

## Mutação do Gene *GLA* na Cardiomiopatia Hipertrófica com Descrição de Nova Variante: É Doença de Fabry?

*GLA Gene Mutation in Hypertrophic Cardiomyopathy with a New Variant Description: Is it Fabry's Disease?*

Ândrea Virgínia Chaves-Markman,<sup>1,2,3,4,5</sup> Manuel Markman,<sup>2</sup> Eveline Barros Calado,<sup>1</sup> Ricardo Flores Pires,<sup>6</sup> Marcelo Antônio Oliveira Santos-Veloso,<sup>3,4,5</sup> Catarina Maria Fonseca Pereira,<sup>7</sup> Andréa Bezerra de Melo da Silveira Lordseem,<sup>1,3,5</sup> Sandro Gonçalves de Lima,<sup>1,3,5</sup> Brivaldo Markman Filho,<sup>1</sup> Dinaldo Cavalcanti de Oliveira<sup>1,4,5</sup>

Universidade Federal de Pernambuco - Hospital das Clínicas - Área Acadêmica de Medicina Clínica - Centro de Medicina Clínica - CCM,<sup>1</sup> Recife, PE - Brasil

Hospital Agamenon Magalhães,<sup>2</sup> Recife, PE - Brasil

Universidade Federal de Pernambuco - Grupo de pesquisa em Epidemiologia e Cardiologia (EPICARDIO),<sup>3</sup> Recife, PE - Brasil

Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) - Universidade Federal de Pernambuco,<sup>4</sup> Recife, PE - Brasil

Centro Universitário Maurício de Nassau - Curso de Medicina,<sup>5</sup> Recife, PE - Brasil

Clínica de Doenças Metabólicas,<sup>6</sup> Porto Alegre, RS - Brasil

Cetogene AG,<sup>7</sup> Rostock - Alemanha

### Resumo

**Fundamento:** A doença de Fabry (DF) é uma doença de armazenamento lisossômico ligada ao cromossomo X, devido a mutações no gene da alfa galactosidase A (*GLA*), levando a deficiência enzimática de alfa-galactosidase ( $\alpha$ -Gal A) e acúmulo de globotriaosilceramida (Gb3) e globotriaosilsulfingosina (liso-Gb3), causando disfunção de múltiplos órgãos. **Objetivo:** Realizar a triagem do gene *GLA* em um grupo de pacientes com diagnóstico ecocardiográfico de cardiomiopatia hipertrófica (CMH).

**Métodos:** Estudo transversal realizado com pacientes com CMH em um hospital universitário. Pacientes com doença arterial coronariana e valvopatias foram excluídos. Foi realizada análise de mutação do gene *GLA*. Em indivíduos do sexo masculino, a análise foi realizada após evidência de baixa atividade de  $\alpha$ -Gal A.

**Resultados:** Foram incluídos 60 pacientes com diagnóstico ecocardiográfico de CMH. A idade variou de 12 a 85 anos e 60% eram mulheres. O percentual médio de fibrose miocárdica na RM foi  $10,7 \pm 13,1\%$  e a espessura ventricular média foi  $18,7 \pm 6,7$  mm. Quatro pacientes tinham as seguintes mutações do *GLA*: c.967C>A (p.Pro323Thr), ainda não descrita na literatura; c.937G>T (p.Asp313Tyr); e c.352C>T (p.Arg118Cys). Todos os pacientes apresentavam níveis normais de liso-Gb3 e fibrose miocárdica não isquêmica na ressonância magnética; um paciente apresentou proteinúria; um paciente apresentou taquicardia ventricular.

**Conclusão:** Neste estudo, a frequência de mutação no gene *GLA* em pacientes com CMH foi 6,7%. Uma nova mutação no exon 6 do gene *GLA*, c.967C>A (p.Pro323Thr), foi identificada. Pacientes com CMH podem ter mutações do *GLA* e a DF deve ser excluída. Os níveis plasmáticos de (liso-Gb3) não parecem ser suficientes para fazer um diagnóstico e biópsia de órgãos deve ser considerada. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(1):77-84)

**Palavras-chave:** Doença de Fabry/genética; Cardiomiopatia Hipertrófica; Hipertrofia Ventricular Esquerda; Glicosfingolípídeos.

### Abstract

**Background:** Fabry disease (FD) is an X-linked lysosomal storage disorder caused by mutations in the alpha galactosidase A gene (*GLA*) that lead to the enzymatic deficiency of alpha galactosidase ( $\alpha$ -Gal A), resulting in the accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) and globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3), causing multiple organ dysfunctions.

**Objective:** To perform *GLA* gene screening in a group of patients with echocardiographic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy (HCM).

**Methods:** A cross-sectional study was conducted with HCM patients from a university hospital. Patients with coronary artery disease and valvulopathies were excluded. Mutation analysis of the *GLA* gene was performed. In male subjects, the analysis was performed after evidence of low  $\alpha$ -Gal A activity.

**Results:** 60 patients with echocardiographic diagnosis of HCM were included. Age ranged from 12 to 85 years and 60% were women. Mean myocardial fibrosis percentage on MRI was  $10.7 \pm 13.1\%$  and mean ventricular thickness was  $18.7 \pm 6.7$  mm. Four patients had the following *GLA* gene mutations: c.967C>A (p.Pro323Thr), not yet described in the literature; c.937G>T (p.Asp313Tyr); and c.352C>T (p.Arg118Cys). All patients had normal levels of lyso-Gb3 and non-ischemic myocardial fibrosis on magnetic resonance imaging; one patient had proteinuria and one patient had ventricular tachycardia.

**Conclusion:** In this study, the frequency of mutation in the *GLA* gene in patients with HCM was 6.7%. A novel mutation in exon 6 of the *GLA* gene, c.967C>A (p.Pro323Thr), was identified. Patients with HCM may have *GLA* mutations and FD should be ruled out. Plasma (lyso-Gb3) levels do not seem to be sufficient to attain a diagnosis and organ biopsy should be considered. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(1):77-84)

**Keywords:** Fabry Disease/genetic; Cardiomyopathy, Hypertrophic; Hypertrophy, Left Ventricular; Glycosphingolipids.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Ândrea Virgínia Chaves-Markman •

Rua Doutor Pedro de melo Cahú, 51/2102. CEP 51020-080, Boa Viagem, Recife, PE - Brasil

E-mail: andreachaves.cardio@gmail.com

Artigo recebido em 14/06/2018, revisado em 31/10/2018, aceito em 01/11/2018

DOI: 10.5935/abc.20190112

## Fundamento

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é a cardiopatia de origem genética mais prevalente, causada por >1.400 mutações em genes codificando proteínas que são componentes de sarcômeros cardíacos e outras proteínas de estruturas relacionadas, tais como discos Z e discos intercalados.<sup>1-3</sup> Devido a avanços nas técnicas de biologia molecular, o diagnóstico diferencial da CMH foi ampliado e outros distúrbios genéticos que se apresentam com hipertrofia ventricular têm sido relatados.<sup>4</sup>

A doença de Fabry (DF) é uma condição genética rara ligada ao cromossomo X. É causada por erros inatos no metabolismo dos glicosíngolipídeos, devido a mutações no gene que codifica a enzima  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A). A deficiência total ou parcial dessa enzima resulta em acúmulo progressivo de globotriaosilceramida (Gb3) e globotriaosilsulfingosina (liso-Gb3) em alguns tecidos, particularmente nos vasos sanguíneos, rins e miocárdio.<sup>5-7</sup> Mais de 900 mutações com diferentes efeitos sobre a atividade enzimática da  $\alpha$ -Gal já foram descritas.<sup>8,9</sup>

A incidência de DF é estimada em 1: 40.000 a 117.000 indivíduos, homocigotos masculinos e heterocigotos femininos podem ser afetados.<sup>5,6,8,9</sup> Dois fenótipos são reconhecidos: uma forma clássica, que é caracterizada por um início precoce com manifestações durante a infância, e uma forma de início tardio, que frequentemente afeta apenas um órgão.<sup>5,6,8</sup> As alterações cardíacas parecem estar presentes nos estágios iniciais da vida; entretanto, geralmente não é clinicamente detectável até a terceira ou quarta décadas de vida.

Depósitos de glicosíngolipídeos em válvulas e vasos coronarianos são frequentes, podendo causar bloqueio atrioventricular total, insuficiência mitral, hipertrofia ventricular esquerda (HVE) ou isquemia miocárdica.<sup>10</sup>

Atualmente, mutações específicas estão associadas à variante cardíaca mostrando hipertrofia miocárdica que é clinicamente semelhante à CMH.<sup>11,12</sup> Os pacientes com DF estão em risco de desenvolver doença cerebrovascular (DCV), morte súbita cardíaca e insuficiência renal, e esses pacientes podem se beneficiar de tratamentos específicos.<sup>13-15</sup>

Neste estudo, foi realizada uma triagem para o gene *GLA* em um grupo de pacientes com diagnóstico ecocardiográfico de cardiomiopatia hipertrófica (CMH).

## Métodos

### Amostra

Um estudo transversal foi realizado em uma amostra de conveniência de pacientes com CMH atendidos no ambulatório de cardiologia de um hospital universitário de Recife, Pernambuco, Brasil. Todos os pacientes com diagnóstico ecocardiográfico de CMH com base nos critérios da *European Society of Cardiology*<sup>16</sup> foram incluídos. Pacientes com doença arterial coronariana, valvopatias e cardiomiopatia hipertensiva foram excluídos.

### Definições de CMH

Um ecocardiograma transtorácico (ETT) foi utilizado para estabelecer o diagnóstico de CMH com base nos seguintes critérios: hipertrofia ventricular máxima (HVM) inexplicável  $\geq 15$  mm em qualquer segmento cardíaco ou HVM  $\geq 13$  mm em um paciente com história familiar de CMH. A apresentação obstrutiva foi definida por um gradiente da via de saída do ventrículo esquerdo  $\geq 30$  mmHg em repouso ou após manobra de Valsalva ou em ortostatismo.<sup>13,16</sup>

### Avaliação Ecocardiográfica

O ETT foi previamente realizado em todos os indivíduos para estabelecer o diagnóstico de CMH (Vivid 7 ou Vivid E9 GE) com análise de conjuntos de dados off-line (EchoPac®, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Os diâmetros do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE), volume diastólico final do VE e volume sistólico final do VE foram determinados pelo modo M ou da imagem em 2D. O MVT de todos os segmentos foi medido no eixo curto paraesternal. A fração de ejeção (FE) e a função diastólica foram calculadas pelo método de Simpson e pelo Doppler pulsátil, respectivamente.<sup>17,18</sup>

### Imagem de ressonância magnética

A avaliação por ressonância magnética (RM) foi realizada em todos os pacientes com mutação do *GLA* para avaliar a presença de fibrose miocárdica, utilizando a técnica do realce tardio miocárdico (RTM). Um aparelho de RM de 1,5 T (MAGNETOM Essenza, Siemens Healthcare, Erlangen, Alemanha) com uma bobina de oito canais do tipo *Phased Array* foi utilizado. As imagens foram adquiridas no eixo curto cardíaco, da base ao ápice, com cortes de 8 mm e intervalos de 2 mm, utilizando a sequência Gradiente Eco ponderada em T1. Um pré-pulso inversão-recuperação e tempo de inversão ajustado foram utilizados para neutralizar o sinal miocárdico. A aquisição da imagem foi iniciada aproximadamente 8 a 10 minutos após a infusão do contraste de gadolínio a uma dose de 0,2 mmol/kg. O RTM aumenta a quantidade de contraste entre o tecido normal (escuro devido à neutralização do sinal) e o tecido fibrótico (branco devido ao aumento do gadolínio na sequência ponderada em T1).<sup>19</sup>

### Eletrocardiografia e eletrocardiografia dinâmica (Holter de 24 h)

Um eletrocardiograma de 12 derivações em repouso foi realizado em todos os pacientes. Um gravador digital contínuo (Cardio Light®, Cardio Sistemas Comerciais Industriais, São Paulo, Brasil) foi utilizado para registrar e analisar os testes Holter por 24 horas. Os eletrodos foram posicionados nas derivações eletrocardiográficas MV1, MV4 e MV6. Os resultados foram analisados utilizando o software *CardioManager 540®* (Cardio Sistemas Comerciais Industriais, São Paulo, Brasil) por um observador independente em busca de arritmias cardíacas.

### Ensaio molecular e enzimáticos

Todos os pacientes incluídos foram submetidos a dígito punção de sangue capilar e amostras coletadas em papel de filtro e colocadas para secar por 3-4 horas à temperatura ambiente, armazenadas em envelope plástico a 4°C e enviadas ao *Centogene Laboratory* (Rostock, Alemanha).

A análise molecular para determinar as mutações do gene *GLA* foi realizada nas amostras dos indivíduos do sexo feminino, enquanto a análise de mutação foi realizada após evidência de baixa atividade de  $\alpha$ -Gal A em indivíduos do sexo masculino. O nível de expressão e a atividade enzimática do biomarcador liso-Gb3 foram identificados através de cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa em tandem.

O gene *GLA* foi analisado utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de todas as regiões codificadoras e limites exon-intron altamente conservados através de sequenciamento de próxima geração com Illumina HiSeq (Illumina, Califórnia, EUA). A análise do gene *GLA* foi realizada em todos os pacientes com CMH.

### Análises estatísticas

Os dados foram analisados de forma descritiva utilizando o software *Statistical Package for Social Sciences*, versão 20.0 (IBM Company, Armonk, NY, EUA). Antes de analisar as variáveis contínuas, os conjuntos de dados foram testados quanto à normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentadas com medidas de tendência central e dispersão (média e desvio-padrão), e as variáveis categóricas foram descritas como frequências absolutas (n) e relativas (%). A análise comparativa foi realizada pelo teste de qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas. As variáveis numéricas foram analisadas usando o teste *t* de Student pareado. O nível de significância foi definido como 5% através de toda a análise estatística ( $p < 0,05$ ).

O teste *t* de Student pareado foi utilizado para comparar as características basais de ambos os grupos, HCM e com mutações no gene *GLA*, e o teste qui-quadrado de Pearson foi utilizado para identificar quaisquer associações entre as variáveis clínicas.

### Padrões éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional e foi realizado de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das diretrizes e normas para pesquisas envolvendo seres humanos. A investigação também foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque. O consentimento livre e informado foi obtido de todos os pacientes antes da inclusão neste estudo.

### Resultados

Foram incluídos 60 pacientes com diagnóstico ecocardiográfico de CMH submetidos a testes moleculares para DF. Sua idade variou de 12 a 85 anos (média de  $42,3 \pm 17$ ) e 60% (n = 36) eram mulheres. Quatro pacientes, sendo três mulheres, apresentaram mutações no gene *GLA*, correspondendo a 6,7% da nossa amostra.

Síncope e dispneia foram os sintomas cardíacos mais frequentes em todos os pacientes. A cardiomiopatia hipertrófica septal assimétrica foi o tipo mais frequente em pacientes sem mutações no gene *GLA* (61,5%) e no grupo com mutação no *GLA* (50%). A FE foi semelhante em ambos os grupos. Os padrões eletrocardiográficos mais comuns de todos os pacientes foram hipertrofia ventricular esquerda (37,9%), bloqueio atrioventricular (13,8%) e bloqueio de ramo esquerdo (10,3%). As características clínicas e epidemiológicas da nossa amostra são mostradas na Tabela 1.

Três mutações com variantes heterozigotas foram encontradas: c.967C>A (p.Pro323Thr), a qual é uma nova mutação ainda não descrita na literatura (Figura 1); c.937G>T (p.Asp313Tyr); e c.352C>T (p.Arg118Cys). Uma variante homozigota também foi encontrada: c.352C>T (p.Arg118Cys). Cinco pacientes do sexo masculino foram submetidos à análise molecular devido à baixa atividade da enzima  $\alpha$ -Gal A; no entanto, nenhum deles apresentava mutações no gene *GLA*. As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com mutações no *GLA* estão descritas na Tabela 2.

### Discussão

Em nossa amostra de 60 pacientes com CMH, determinamos através de testes moleculares que a prevalência de mutações no *GLA* foi de 6,7%. Além disso, encontramos uma nova mutação no gene *GLA*. A reposição de enzimas foi iniciada em um paciente com mutação no *GLA*.

A DF tem herança ligada ao X. O distúrbio clássico ligado ao cromossomo X geralmente mostra uma transmissão vertical, na qual as mulheres heterozigotas transmitem o alelo para sua descendência. A maioria das mutações nos genes ligados ao X resulta em doenças que só ocorrerão em homens. No entanto, algumas doenças ligadas ao cromossomo X apresentam diferentes taxas de penetrância e expressividade em ambos os sexos. Na DF, os indivíduos heterozigotos (mulheres) geralmente são afetados, mas tendem a ter um fenótipo mais leve e mais variável do que os homozigotos (homens).<sup>20</sup>

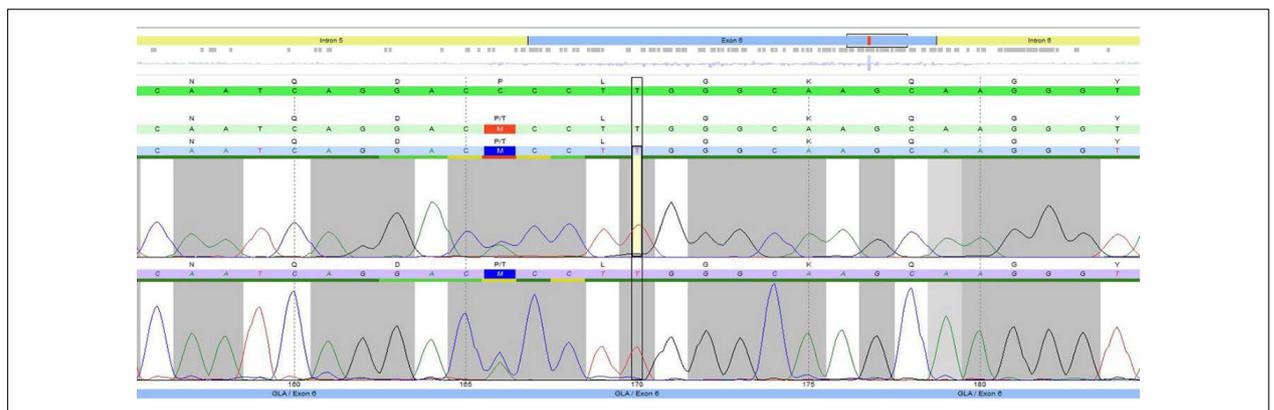
Estima-se que a prevalência de DF seja de 0,02-0,09: 10.000 na população geral, embora a triagem molecular em recém-nascidos tenha sugerido uma prevalência maior.<sup>21,22</sup> Em relação à variante cardíaca, a prevalência pode ser de até 12%, dependendo do método utilizado.<sup>23-26</sup>

A média da HVM em pacientes com mutação do *GLA* em nossa amostra foi maior do que a encontrada em estudos anteriores. A média da HVM foi de  $11,6 \pm 3,3$  mm no estudo de Koskenvuo et al.,<sup>27</sup> e, apenas, oito pacientes tinham HVE. A média da HVM foi de  $16,7 \pm 1,9$  mm no estudo de Takenaka et al.,<sup>28</sup> mais próximo do encontrado neste estudo. Pacientes com mutação no gene *GLA* foram selecionados de uma amostra de CMH, o que pode explicar a tendência para os valores médios mais elevados da HVM. Em nosso estudo, pacientes com mutações no *GLA* tinham média de idade maior. Esse achado talvez possa ser atribuído ao fato de que a variante cardíaca da DF apresentar início mais tardio.

**Tabela 1 – Características clínicas e resultados de exames complementares de pacientes**

		CMH (n = 56)	Mutação do GLA (n = 4)	Valor de p
Idade (anos)		42,3 ± 17,0	58,5 ± 15,2	0,11
Sexo (feminino)		59,9%	75%	0,53
FE (%) †		67,6 ± 8,6	65,0 ± 4,2	0,43
Sintomas Cardíacos	Dispneia	8%	25%	0,80
	Dor Precordial	5%	-	
	Síncope	17,5%	50%	
	Palpitação	5%	-	
	Tontura	7%	-	
Predominância de HVE †	Apical	5,56%	25%	0,38
	Concêntrica	25%	25%	
	AS	61,1%	50%	
	AM	0,05%	-	
	HMP	2,78%	-	
HVM (mm) †		19,1 ± 6,4	18,7 ± 0,9	0,98
Fibrose na RM (%)		11,0 ± 13,9	12,0 ± 11,6	0,82
	VSVE	38,5%	100%	0,83
	AEA	10,3%	-	
	RVA	28,6%	-	
	BCRE	10,3%	25%	
	BAV	5,1%	50%	
	QRSFrag	20,5%	-	

CMH: cardiomiopatia hipertrófica; FE: fração de ejeção; HVE: hipertrofia ventricular esquerda; AS: assimétrica septal; AM: ânteromedial; HMP: hipertrofia do músculo papilar; HVM: hipertrofia ventricular máxima; RM: ressonância magnética; ECG: eletrocardiograma; VSVE: via de saída do ventrículo esquerdo; AEA: átrio esquerdo aumentado; RVA: repolarização ventricular anormal; BCRE: bloqueio de ramo esquerdo; BAV: bloqueio atrioventricular; QRSFrag: fragmentação de QRS. † medida via ecocardiografia transtorácica (ETT).



**Figura 1 – Cromatograma da nova mutação do gene GLA: c.967C>A (p.Pro323Thr).**

Em relação ao padrão de hipertrofia, a DF está predominantemente associada à hipertrofia concêntrica.<sup>29</sup> No entanto, alguns estudos encontraram maior prevalência da variedade assimétrica,<sup>25</sup> o que está de acordo com nossos resultados. Essa variedade é geralmente associada às formas graves da doença.<sup>25,29</sup>

O bloqueio atrioventricular estava presente nos achados eletrocardiográficos (ECG) em dois pacientes com mutação do GLA (50%), o que está de acordo com achados de estudos anteriores.<sup>29</sup> Entretanto, anormalidades de repolarização foram comuns em pacientes com CMH, mas não em pacientes com DF, como esperado. Essas anormalidades estão associadas

Tabela 2 – Características clínicas e resultados de exames complementares de pacientes com DF

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Idade (anos)	69	39	72	53
Sexo	F	F	F	M
Sintomas Cardíacos	Síncope	Síncope, dispneia	Não	Não
Sintomas Extracardíacos	AIT	Acroparestesia, intolerância ao calor/frio, alterações de humor	Acroparestesia, trombose arterial	AVCi
ECG	FCN, SVE, BAVPG, BCRE	FCN, SVE	FCN, SVE, BAVPG	FCN, SVE
Holter de 24h	8 episódios de TV, 677 CVP	Sem arritmias	AFib Paroxística	Sem arritmias
EF †	67%	60%	70%	65%
Predominância de HVE †	Apical	Hipertrofia septal assimétrica	Hipertrofia septal assimétrica	Concêntrica
HVM (mm) †	19	20	18	18
Disfunção diastólica †	Leve	Pseudo-normal	Leve	Leve
LVOTO †	Não	Não	Não	Não
Fibrose na RM	6%	28%	13%	1.36%
MSF	Yes	Yes	No	No
CDI	Yes	Yes	No	No
Mutação no gene GLA	c.967C>A (p. Pro323Thr)	c.937G>T (p.Asp313Tyr)	c.352C>T (p.Arg118Cys)	c.352C>T (p.Arg118Cys)
Alto nível de lyso-Gb3	Não	Não	Não	Não
Baixo nível de α-Gal A	NM	NM	NM	Sim
Proteinúria	Não	Não	Sim	Não

F: feminino; M: masculino; AIT: ataque isquêmico transitório; AVCi: acidente vascular cerebral isquêmico; ECG: eletrocardiograma; FCN: frequência cardíaca normal; SVE: sobrecarga ventricular esquerda; BAVPG: bloqueio atrioventricular de primeiro grau; BCRE: bloqueio de ramo esquerdo; TV: taquicardia ventricular; CVP: contração ventricular prematura; AFib: fibrilação atrial; FE: fração de ejeção; HVE: hipertrofia ventricular esquerda; HVM: hipertrofia ventricular máxima; LVOTO: obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo; RM: ressonância magnética; MSF: morte súbita familiar; CDI: cardioversor-desfibrilador implantável; NM: não medido. † medição via ecocardiografia transtorácica (ETT).

à hipertrofia concêntrica leve.<sup>30</sup> Em nosso estudo, apenas um paciente apresentou hipertrofia concêntrica, o que pode explicar a ausência de anormalidades de repolarização nos resultados do ECG de nossos pacientes com mutação do GLA.

A média do porcentual de fibrose miocárdica na RM foi  $12 \pm 11,6\%$  e  $10,5 \pm 13,7\%$  em pacientes com mutação do GLA e sem mutação, respectivamente. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparados ( $p = 0,85$ ). Embora a apresentação clínica da DF tenha sido bem descrita, o mecanismo fisiopatológico que liga o acúmulo intracelular de Gb3 ao dano tecidual e às manifestações clínicas ainda não está bem estabelecido.<sup>31</sup> Pressupõe-se que o armazenamento intracelular de Gb3 desencadeie importantes cascatas fisiopatológicas relacionadas aos processos inflamatórios, levando a alterações celulares miocárdicas e, com o tempo, à fibrose.<sup>31-33</sup>

A mutação do GLA não foi associada a nenhum padrão específico de realce tardio pelo gadolínio (RTG) na ressonância magnética. O paciente 2 mostra o RTG no septo médio ventricular basal, septo anterior, segmento lateral inferior e apical do ventrículo esquerdo. O paciente 3 mostra o RTG no septo interventricular, na parede inferior e nos pontos de inserção do ventrículo direito. O paciente 4 mostra o RTG nos segmentos basais do septo inferior e segmentos da parede inferior do ventrículo direito. Informações sobre o RTG no paciente 1 não estavam disponíveis.

Uma das variantes encontradas não foi descrita em estudos anteriores nos bancos de dados do *Exome Aggregation Consortium*, *Exome Sequencing Project* ou *1000 Genomes Browser*. A variante c.967C>A (p.Pro323Thr), está localizada no exon 6 do gene GLA. Esta mutação resulta na substituição de um aminoácido de treonina por um aminoácido prolina na posição 323 da proteína. Esta posição mostra um nucleotídeo altamente conservado e um aminoácido altamente conservado, com diferenças físico-químicas moderadas entre os aminoácidos prolina e treonina. Ela apresenta características de patogenicidade, com base na análise utilizando os programas Polyphen-2, SIFT, MutationTaster e Align-GVGD. O paciente 1, portador dessa mutação, apresentava defeitos cardíacos graves, manifestando-se como arritmia e hipertrofia, sem outras causas explicáveis.

A variante 352C>T (p.Arg118Cys) no exon 2 do gene GLA foi inicialmente descrita como sendo patogênica por Spada et al.,<sup>34</sup> De acordo com Ferreira et al.,<sup>35</sup> a deficiência enzimática moderada relacionada à variante p.Arg118Cys pode não ser suficiente para causar complicações maiores da DF, sugerindo baixa patogenicidade.<sup>35</sup> Essa mutação foi encontrada em dois pacientes não aparentados (pacientes 3 e 4), ambos com HVE. O paciente 3 também apresentou bloqueio atrioventricular de primeiro grau e fibrilação atrial paroxística no ECG, bem como proteinúria. O paciente 4 tinha histórico de acidente vascular cerebral isquêmico. Apesar da controvérsia sobre

a patogenicidade dessa variante, os autores acreditam que ela pode causar manifestações órgão-específicas, tais como comprometimento cardíaco e cerebral.

Com relação à terceira variante encontrada no exon 6 do gene *GLA*, *GLA* c.937G>T (p.Asp313Tyr) no paciente 2, há também resultados contraditórios sobre sua patogenicidade. Alguns estudos mostraram que o genótipo D313Y não é responsável por lesões orgânicas graves similares àquelas associadas aos genótipos bem estabelecidos da DF clássica.<sup>36</sup>

Lenders et al.,<sup>36</sup> e Niemann et al.,<sup>37</sup> relataram que a presença dessa variante está potencialmente associada a lesões importantes da substância branca no sistema nervoso central.<sup>36,37</sup> A paciente apresentava hipertrofia cardíaca grave, história de hipertensão arterial sistêmica descontrolada e queixava-se de dor generalizada com labilidade emocional. Ela vem recebendo terapia de reposição enzimática há seis meses e tem mostrado melhora significativa dos sintomas e controle da pressão arterial.

O estudo das variantes c.937G>T (p.Asp313Tyr) e c.352C>T (p.Arg118Cys) mostra resultados contraditórios na literatura, mas os autores acreditam que as mesmas sejam patogênicas. A variante p. Asp313Tyr, encontrada neste grupo, foi identificada em membros da mesma família e todos seguem a herança ligada ao X, com hipertrofia e sintomas cardíacos importantes. Em relação à p.Arg118Cys, que também mostrou resultados controversos na literatura, foi encontrada em dois pacientes de diferentes famílias nesse grupo. Um é um homem homocigoto com hipertrofia cardíaca e acidente vascular cerebral isquêmico; a outra é uma paciente heterocigota, também com hipertrofia cardíaca, trombose arterial e proteinúria. Os autores estão atualmente trabalhando com o objetivo de reunir mais evidências sobre a patogenicidade dessas variantes nos outros membros da família.

A nova variante encontrada, c.967C>A (p. Pro323Thr), parece ser patogênica, de acordo com a análise realizada com os softwares Polyphen-2, SIFT, MutationTaster e Align-GVGD. Como dito anteriormente, a paciente é uma mulher heterocigota com hipertrofia cardíaca e ataque isquêmico transitório, e a investigação dos membros da família sugere patogenicidade.

Embora as variantes 352C>T (p.Arg118Cys) e c.937G>T (p.Asp313Tyr) apresentem resultados controversos em relação à patogenicidade, o heredograma das famílias confirma uma herança ligada ao X. Um dos resultados mais relevantes do estudo foi a identificação de uma nova mutação no gene *GLA* que parece ser patogênica, além da identificação de outros 14 portadores entre os familiares dos quatro pacientes-índice. A probabilidade de realizar terapia de reposição enzimática e acompanhantes farmacológicos enfatiza a importância do diagnóstico precoce da DF<sup>38-40</sup> e a busca para identificar a patogenicidade das variantes encontradas.

### Limitações

As principais limitações do nosso estudo foram: a ausência de cálculo amostral, o pequeno tamanho da amostra devido

à raridade da doença e o pequeno número de pacientes com mutações no *GLA* (as análises estatísticas foram limitadas). Além disso, a análise molecular dos genes sarcoméricos em pacientes com CMH não foi realizada.

O mapeamento de T1 foi realizado em imagens de ressonância magnética apenas para o paciente 4. No momento das outras avaliações por imagem, o mapeamento de T1 por RM não estava disponível em nossa instituição. Os autores entendem que uma biópsia renal ou cardíaca poderia ser realizada para confirmar a patogenicidade dessas variantes incertas.

### Conclusão

Neste estudo, a frequência de mutação no gene *GLA* em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica foi de 6,7%. Uma nova mutação no exon 6 do gene *GLA*, c.967C>A (p.Pro323Thr), foi identificada. Pacientes com CMH podem ter mutações do *GLA* e a doença de Fabry deve ser excluída. Os níveis plasmáticos de liso-Gb3 parecem não ser suficientes para o diagnóstico, e a biópsia de órgãos deve ser considerada.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Chaves-Markman AV, Markman Filho B, Oliveira DC; Obtenção de dados: Chaves-Markman AV, Markman M, Calado EB, Pereira CMF, Lordsleem, ABMS; Análise e interpretação dos dados: Chaves-Markman AV, Santos-Veloso MAO, Lima SG, Markman Filho B, Oliveira DC; Análise estatística: Lima SG, Oliveira DC; Redação do manuscrito: Chaves-Markman AV, Calado EB, Pires RF; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Chaves-Markman AV, Markman Filho B, Oliveira DC.

### Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Ândrea Virginia Chaves-Markman pela Universidade Federal de Pernambuco.

### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães sob o número de protocolo 3076174. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinque de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

## Referências

1. Baptista A, Magalhães P, Leão S, Carvalho S, Mateus P, Moreira I. Screening for fabry disease in left ventricular hypertrophy: documentation of a novel mutation. *Arq Bras Cardiol.* 2015;105(2):139-44.
2. Boggio P, Luna PC, Abad ME, Larralde M. Doença de Fabry. *An Bras Dermatol.* 2009;84(4):367-76.
3. Niemann M, Weidemann F. Echocardiography in Fabry disease. *Cardiogenetics.* 2013;3(1):e3.
4. Mattos BP, Torres MAR, Freitas VC. Diagnostic evaluation of hipertrophic cardiomyopathy in its clinical and preclinical phases. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(1):55-62.
5. Albuquerque CV. Anderson Fabry's disease: cardiac manifestations. *Rev Bras Ecocardiogr Imagem Cardiovasc.* 2012;25(3):214-8.
6. Gómez MG, Varas C, Morales M, Bonacic F, Alvarez M, Rojas A. Cardiac involvement in patients with Fabry's disease. *Rev Chil Cardiol.* 2013;32(1):28-33.
7. Kaminsky P, Noel E, Jaussaud R, Leguy-Seguín V, Hachulla E, Zenone T, et al. Multidimensional analysis of clinical symptoms in patients with Fabry's disease. *Int J Clin Pract.* 2013;67(2):120-7.
8. Hughes DA. Fabry disease: will markers of early disease enable early treatment and better outcomes? *Curr Opin Cardiol.* 2016;31(4):434-9.
9. Stenson PD, Mort M, Ball E V, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136(6):665-77.
10. Linhart A, Elliott PM. The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Heart.* 2007;93(4):528-35.
11. Csányi B, Hategan L, Nagy V, Obál I, Varga ET, Borbás J, et al. Identification of a novel GLA gene mutation, p.Ile239Met, in Fabry Disease with a predominant cardiac phenotype. *Int Heart J.* 2017;58(3):454-8.
12. Hsu TR, Hung SC, Chang FP, Yu WC, Sung SH, Hsu CL, et al. Later onset Fabry disease, cardiac damage progress in silence. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(23):2554-63.
13. Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, Wilcox WR, Whitley CB, McDonald M, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007;146(2):77-86.
14. Germain DP, Charrow J, Desnick RJ, Guffon N, Kempf J, Lachmann RH, et al. Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *J Med Genet.* 2015;52(5):353-8.
15. Wu JC, Ho CY, Skali H, Abichandani R, Wilcox WR, Banikazemi M, et al. Cardiovascular manifestations of Fabry disease: relationships between left ventricular hypertrophy, disease severity, and alpha-galactosidase A activity. *Eur Heart J.* 2010;31(9):1088-97.
16. Task Force members, Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2014;35(39):2733-79.
17. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF 3rd, Dokainish H, Edvardsen T, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr.* 2016;29(4):277-314.
18. Steeds RP, Garbi M, Cardim N, Kasprzak JD, Sade E, Nihoyannopoulos P, et al. EACVI appropriateness criteria for the use of transthoracic echocardiography in adults: a report of literature and current practice review. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2017;18(11):1191-204.
19. Sara L, Szarf G, Tachibana A, Shiozaki AA, Villa AV, Oliveira AC, et al. II Diretriz de Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia e do Colégio Brasileiro de Radiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(6 supl 3):1-86.
20. Pinto LL, Vieira TA, Giugliani R, Schwartz IV. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. *Orphanet J Rare Dis.* 2010 May 28;5:14.
21. Mechtler TP, Stary S, Metz TF, De Jesús VR, Greber-Platzer S, Pollak A, et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet.* 2012;379(9813):335-41.
22. Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat.* 2009;30(10):1397-405.
23. Hagege AA, Caudron E, Damy T, Roudaut R, Millaire A, Etchecopar-Chevreuil C, et al. Screening patients with hypertrophic cardiomyopathy for Fabry disease using a filter-paper test: the FOCUS study. *Heart.* 2011;97(2):131-6.
24. Monserrat L, Gimeno-Blanes JR, Marín F, Hermida-Prieto M, García-Honrubia A, Pérez I, et al. Prevalence of Fabry disease in a cohort of 508 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(25):2399-403.
25. Chimenti C, Pieroni M, Morgante E, Antuzzi D, Russo A, Russo MA, et al. Prevalence of Fabry disease in female patients with late-onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;110(9):1047-53.
26. Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2002;105(12):1407-11.
27. Koskenvuo JW, Engblom E, Kantola IM, Hartiala JJ, Saraste A, Kiviniemi TO, et al. Echocardiography in Fabry disease: diagnostic value of endocardial border binary appearance. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2009;29(3):177-80.
28. Takenaka T, Teraguchi H, Yoshida A, Taguchi S, Ninomiya K, Umekita Y, et al. Terminal stage cardiac findings in patients with cardiac Fabry disease: An electrocardiographic, echocardiographic, and autopsy study. *J Cardiol.* 2008;51(1):50-9.
29. Yousef Z, Elliott PM, Cecchi F, Escoubet B, Linhart A, Monserrat L, et al. Left ventricular hypertrophy in Fabry disease: a practical approach to diagnosis. *Eur Heart J.* 2013;34(11):802-8.
30. Goldman ME, Cantor R, Schwartz MF, Baker M, Desnick RJ. Echocardiographic abnormalities and disease severity in Fabry's disease. *J Am Coll Cardiol.* 1986;7(5):1157-61.
31. De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab.* 2013;109(1):93-9.
32. Seydelmann N, Wanner C, Störk S, Ertl G, Weidemann F. Fabry disease and the heart. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(2):195-204.
33. Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB, Deon M, Ribas GS, Barschak AG, et al. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(2):226-32.
34. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukul T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2006;79(1):31-40.
35. Ferreira S, Ortiz A, Germain DP, Viana-Baptista M, Caldeira-Gomes A, Camprecios M, et al. The alpha-galactosidase A p.Arg118Cys variant does not cause a Fabry disease phenotype: data from individual patients and family studies. *Mol Genet Metab.* 2015;114(2):248-58.

36. Lenders M, Duning T, Schelleckes M, Schmitz B, Stander S, Rolfs A, et al. Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the  $\alpha$ -Galactosidase A gene. *PLoS One*. 2013;8(2):e55565.
37. Niemann M, Rolfs A, Giese A, Mascher H, Breunig F, Ertl G, et al. Lyso-Gb3 indicates that the Alpha-Galactosidase A Mutation D313Y is not clinically relevant for Fabry disease. *JIMD Rep*. 2013;7:99-102.
38. Kampmann C, Perrin A, Beck M. Effectiveness of agalsidase alfa enzyme replacement in Fabry disease: cardiac outcomes after 10 years' treatment. *Orphanet J Rare Dis*. 2015 Sep 29;10:125.
39. Biegstraaten M, Arngímsson R, Barbey F, Boks L, Cecchi F, Deegan PB, et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet J Rare Dis*. 2015 Mar 27;10:36.
40. Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, Bichet DG, Giugliani R, Wilcox WR, et al. Treatment of Fabry's disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N Engl J Med*. 2016;375(6):545-55.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição pelo Creative Commons