, e por fazer parte de mais essa etapa importante de minha vida profissional.

Aos diretores, amigos e colegas da Clínica Senhor do Bonfim, pelo incentivo, pela confiança e pelo apoio.

Ao Prof. Dr. José Andrade Moura Junior, amigo. com quem eu muito aprendi, e a quem eu devo minha entrada na vida da pós-graduação.

A todos os meus amigos de jornada.

A Deus, por estar comigo sempre.

*"A dor é passageira, o orgulho é para sempre."*

*"Orar como se tudo dependesse de Deus, e agir  
como se tudo dependesse de mim."*

*Autores desconhecidos.*

## **IMPACTO ESPERADO**

Esse trabalho aborda uma forma alternativa de rastreamento da doença de Fabry em mulheres utilizando-se da associação da atividade da enzima  $\alpha$ -GAL com a dosagem plasmática de lyso-GL3.

Frente ao grande número de pacientes que evoluem para doença renal crônica sem etiologia corretamente determinada e ao subdiagnóstico da doença de Fabry entre mulheres, o impacto esperado desse estudo envolve um método de rastreamento mais assertivo, mais barato e menos subjetivo, facilitando o diagnóstico dessa enfermidade dentre as consideradas populações de risco.

## **EXPECTED IMPACT**

This work addresses an alternative way of screening Fabry disease in women using the association of  $\alpha$ -GAL enzyme activity with plasma lyso-GL3 dosage.

Given the large number of patients who progress to chronic kidney disease without a correctly determined etiology and the underdiagnosis of Fabry disease among women, the expected impact of this study involves a more assertive, cheaper, and less subjective screening method, facilitating the diagnosis of the disease among at-risk populations.

## RESUMO

### **Avaliação da efetividade de um método alternativo para rastreamento da doença de Fabry na população feminina com doença renal**

**Introdução:** A doença de Fabry (DF) é uma enfermidade rara de armazenamento lisossômico ligada ao cromossomo X que pode afetar múltiplos órgãos, incluindo os rins. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da combinação da atividade da enzima  $\alpha$ -GAL e dos níveis plasmáticos de lyso-GL3 para triagem de DF em mulheres com doença renal crônica (DRC).

**Materiais e Métodos:** Mulheres com DRC em tratamento conservador, estágios 3 a 5, ou em diálise, estágio 5D, foram selecionadas em centros renais de todas as regiões do Brasil. Critérios de exclusão: menores de 18 anos e diagnóstico conhecido de DF. As pacientes foram submetidas à análise bioquímica da atividade da enzima  $\alpha$ -GAL e dos níveis plasmáticos de lyso-GL3. Foi realizado o sequenciamento do gene GLA quando a atividade da enzima  $\alpha$ -GAL se apresentou abaixo e/ou os níveis de lyso-GL3 se mostraram acima dos seus respectivos intervalos de referência. Análises de sensibilidade e especificidade foram realizadas para avaliar o desempenho dessa abordagem bioquímica combinada para o diagnóstico de DF.

**Resultados:** De outubro de 2020 a abril de 2023 foram realizadas 1.874 coletas. Baixa atividade de  $\alpha$ -GAL foi encontrada em 65 (3.5%) dos casos e aumento de lyso-GL3 foi encontrado em 68 (3.6%) dos casos. A idade mediana foi de 54 [42 – 65] anos. Todos os casos de  $\alpha$ -GAL baixa e/ou lyso-GL3 aumentado foram submetidos à análise genética, sendo encontrados 7 casos com variantes positivas para a DF, o que representa 0,37% do total de casos avaliados. 6 pacientes apresentam variantes de significado incerto (VUS), sendo 4 casos de R118C, 1 caso de A143T e outro com T430G. Apenas 1 paciente foi identificada como portadora de variante patogênica, I319T, sendo justamente o único caso diagnosticado com ambos os exames alterados. Das outras 6 pacientes portadoras de variantes para a DF, 5 foram identificadas através da baixa atividade enzimática e 1 através do lyso-GL3 aumentado. A melhor relação entre sensibilidade e especificidade foi obtida com a dosagem isolada de  $\alpha$ -GAL. Quando ambos os exames foram alterados, os valores preditivos positivo e negativo foram melhores, porém a sensibilidade foi baixa.

**Conclusão:** Os resultados apresentados sugerem que a combinação desses biomarcadores parece ser uma abordagem efetiva para o diagnóstico da DF. Além disso, a prevalência de variantes alteradas foi relevante, atestando a importância do rastreamento da DF nessa população de risco.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the effectiveness of an alternative method for screening Fabry disease in the female population with kidney disease**

**Introduction:** Fabry disease (FD) is a rare X-linked lysosomal storage disease that can affect multiple organs, including the kidneys. The main objective of this study was to evaluate the effectiveness of combining  $\alpha$ -GAL enzyme activity and plasma lyso-GL3 levels to screen for FD in women with chronic kidney disease (CKD).

**Materials and Methods:** Women with CKD undergoing conservative treatment, stages 3 to 5, or on dialysis, stage 5D, were selected from renal centers in all regions of Brazil. Exclusion criteria: under 18 years of age and known diagnosis of FD. The patients underwent biochemical analysis of the  $\alpha$ -GAL enzyme activity and plasma lyso-GL3 levels. Sequencing of the GLA gene was performed when the activity of the  $\alpha$ -GAL enzyme was below and/or the levels of lyso-GL3 were above their respective reference ranges. Sensitivity and specificity analyzes were performed to evaluate the performance of this combined biochemical approach for diagnosing FD.

**Results:** From October 2020 to April 2023, 1,874 collections were carried out. Low  $\alpha$ -GAL activity was found in 65 (3.5%) of cases and increased lyso-GL3 was found in 68 (3.6%) of cases. The median age was 54 [42 – 65] years. All cases of low  $\alpha$ -GAL and/or increased lyso-GL3 were subjected to genetic analysis, and 7 cases were found with positive variants for DF, which represents 0.37% of the total cases evaluated. 6 patients have variants of uncertain significance (VUS), 4 cases of R118C, 1 case of A143T and another with T430G. Only 1 patient was identified as carrying the pathogenic variant, I319T, being precisely the only case diagnosed with both tests altered. Of the other 6 patients carrying FD variants, 5 were identified through low enzymatic activity and 1 through increased lyso-GL3. The best relationship between sensitivity and specificity was obtained with the isolated measurement of  $\alpha$ -GAL. When both tests were changed, the positive and negative predictive values were better, but sensitivity was low.

**Conclusion:** The results presented suggest that the combination of these biomarkers appears to be an effective approach for diagnosing FD. Furthermore, the prevalence of altered variants was relevant, attesting to the importance of screening for FD in this at-risk population.

## SUMÁRIO

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                        | 16 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....             | 18 |
| 3. OBJETIVOS DO ESTUDO .....              | 23 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....              | 24 |
| 4.1. TIPO DE ESTUDO .....                 | 24 |
| 4.2. PARTICIPANTES DO ESTUDO.....         | 24 |
| 4.3. DOSAGENS BIOQUÍMICAS .....           | 24 |
| 4.4. ANÁLISE GENÉTICA.....                | 25 |
| 4.5. VARIÁVEIS ANALISADAS.....            | 26 |
| 4.6. ANÁLISES DE ACURÁCIA E GRUPOS .....  | 26 |
| 4.7. DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE FABRY ..... | 26 |
| 4.8. CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL.....     | 27 |
| 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....            | 27 |
| 4.10. FINANCIAMENTO.....                  | 28 |
| 5. RESULTADOS .....                       | 30 |
| 6. DISCUSSÃO.....                         | 43 |
| 7. CONCLUSÃO .....                        | 47 |
| 8. REFERÊNCIAS .....                      | 48 |
| 9. ANEXOS.....                            | 54 |

## SUMÁRIO DE FIGURAS

1. Figura 01. Delineamento do estudo em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....28
2. Figura 02. Distribuição das dosagens de  $\alpha$ -GAL (histograma de frequência) em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....30
3. Figura 03. Distribuição das dosagens de lyso-GL3 (histograma de frequência) em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....31
4. Figura 04. Combinação entre dosagem de  $\alpha$ -GAL, lyso-GL3 e diagnóstico de DF em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF. ....34
5. Figura 05. Relação entre dosagem de  $\alpha$ -GAL, lyso-GL3 e presença de DF em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....35

## SUMÁRIO DE TABELAS

1. Tabela 01. Análise global dos resultados em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....29
2. Tabela 02. Métricas de acurácia em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.32
3. Tabela 03. Matriz de confusão mostrando a combinação entre predito e observado em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....33
4. Tabela 04. Comparação entre os pacientes com e sem DF em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....36
5. Tabela 05. Descrição das variantes genéticas encontradas em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. ....37

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AVE: acidente vascular encefálico

DBS: dried blood spot

DF: doença de Fabry

DM: diabetes mellitus

DRC: doença renal crônica

DRPAD: doença renal policística autossômica dominante

GL3: globotriaosilceramida

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HD: hemodiálise

HVE: hipertrofia ventricular esquerda concêntrica

IAM: infarto agudo do miocárdio

Lyso-GL3: globotriaosilesfingosina

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MS: Ministério da Saúde

NGS: sequenciamento de nova geração

RNM: ressonância nuclear magnética

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TFG: taxa de filtração glomerular

TRE: terapia de reposição enzimática

TRS: terapia renal substitutiva

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo

VR: valor de referência

VUS: variante de significado incerto

$\alpha$ -GAL:  $\alpha$ -galactosidase A

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Fabry (DF) é classificada dentro do espectro das enfermidades raras, sendo caracterizada como uma doença de depósito lisossômico com padrão de herança ligada ao cromossomo X. É causada por variantes do gene *GLA*, que é o responsável por codificar a enzima lisossomal  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GAL). A atividade marcadamente reduzida ou ausente da enzima resulta no acúmulo sistêmico e progressivo de glicoesfingolipídios, sendo os principais globotriaosilceramida (GL3) e seu metabólito globotriaosilinosina (lyso-GL3). O envolvimento dos órgãos alvo pode levar a consequências graves e precoces associadas principalmente a complicações renais, cardíacas e cerebrovasculares.(1-3)

A prevalência estimada da DF é de aproximadamente 1:40.000 a 1:117.000 homens.(1,4) Muitos estudos abordam a prevalência naquelas populações consideradas de alto risco para a doença. Para pacientes em diálise, a prevalência varia de 0,20% a 0,99% em homens e 0,05% a 0,33% em mulheres.(5-9) Entre os cardiopatas, a prevalência varia de 0,21% a 2,99% em homens e 0,28% para 1,68% nas mulheres.(10-15) Para indivíduos com doença cerebrovascular, incluindo acidente vascular encefálico (AVE), a prevalência varia de 0,17% a 2,3% em homens e de 2,5% a 4,7% em mulheres.(16-20)

Em um estudo publicado recentemente utilizando-se de trabalhos de rastreamento das populações de risco, após uma reanálise das variantes, foram encontradas prevalências da DF entre a população em hemodiálise (HD) de 0,15% entre mulheres e 0,21% em homens. De acordo com essa mesma publicação, a prevalência absoluta entre pacientes em HD foi de 1 para cada 667 e 476, respectivamente em mulheres e homens.(21) Frente aos dados apresentados e ao crescente número de pacientes em diálise ao redor do mundo, fica clara a necessidade de rastreamento contínuo nessa população.

Nesse mesmo contexto, outro ponto que justifica a necessidade de se buscar a etiologia de base dos pacientes que evoluem para a DRC (doença renal crônica) é justamente o grande número de pacientes incidentes em TRS (terapia renal substitutiva) sem um diagnóstico de base bem caracterizado. No Brasil, tomando como base os dados do último censo nacional publicado, aproximadamente 11% dos pacientes adentram em diálise com diagnóstico indeterminado. Somado a isso, muitos pacientes podem ter uma definição errônea da etiologia, como por exemplo nos casos de nefropatia hipertensiva secundária e naqueles casos classificados como glomerulopatia crônica, muitas vezes sem a realização da biópsia renal.(22) Dados ao redor do mundo relatam números similares aos do Brasil. Na Europa, dados oficiais mostram que 27% dentre os pacientes em TRS não tem um diagnóstico de base definido. Nos EUA, 22% dos

pacientes pediátricos e 18% dos pacientes adultos iniciam diálise sem um diagnóstico etiológico de certeza.(23)

Em um primeiro momento, podem surgir dúvidas sobre os benefícios de se identificar a DF em pacientes com acometimento grave, como por exemplo, aqueles já em programa de diálise, visto a enorme possibilidade do acometimento severo de outros órgãos além dos rins, não só pela DF, mas pela própria DRC. No entanto, a importância dos estudos de rastreamento passa por permitir a identificação, a partir dos pacientes índice, de outros familiares muitas vezes com menor idade e em estágios mais leves da doença, população em que se mostram os melhores resultados a longo prazo do tratamento se instalados precocemente. Nesse contexto, a triagem para DF em populações de alto risco parece ser a melhor estratégia custo-efetiva para diagnosticar novos casos e intervir nos estágios iniciais da doença.(24,25)

Embora classificada como rara, a DF acarreta grande vulnerabilidade dos indivíduos acometidos devido ao elevado índice de complicações e de comorbidades graves, que podem ser minimizados ou até evitados caso se vislumbre o diagnóstico e tratamento precoces.(26)

Frente à necessidade de maior assistência aos pacientes portadores de doenças raras, o Ministério da Saúde (MS) em sua portaria nº 199 de 30 de janeiro de 2014, instituiu a política nacional de atenção integral às pessoas com doenças raras no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), tendo como objetivos reduzir a mortalidade, contribuir para a redução da morbimortalidade e das manifestações secundárias, e melhorar a qualidade de vida das pessoas, por meio de ações de promoção, prevenção, detecção precoce, tratamento oportuno e redução de incapacidade.(27)

O presente estudo visa avaliar a efetividade de uma forma alternativa de rastreamento da DF em mulheres dentre pacientes portadoras de DRC em tratamento conservador ou em programa de diálise, utilizando-se da combinação da análise da atividade enzimática da  $\alpha$ -GAL com a dosagem plasmática de lyso-GL3. O objetivo inclui também avaliar se a realização conjunta desses dois exames aumenta a detecção diagnóstica da DF no sexo feminino.

Também é motivo de destaque que o desenvolvimento e validação de instrumentos de aferição de saúde constam como tópico da seção de desenvolvimento conceitual e metodológico da Epidemiologia, assim como dos estudos sobre saúde e qualidade de vida da agenda de prioridades de pesquisa em Saúde do MS em seu tópico desenvolvimento de tecnologias e inovação em saúde da agenda 2018.(28)

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Embora já estejam descritas mais de 1.100 variantes diferentes do gene *GLA*, nem todas elas resultam em DF, sendo muitas consideradas benignas ou polimorfismos sem implicações clínicas.(2,29)

Cada variante tende a ser específica para cada família, o que justifica parcialmente a acentuada variabilidade na atividade enzimática residual e, conseqüentemente, a diferença no quadro clínico.(3,30,31)

Duas apresentações clínicas são descritas. Pacientes com fenótipo clássico podem ter seus primeiros sintomas durante a infância ou adolescência. As manifestações iniciais são acroparestesias, crises de dor intensa conhecidas como ‘crises de Fabry’ e sintomas gastrointestinais. Outros sintomas podem aparecer mais tarde, como resultado da progressão dos depósitos sistêmicos. Os angioqueratomas são descritos como lesões dermatológicas vermelho escuras, papulosas e não pruriginosas. O envolvimento das glândulas sudoríparas pode levar à hipoidrose ou anidrose, que causa grande intolerância às mudanças de temperatura. A córnea verticillata é a principal alteração oftalmológica da DF e tem como causa os depósitos de GL3 na córnea, porém sem comprometimento da acuidade visual. É um achado não patognomônico da DF, estando relacionada também ao uso de medicamentos que agem inibindo diretamente a ação da enzima  $\alpha$ -GAL, tais como amiodarona, cloroquina, ibuprofeno, entre outros. Por sua vez, a perda auditiva é um achado comum. O déficit cognitivo pode ocorrer como resultado de múltiplos microinfartos cerebrais.(1,32)

Com o aumento da idade e a progressão dos depósitos de GL3, a DF causa lesões em órgãos-alvo, que podem culminar por volta da quarta década de vida em insuficiência cardíaca, AVE e DRC. Esses fatores combinados reduzem a expectativa de vida em uma média de 25 anos para os homens e 10 anos para as mulheres.(33)

A outra forma de apresentação clínica envolve as variantes com o fenótipo de início tardio, no qual os sinais e sintomas clássicos estão ausentes ou aparecem de forma mais branda. Estão descritas as variantes cardíaca e renal, pois apresentam acometimento mais proeminente no coração e nos rins, respectivamente.(32,34) Nesse caso, a evolução mais grave dos órgãos alvo ocorre mais tardiamente, por volta da quinta década de vida.

O envolvimento cardíaco se manifesta mais comumente por meio de hipertrofia ventricular esquerda concêntrica (HVE), e pode se apresentar também como diagnóstico diferencial de arritmias, cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva ou cardiomegalia idiopática.(33)

O acometimento renal se dá pelo acúmulo de GL3 em todos os tipos de células renais.(35-37) As manifestações glomerulares são as mais frequentes e são semelhantes às da

nefropatia diabética, com hiperfiltração nos estágios iniciais, albuminúria, proteinúria e diminuição progressiva da taxa de filtração glomerular (TFG).(36) A evolução para DRC terminal torna-se evidente por volta dos 40 aos 50 anos de idade, levando à necessidade de TRS.(32,38)

Cabe aqui detalhar a classificação da DRC em estágios, que são baseados na TFG, medida em mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Estágio 01 equivale a função renal normal (TFG  $\geq$  90). Estágio 02 representa um leve decréscimo na TFG (60-89). Estágio 03a representa uma queda leve a moderada da TFG (45-59). Estágio 03b equivale a um decréscimo moderado a severo da TFG (30-44). Estágio 04 define uma severa queda da TFG (15-29). Já o estágio 05 representa a falência renal (TFG < 15), e quando o paciente se encontra em diálise, é classificado como estágio 05D.(39)

O espectro da apresentação clínica em mulheres é amplo. A heterogeneidade fenotípica se deve, em parte, ao fenômeno de lionização, responsável pela inativação aleatória do cromossomo X. A atividade enzimática residual é consequentemente bastante variável. Embora algumas mulheres manifestem uma apresentação clínica clássica, outras podem ser assintomáticas, sendo que geralmente apresentam sinais e sintomas mais leves, com evolução mais lenta.(40,41) São descritos casos raros de mulheres homozigotas, com quadro clínico semelhante ao fenótipo clássico masculino.(42) Embora a DF seja potencialmente detectada em um número maior de mulheres por estar ligada ao cromossomo X, um estudo revelou que 88% dos pacientes com DF que iniciaram diálise eram do sexo masculino, sugerindo uma característica clínica mais insidiosa nas mulheres.(43)

Quanto ao diagnóstico da doença, a primeira etapa visa estabelecer a atividade da enzima  $\alpha$ -GAL. O fenótipo clássico é encontrado em homens com menos de 1% da atividade enzimática e é causado por diferentes tipos de rearranjos, defeitos de splicing e variantes sem sentido. Por outro lado, indivíduos do sexo masculino com mais de 1% de atividade enzimática podem ter variantes missense ou splicing e mostrar um fenótipo de 'início tardio'.(1,2) Em mulheres, mesmo naquelas sintomáticas, a atividade enzimática pode estar dentro da faixa normal. Aproximadamente 33 a 50% das heterozigotas com alguma variante do gene *GLA* apresentam atividade da  $\alpha$ -GAL normal ou apenas ligeiramente diminuída.(44,45) Isso se deve ao fato de que o gene defeituoso pode ser compensado por uma cópia funcional do gene equivalente no outro cromossomo X. Por esse motivo, esse teste não é suficiente para diagnóstico em mulheres.(44,45)

O teste confirmatório é a análise genética. É reservado para mulheres com suspeita clínica ou laboratorial e para homens com baixa atividade enzimática.(46,47) Recomenda-se que os familiares dos pacientes índice sejam submetidos diretamente à análise genética. O

heredograma familiar é de grande valor, pois permite o diagnóstico de pacientes em estágios iniciais da doença. Em média, para cada paciente índice, mais cinco familiares são diagnosticados; entretanto, em alguns estudos esse número é muito maior.(26,48)

Em relação ao tratamento da DF, antes do advento da terapia de reposição enzimática (TRE) que mudou a evolução natural da doença, a abordagem visava apenas medidas de suporte para minimizar os sintomas mais proeminentes. Mudanças no estilo de vida continuam sendo recomendadas juntamente com outras medidas que consistem em medicamentos que podem retardar o envolvimento de órgãos-alvo, como inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores dos receptores da angiotensina II, que, além de otimizar o controle da pressão arterial diminui a proteinúria e a progressão da doença renal.(2,3,49)

O tratamento específico para DF é realizado com TRE ou migalastat. Atualmente, existem duas enzimas disponíveis: agalsidase alfa (Replagal®) e agalsidase beta (Fabrazyme®).(50,51) Ambas as proteínas são estrutural e funcionalmente semelhantes e são administradas por via intravenosa a cada 15 dias. Já o migalastat (Galafold®), é um medicamento pertencente à classe das chaperonas, que podem ser usados apenas em pacientes portadores de variantes ‘amenable’, que são responsivas à droga. Atua ligando-se seletiva e reversivelmente às formas mutantes  $\alpha$ -GAL, o que facilita seu transporte adequado para os lisossomos, onde ocorre a dissociação dessa ligação, resultando em aumento da função enzimática. É administrado por via oral, com boa distribuição tecidual e, ao contrário da TRE, atravessa a barreira hematoencefálica.(52-55)

O objetivo do tratamento específico para a DF é reverter ou ao menos estabilizar as alterações patológicas já estabelecidas, e prevenir o acometimento dos órgãos alvo, evitando com isso a disfunção progressiva que pode culminar com sequelas graves, irreversíveis e incapacitantes.(2,3,56)

Baseado nas definições acima, o estabelecimento do diagnóstico da DF é um desafio em pacientes do sexo feminino devido à manifestação clínica mais branda e à atividade muitas vezes normal da enzima  $\alpha$ -GAL. Nesse sentido, a dosagem do lyso-GL3 é descrita como um biomarcador diagnóstico mais sensível entre as mulheres.

Nesse contexto, um estudo europeu utilizou uma estratégia diferente para o rastreamento da DF em mulheres, analisando em conjunto a atividade enzimática de  $\alpha$ -GAL com a dosagem plasmática de lyso-GL3. No total foram avaliadas 11.948 mulheres com suspeita da DF, porém sem especificar claramente em que população tal estratégia foi adotada. Como resultado, foi evidenciada uma melhora substancial na detecção diagnóstica em comparação com a atividade enzimática isolada. Os valores anormais para ambos os marcadores eram altamente suspeitos de DF (97% de valor preditivo positivo [VPP], semelhante ao VPP encontrado em homens).

Em casos com um valor bioquímico anormal, a lyso-GL3 elevada foi um indicador muito mais importante do que a baixa atividade enzimática (39% VPP versus 6% VPP). Casos com resultados dentro dos valores de normalidade se mostraram improváveis de se detectar a DF, mesmo nas situações com alta suspeita clínica. O objetivo foi evidenciar o benefício de adicionar lyso-GL3 ao teste de diagnóstico primário, não apenas para melhorar a taxa de detecção de mulheres com DF, mas para evitar testes genéticos desnecessários, que muitas vezes levam à identificação de variantes benignas, sem importância clínica. Na mesma amostra, aproximadamente 60% das mulheres portadoras de DF não seriam identificadas caso fosse utilizada apenas a medição da atividade da enzima  $\alpha$ -GAL.(46)

Cabe aqui salientar que a análise genética será sempre obrigatória para confirmar ou excluir a DF em qualquer paciente que apresente resultados bioquímicos alterados.

Em outro estudo disponível sobre o mesmo tema, foi utilizado a razão entre  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3 como um novo critério bioquímico objetivando melhorar a eficiência diagnóstica da DF entre mulheres. Foi evidenciado 100% de sensibilidade na distinção das pacientes com DF em comparação com o grupo controle, enquanto a atividade da enzima  $\alpha$ -GAL e a dosagem plasmática de lyso-GL3 isoladamente mostraram sensibilidade de 8,6% e 74,4%, respectivamente.(57)

Em busca de informações financeiras relacionadas aos custos dos exames envolvidos com o diagnóstico da DF, foram feitas consultas formais ao laboratório DLE, que faz parte do grupo Hermes Pardini S/A, um dos maiores grupos de medicina diagnóstica do Brasil, com sedes em São Paulo - SP e Rio de Janeiro - RJ. Confirmamos que a análise genética ainda é um exame de elevado custo, sendo aproximadamente 30% mais caro em comparação com os valores envolvidos na avaliação conjunta da atividade enzimática da  $\alpha$ -GAL com a dosagem de lyso-GL3.

Outro ponto que merece destaque é a questão da subjetividade envolvida em muitos casos de rastreamento da DF em mulheres. Nas pacientes das consideradas populações de risco, com o intuito de se evitar com que todas as pacientes se submetam à análise genética, é possível uma triagem inicial utilizando-se de dados clínicos, familiares, laboratoriais e radiológicos. No entanto, as informações referentes a dados familiares ou sintomas prévios nem sempre são reportados com exatidão, e exames laboratoriais e de imagem de qualidade duvidosa infelizmente ainda fazem parte do cotidiano de muitas localidades. Com isso, encontrar um método de rastreamento que seja mais assertivo, mais barato e menos subjetivo é de extrema importância para o diagnóstico da DF.

Baseado no exposto acima, o objetivo do presente estudo é a avaliação da efetividade de uma forma alternativa de rastreamento da DF em mulheres utilizando-se da associação da atividade da enzima  $\alpha$ -GAL com a dosagem plasmática de lyso-GL3.

### **3. OBJETIVOS DO ESTUDO**

#### **PRIMÁRIO:**

Avaliar a efetividade de um método de rastreamento da DF em pacientes do sexo feminino com DRC, em tratamento conservador, estágios 3 a 5, ou que já estejam em diálise, estágio 5D, que combina a dosagem da atividade enzimática  $\alpha$ -GAL com a dosagem dos níveis plasmáticos de lyso-GL3.

#### **SECUNDÁRIO:**

Estimar a prevalência de DF entre pacientes do sexo feminino com DRC no Brasil.

Avaliar as características clínicas e demográficas das pacientes diagnosticadas com DF nesse estudo.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. TIPO DE ESTUDO**

Estudo transversal colaborativo multicêntrico para avaliar a sensibilidade e especificidade da combinação de dois exames (dosagem da atividade da enzima  $\alpha$ -GAL e dosagem de lyso-GL3) para o diagnóstico definitivo da DF em pacientes do sexo feminino. Foram convidados a participar do estudo 30 centros brasileiros de TRS em todas as regiões geográficas do Brasil (Amazonas, Bahia, Goiás, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo), sendo que todos aceitaram voluntariamente a entrar no estudo. O convite para participar do estudo foi realizado através do grupo de estudos de Fabry que se reúne mensalmente no Brasil. Este grupo constituído por nefrologistas experientes em rastreio da DF foi convidado a participar deste projeto denominado estudo PETRA. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (CAAE: 53348721.0.0000.5411).

### **4.2. PARTICIPANTES DO ESTUDO**

Pacientes do sexo feminino, portadoras de DRC em tratamento conservador ou em programa regular de diálise, provenientes de diferentes serviços de nefrologia do Brasil, obedecidos os critérios de inclusão.

Critérios de inclusão: mulheres com DRC estágios 3 a 5, ou 5D em diálise, que aceitaram voluntariamente assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critério de exclusão: menores de 18 anos, pacientes com diagnóstico de DF já conhecido, e aquelas que não aceitaram assinar o TCLE.

### **4.3. DOSAGENS BIOQUÍMICAS**

Foram coletadas amostras de sangue por punção capilar através de lanceta. Após isso, o sangue foi pingado em papel filtro - método DBS (dried blood spot) devidamente identificado para cada paciente. Após correta secagem das amostras em ar ambiente, os kits foram lacrados e enviados em compartimentos individuais, devidamente identificados para o laboratório DLE, localizado na cidade de São Paulo – SP.

A atividade enzimática da  $\alpha$ -GAL foi realizada por ensaio de Cromatografia Líquida / Espectrometria de Massas em Tandem (LC-MS/MS). Os valores de referência (VR) foram considerados normais para adultos como superiores ou iguais a 1,68 mcmol/L/h.

A dosagem do lyso-GL3 foi realizado pelo método da Espectrometria de massa. O VR considerado normal foi de até 2 ng/mL, com limite de detecção de 0,2 ng/mL.

#### **4.4. ANÁLISE GENÉTICA**

Foi realizado o sequenciamento do gene *GLA* em busca de variantes relacionadas à DF nos casos em que:

1. A dosagem da atividade enzimática foi abaixo do VR e/ou
2. A dosagem de lyso-GL3 foi acima do VR.

Neste caso, as amostras foram processadas para a análise molecular em busca de variantes da DF pelo método de sequenciamento de nova geração (NGS). Em caso de resultado negativo foi realizado o teste da análise de deleções e duplicações no gene *GLA* pelo método Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

##### **4.4.1. MÉTODO PARA REALIZAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DO DNA**

O DNA foi extraído de forma automatizada pelo equipamento QIA symphony (QIAGEN), sendo posteriormente fragmentado e submetido a captura com a utilização de sondas customizadas e kit de preparo de biblioteca XTHS (Agilent).

O NGS foi realizado na plataforma NovaSeq 6000 (illumina). As sequências geradas foram alinhadas contra o genoma de referência GRCh37 / Hg19 e processadas em pipeline desenvolvido para chamada de variantes de nucleotídeo único (SNV) e pequenas inserções e deleções (indels) com cobertura mínima de 20 fragmentos superior a 98%.

A classificação das variantes obedece às diretrizes do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica - (ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics), sendo classificados como: patogênica, provavelmente patogênica (probabilidade maior que 90% de ser patogênica), de significado incerto (VUS, do inglês Variant of Unknown Significance), provavelmente benigna (probabilidade maior que 90% de ser benigna) e benigna.(58)

A nomenclatura segue as recomendações atualizadas da Sociedade de Variação do Genoma Humano (HGVS: Human Genome Variation Society).(59)

No presente trabalho, não foram reportadas variantes benignas e provavelmente benignas.

Nos casos de teste molecular NGS negativo foram realizadas análise de MLPA.

Extração de DNA, seguida de amplificação (PCR) pela técnica de MLPA para detecção de deleções e duplicações no gene *GLA*. A sensibilidade analítica para este teste foi superior a 99% em casos de detecção de deleções e duplicações no gene *GLA*.

#### **4.5. VARIÁVEIS ANALISADAS**

Foram analisados dados demográficos, dosagem da atividade da  $\alpha$ -GAL e do lyso-GL3. Para os casos de suspeita de DF, com genética positiva, foram levantados dados adicionais tais como história clínica e exames complementares.

#### **4.6. ANÁLISES DE ACURÁCIA E GRUPOS**

Para a avaliação da acurácia dos métodos em diagnosticar DF foram formados três grupos:

Grupo  $\alpha$ -GAL: pacientes com dosagem de  $\alpha$ -GAL abaixo do VR (1,68 mcmol/L/h).

Grupo lyso-GL3: pacientes com dosagem de lyso-GL3 acima do VR (2 ng/mL).

Grupo com ambos os exames alterados: pacientes com dosagem de  $\alpha$ -GAL abaixo do VR e com dosagem de lyso-GL3 acima do VR.

Os pacientes com DF foram aquelas com variantes genéticas patogênicas ou possivelmente patogênicas identificadas no sequenciamento do *GLA*. Nesse trabalho, todos os casos de VUS também foram considerados como pacientes com DF por inicialmente não conseguirmos definir com exatidão a respeito da patogenicidade dessas variantes.(57)

#### **4.7. DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE FABRY**

Os critérios para um diagnóstico definitivo da DF incluem a presença de variante no gene *GLA* combinado com pelo menos um sintoma específico (dor neuropática, córnea verticillata, angioqueratoma) e/ou aumento de lyso-GL3, e/ou um membro da família afetado com o diagnóstico já definido. Dor neuropática foi definida como dor nas mãos e/ou pés com início de dor na infância ou adolescência e/ou curso caracterizado por exacerbações provocadas por febre, exercício ou calor. O angioqueratoma preenche os critérios clínicos caso esteja agrupado e presente em áreas características, tais como o tronco, região conhecida como ‘calção de banho’, lábios e umbigo. A córnea verticillata é determinada por lâmpada de fenda na

ausência de uso de drogas anfifílicas (por exemplo amiodarona e cloroquina). Os critérios acima estão descritos no Consenso Brasileiro da DF.(60)

#### **4.8. CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL**

Estimamos que pelo menos 3.000 participantes deveriam ser incluídos para a triagem. A incidência estimada da DF nesta população é estimada em 0,25%.(21). Assim, estimava-se que 8 pacientes com diagnóstico de DF seriam suficientes para validar o teste.

#### **4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados coletados estão armazenados de forma eletrônica. Os participantes foram identificados apenas pelas suas iniciais e um código de identificação.

As variáveis quantitativas, contínuas ou ordinais, foram descritas por suas medidas de tendência central (médias ou medianas) e pelas respectivas medidas de dispersão (desvio padrão, variação interquartil ou valores mínimo e máximo), enquanto as nominais ou qualitativas por seus valores absolutos, percentagens e proporções. Para comparação das variáveis contínuas, utilizamos o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney. Na comparação dos dados categóricos, utilizamos os testes de Fisher ou do qui-quadrado.

Foi realizada análise de sensibilidade e especificidade para a combinação das análises bioquímicas com os sinais diagnósticos da DF.

Foram utilizados nesta análise:

**Acurácia:** A acurácia é a medida geral de quão bem o seu modelo ou teste classifica corretamente os casos, considerando tanto os verdadeiros positivos quanto os verdadeiros negativos. A fórmula é  $\text{Acurácia} = (\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Verdadeiros Negativos}) / (\text{Total de Amostras})$ .

**Sensibilidade (ou taxa de verdadeiros positivos):** É a proporção de verdadeiros positivos em relação a todos os casos positivos verdadeiros. A fórmula é  $\text{Sensibilidade} = (\text{Verdadeiros Positivos}) / (\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Negativos})$ .

**Especificidade (ou taxa de verdadeiros negativos):** É a proporção de verdadeiros negativos em relação a todos os casos negativos verdadeiros. A fórmula é  $\text{Especificidade} = (\text{Verdadeiros Negativos}) / (\text{Verdadeiros Negativos} + \text{Falsos Positivos})$ .

**Curva ROC (Receiver Operating Characteristic):** A curva ROC é um gráfico que representa a relação entre a sensibilidade e a taxa de falsos positivos (1 - especificidade) para diferentes

valores de limite de classificação. Ela ajuda a visualizar o desempenho de um modelo ou teste diagnóstico.

Recall (ou taxa de verdadeiros positivos): É outra forma de medir a sensibilidade. É a proporção de verdadeiros positivos em relação a todos os casos positivos verdadeiros. A fórmula é  $\text{Recall} = (\text{Verdadeiros Positivos}) / (\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Negativos})$ .

Precisão: É a proporção de verdadeiros positivos em relação a todos os casos classificados como positivos pelo modelo. A fórmula é  $\text{Precisão} = (\text{Verdadeiros Positivos}) / (\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Positivos})$ .

F1-Score: O F1-Score é uma medida que combina precisão e recall em uma única métrica. É especialmente útil quando você deseja equilibrar a importância da precisão e da sensibilidade. A fórmula é  $\text{F1-Score} = 2 * (\text{Precisão} * \text{Recall}) / (\text{Precisão} + \text{Recall})$ .

Acurácia Balanceada: A acurácia balanceada leva em consideração as taxas de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, ponderando igualmente ambas as classes (positiva e negativa). Ela é especialmente útil quando as classes são desequilibradas. A fórmula é  $\text{Acurácia Balanceada} = (\text{Sensibilidade} + \text{Especificidade}) / 2$ .

Valor Preditivo Positivo (VPP): O VPP, também conhecido como precisão positiva, é a proporção de verdadeiros positivos em relação ao número total de casos classificados como positivos pelo modelo. A fórmula é  $\text{VPP} = (\text{Verdadeiros Positivos}) / (\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Positivos})$ .

Valor Preditivo Negativo (VPN): O VPN é a proporção de verdadeiros negativos em relação ao número total de casos classificados como negativos pelo modelo. A fórmula é  $\text{VPN} = (\text{Verdadeiros Negativos}) / (\text{Verdadeiros Negativos} + \text{Falsos Negativos})$ .

Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) são considerados significativos. Nas análises utilizamos o software R.

#### **4.10. FINANCIAMENTO**

Os custos previstos no presente estudo foram subsidiados pelo laboratório SANOFI, através da disponibilização dos kits de coleta das amostras, do envio das amostras por sedex, e da avaliação laboratorial, aqui englobando a avaliação da atividade da enzima  $\alpha$ -GAL, dos níveis plasmáticos de lyso-GL3, e da análise genética em busca de variantes do gene *GLA*.

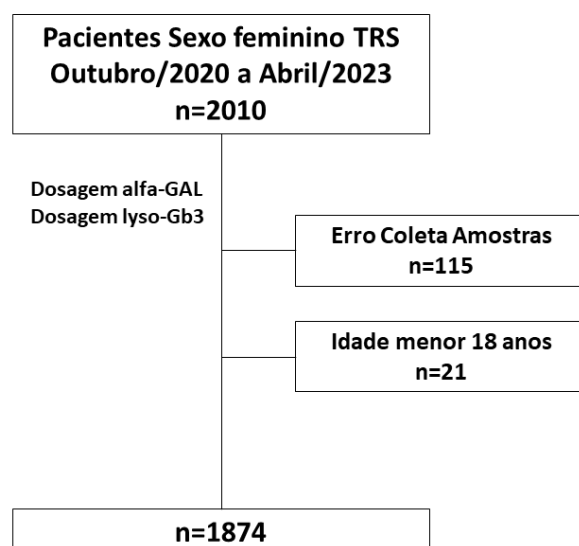
Cabe aqui salientar que a SANOFI não participou e não interferiu em nenhuma etapa desse trabalho, sendo apenas fonte financiadora dos itens citados acima. Outro ponto de destaque é que os respectivos médicos que acompanham as pacientes diagnosticadas com a DF têm e terão

a liberdade e autonomia de decidir sobre o melhor tratamento a ser dispensado em cada caso, sem qualquer tipo de interferência externa.

## 5. RESULTADOS

O período do estudo englobou os meses de outubro de 2020 a abril de 2023. O número total de casos analisados foi de 2.010 pacientes, que foram submetidas à coleta de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. Após a exclusão das mulheres que tiveram erro no processo da coleta das amostras (n=115) e as menores de 18 anos (n=21), resultou numa amostra final de 1.874 pacientes (figura 01).

**Figura 01. Delineamento do estudo em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**



Atividade diminuída da enzima  $\alpha$ -GAL foi encontrada em 65 pacientes (3.5% dos casos), e o número de casos com níveis aumentados de lyso-GL3 foi de 68 pacientes (3.6% dos casos). A idade mediana foi de 54 [42 – 65] anos. Todos os casos com baixa atividade da enzima  $\alpha$ -GAL e/ou lyso-GL3 aumentado foram submetidos à análise genética em busca de variantes para a DF. Desta forma os 68 casos de lyso-GL3 aumentado somados aos 65 casos de  $\alpha$ -GAL reduzida foram submetidos à análise molecular no gene *GLA* (n=132). Cabe aqui explicar que a soma dos números acima (68 casos de lyso-GL3 aumentado com 65 casos de  $\alpha$ -GAL) não totaliza 133 pacientes pois tem uma paciente que apresentou ambos os exames alterados, sendo que ela se encontra dentro dos dois grupos.

Após análise do gene *GLA*, foram identificadas 7 mulheres com variantes para a DF, o que representa 0,37% do total de casos avaliados. A tabela 1 representa um resumo dos casos avaliados.

**Tabela 01. Análise global dos resultados em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**

| <b>Característica</b>                      | <b>n=1874</b>    |
|--------------------------------------------|------------------|
| <b>Idade (anos)</b>                        | 54 (42-65)       |
| <b><math>\alpha</math>-GAL (mcmol/L/h)</b> | 3.54 (2.64-4.67) |
| <b>baixa</b>                               | 65 (3.5%)        |
| <b>normal</b>                              | 1.809 (96.5%)    |
| <b>Lyso-GL3 (ng/mL)</b>                    | 0.80 (0.50-1.40) |
| <b>elevado</b>                             | 68 (3.6%)        |
| <b>normal</b>                              | 1,806 (96.4%)    |
| <b>DF ausente</b>                          | 1.867 (99.6%)    |
| <b>DF presente*</b>                        | 7 (0.4%)         |

$\alpha$ -GAL: valores normais foram superiores ou iguais a 1,68 mcmol/L/h.

Lyso-GL3: até 2 ng/mL.

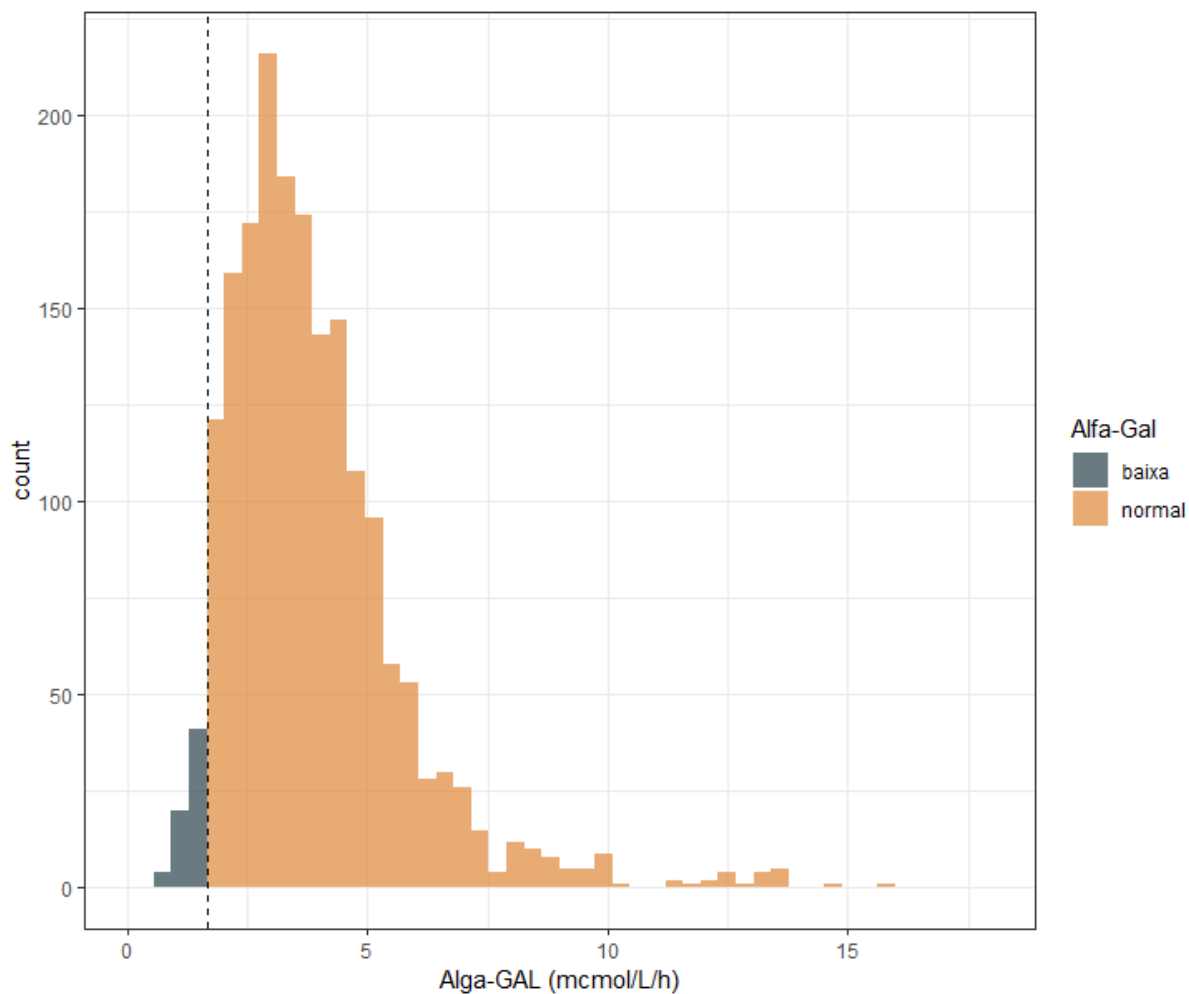
\*Paciente com variantes genéticas encontradas para DF.

Valores expressos em mediana e percentis 25 e 75%; número e percentagem.

DF: doença de Fabry.

Na figura 02 podemos verificar a distribuição das dosagens de  $\alpha$ -GAL, onde a maior parte das concentrações apresenta valores normais (cor laranja). Uma fração menor das pacientes apresentou concentrações reduzidas de  $\alpha$ -GAL (cor cinza).

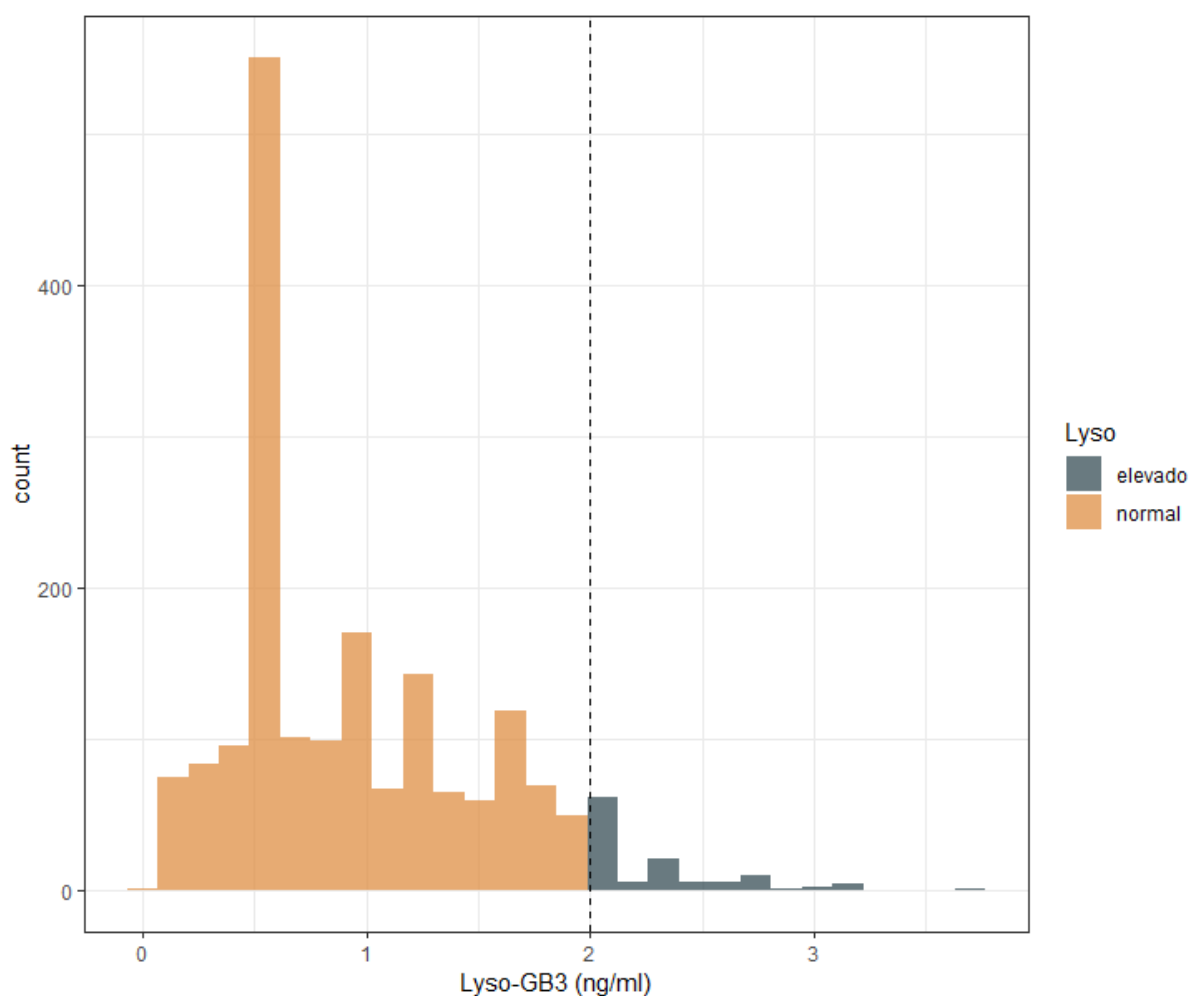
**Figura 02. Distribuição das dosagens de  $\alpha$ -GAL (histograma de frequência) em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**



Eixo x: valores de  $\alpha$ -GAL (valores normais foram superiores ou iguais a 1,68 mcmol/L/h - linha tracejada); eixo y: número de casos.

Quanto às distribuições das dosagens de lyso-GL3, a maioria das pacientes apresentaram concentrações normais (cor laranja). Uma menor percentagem das pacientes apresentou concentrações acima da normalidade (cor cinza).

**Figura 03. Distribuição das dosagens de lyso-GL3 (histograma de frequência) em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**



Eixo x: valores de lyso-GL3 (valores normais foram inferiores a 2 ng/mL - linha tracejada), eixo y: número de casos.

## 5.1. MÉTRICAS DE ACURÁCIA

Analisando as métricas de acurácia temos três grupos:  $\alpha$ -GAL reduzida, lyso-GL3 elevado e ambos alterados ( $\alpha$ -GAL reduzida e lyso-GL3 aumentado). Os valores estão apresentados na tabela 02.

**Tabela 02. Métricas de acurácia em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**

|                      | $\alpha$ -GAL | Lyso-GL3 | Ambos alterados* |
|----------------------|---------------|----------|------------------|
| Accuracy             | 0.968         | 0.962    | 0.997            |
| Kappa                | 0.161         | 0.047    | 0.249            |
| AccuracyLower        | 0.959         | 0.952    | 0.993            |
| AccuracyUpper        | 0.975         | 0.970    | 0.999            |
| AccuracyNull         | 0.996         | 0.996    | 0.996            |
| AccuracyPValue       | 1.000         | 1.000    | 0.449            |
| McnemarPValue        | 0.000         | 0.000    | 0.041            |
| Sensitivity          | 0.857         | 0.286    | 0.143            |
| Specificity          | 0.968         | 0.965    | 1.000            |
| Pos Pred Value       | 0.092         | 0.029    | 1.000            |
| Neg Pred Value       | 0.999         | 0.997    | 0.997            |
| Precision            | 0.092         | 0.029    | 1.000            |
| Recall               | 0.857         | 0.286    | 0.143            |
| F1                   | 0.167         | 0.053    | 0.250            |
| Prevalence           | 0.004         | 0.004    | 0.004            |
| Detection Rate       | 0.003         | 0.001    | 0.001            |
| Detection Prevalence | 0.035         | 0.036    | 0.001            |
| Balanced Accuracy    | 0.913         | 0.625    | 0.571            |

$\alpha$ -GAL: valores normais foram superiores ou iguais a 1,68 mcmol/L/h.

Lyso-GL3: valores normais foram inferiores a 2 ng/mL.

\*Ambos alterados:  $\alpha$ -GAL reduzida e lyso-GL3 elevado.

A baixa atividade da enzima  $\alpha$ -GAL teve maior sensibilidade e especificidade comparadas às demais medidas (lyso-GL3 isolado ou ambos alterados). O VPN da atividade da  $\alpha$ -GAL foi elevado de 99%, porém o VPP foi de 9,2%. Analisando apenas lyso-GL3 elevado, a especificidade foi baixa e o VPP também foi baixo (2,9%), sendo, portanto, considerado inferior à dosagem de  $\alpha$ -GAL. Houve apenas um caso de ambos alterados ( $\alpha$ -GAL reduzida e lyso-GL3 elevado), entretanto o VPP foi de 100%, com VPN de 99,7% sendo considerado o melhor método. Vale ressaltar que apesar de ambos os valores alterados apresentarem melhores

valores de VPP e VPN a sensibilidade foi baixa, sendo a melhor relação entre sensibilidade e especificidade obtida com a dosagem isolada de  $\alpha$ -GAL. A matriz que mostra a combinação entre predito e observado pode ser vista na tabela 3 (matriz de confusão).

**Tabela 03. Matriz de confusão mostrando a combinação entre predito e observado em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**

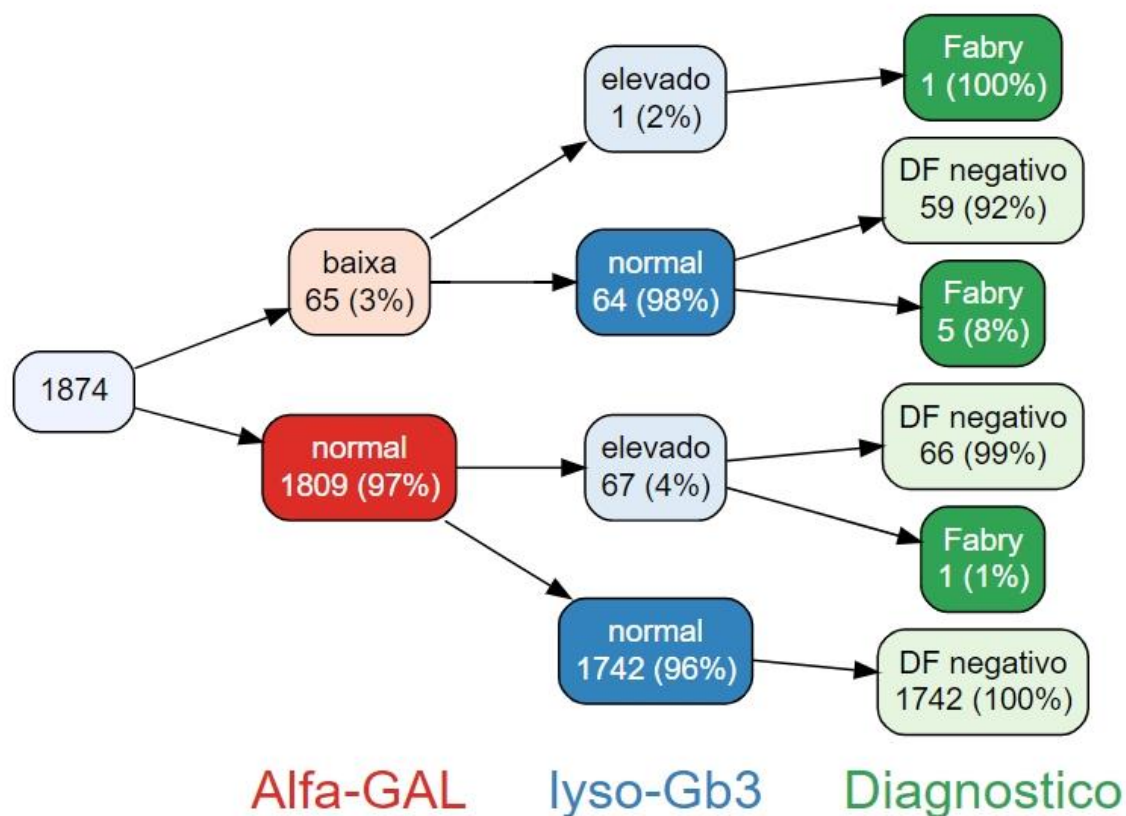
|                                      | DF ausente | DF presente |
|--------------------------------------|------------|-------------|
| <b><math>\alpha</math>-GAL baixo</b> |            |             |
| DF ausente                           | 1808       | 1           |
| DF presente                          | 59         | 6           |
| <b>Lyso-GL3 elevado</b>              |            |             |
| DF ausente                           | 1801       | 5           |
| DF presente                          | 66         | 2           |
| <b>Ambos alterados*</b>              |            |             |
| DF ausente                           | 1867       | 6           |
| DF presente                          | 0          | 1           |

\*ambos alterados:  $\alpha$ -GAL reduzida e lyso-GL3 elevado.

DF: Doença de Fabry.

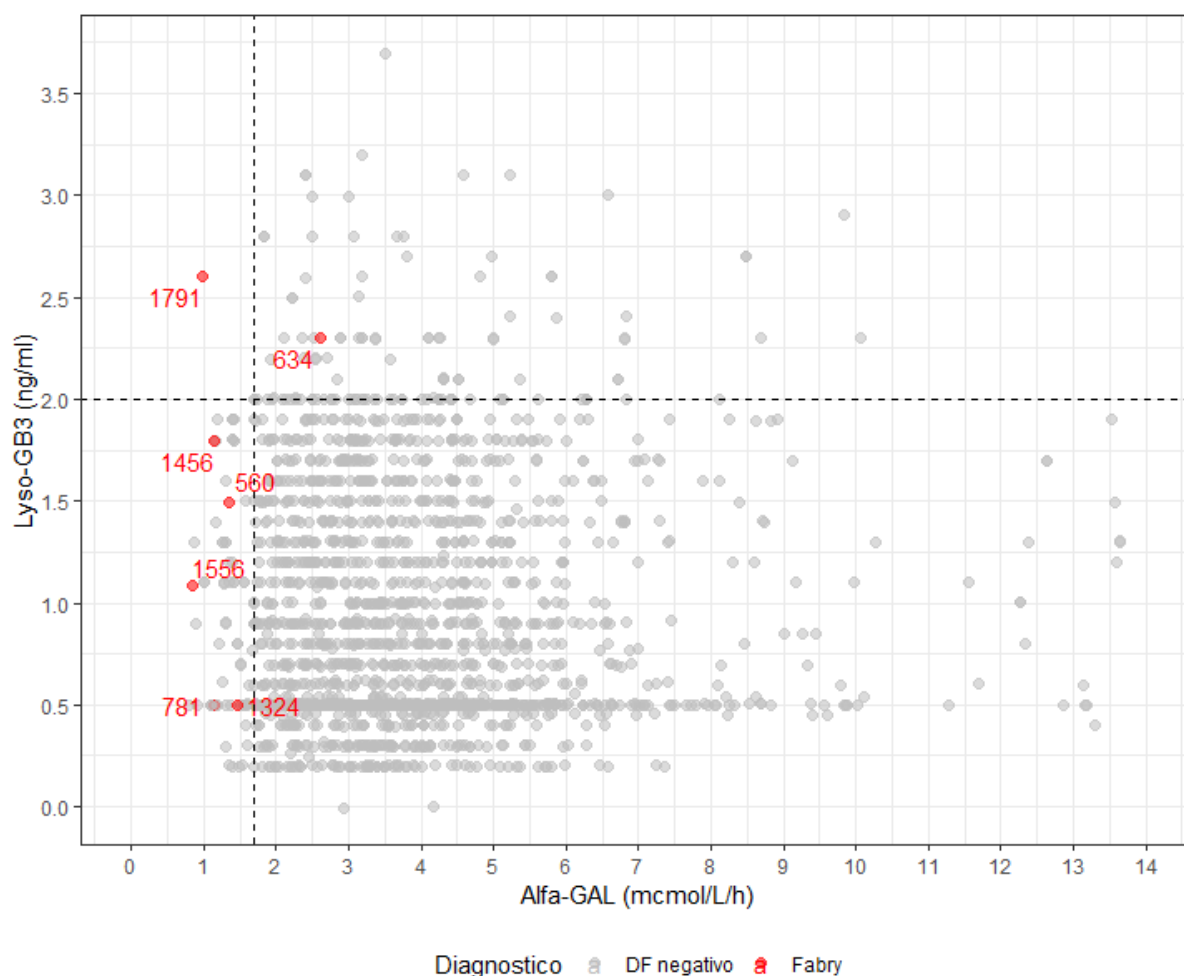
Estes resultados podem ser visualizados graficamente na figura 04. Nesta figura vemos que o encontro de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3 normais tem um VPN de 100% (nenhum paciente apresentava DF). Por outro lado,  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3 alterados teve VPP de 100% (todos os casos com DF). Combinações de  $\alpha$ -GAL baixa com lyso-GL3 formam um grupo intermediário de VPP e VPN.

**Figura 04. Combinação entre dosagem de  $\alpha$ -GAL, lyso-GL3 e diagnóstico de DF em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF.**



A relação entre dosagem de  $\alpha$ -GAL, lyso-GL3 e presença de DF pode ser vista na figura 05. Seis pacientes apresentaram níveis reduzidos de  $\alpha$ -GAL associado ao diagnóstico de DF representados na cor vermelha no canto esquerdo do gráfico (abaixo da linha tracejada vertical). Dois pacientes apresentaram lyso-GL3 elevado e diagnóstico de DF (cor vermelha acima da linha tracejada horizontal). Apenas um paciente apresentou ambos os valores elevados. Este caso encontra-se nesta faixa do quadrante acima das linhas tracejadas horizontais e verticais.

**Figura 05. Relação entre dosagem de  $\alpha$ -GAL, lyso-GL3 e presença de DF em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**



$\alpha$ -GAL: valores normais foram superiores ou iguais a 1,68 mcmol/L/h (linha tracejada vertical). Lyso-GL3: valores normais foram inferiores a 2 ng/mL (linha tracejada horizontal). Doença de Fabry (DF) negativo: cinza; pacientes com diagnóstico de DF estão identificadas em vermelho, sendo que os números de cada paciente se relacionam com a ordem numérica da entrada da paciente na lista de pacientes do estudo.

## 5.2. COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS

Foi realizada uma comparação entre os grupos com DF (n=7) e os pacientes sem DF (n=1867). A idade mediana não foi diferente entre os grupos. A atividade da  $\alpha$ -GAL foi menor nos pacientes com DF sendo 1.15 versus 3.55 mcmol/L/h em pacientes não Fabry,  $p < 0.001$ . Lyso-GL3 apresentou tendência a maiores valores no grupo com DF 1.5 versus 0.8 ng/mL no grupo não Fabry,  $p = 0.087$ , tabela 04.

**Tabela 04. Comparação entre os pacientes com e sem DF em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**

|                          | <b>DF ausente, N = 1,867</b> | <b>DF presente, N = 7</b> | <b>p-value</b> |
|--------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------|
| Idade (anos)             | 54 (42, 65)                  | 60 (48, 62)               | 0.7            |
| $\alpha$ -GAL(mcmol/L/h) | 3.55 (2.65, 4.67)            | 1.15 (1.06, 1.40)         | <0.001         |
| Categoria $\alpha$ -GAL  |                              |                           | <0.001         |
| baixa                    | 59 (3.2%)                    | 6 (86%)                   |                |
| normal                   | 1,808 (97%)                  | 1 (14%)                   |                |
| Lyso-GL3 (ng/mL)         | 0.80 (0.50, 1.40)            | 1.50 (0.79, 2.05)         | 0.087          |
| Categoria Lyso-GL3       |                              |                           | 0.024          |
| elevado                  | 66 (3.5%)                    | 2 (29%)                   |                |
| normal                   | 1,801 (96%)                  | 5 (71%)                   |                |

$\alpha$ -GAL: valores normais foram superiores ou iguais a 1,68 mcmol/L/h.

Lyso-GL3: valores normais foram inferiores a 2 ng/mL.

Valores expressos em mediana e percentis 25 e 75%; número e percentagem.

### 5.3. VARIANTES GENÉTICAS

Foram identificadas 7 pacientes com variantes positivas para a DF. Foram encontrados 6 casos de VUS, sendo 4 casos de R118C, 1 caso com A143T, e outro caso com T430G. Apenas 1 paciente foi identificada como sendo portadora de uma variante patogênica, I319T (tabela 05).

A paciente com variante patogênica apresentou ambos os exames alterados ( $\alpha$ -GAL baixa e lyso-GL3 elevado). Das outras 6 pacientes portadoras de variantes para a DF, 5 foram identificadas através da baixa atividade enzimática e 1 através do aumento do lyso-GL3 (tabela 05).

**Tabela 05. Descrição das variantes genéticas encontradas em pacientes do sexo feminino com DRC submetidas a uma nova forma de rastreamento da DF através da dosagem de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3.**

| <b>Idade<br/>(anos)</b> | <b><math>\alpha</math>-GAL<br/>(mcmol/L/h)</b> | <b>Lyso-GL3<br/>(ng/mL)</b> | <b>Variante Completa / Resumida*</b>   | <b>Classificação<sup>#</sup></b> |
|-------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| 63                      | 1.34                                           | 1.50                        | c.352C>T;p.(Arg118Cys) - R118C         | VUS                              |
| 28                      | 2.61                                           | 2.30                        | c.352C>T;p.(Arg118Cys) - R118C         | VUS                              |
| 62                      | 1.13                                           | 0.50                        | c.352C>T;p.(Arg118Cys) - R118C         | VUS                              |
| 51                      | 1.46                                           | 0.50                        | c.427G>A;p.(Ala143Thr) - A143T         | VUS                              |
| 47                      | 1.15                                           | 1.80                        | c.352C>T;p.(Arg118Cys) - R118C         | VUS                              |
| 87                      | 0.84                                           | 1.08                        | c.1288T>G;p.(Ter430GluextTer?) - T430G | VUS                              |
| 61                      | 0.99                                           | 2.60                        | c.956T>C;p.(Ile319Thr) - I319T         | patogênica                       |

$\alpha$ -GAL: valores normais foram superiores ou iguais a 1,68 mcmol/L/h.

Lyso-GL3: valores normais foram inferiores a 2 ng/mL.

Locus: NM\_000169.3 (GLA).

# Classificação de acordo com a Associação Americana de Genética Médica.

#### **5.4. PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE FABRY**

Foram analisadas 1.874 pacientes do sexo feminino, sendo encontrado 7 casos com variantes positivas para a DF, resultando numa prevalência inicial de 0,37%. Cabe aqui salientar que apenas uma paciente possui variante com potencial patogênico comprovado. As outras 6 pacientes apresentam VUS, portanto com a possibilidade de serem portadoras da DF, o que depende da avaliação individualizada das variantes encontradas juntamente com os dados clínicos, laboratoriais e familiares.

## 5.5. DESCRIÇÃO DAS PACIENTES IDENTIFICADAS

Abaixo estão descritas as pacientes com variantes positivas para a DF, seguindo a mesma ordem apresentada na tabela 05.

### PACIENTE 01

Paciente de 63 anos de idade, portadora da VUS c.352C>T;p.(Arg118Cys), ou simplesmente R118C. A suspeita da DF foi baseada nos baixos níveis da enzima  $\alpha$ -GAL (1,34 mcmol/L/h). Os níveis de lyso-GL3 foram normais (1,50 ng/mL). A paciente realiza HD desde 2015, e entrou em programa de diálise com diagnóstico etiológico da DRC associado a hipertensão arterial sistêmica (HAS), litíase renal de repetição e infecção do trato urinário de repetição. Os rins atualmente estão atrofiados, com a presença de múltiplos cistos. Sem histórico de cardiopatia ou AVE. Nega sintomas característicos da DF, e não apresenta angioqueratomas. Quanto ao histórico familiar, sua mãe faleceu após episódio de AVE, com idade do óbito não informado. Após confecção do heredograma, foi identificado até o presente momento 1 irmã portadora da mesma mutação, também sem sintomas associados a DF, e um sobrinho (filho dessa mesma irmã) com 35 anos de idade, com diminuição da atividade enzimática (1,07 mcmol/L/h) e lyso-GL3 aumentado (4,3 ng/mL). Os exames desse paciente, que foram realizados logo após o diagnóstico da DF, evidenciaram função renal normal, ausência de microalbuminúria, ressonância nuclear magnética (RNM) cerebral e cardíaca normais. Nega sintomas característicos da DF, estando até o momento assintomático.

### PACIENTE 02

Trata-se de paciente de 28 anos, portadora da VUS c.352C>T;p.(Arg118Cys), ou simplesmente R118C. A suspeita da DF foi baseada nos níveis aumentados de lyso-GL3 (2,30 ng/mL), com atividade normal da enzima  $\alpha$ -GAL (2,61 mcmol/L/h). É portadora de DRC em programa regular de HD desde 2021, porém com etiologia atrelada à nefropatia diabética, sendo portadora de diabetes mellitus (DM) insulino dependente desde 2005, quando tinha 10 anos de idade. Nega sintomas atrelados à DF. Sua mãe, portadora da mesma variante, nega sintomas associados à DF, estando assintomática, e não apresenta alterações nos exames laboratoriais e de imagem realizados. A paciente possui outros 3 irmãos, sendo 2 mulheres e 1 homem, todos com exames normais e sem sintomas característicos da DF. Apresenta 1 primo por parte da família materna, que foi submetido a transplante renal, porém não sabe referir sobre diagnóstico de base ou outros dados clínicos.

### **PACIENTE 03**

Paciente de 51 anos, portadora da VUS c.427G>A;p.(Ala143Thr), ou simplesmente A143T. A suspeita da DF foi atrelada à atividade reduzida da enzima  $\alpha$ -GAL (1,13 mcmol/L/h). Os níveis de lyso-GL3 foram normais (< 0,50 ng/mL). Paciente encontra-se em esquema regular de HD desde 2014, sendo que a etiologia da DRC foi associada à presença de doença renal policística autossômica dominante (DRPAD), inclusive com histórico familiar, com irmão e mãe que evoluíram para HD supostamente pelo mesmo motivo. Nega queixas associadas à DF, e nega casos familiares de AVE ou infarto agudo do miocárdio (IAM).

### **PACIENTE 04**

Paciente de 63 anos de idade, portadora da VUS c.352C>T;p.(Arg118Cys), ou simplesmente R118C. A suspeita da DF foi baseada nos baixos níveis da enzima  $\alpha$ -GAL (1,46 mcmol/L/h). Os níveis de lyso-GL3 foram normais (< 0,50 ng/mL). A paciente em questão iniciou esquema de HD em 2017, e no momento encontra-se transplantada renal desde março de 2023. Não fazia seguimento regular com nefrologia previamente, e entrou em TRS com quadro de uremia, sem diagnóstico etiológico bem definido, porém referia quadro de HAS associado. Nega sintomas clássicos associados à DF, e não sabe referir sobre histórico familiar. Durante período de HD, apresentava quadro de ansiedade exacerbada e dores difusas, porém mal definidas.

### **PACIENTE 05**

Paciente de 47 anos de idade, também portadora da VUS c.352C>T;p.(Arg118Cys), ou simplesmente R118C. A suspeita da DF se baseou nos níveis reduzidos de atividade da enzima  $\alpha$ -GAL (1,15 mcmol/L/h). Os níveis de lyso-GL3 apresentaram valores dentro na normalidade (1,80 ng/mL). O início do seu acompanhamento nefrológico foi com 40 anos de idade devido sinais de glomerulopatia crônica, com proteinúria e queda importante da TFG. Baseado na apresentação inicial já avançada da nefropatia, não foi submetida à biopsia renal. Pela piora progressiva do quadro, iniciou esquema regular de HD em 2022, com 46 anos de idade. Nega sintomas característicos da DF e também nega sinais ou comorbidades associadas à DF em seus familiares.

## **PACIENTE 06**

Paciente de 87 anos de idade, portadora da VUS c.1288T>G;p.(Ter430GluextTer?), ou resumidamente T430G. A DF foi suspeitada pelos níveis reduzidos de atividade da enzima  $\alpha$ -GAL (0,84 mcmol/L/h). Os níveis de lyso-GL3 apresentaram valores normais (1,08 ng/mL). Iniciou esquema de HD com 85 anos, sem etiologia claramente definida. A paciente negou queixas ou sinais que possam ser atribuídas à DF. Negou dores articulares e sensibilidade ao calor e não apresenta angioqueratomas. Não possui alterações de exames cardíacos, tais como HVE. Possui 2 primos com histórico de doença renal, porém sem informações relevantes quanto à etiologia. Negou outras particularidades.

## **PACIENTE 07**

Paciente de 61 anos de idade, foi a única paciente do estudo que foi diagnosticada com uma variante classificada como patogênica, c.956T>C;p.(Ile319Thr), ou simplesmente I319T. E atestando a patogenicidade da variante, foi criada a suspeita de DF por ambos os exames alterados, os níveis de atividade da enzima  $\alpha$ -GAL estavam reduzidos (0,99 mcmol/L/h) e os níveis de lyso-GL3 estavam aumentados (2,60 ng/mL). Tal paciente encontra-se em tratamento conservador, com DRC estágio 3 no momento (TFG estimada em 59 ml/min). Das pacientes diagnosticadas também foi a única que não se encontra em TRS. Já estava em uso de ramipril e atorvastatina devido proteinúria e dislipidemia, respectivamente. Referia quadro de parestesias e sensação de peso em membros inferiores quando criança, porém com melhora espontânea, a qual não sabe precisar com exatidão o tempo. Negou a presença de outros sintomas típicos de DF quando era jovem. No momento queixa-se de dores intermitentes em região abdominal, atreladas a problemas de digestão, inclusive com suspeita clínica de síndrome do intestino irritável. Exames cardiológicos foram realizados, com ecocardiograma evidenciando disfunção diastólica de ventrículo esquerdo, eletrocardiograma mostrando bloqueio de ramo direito. Foi identificado um filho com DF, inicialmente já com níveis aumentados de lyso-GL3 (6,60 ng/mL) e com disfunção renal, com creatinina de 2,3 mg/dL, motivos pelos quais já foi prescrito o início de TRE. RNM cardíaca e cerebral foram realizadas e não apresentaram alterações. Apresenta também sinais de depressão, sem outros sinais ou sintomas que pode se associar a DF. O heredograma ainda não foi todo caracterizado, com possibilidade de se encontrar outros familiares portadores da variante.

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo utilizando uma abordagem alternativa de rastreamento para DF foram analisadas 1874 pacientes do sexo feminino com DRC em tratamento conservador, estágios 3 a 5, ou 5D em diálise. Todas as pacientes foram submetidas às dosagens de  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3. Nos casos em que havia variações da normalidade de ambos ou qualquer um dos biomarcadores foi realizada a análise genética em busca de variantes do gene *GLA* (n=132). Do total de pacientes avaliadas após sequenciamento genético, foram encontradas 7 mulheres com variantes genéticas.

Analisando os resultados encontrados, foram realizadas análises estatísticas partindo da premissa que todas as pacientes com variantes do gene *GLA* são portadoras da DF, porém com a ciência que o número desses casos inicialmente positivos pode variar após continuidade das investigações clínicas, laboratoriais, com exames de imagem e dados familiares. Cabe aqui salientar a importância que frente a casos de VUS, por ser um diagnóstico não definitivo, é recomendado um seguimento contínuo multidisciplinar e com diversas especialidades envolvidas em busca de alterações que possam servir ou evidenciar em algum momento a presença da DF.

Levando-se em conta todos os 7 casos encontrados como sendo DF, o VPN foi superior a 99% para lyso-GL3,  $\alpha$ -GAL ou a combinação de ambos alterados. Nesta análise o encontro de ambos os valores alterados teve VPP de 100%. A análise de  $\alpha$ -GAL reduzida foi superior ao lyso-GL3 elevado, apresentando maior sensibilidade e maior VPP. A prevalência de DF nesta população foi de 0,37%.

Encontramos um alto VPP (100%) e VPN (99.7%) para a combinação de  $\alpha$ -GAL baixa com lyso-GL3 elevado. Isto está de acordo com o publicado em estudo similar, que encontrou valores semelhantes para a combinação de ambos os biomarcadores alterados. Entretanto, para a análise isolada de cada biomarcador os VPPs para  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3 foram respectivamente 9,2% e 2,9%. O mesmo estudo também encontrou baixo VPP, porém o lyso-GL3 teve maior VPP comparado à atividade da  $\alpha$ -GAL.(42) Os altos VPNs de cada um dos biomarcadores no presente estudo (superior a 99%) poderiam ser usados para rastreio pois torna-se muito improvável o diagnóstico de DF em caso de ambos os valores normais. Já para o diagnóstico de DF, a combinação dos dois biomarcadores teve maior VPP.

Dentre os biomarcadores, a atividade da  $\alpha$ -GAL reduzida teve melhor VPP e sensibilidade comparado à dosagem de lyso-GL3. O melhor balanço entre sensibilidade e especificidade foi obtido com a dosagem de  $\alpha$ -GAL.

Tem sido descrito que o lyso-GL3 é um biomarcador melhor para o diagnóstico da DF em mulheres, especialmente porque mais de 60% delas com DF têm valores normais de  $\alpha$ -GAL.(61,62) Duas publicações também encontram maior sensibilidade na dosagem de lyso-GL3.(46,57) Diferente destes resultados, encontramos maior sensibilidade e especificidade nas dosagens de  $\alpha$ -GAL. Há a descrição da relação entre  $\alpha$ -GAL / lyso-GL3, sendo que valores menores que 2.5 apresentaram sensibilidade e especificidade de 100% para detectar DF.(57) Vale ressaltar que neste estudo o critério de DF incluiu apenas mulheres com fenótipo clássico. No presente estudo foram incluídas mulheres de fenótipo tardio, o que pode explicar valores mais baixos de lyso-GL3. Corroborando esta informação, alguns autores reportaram menores valores de lyso-GL3 em mulheres com fenótipo tardio.(63)

Quanto à viabilidade da aplicação destes dois biomarcadores para rastreio da DF, acreditamos que eles possam ser usados para o diagnóstico de exclusão devido ao elevado VPN. Idealmente ambos os biomarcadores deveriam ser realizados devido à baixa sensibilidade, porém nesta população a atividade da  $\alpha$ -GAL teve maior poder discriminatório, possivelmente pela predominância de fenótipo tardio. Ambos os valores negativos praticamente excluem o diagnóstico de DF, e ambos positivos atestam o diagnóstico. Em situações intermediárias, com apenas lyso-GL3 elevado ou  $\alpha$ -GAL reduzida, o teste molecular é necessário.

A prevalência de variantes genéticas para a DF nesta população foi de 0.37%. Considerando dados brasileiros, dois estudos de prevalência da DF entre a população em HD, um na Bahia e outro no Rio Grande do Sul, encontraram valores de 0.12% e 0.36%, respectivamente, porém ambos incluíram apenas homens na análise.(26,64) No estudo da região do Vale do Paraíba em São Paulo, incluindo homens e mulheres, a prevalência foi de 0.45% sem incluir VUS, e de 0.85% incluindo as variantes VUS.(65) Na nossa população a prevalência de 0.37% pode ser considerada elevada visto que foram avaliadas apenas mulheres, mas em parte explicada pela inclusão de casos de fenótipo tardio.

Um questionamento pertinente baseado nos resultados apresentados envolve a alteração dos biomarcadores em pacientes que não tem alterações genéticas para a DF. Em busca de literatura sobre tal assunto, mesmo em estudos de rastreamentos, em que os números de casos de atividade enzimática e lyso-GL3 alterados sem o diagnóstico de DF são similares ao encontrados nesse trabalho, pouco ou quase nada se discute a respeito de tal achado.

Uma justificativa plausível, que pode explicar ao menos parcialmente essa possibilidade, é fornecida pela própria técnica de análise laboratorial do exame.(66) A atividade enzimática é padronizada para hematócrito (Ht) de 40, o que em média remete a níveis de hemoglobina ao redor de 13 g/dL, valor geralmente não encontrado em pacientes dialíticas, que contabilizam a ampla maioria de nossa amostra. Quando os níveis de Ht estão abaixo desse

patamar existe a possibilidade de a atividade enzimática vir falsamente alterada. O que ainda pode estar atrelado a isso é os casos de coleta do sangue das pacientes através do sistema de diálise, o que pode diluir ainda mais o sangue das pacientes, mesmo sabedores que a padronização da coleta é sempre orientada para ser feita antes da HD em via sanguínea ainda não diluída.

No tocante ao encontro de lyso-GL3 aumentado nos pacientes que não tem DF, existem algumas explicações em literatura que podem ao menos parcialmente explicar tal achado, porém pela excepcionalidade dos dados encontrados, entendemos ser muito difícil uma relação de causa e efeito nessa situação. Níveis minimamente elevados de lyso-GL3 podem ser encontrados na deficiência de prosaposina, que é uma glicoproteína precursora de produtos de clivagem conhecidas como saposinas, que se localizam principalmente no compartimento lisossômico, onde facilitam o catabolismo de glicosfingolipídios através do isolamento do substrato lipídico do entorno da membrana, tornando-o mais acessível às enzimas degradativas.(67)

Podendo ainda justificar, mesmo que em mínimas proporções, o aumento de lyso-GL3 na ausência da DF, pode haver algum grau de deficiência da enzima ceramidase ácida, descrita por poder assumir o catabolismo alternativo de GL3 em situações em que o metabolismo se encontra alterado.(68,69)

No tocante às pacientes descritas e que foram identificadas com variantes VUS a partir desse rastreamento, é ponto de destaque e bastante perceptível a necessidade de uma avaliação individualizada, levando-se em conta parâmetros clínicos, familiares, laboratoriais e radiológicos em busca de dados que sustentem ou não o diagnóstico da DF como etiologia do acometimento renal e dos outros órgãos-alvo.

O dado que talvez mais ilustre esse ponto acima é a paciente número 01. É portadora da variante c.352C>T;p.(Arg118Cys), bastante conhecida e descrita em populações ao redor do mundo, e que a maioria dos autores considera como benigna, ou seja, não causadora da DF. O fato de um familiar homem dessa paciente, ainda jovem, com diminuição da atividade enzimática e já com aumento de lyso-GL3, atesta que algum grau de patogenicidade tal variante pode carregar. Se existe algum outro fator confundidor, abrandador ou estimulador, que faça com que as alterações dos biomarcadores desse paciente tenham ocorrido, difícil através dessa análise genética alguma afirmação, mas cabe sempre o benefício de ao menos se buscar sinais ou sintomas ou alterações que possam detalhar individualmente cada paciente.

Como forma de se descobrir outros fatores genéticos que podem ser modificadores da expressão genética de cada variante, mesmo não fazendo parte dos nossos objetivos iniciais,

pediremos ao laboratório DLE os dados genéticos brutos de todas as pacientes. Infelizmente não tivemos tempo hábil de mostrar tais dados nessa presente tese.

A mensagem que se destaca através do exemplo acima é para que todos os profissionais envolvidos com a DF sejam os mais criteriosos e cuidadosos possíveis perante uma enfermidade com algumas peculiaridades, sabedores que uma afirmação ou comprovação nunca podem ser tomadas como definitivas.

Este estudo apresenta algumas limitações. Não foram realizadas análises genéticas para os pacientes com  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3 normais. Estes casos foram inferidos como negativos para DF baseado nos resultados dos biomarcadores e ausência de características clínicas para DF. Uma avaliação ainda mais completa e contínua dos casos com variantes atreladas à DF seria recomendada incluindo avaliação da história familiar e pesquisa de outras alterações genéticas, tais como as variantes intrônicas, sabendo-se que alterações na região dos íntrons podem modificar a expressão de gene *GLA*.(70)

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo contribui para a compreensão do valor diagnóstico dos biomarcadores  $\alpha$ -GAL e lyso-GL3 no contexto da DF em mulheres com DRC. A combinação desses biomarcadores parece ser uma abordagem efetiva para o diagnóstico da doença, com alto VPP e VPN, e a dosagem de  $\alpha$ -GAL mostrou ser mais sensível neste contexto específico. Além disso, tomando-se em conta a totalidade dos casos encontrados, aqui não excluindo a situação das variantes VUS, a prevalência encontrada foi relevante, atestando a importância do rastreamento da DF nessa população.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Desnick RJ, Ioannou YA; Eng CM.  $\alpha$ -Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York. McGraw Hill. 2014;1-64.
2. Germain DP. Fabry disease. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2010;5:30.
3. Schiffmann R. Fabry disease. Handb Clin Neurol. 2015;132:231-48.
4. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA 1999;281(3):249-54.
5. Merta M, Reiterova J, Ledvinova J, Poupetová H, Dobrovolny R, Rysavá R, et al. A nationwide blood spot screening study for Fabry disease in the Czech Republic haemodialysis patient population. Nephrol Dial Transplant. 2007;22(1):179-86.
6. Linthorst GE, Hollak CE, Korevaar JC, Van Manen JG, Aerts JM, Boeschoten EW. Alpha-Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(8):1581-4.
7. Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, Paschke E, Voigtländer T, Auinger M, et al. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. J Am Soc Nephrol. 2004;15(5):1323-9.
8. Tanaka M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Miyamura N, Nishida K, et al. Identification of Fabry's disease by the screening of alpha-galactosidase A activity in male and female hemodialysis patients. Clin Nephrol. 2005;64(4):281-7.
9. Terryn W, Poppe B, Wuyts B, Claes K, Maes B, Verbeelen D, et al. Two-tier approach for the detection of alpha-galactosidase A deficiency in a predominantly female haemodialysis population. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(1):294-300.
10. Elliott P, Baker R, Pasquale F, Quarta G, Ebrahim H, Mehta AB, et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson-Fabry Disease survey. Heart. 2011;97(23):1957-60.
11. Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Togawa T, Tsukimura T, et al. Screening for Fabry disease in patients with left ventricular hypertrophy. Int J Cardiol. 2013;167(3):1059-61.
12. Kubo T, Ochi Y, Baba Y, Hirota T, Tanioka K, Yamasaki N, et al. Prevalence and clinical features of Fabry disease in Japanese male patients with diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. J Cardiol. 2017;69(1):302-7.
13. Maron MS, Xin W, Sims KB, Butler R, Haas TS, Rowin EJ, et al. Identification of Fabry Disease in a tertiary referral cohort of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Am J Med. 2018;131(2):200.e1-200.e8.

14. Terry 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(6):2555-60.
15. Sadasivan C, Chow JTY, Sheng B, Chan DKH, Fan Y, Choi PCL, et al. Screening for Fabry disease in patients with unexplained left ventricular hypertrophy. *PLoS One.* 2020;15(9):e0239675.
16. Baptista MV, Ferreira S, Pinho-E-Melo T, Carvalho M, Cruz VT, et al. PORTuguese Young STROKE Investigators. Mutations of the GLA gene in young patients with stroke: the PORTYSTROKE study--screening genetic conditions in Portuguese young stroke patients. *Stroke.* 2010;41(3):431-6.
17. Wozniak MA, Kittner SJ, Tuhim S, Cole JW, Stern B, Dobbins M, et al. Frequency of unrecognized Fabry disease among young European-American and African-American men with first ischemic stroke. *Stroke.* 2010;41(1):78-81.
18. Dubuc V, Moore DF, Gioia LC, Saposnik G, Selchen D, Lanthier S. Prevalence of Fabry disease in young patients with cryptogenic ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013;22(8):1288-92.
19. Romani I, Borsini W, Nencini P, Morrone A, Ferri L, Frusconi S, et al. De novo diagnosis of Fabry disease among Italian adults with acute ischemic stroke or transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015;24(11):2588-95.
20. Lanthier S, Saposnik G, Lebovic G, Pope K, Selchen D, Moore DF, et al. Prevalence of Fabry disease and outcomes in young Canadian patients with cryptogenic ischemic cerebrovascular events. *Stroke.* 2017;48(7):1766-72.)
21. Germain DP, Levade T, Hachulla E, Knebelmann B, Lacombe D, Seguin VL, et al. Challenging the traditional approach for interpreting genetic variants: Lessons from Fabry disease. *Clin Genet.* 2022;101(4):390-402.
22. Nerbass FB, Lima H do N, Thomé FS, Vieira Neto OM, Lugon JR, Sesso R. Brazilian Dialysis Survey 2020. *Braz J Nephrol.* 2022;44(3):349-57.
23. Torra R, Furlano M, Ortiz A, Ars E. Genetic kidney diseases as an underrecognized cause of chronic kidney disease: the key role of international registry reports. *Clin Kidney J.* 2021;14(8):1879-85.
24. Newman DB, Miranda WR, Matern D, Peck DS, Geske JB, Maleszewski JJ, et al. Cost efficacy of  $\alpha$ -Galactosidase A enzyme screening for Fabry disease. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(1):84-8.

25. Maruyama H, Miyata K, Mikame M, Taguchi A, Guili C, Shimura M, et al. Effectiveness of plasma lyso-Gb3 as a biomarker for selecting high-risk patients with Fabry disease from multispecialty clinics for genetic analysis. *Genet Med*. 2019;21(1):44-52.
26. Silva CA, Barreto FC, dos Reis MA, Moura Junior JA, Cruz CM. Targeted screening of Fabry disease in male hemodialysis patients in Brazil highlights importance of family screening. *Nephron*. 2016;134(4):221-30.
27. Política nacional de atenção integral às pessoas com doenças raras. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199\\_30\\_01\\_2014.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html).
28. Agenda Nacional de prioridades de pesquisa em Saúde do Ministério da Saúde. 2018. Disponível: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agenda\\_prioridades\\_pesquisa\\_ms.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agenda_prioridades_pesquisa_ms.pdf)
29. The Human Gene Mutation Database. Accessed in January 2024. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GLA>.
30. Curiati MA, Aranda CS, Kyosen SO, Varela P, Pereira VG, D'Almeida V, et al. The challenge of diagnosis and indication for treatment in Fabry disease. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*. 2017;5:1–7.
31. Varela P, Mastroianni Kirsztajn G, Ferrer H, Aranda C, Wallbach K, Ferreira da Mata G, et al. Functional characterization and pharmacological evaluation of a novel GLA missense mutation found in a severely affected Fabry disease family. *Nephron*. 2020;144(3):147-55.
32. Arends M, Wanner C, Hughes D, Mehta A, Oder D, Watkinson OT, et al. Characterization of classical and nonclassical Fabry disease: a multicenter study. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(5):1631-41.
33. Schiffmann R, Warnock DG, Banikazemi M, Bultas J, Linthorst GE, Packman S, et al. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(7):2102-11.
34. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*. 1995;333(5):288-93.
35. Waldek S, Feriozzi S. Fabry nephropathy: a review - how can we optimize the management of Fabry nephropathy? *BMC Nephrol*. 2014;15:72.
36. Warnock DG, Ortiz A, Mauer M, Linthorst GE, Oliveira JP, Serra AL, et al. Renal outcomes of agalsidase beta treatment for Fabry disease: role of proteinuria and timing of treatment initiation. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1042-9.
37. Rozenfeld PA, de Los Angeles Bolla M, Quietto P, Pisani A, Feriozzi S, Neuman P, et al. Pathogenesis of Fabry nephropathy: The pathways leading to fibrosis. *Mol Genet Metab*. 2020;129(2):132-41.

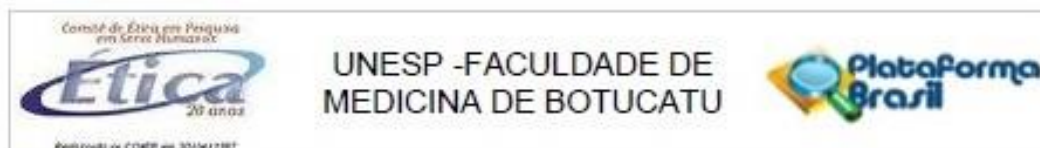
38. Del Pino M, Andrés A, Bernabéu AA, de Juan-Rivera J, Fernández E, de Dios García Díaz J, et al. Fabry nephropathy: an evidence-based narrative review. *Kidney Blood Press Res.* 2018;43(2):406-21.
39. Stevens PE, Levin A; Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* 2013;158(11):825-30.
40. Veloso VSP, Ataides TL, Canziani MEF, Veloso MP, da Silva NA, Barreto DV, et al. A novel missense GLA mutation (p.G35V) detected in hemodialysis screening leads to severe systemic manifestations of Fabry disease in men and women. *Nephron.* 2018;138(2):147-56.
41. Pan X, Ouyang Y, Wang Z, Ren H, Shen P, Wang W, et al. Genotype: a crucial but not unique factor affecting the clinical phenotypes in Fabry disease. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161330.
42. Rodríguez-Marí A, Coll MJ, Chabás A. Molecular analysis in Fabry disease in Spain: fifteen novel GLA mutations and identification of a homozygous female. *Hum Mutat.* 2003;22(3):258.
43. Thadhani R, Wolf M, West ML, Tonelli M, Ruthazer R, Pastores GM, et al. Patients with Fabry disease on dialysis in the United States. *Kidney Int.* 2002;61(1):249-55.
44. Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta.* 2005;353(1-2):201-3.
45. Echevarria L, Benistan K, Toussaint A, Dubourg O, Hagege AA, Eladari D, et al. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin Genet.* 2016;89(1):44-54.
46. Balendran S, Oliva P, Sansen S, Mechtler TP, Streubel B, Cobos PN, et al. Diagnostic strategy for females suspected of Fabry disease. *Clin Genet.* 2020 Apr;97(4):655-60.
47. Germain DP, Benistan K, Angelova L. X-linked inheritance and its implication in the diagnosis and management of female patients in Fabry disease. *Rev Med Interne.* 2010;31 Suppl 2:S209-13.
48. Laney DA, Fernhoff PM. Diagnosis of Fabry disease via analysis of family history. *J Genet Couns.* 2008;17(1):79-83.
49. Jain G, Warnock DG. Blood pressure, proteinuria and nephropathy in Fabry disease. *Nephron Clin Pract.* 2011;118(1):c43-8.
50. Fabrazyme monograph. Available in: <https://www.drugs.com/monograph/fabrazyme.html>.
51. Replagal monograph. Available in: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/replagal-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/replagal-epar-product-information_en.pdf).

52. Yam GH, Bosshard N, Zuber C, Steinmann B, Roth J. Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(4):C1076-82.
53. Germain DP, Giugliani R, Hughes DA, Mehta A, Nicholls K, Barisoni L, et al. Safety and pharmacodynamic effects of a pharmacological chaperone on  $\alpha$ -galactosidase A activity and globotriaosylceramide clearance in Fabry disease: report from two phase 2 clinical studies. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7:91.
54. Germain DP, Fan JQ. Pharmacological chaperone therapy by active-site-specific chaperones in Fabry disease: in vitro and preclinical studies. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47 Suppl 1:S111-7.
55. Migalastat monograph. Available in: <https://www.drugs.com/monograph/migalastat-hydrochloride.html>.
56. Waldek S, Feriozzi S. Fabry nephropathy: a review - how can we optimize the management of Fabry nephropathy? *BMC Nephrol*. 2014;15:72.
57. Baydakova GV, Ilyushkina AA, Moiseev S, Bychkov IO, Nikitina NV, Buruleva TA, et al.  $\alpha$ -Galactosidase A/lysoGb3 ratio as a potential marker for Fabry disease in females. *Clin Chim Acta*. 2020;501:27-32.
58. Masson E, Zou WB, Génin E, Cooper DN, Le Gac G, Fichou Y, et al. Expanding ACMG variant classification guidelines into a general framework. *Hum Genomics*. 2022;16(1):31.
59. Sequence Variant Nomenclature. Disponível em: <https://varnomen.hgvs.org/>. Acessado em setembro de 2023.
60. Silva CAB, Andrade LGM, Vaisbich MH, Barreto FC. Brazilian consensus recommendations for the diagnosis, screening, and treatment of individuals with fabry disease: Committee for Rare Diseases - Brazilian Society of Nephrology/2021. *J Bras Nefrol*. 2022;44(2):249-67.
61. Niemann M, Rolfs A, Störk S, Bijnens B, Breunig F, Beer M, et al. Gene mutations versus clinically relevant phenotypes: lyso-Gb3 defines Fabry disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(1):8-16.
62. Duro G, Zizzo C, Cammarata G, Burlina A, Burlina A, Polo G, et al. Mutations in the GLA Gene and LysoGb3: Is It Really Anderson-Fabry Disease? *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3726.
63. Smid BE, van der Tol L, Biegstraaten M, Linthorst GE, Hollak CE, Poorthuis BJ. Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease. *J Med Genet*. 2015;52(4):262-8.

64. Porsch DB, Nunes AC, Milani V, Rossato LB, Mattos CB, Tsao M, et al. Fabry disease in hemodialysis patients in southern Brazil: prevalence study and clinical report. *Ren Fail.* 2008;30(9):825-30.
65. Paz OTD, Lacerda RCT, de Andrade LGM. Genetic and phenotypic profile of Fabry disease in the population of Vale do Paraíba and Eastern São Paulo. *J BrasNefrol.* 2023:S0101-28002023005005502.
66. Bula do kit do exame de atividade enzimática. NeoLSD™ MSMS kit. Disponível em: <https://www.perkinelmer.com.br/product/neolsd-msms-kit-3093-0020>. Acessado em novembro de 2023.
67. Polo G, Burlina AP, Ranieri E, Colucci F, Rubert L, Pascarella A, et al. Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: a comparative study. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(12):1863-74.
68. Ferraz MJ, Marques AR, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M, et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett.* 2016;590(6):716-25.
69. Heywood WE, Doykov I, Spiewak J, Hallqvist J, Mills K, Nowak A. Global glycosphingolipid analysis in urine and plasma of female Fabry disease patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(10):2726-35.
70. Filoni C, Caciotti A, Carraresi L, Donati MA, Mignani R, Parini R, et al. Unbalanced GLA mRNAs ratio quantified by real-time PCR in Fabry patients' fibroblasts results in Fabry disease. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(11):1311-7.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 01 – COMPROVANTE DE ACEITAÇÃO DO CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de um método alternativo para rastreamento de Doença de Fabry em mulheres

**Pesquisador:** CASSIANO AUGUSTO BRAGA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 53348721.0.0000.5411

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.152.533

##### Apresentação do Projeto:

As informações apresentadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa.

A doença de Fabry (DF) é classificada dentro das doenças raras, sendo caracterizada como uma patologia de depósito lisossômico com padrão de herança ligada ao cromossomo X. O objetivo principal foi avaliar o teste diagnóstico para analisar a eficácia da associação da atividade da enzima - GAL combinada com o valor plasmático de liso-GL3 no rastreamento da Doença de Fabry (DF) em pacientes do sexo feminino. A proposta de

triagem atende à necessidade de definir um método que garanta melhor acurácia diagnóstica na triagem de DF entre pacientes do sexo feminino

consideradas populações de risco. **Materiais e Métodos:** Serão convidadas a participar do estudo pacientes do sexo feminino procedentes de centros de terapia renal substitutiva, em hemodiálise, diálise peritoneal ou tratamento conservador de diferentes serviços de nefrologia do Brasil. **Crêterios de inclusão:** pacientes do sexo feminino com doença renal crônica com ou sem indicação de terapia renal substitutiva. **Crêterios de exclusão:** menores

de 18 anos e pacientes com diagnóstico conhecido de Doença de Fabry. Os pacientes eletivos serão submetidos à análise bioquímica da atividade da enzima liso-GL3 e -GAL plasmática. O sequenciamento do gene GLA será realizado nos casos em que: A dosagem da atividade enzimática esteja abaixo do valor de referência e / ou a dosagem do Lyso-GB3 esteja acima do

**Endereço:** Chácara Butignoli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

valor de referência. Serão realizadas análises de sensibilidade e especificidade para a combinação das análises bioquímicas com o diagnóstico de Doença de Fabry. Estimamos que pelo menos 3.000 participantes

estão incluídos para a triagem. A incidência estimada da doença de Fabry nesta população é estimada em 0,25. Assim, estima-se que 8 pacientes com diagnóstico de Fabry sejam suficientes para validar o teste.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o método de rastreamento da DF em mulheres com doença renal crônica, que combina a dosagem da atividade enzimática -GAL com a dosagem dos níveis plasmáticos de lyso-GL3.

#### Objetivo Secundário:

Estimar a prevalência de DF entre mulheres com doença renal crônica no Brasil.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### Riscos:

Os riscos na participação do projeto são pequenos pois envolvem apenas a coleta de sangue por punção capilar (coleta em papel de filtro)

##### Benefícios:

Esperamos a validação de um método de diagnóstico da DF em mulheres que apresente menor custo e maior eficácia em detrimento ao método

anteriormente utilizado (sequenciamento genético de todos os casos). Outro benefício será estabelecer uma nova forma de rastreamento da DF entre a população feminina envolve a definição da etiologia de base dessas pacientes, visto que ainda hoje é grande o número de pacientes que evoluem para terapia de substituição renal sem seguimento médico regular e também sem a correta definição do motivo da disfunção renal.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa relevante, já que através do estudo feita através de coleta de sangue da coleta de sangue em mais de 2000 mulheres em tratamento de doença renal crônica seja possível a validação de um método de diagnóstico da DF que apresente menor custo e maior eficácia em detrimento ao método anteriormente utilizado (sequenciamento genético de todos os casos). O custos será por conta do pesquisados, estimado em R\$ 400,00 com material de

escritório. O cronograma da pesquisa será 18/11/2022 à 04/02/2023, a pesquisa deverá iniciar após a aprovação do CEP.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios foram apresentados: Folha de rosto, anuência da FMB, projeto de pesquisa. Pede dispensa do TCLE, pois exames bioquímicos e genéticos coletados neste estudo foram por indicação clínica de cada centro tendo os pacientes assinado um termo de consentimento do laboratório que realiza as análises (laboratório DLE). Será analisado os dados agregados de forma anônima oferecidos pelo laboratório DLE sem consulta a prontuário. Os dados coletados serão somente os referentes às variáveis em estudo previstas no projeto de pesquisa e somente poderão ser utilizados para o projeto ao qual se vinculam. O acesso aos indivíduos que foram avaliados é bastante limitado, pois o trabalho será realizado somente com resultados de exames não identificados. Os indivíduos cujos resultados serão utilizados já receberam os resultados da investigação diagnóstica através do médico que os acompanha. Para a realização deste projeto solicita-se a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo fato de que não teremos acesso aos indivíduos cujos resultados serão avaliados. O desenvolvimento deste estudo implica em somente avaliar os resultados já obtidos pelos médicos responsáveis pelos indivíduos por eles acompanhados.

**Recomendações:**

Apresentar relatório final de atividades após finalização da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após análise em REUNIÃO ORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO do PROJETO de Pesquisa apresentado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO ORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 06/12/2021, do PROJETO de Pesquisa apresentado encontra-se APROVADO. O projeto de pesquisa deverá ter início somente após aprovação deste CEP.

Ao final da execução da pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

|                                  |                          |
|----------------------------------|--------------------------|
| Endereço: Chácara Butignoli, s/n |                          |
| Bairro: Rubião Junior            | CEP: 13.618-970          |
| UF: SP                           | Município: BOTUCATU      |
| Telefone: (14)3880-1609          | E-mail: cep@fmb.unesp.br |

Continuação do Parecer: 5.152.533

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                           | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1858402.pdf | 16/11/2021<br>14:52:41 |                                 | Aceito   |
| Outros                                                    | TermoDeAnuencialInstitucional.pdf             | 16/11/2021<br>14:52:25 | Luis Gustavo Modelli de Andrade | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | FolhaDeRostoAssinada.pdf                      | 16/11/2021<br>14:51:54 | Luis Gustavo Modelli de Andrade | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | termo_dispenza_TCLE.pdf                       | 16/11/2021<br>10:28:43 | Luis Gustavo Modelli de Andrade | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto_cassiano.docx                         | 12/11/2021<br>12:43:59 | Luis Gustavo Modelli de Andrade | Aceito   |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 08 de Dezembro de 2021

---

Assinado por:  
Trajano Sardenberg  
(Coordenador(a))

|                                                                                                                                                       |                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>Endereço:</b> Chácara Butignoli, s/n<br><b>Bairro:</b> Rubião Junior<br><b>UF:</b> SP <b>Município:</b> BOTUCATU<br><b>Telefone:</b> (14)3880-1609 | <b>CEP:</b> 18.518-970<br><br><b>E-mail:</b> cep@fmb.unesp.br |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARCIAIS DO TRABALHO NO CONGRESSO BRASILEIRO DE NEFROLOGIA EM 2022.



XXXI CONGRESSO  
**BRASILEIRO DE NEFROLOGIA**  
XIII Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia  
XIX Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia  
21 A 24 DE SETEMBRO DE 2022 • CENTROSUL • FLORIANÓPOLIS-SC

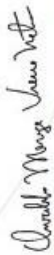
**Certificamos que o trabalho**

**RESULTADOS PARCIAIS DE UM ESTUDO BRASILEIRO SOBRE A AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA RASTREAMENTO DE DOENÇA DE FABRY EM MULHERES.**

foi apresentado na modalidade Apresentação oral, por Cassiano Augusto Braga Silva, no evento XXXI Congresso Brasileiro de Nefrologia, XIII Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia e XIX Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia ocorrido de 21 a 24 de setembro de 2022, na Centro de Convenções de Florianópolis (CentroSul) em Florianópolis/SC.

**24 de setembro de 2022**

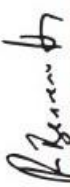
Para validar, acesse <http://www.comcongressos.com.br/validacao/?cod=55687537>



**Dr. Osvaldo Meregue Vieira Neto**  
Presidente da  
Sociedade Brasileira de Nefrologia



**Dr. José H. Rocco Suassuna**  
Diretor Científico da  
Sociedade Brasileira de Nefrologia



**Dr. Roberto Benvenuti**  
Presidente do XXXI Congresso  
Brasileiro de Nefrologia



**Dr. Marcelo Mazza do Nascimento**  
Chefe do Departamento de  
Ensino Titulação SEN

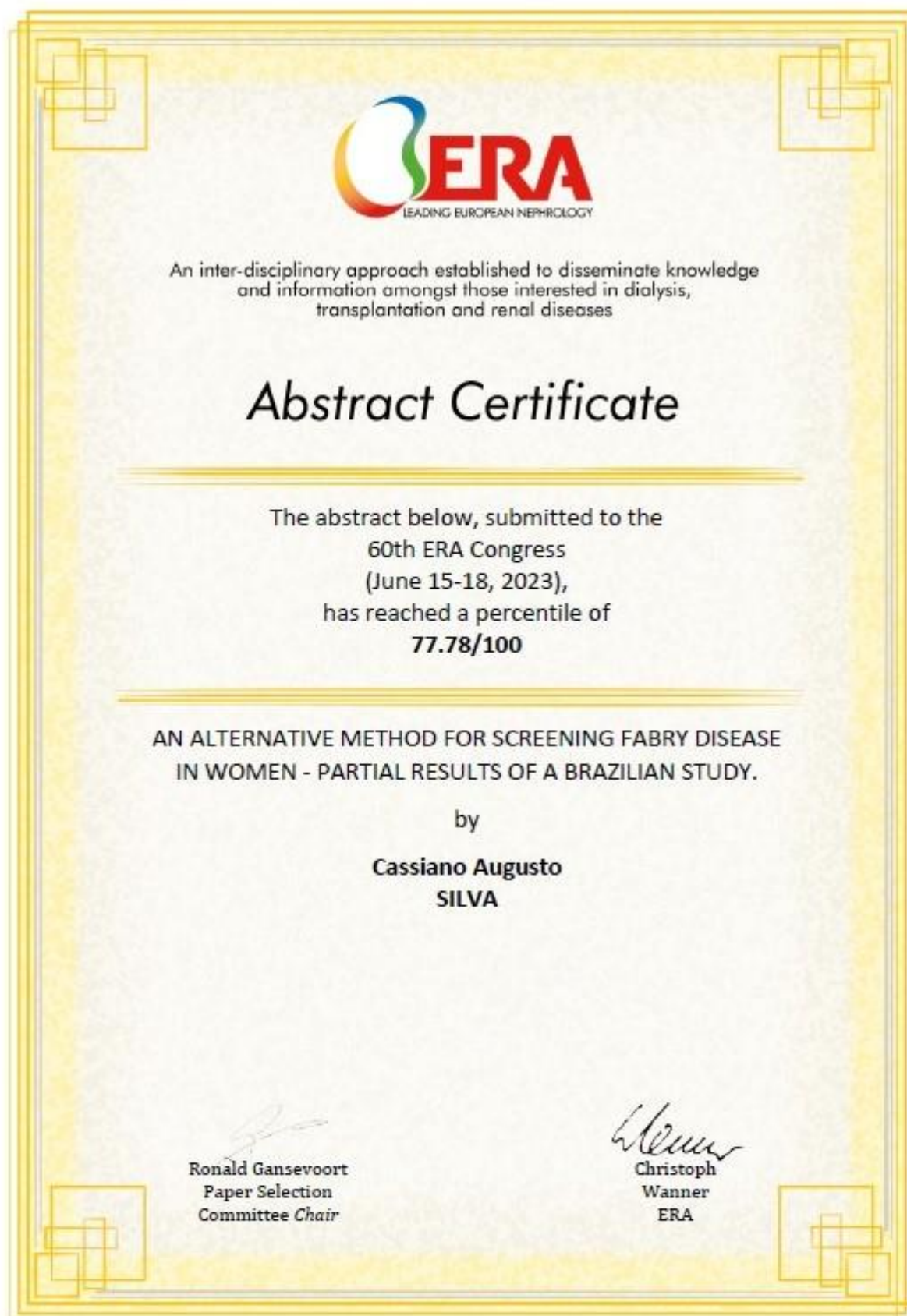


Hospital de Nefrologia



Gerenciamento  
**CCM GROUP**  
20 ANOS

ANEXO 3 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARCIAIS DO TRABALHO NO CONGRESSO EUROPEU DE NEFROLOGIA EM 2023.



ANEXO 4 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARCIAIS DO TRABALHO NO CONGRESSO PAULISTA DE NEFROLOGIA EM 2023.

CERTIFICADO



XXII Congresso Paulista de Nefrologia

Integrando Gerações na Era da Inteligência Artificial

18 A 21 OUT/2023

BOURBON ATIBAIA

CERTIFICAMOS QUE

CASSIANO AUGUSTO BRAGA SILVA

Participou do XXII Congresso Paulista de Nefrologia 2023, realizado no Hotel Bourbon Atibaia - SP, de 18 a 21 de outubro de 2023, na qualidade de Apresentador de TL na atividade Mini-conferência + TL: Nefrologia Clínica com o tema OR 3578: SCREENING FABRY DISEASE IN WOMEN COMBINING ENZYME ACTIVITY WITH LYSO-GB3 - PARTIAL RESULTS OF A BRAZILIAN STUDY.

Atibaia, 21 de outubro de 2023.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse <https://validacertificados.iweventos.com.br> e use o código: a8d758e026



Daniela Ponce  
Presidente do Congresso CPN 2023



Rosa Maria Affonso Moyses  
Presidente da Comissão Científica CPN 2023

Realização:

SONESP

60

ANEXO 5 – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PARA APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARCIAIS DO TRABALHO NO CONGRESSO AMERICANO DE NEFROLOGIA EM 2023.



ASN  
American Society of Nephrology

1401 H Street, NW • Suite 900 • Washington, DC 20005  
202.640.4660 • [www.ASN-online.org](http://www.ASN-online.org)

Friday, 11-Aug-2023

Dear Cassiano Augusto Silva:

On behalf of the American Society of Nephrology (ASN) and the Kidney Week Education Committee, thank you for submitting an abstract for ASN Kidney Week 2023 in Philadelphia, PA. We are pleased to inform you that your abstract **3941368 "Screening Fabry Disease in Women Combining Enzyme Activity With Lyso-GL3 - Results of a Brazilian Study"** has been selected by the Committee for poster presentation. The details of the poster session are outlined below:

**Poster Session**  
**Session Title:** Women's Health and Kidney Diseases [PO2200]  
**Session Date, Time:** November 3, 2023 from 10:00 AM to 12:00 PM  
**Your Poster Board #:** FR-PO845