



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO DE
MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR

DOENÇA DE FABRY:
ESTUDO DA FREQUÊNCIA
DAS VARIANTES ALÉLICAS DO GENE *GLA*
NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Sérgio Bernardo de Sousa

2007

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO DE
MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR

DOENÇA DE FABRY:
ESTUDO DA FREQUÊNCIA
DAS VARIANTES ALÉLICAS DO GENE *GLA*
NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
para cumprimento dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina e Oncologia Molecular,
realizada sob a orientação da Professora Doutora Filipa Carvalho
(Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)

Sérgio Bernardo de Sousa

2007

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Filipa Carvalho e ao Dr. João Paulo Oliveira pelo empenho pessoal, disponibilidade e exigência que dedicaram à orientação deste projecto.

À Dr^a. Susana Oliveira, um agradecimento particular pela paciência, o tempo dispendido, o apoio e a partilha de resultados e da sua experiência.

Aos restantes elementos do Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, em especial à Dr^a. Susana Fernandes, agradeço pela ajuda sempre disponível, amizade e óptimo ambiente de trabalho proporcionado.

À minha colega Dr^a. Margarida Venâncio, a minha gratidão pelo companheirismo e amizade ao longo destes anos, em especial durante a realização das componentes teórica e prática deste mestrado.

Ao Professor Doutor Jorge Saraiva, agradeço pelo incentivo dado à realização deste mestrado, pelas sugestões sempre oportunas, pela disponibilidade, pelo rigor científico e pela orientação nos diferentes aspectos da minha carreira.

À Dr^a. Lina Ramos, agradeço também pelo seu incentivo e orientação mas em especial pelo seu carinho, atenção e entusiasmo que a todos contagia.

Agradeço à minha família, em especial ao meu pai pelo exemplo que me deu e à minha mãe pela sua entrega incondicional, à Susana por todos os momentos em que não estive ao seu lado e aos meus amigos por todo o apoio demonstrado.

RESUMO

A doença de Fabry (MIM+301500) é uma doença de hereditariedade ligada ao cromossoma X resultante da actividade reduzida da enzima lisossomal α -galactosidase A, necessária para o catabolismo dos glicoesfingolípidos e codificada pelo gene *GLA*, localizado em Xq22.1.

No decurso do estudo genético do gene *GLA* em doentes com suspeita de Doença de Fabry são encontradas variações da sequência de referência publicada, cuja interpretação, com alguma frequência, se revela problemática. Um dos parâmetros necessários para a classificação como mutação patogénica ou como variação polimórfica é a avaliação da sua frequência numa população de controlos saudáveis.

Deste modo, neste trabalho, usando metodologia adequada, avaliámos, numa população de 114 indivíduos portugueses, 43 do sexo masculino e 71 do sexo feminino (no total: 185 cromossomas X), a frequência das variantes alélicas encontradas até ao momento na população portuguesa, algumas das quais não tinham sido previamente descritas: -30ATGG>A, -12ATGG>A, -10ATGC>T IVS4+68A>G; IVS4+1518CTTAAA>del6bp; IVS4+1583T>C; IVS4+1703A>G; e IVS6+249C>T. A maioria destas variações já estava reportada como polimorfismo mas poucas tinham estudos populacionais adequados.

Confirmámos que todas variantes estudadas são polimorfismos, sendo a variação -30ATG G>A a única na nossa população com uma frequência inferior a 1% (0,5%). Em cada variante, comparámos estatisticamente as frequências genotípicas com as que seriam de esperar pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, concluindo que todas as variantes estudadas estão de acordo com o referido modelo, excepto a variante IVS4+1703 A>G, cujos os dados observados diferem dos esperados, para o nível de significância escolhido de 5%.

Finalmente, concluímos pela existência de segregação conjunta entre alguns destes polimorfismos. A interpretação dos dados obtidos sugere a existência de 7 haplótipos diferentes na população estudada, tendo sido formuladas duas possíveis hipóteses explicativas para a sua génese.

ABSTRACT

Fabry disease (MIM+301500) is an X-linked condition caused by deficient activity of the lysosomal enzyme α -galactosidase A, necessary for the glycosphingolipid catabolism and coded by the gene *GLA*, located in Xq22.1.

During the molecular analysis of the *GLA* gene in patients with a possible form of Fabry disease, several sequence variants are found which interpretation is frequently problematic. One of the parameters required for the classification as a pathogenic mutation or a polymorphism is the evaluation of its frequency in a healthy control population.

In this study, using appropriate methods, in a population of 114 Portuguese individuals, 43 males and 71 females (in a total of 185 X chromosomes), we evaluated the frequency of the allelic variants found so far in the Portuguese population, some of which have not previously been described: -30ATGG>A, -12ATGG>A, -10ATGC>T IVS4+68A>G; IVS4+1518CTTAAA>del6bp; IVS4+1583T>C; IVS4+1703A>G; and IVS6+249C>T. Most of these variants were already reported as polymorphisms but few had proper population studies.

We confirmed that all the analysed variants were polymorphisms, being the variant -30ATGG>A the only with a frequency below 1% (0,5%). In each polymorphism, we compared statistically the genotypic frequencies we those expected by the Hardy-Weinberg Equilibrium. We concluded that all the polymorphisms were in accordance with the referred model except the variant IVS4+1703 A>G, which observed data is different from the expected data, for the level of significance of 5%.

Finally, we found the existence of linkage disequilibrium between some polymorphisms. The analysis of the data obtained suggests the existence of 7 different haplotypes in our population, having been proposed two possible hypotheses for their genesis.

ÍNDICE GERAL

| CAPÍTULOS | Pág. |
|---|-------------|
| Resumo..... | iv |
| Abstract..... | v |
| Índice Geral..... | vi |
| Índice de Figuras..... | viii |
| Índice de Quadros..... | x |
| Lista de Abreviaturas..... | xii |
| 1. Introdução – A Doença de Fabry | 1 |
| 1.1. Perspectiva histórica | 2 |
| 1.2. Patogénese e manifestações clínicas | 4 |
| 1.2.1. A Doença de Fabry clássica | 5 |
| 1.2.1.1. Homens afectados | 5 |
| 1.2.1.2. Mulheres heterozigotas | 13 |
| 1.2.2. A variante cardíaca da Doença de Fabry | 15 |
| 1.2.2.1. Homens afectados | 15 |
| 1.2.2.2. Mulheres heterozigotas | 16 |
| 1.2.3. A variante renal da Doença de Fabry | 16 |
| 1.2.3.1. Homens afectados | 16 |
| 1.2.3.2. Mulheres heterozigotas | 17 |
| 1.2.4 A variante neurológica da Doença de Fabry | 17 |
| 1.3. O gene <i>GLA</i> e a proteína α -galactosidase A | 18 |
| 1.4. A patologia molecular na Doença de Fabry | 25 |
| 1.5. Correlações genótipo-fenótipo | 30 |
| 1.6. Diagnóstico e tratamento da Doença de Fabry | 34 |
| 1.7. Aconselhamento genético | 37 |
| 2. Objectivos | 40 |

| | |
|---|----|
| 3. Material e Métodos | 41 |
| 3.1. Amostra | 41 |
| 3.2. Variações de sequência a avaliar | 41 |
| 3.2.1. Extracção de DNA | 42 |
| 3.2.2. Reacção de polimerase em cadeia (PCR) <i>standard</i> | 42 |
| 3.2.3. Polimorfismos da região 5'-UTR: -30ATG G>A, -12ATG G>A , -10ATG C>T | 43 |
| 3.2.4. IVS4+68 A>G | 45 |
| 3.2.5. IVS4+1518 CTTTAA>del6BP, IVS4+1583 T>C, IVS4+1703 A>G..... | 47 |
| 3.2.6. IVS6+249 C>T | 47 |
| 3.3. Análise dos dados | 50 |
| 4. Resultados | 51 |
| 4.1. -30ATG G>A | 54 |
| 4.2. -12ATG G>A | 55 |
| 4.3. -10ATG C>T | 56 |
| 4.4. IVS4+68 A>G | 57 |
| 4.5. IVS4+1518 CTTTAA>del6BP | 60 |
| 4.6. IVS4+1583 T>C | 63 |
| 4.7. IVS4+1703 A>G | 66 |
| 4.8. IVS6+249 C>T | 67 |
| 5. Discussão | 70 |
| 5.1. Análise das frequências alélicas de cada variação de sequência | 74 |
| 5.1.1. -30 ATG G>A, -12 ATG G>A e -10 ATG C>T | 74 |
| 5.1.2. IVS4+68 A>G, IVS4+1518 CTTTAA>del6BP e IVS4+1583 T>C | 76 |
| 5.1.3. IVS4+1703 A>G | 77 |
| 5.1.4. IVS6+249 C>T | 78 |
| 5.2. Segregação conjunta das diferentes variações de sequência | 79 |
| 6. Conclusões | 89 |
| 7. Anexos | 91 |
| 8. Referências | 98 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURAS | Pág. |
|--|-------------|
| FIGURA 1 – Lesões escrotais de angioceratoma em doente com fenótipo clássico de Doença de Fabry..... | 8 |
| FIGURA 2 – Ideograma ilustrando a posição da banda Xq22.1 e o mapeamento físico do gene <i>GLA</i> | 18 |
| FIGURA 3 – Estrutura dos genes das enzimas α -galactosidase A e B. | 21 |
| FIGURA 4 – Catabolismo dos glicoesfingolípidos: enzimas envolvidas e doenças de acumulação relacionadas..... | 23 |
| FIGURA 5 – Distribuição das mutações descritas no gene <i>GLA</i> a nível da sequência de amnioácidos, excluindo as mutações de <i>splicing</i> , segundo a HMGD..... | 26 |
| FIGURA 6 – Sequência oligonucleotídica usada como <i>primer</i> modificado Fabry 7Fm em comparação com a sequência original..... | 47 |
| FIGURA 7 – Representação esquemática do método de identificação da variação de sequência IVS6+249 C>T, usando a técnica de <i>mismatch</i> PCR..... | 49 |
| FIGURA 8 – Figura representativa do padrão de bandas do SSCP e dos electroforogramas de sequenciação no sentido directo dos diferentes resultados dos polimorfismos da região 5'-UTR..... | 55 |
| FIGURA 9 – Electroforese em gel de agarose Nusieve 3:1 a 3% durante 70' a 110V após digestão com a enzima Mnl1 dos produtos de PCR do exão 4 de um grupo de amostras..... | 59 |
| FIGURA 10 – Electroforograma representando o alelo IVS4+68 A em homozigotia..... | 59 |
| FIGURA 11 – Electroforograma representando o alelo IVS4+68 G em hemizigotia..... | 60 |
| FIGURA 12 – Electroforograma representando a heterozigotia IVS4+68 A/G..... | 60 |
| FIGURA 13 – Electroforogramas representando a homozigotia para o alelo IVS4+1518 CTTTAA..... | 61 |
| FIGURA 14 – Electroforogramas representando a hemizigotia para o alelo IVS4+1518 del6bp..... | 62 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 15 – Electroforogramas representando a heterozigotia IVS4+1518 CTTTAA/del6bp..... | 62 |
| FIGURA 16 – Comparação das seqüências dos alelos IVS4+1518 CTTTAA e IVS4+1518 del6bp..... | 63 |
| FIGURA 17 – Electroforogramas representando a homozigotia para o alelo IVS4+1583 T..... | 64 |
| FIGURA 18 – Electroforogramas representando a heterozigotia IVS4+1583 T/C..... | 65 |
| FIGURA 19 – Electroforogramas representando a homozigotia para o alelo IVS4+1583 C..... | 65 |
| FIGURA 20 – Electroforogramas representando os diferentes resultados de sequenciação do polimorfismo IVS4+1703 A>G..... | 67 |
| FIGURA 21 – Electroforese em gel de agarose Nusieve 3:1 a 3% durante 100' a 110V após digestão com a enzima HinfI dos produtos de PCR <i>mismatch</i> usando os <i>primers</i> Fabry 7Fm e GLA7R..... | 69 |
| FIGURA 22 – Electroforogramas representando os diferentes resultados de sequenciação do polimorfismo IVS6+249 C>T..... | 69 |
| FIGURA 23 – Variantes alélicas referidas no HapMap, acedido a 26/08/2007, e sua localização ao longo do gene <i>GLA</i> | 71 |
| FIGURA 24 – Haplótipos encontrados nos 43 cromossomas X dos indivíduos do sexo masculino estudados neste trabalho quanto às variações de seqüência encontradas..... | 81 |
| FIGURA 25 – Figura representativa dos 7 haplótipos encontrados nos 185 cromossomas X dos 114 indivíduos estudados neste trabalho quanto às variações de seqüência encontradas..... | 83 |
| FIGURA 26 – Diagrama representativo da explicação proposta de acordo com a hipótese P, baseada nos resultados do presente estudo na população portuguesa, para a seqüência temporal do aparecimento dos diferentes polimorfismos e a constituição dos diferentes haplótipos.... | 87 |
| FIGURA 27 - Diagrama representativo da explicação proposta de acordo com a hipótese A, baseada na integração dos resultados do presente estudo com os dos estudos anteriores em outras populações, para a seqüência temporal do aparecimento dos diferentes polimorfismos e a constituição dos diferentes haplótipos..... | 88 |

ÍNDICE DE QUADROS

| QUADROS | Pág. |
|--|-------------|
| QUADRO I - Frequências estimadas de homens com fenótipos clássico e de início tardio de Doença de Fabry..... | 2 |
| QUADRO II – Principais manifestações clínicas no homem afectado com fenótipo clássico de Doença de Fabry..... | 13 |
| QUADRO III – Distribuição do tipo de mutações descritas no gene <i>GLA</i> segundo a HMGD..... | 26 |
| QUADRO IV – Variações de sequência estudadas e respectivos métodos de detecção utilizados..... | 41 |
| QUADRO V – Sequências oligonucleotídicas usadas como <i>primers</i> para amplificar os fragmentos do gene <i>GLA</i> a estudar..... | 43 |
| QUADRO VI – Resultados da análise das 8 variantes alélicas encontradas na população portuguesa nos 114 indivíduos (185 cromossomas X) estudados..... | 51-53 |
| QUADRO VII – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo -30ATG G>A observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 54 |
| QUADRO VIII – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo -12ATG G>A, observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 56 |
| QUADRO IX – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo -10ATG C>T, observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 57 |
| QUADRO X – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo IVS +68 A>G, observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 58 |

| | |
|--|----|
| QUADRO XI – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo IVS4+1518 CTTTAA>del6bp observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 61 |
| QUADRO XII – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo IVS4+1583 T>C observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 64 |
| QUADRO XIII – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo IVS4+1703 A>G observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 66 |
| QUADRO XIV – Quadro comparativo entre as frequências genotípicas relativas ao polimorfismo IVS6+249 C>T observadas na amostra estudada e as que seriam de esperar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... | 68 |
| QUADRO XV – Polimorfismos descritos até ao momento considerados não patogénicos e para os quais existem dados populacionais..... | 72 |
| QUADRO XVI – Quadro comparativo entre as frequências alélicas encontradas neste estudo e as existentes na literatura disponível..... | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|--|
| α-GAL A | Enzima α -galactosidase A |
| bp | par de base |
| CHO | <i>Chinese Hamster Ovary</i> |
| DGGE | <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> |
| dHPLC | <i>denaturing High Performance Liquid Chromatography</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EHW | Equilíbrio de Hardy-Weinberg |
| FOS | <i>Fabry Outcome Survey</i> |
| FR | <i>Fabry Registry</i> |
| Gb3 | globotriaosilceramida |
| HGMD | <i>Human Genetic Mutation Database</i> |
| JSNP | <i>Japanese Variation Database</i> |
| kb | <i>kilobase</i> |
| MIM | <i>Mendelian Inheritance in Man</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| RFLP | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| SAP | <i>Sphingolipid Activator Protein</i> |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| SSCP | <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> |
| UTR | <i>Untranslated Region</i> |
| YAC | <i>Yeast Artificial Chromosome</i> |