



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ÂNDREA VIRGÍNIA FERREIRA CHAVES

**MicroRNAs NA VARIANTE CARDÍACA DA DOENÇA DE FABRY:
NOVO BIOMARCADOR?**

Recife

2022

ÂNDREA VIRGÍNIA FERREIRA CHAVES

**MicroRNAs NA VARIANTE CARDÍACA DA DOENÇA DE FABRY:
NOVO BIOMARCADOR?**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadores: Prof. Dr. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira.

Prof. Dr. Brivaldo Markman Filho

Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Chaves, Ândrea Virgínia Ferreira

MicroRNAs na variante cardíaca da Doença de Fabry: novo biomarcador? / Ândrea Virgínia Ferreira Chaves– 2022.

59 f. : il., fig., tab.

Orientadores: Dinaldo Cavalcanti de Oliveira, Brivaldo Markman Filho e Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Miocárdio- doenças 2. RNA 3. Biomarcadores I. Oliveira, Dinaldo Cavalcanti (orient) II. Markman Filho, Brivaldo (orient.) III. Vasconcelos, Luydson Richardson Silva (orient.) IV. Título

616.124

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022- 182

ÂNDREA VIRGÍNIA FERREIRA CHAVES

**MicroRNAs NA VARIANTE CARDÍACA DA DOENÇA DE FABRY:
NOVO BIOMARCADOR?**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 13/05/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Lúcia Helena de Oliveira Cordeiro (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Simone Cristina Soares Brandão (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Dário Sobral C. Filho (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco – UPE

Prof. Dr. Carlos Gun (Examinador Externo)
Universidade de Santo Amaro – UNISA/ SP

Dedico este trabalho aos pacientes com doenças raras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, aos meus pais William Chaves e Virgínia Ferreira, e a minha filha Sofia, por tanto apoio e compreensão durante os momentos roubados. Assim como aos demais familiares e amigos por compreenderem a minha ausência.

A Petrônio Magalhães, meu marido, agradeço pelo estímulo e suporte constantes, imprescindíveis, na redação final deste manuscrito.

Ao Dr. Brivaldo Markman Filho, meu coorientador que juntamente aos Drs. Manuel Markman e Eveline Calado, agradeço pela dedicação incansável quanto à realização dos exames de imagem dos pacientes. À enfermeira Milca Dantas pela disponibilidade na coleta do material para análise.

Ao Dr. Luydson Vasconcelos que além de coorientador foi fundamental para a viabilidade deste projeto, assim como a bióloga Débora Nóbrega que realizou com presteza e determinação a parte da bancada e estatística. Ao Dr. Marcelo Santos-Veloso pela inestimável cooperação durante todo o processo deste trabalho e ao Dr. Dinaldo Cavalcanti, meu orientador, pela plena confiança.

Agradeço a minha chefe Dr^a Glória Melo, aos meus colegas da enfermagem da cardiologia do hospital Agamenon Magalhães pela cooperação incondicional e à Dr^a Jéssica Garcia por ter me apresentado ao PPGIT.

Por fim, agradeço aos meus pacientes pela confiança e ensinamentos.

RESUMO

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é uma doença genética caracterizada por hipertrofia ventricular esquerda (HVE) na ausência de outra condição cardíaca, sistêmica ou metabólica. A investigação através dos painéis genéticos possibilita a identificação de fenocópias, dentre as quais a doença de Fabry (DF), cuja forma clássica não apresenta controvérsias quanto ao tratamento, porém as de apresentação tardia são objeto de discussão, incorrendo na investigação de novos biomarcadores. Neste estudo, três microRNAs (miRNAs) foram avaliados como possíveis marcadores na forma tardia cardíaca da DF. Foram incluídos 131 pcts com o diagnóstico ecocardiográfico de CMH submetidos à investigação genética para a DF, dos quais 76 através do sequenciamento do gene *GLA* e 55 pelo painel genético para CMH. Em sete pcts (5,34%) foram encontradas as seguintes mutações no gene *GLA*: uma c.967C>A(p.Pro323Thr), quatro c.352C>T(p.Arg118Cys) e duas c.937G>T(p.Asp313Tyr), os quais realizaram o painel para CMH ou cardiomiopatias. Destes, três (com a p.Arg118Cys) apresentaram mutações em outros genes. A triagem familiar revelou 17 indivíduos com mutações no gene *GLA*, dois irmãos com a variante c.937G>T(p.Asp313Tyr) apresentavam HVE. A dosagem do liso-Gb3 e à análise dos miR-1291, miR-214 e miR-505 foram coletados em 20 indivíduos com mutações no gene *GLA* (8 com HVE e 12 sem HVE). Houve tendência a superexpressão nos indivíduos que apresentam HVE, principalmente para o miR-1291. Quando comparados a indivíduos saudáveis a expressão do miR-214 naqueles com HVE foi significativamente menor do que nos sem HVE (p=0,0416) e para o miR-505 houve uma expressão significativa independente da presença de HVE (p=0,0195). O miR-505 e o miR-214 apresentaram uma correlação significativa e diretamente proporcional com o liso-Gb3 nos pcts agrupados (com e sem HVE). Todos os indivíduos apresentaram os níveis do liso-Gb3 normais. Neste estudo a frequência de mutação no gene *GLA* em pcts com CMH foi 5,34%. A coleta do painel molecular para cardiomiopatias hereditárias não detectou outras variantes que justifiquem a HVE em pcts com as mutações c.967C>A(p.Pro323Thr) e c.937G>T(p.Asp313Tyr), classificadas como variantes de significado incerto (VUS). Este estudo contribui com evidências de que o aumento na expressão do miR-505 e do miR-1291 e a subexpressão do miR-214 naqueles com HVE podem ser marcadores de patogenicidade na DF. No entanto, são necessárias maiores investigações destes microRNAs com um número maior de indivíduos.

Palavras-chave: cardiomiopatia hipertrófica; doença de Fabry; variante cardíaca; p.Asp313Tyr; miR-1291; miR-214; miR-505; microRNAs.

ABSTRACT

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a genetic disease characterized by left ventricular hypertrophy (LVH) in the absence of another cardiac, systemic, or metabolic condition. The investigation through genetic panels makes it possible to identify phenocopies, among which Fabry disease (FD), whose classic form is not controversial in terms of treatment, but those with late presentation are the subject of discussion, incurring further investigation of new biomarkers. In this study, three microRNAs (miRNAs) were evaluated as possible markers in the late cardiac form of FD. A total of 131 patients with an echocardiographic diagnosis of HCM who underwent genetic investigation for FD were included, of which 76 through sequencing the *GLA* gene and 55 by the genetic panel for HCM. In seven pts (5.34%) the following mutations were found in the *GLA* gene: one c.967C>A(p.Pro323Thr), four c.352C>T(p.Arg118Cys), and two c.937G>T(p.Asp313Tyr). They performed the panel for HCM or cardiomyopathies, of these, three (with p.Arg118Cys) had mutations in other genes. Family screening revealed 17 individuals with mutations in the *GLA* gene, two brothers with the c.937G>T(p.Asp313Tyr) variant had LVH. Lyso-Gb3 assay and analysis of miR-1291, miR-214 and miR-505 were collected in 20 individuals with mutations in the *GLA* gene (8 with LVH and 12 without LVH). There was a tendency to overexpression in individuals with LVH, mainly for miR-1291. When compared to healthy individuals, miR-214 expression in those with LVH was significantly lower than in those without LVH ($p=0.0416$) and for miR-505 there was a significant expression regardless of the presence of LVH ($p=0.0195$). The miR-505 and miR-214 showed a significant and directly proportional correlation with lyso-Gb3 in pooled individuals (with and without LVH). All subjects had normal lyso-Gb3 levels. In this study, the frequency of mutation in the *GLA* gene in HCM pts was 5.34%. The molecular panel for hereditary cardiomyopathies did not detect other variants that justify LVH in those with mutations c.967C>A(p.Pro323Thr) and c.937G>T(p.Asp313Tyr), classified as variants of uncertain significance (VUS). This study provides evidence that the overexpression of miR-505 and miR-1291 and the under expression of miR-214 in those with LVH may be pathogenicity markers in FD. However, further investigations of these microRNAs with a larger number of individuals are needed.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy; Fabry disease; cardiac variant; p.Asp313Tyr; miR-1291; miR-214; miR-505; microRNAs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -GAL A – α -galactosidase A

AHA – *American Heart Association* (Associação Americana do Coração)

CDI – cardiodesfibrilador implantável

CMH – cardiomiopatia hipertrófica

DAC – doença arterial coronariana

DDL – doença de depósito lisossomal

DF – doença de Fabry

ECG – eletrocardiograma

ESC – *European Society of Cardiology* (Sociedade Europeia de Cardiologia)

ETT – ecocardiograma transtorácico

FE – fração de ejeção

Gb3 – globotriaosilceramida

HVE – hipertrofia ventricular esquerda

HVM – hipertrofia ventricular máxima

liso-Gb3 – globotriaosil esfingosina

MS – morte súbita

MVT – *myocardial ventricular thickness* (espessura ventricular miocárdica)

PCTS – pacientes

QRSf – complexo QRS fragmentado

RMc – ressonância magnética cardíaca

RNA – ácido ribonucleico

RT – realce tardio

TV – taquicardia ventricular

TVNS – taquicardia ventricular não sustentada

VE – ventrículo esquerdo

VSVE – via de saída do ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	DOENÇAS DE DEPÓSITOS LISOSSOMAIS	11
1.2	DOENÇA DE FABRY	12
1.3	BIOMARCADORES	14
1.4	MICRORNAS	14
1.4.1	miR-505	17
1.4.2	miR-214	17
1.4.3	miR-1291	17
1.5	OBJETIVOS	18
1.5.1	Primário	18
1.5.2	Secundários	18
2	HIPÓTESES	18
3	MÉTODOS	19
3.1	TIPO E LOCAL DO ESTUDO	19
3.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO	19
3.2.1	Critérios de inclusão e exclusão	19
3.2.2	Coleta de dados	19
3.3	DEFINIÇÃO DE CMH	20
3.4	ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCICO	20
3.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA CARDÍACA	20
3.6	AVALIAÇÃO MOLECULAR	21
3.6.1	Sequenciamento do gene GLA	21
3.6.2	Painel molecular para cardiomiopatia hipertrófica	21
3.6.3	Painel molecular para cardiomiopatias hereditárias	21
3.7	DOSAGEM DE LISO-GB3 E ATIVIDADE DE A-GAL A	22
3.8	EXTRAÇÃO DE MIRNA	23
3.8.1	Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) e isolamento de RNA	23
3.8.2	Purificação de RNA total, Síntese de cDNA e Ensaio de miRNA TaqMan	23
3.8.3	Análises Estatísticas	23

3.8.4	Predição de genes e manifestações comuns na doença de Fabry associada à expressão de miR-1291, miR-214 e miR-505	24
3.9	PADRÕES ÉTICOS	25
4	RESULTADOS	26
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO A - LISTA DOS GENES	45
	ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	57

1 INTRODUÇÃO

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é uma doença genética, caracterizada por hipertrofia ventricular esquerda (HVE) na ausência de outra condição cardíaca, sistêmica ou metabólica (OMMEN *et al*, 2020). Tem caráter autossômico dominante, com penetração variável, tendo sido descritas, aproximadamente, 1.500 variantes em genes do sarcômero cardíaco ou estruturas relacionadas. A prevalência estimada nos EUA encontra-se entre 1:200 a 1:500 adultos (OMMEN *et al*, 2020). A investigação molecular através dos painéis genéticos, possibilita tanto a identificação de mutações causais da CMH como de fenocópias que cursam com HVE (MARIAN & BRAUNWALD, 2017; CHAVES-MARKMAN *et al*, 2019; CAIRNS *et al*, 2018). Variantes nos genes da cadeia pesada da β -miosina cardíaca (MYH7) e da proteína C de ligação à miosina (MYBPC3) são responsáveis por até 70% das causas de CMH (MARIAN & BRAUNWALD, 2017).

Entretanto, outras desordens que cursam com HVE podem levar a confusão no diagnóstico. Em situações mais comuns, temos aquelas que levam a HVE secundária, como o remodelamento do ventrículo esquerdo (VE) no coração de atleta, na estenose aórtica e na hipertensão arterial sistêmica (OMMEN *et al*, 2020). Além de doenças consideradas raras, como as rasopatias, miopatias mitocondriais, amiloidose, sarcoidose, hemocromatose, algumas distrofias musculares, doenças de depósito de glicogênio e lisossomais, como as doenças de Fabry (DF), de Pompe e de Danon (OMMEN *et al*, 2020; MARIAN & BRAUNWALD, 2017). A importância da identificação destes indivíduos é a possibilidade do tratamento específico precoce levando a uma mudança na história natural.

1.1 DOENÇAS DE DEPÓSITOS LISSOSSOMAIS

Os lisossomos, partículas com propriedades líticas, foram inicialmente descritas por de DUVE *et al* em 1955, desde então há grande interesse nas doenças que resultam de falência enzimática incorrendo no mal funcionamento dos lisossomos. As doenças de depósitos lisossomais (DDL) compreendem um grupo heterogêneo de enfermidades causadas por distúrbios genéticos que levam ao acúmulo progressivo de algum substrato intralisossomal. São classificadas, de acordo com a substância acumulada, em: mucopolissacaridoses (MPS), oligossacaridoses, esfingolipidoses, gangliosidoses, dentre outras. (WANG *et al*, 2011).

As DDLs, em conjunto, apresentam uma frequência de um para 5.000 nascidos vivos (BOUSTANY, 2013), embora possa variar de acordo com a região geográfica, a depender da

enfermidade. A maioria apresenta padrão de herança autossômica recessiva, exceto as doenças de Fabry, MPS tipo II (doença de Hunter) e Danon, ligadas ao X. Geralmente, a manifestação fenotípica e os sintomas dependem da atividade residual de uma única enzima, embora algumas destas doenças possam ser causadas por mais de um defeito enzimático. A idade de apresentação, a severidade e os órgãos afetados podem variar entre membros de uma mesma família e, é comum o acometimento do sistema nervoso central (SNC) (HOLLAK e WIJBURG, 2014).

Nos últimos 20 anos, a terapia de reposição enzimática (TRE) tem se mostrado efetiva para algumas DDLs, dentre as quais a DF, MPS I, II, IV e VI, e a doença de Pompe (DP) (HOLLAK e WIJBURG, 2014). Atualmente, alguns estudos investigam novos métodos de tratamento a fim de minimizar efeitos colaterais, resistência e maior aderência do paciente, como as enzimas intratecais que melhoram a ação no SNC, a terapia genética e drogas por via oral, chaperonas farmacológicas que aumentam a atividade e o transporte de enzimas lisossômicas (ORTOLANO *et al*, 2014).

O tratamento das DDLs varia na prática clínica, devido a controvérsias quanto ao início, manutenção e término da terapia. Em alguns casos, as discussões relacionam-se ao custo das drogas, porém em outras situações advêm da falta de estudos devido ao número insuficiente de pacientes. Indivíduos assintomáticos, diagnosticados, apresentam limitações quanto à tomada de decisão relacionada ao início da instituição terapêutica. A resposta clínica é variável à terapia e o tempo necessário para a melhoria ou estabilização também carece de grandes estudos de história natural para comparação.

1.2 DOENÇA DE FABRY

A DF (OMIM 301500), uma DDL classificada como esfingolipidose, causada por mutações no gene GLA, localizado no cromossomo X (Xq22.1) e tem sido investigada como diagnóstico diferencial da CMH. Tais mutações levam a alteração na produção da enzima α -galactosidase A (α -GAL A) e acúmulo dos metabólitos globotriaosilceramida (Gb3) e globotriaosilesfingosina (liso-Gb3) nos lisossomos, especialmente, dos tecidos renal, cardíaco, endotelial e neurológico (CHAVES-MARKMAN *et al*, 2019; CAIRNS *et al*, 2018). A prevalência da DF encontra-se entre 1:40.000 a 117.000 indivíduos, porém em países que realizam a triagem em recém-nascidos pode variar de 1:1.368 a 1:8.882 (CAIRNS *et al*, 2018; BURLINA *et al*, 2017; LIN *et al*, 2009; MECHTLER *et al*, 2012) e nos pacientes com HVE pode chegar a 12%, a depender da coorte avaliada (LINHART *et al*, 2020). Mais de 1000

variantes com diferentes efeitos sobre a atividade enzimática da α -Gal foram descritas (HUGHES, 2016; LINHART *et al*, 2020). Algumas destas, relacionam-se ao fenótipo tardio, com acometimento cardíaco isolado ou predominante, cuja principal manifestação é a HVE (CHAVES *et al*, 2021; CSÁNYI *et al*, 2017; HSU *et al*, 2016), embora o papel de variantes individuais na geração de diferentes níveis de substrato e o seu impacto nos órgãos não é bem compreendido (HUGHES, 2016).

Dois fenótipos são reconhecidos: uma forma clássica de início precoce manifestando-se na infância e uma tardia que, frequentemente, atinge um único órgão (HUGHES, 2016). A forma clássica tem uma apresentação heterogênia caracterizada por acometimento multissistêmico que envolve o sistema neurovegetativo incorrendo em acroparestesia, hipo ou hiperidrose, alterações gastrointestinais, intolerância ao exercício e ataques de febre (KAMINSKY *et al*, 2013). Pode ocorrer ainda a presença de angioqueratomas e opacidade da córnea (córnea verticilata). Entretanto as principais complicações da DF são a lesão endotelial que incorre em acidente vascular cerebral (AVC), cardiomiopatia, hipertensão arterial resistente e insuficiência renal progressiva (ZARATE e HOPKIN, 2008). O envolvimento cardíaco parece estar presente no início da vida, mas não é detectado clinicamente até a terceira ou quarta década (CHAVES *et al*, 2021). É frequente a deposição de glicosfingolipídeos no miocárdio, valvas e vasos coronários, sendo causa de bloqueio atrioventricular completo, insuficiência mitral, hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) e isquemia miocárdica (LINHART & ELLIOT, 2007).

Geralmente, há um atraso de anos para o diagnóstico da DF devido ao desconhecimento da doença, porém desde 2001 com o início do tratamento através da TRE e mais recentemente através de uma chaperona por via oral para alguns tipos de mutações (HUGHES *et al*, 2017), a investigação tem sido realizada com mais frequência (MONSERRAT *et al*, 2007; ELLIOT *et al*, 2011; KUBO *et al*, 2017; ARENDS *et al*, 2017) o que levou a identificação de algumas variantes associadas à forma tardia com acometimento cardíaco semelhante fenotipicamente à CMH (CSÁNYI *et al*, 2017; HSU *et al*, 2016). A DF aumenta o risco de AVC, morte súbita cardíaca e insuficiência renal. Por esta razão, os pacientes podem beneficiar-se com o tratamento precoce específico (GERMAIN *et al*, 2015; BIEGSTRATEN *et al*, 2015; HUGHES *et al*, 2017; KAMPMANN, PERRIN & BECK, 2015). Tal como a heterogeneidade genética, a expressão fenotípica da doença apresenta grande variabilidade. Familiares com a mesma mutação podem apresentar-se de forma diferente devido à combinação de vários fatores, tais como a presença de múltiplas variantes funcionais, expressão de genes modificadores, fenocópias, fatores epigenéticos, modificações pós-traducionais de proteínas e

fatores ambientais. Em várias situações, os biomarcadores são utilizados para identificação de um processo biológico vinculado às manifestações clínicas de uma determinada doença.

1.3 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são entidades químicas que indicam a presença de um processo biológico vinculado às manifestações clínicas de uma determinada doença. A maioria das DDLs não possui biomarcadores úteis e aceitos para a tomada de decisões terapêuticas, mas são amplamente utilizados na prática clínica, como a medida da glicemia ou hemoglobina glicosilada em diabéticos. Quanto às DDLs os biomarcadores dividem-se em duas categorias. O primeiro grupo consiste em moléculas que se acumulam em tecidos e fluidos corporais diretamente devido ao defeito enzimático. O segundo, inclui moléculas produzidas por armazenamento celular específico e pode ser medido no plasma, urina ou líquido cefalorraquidiano (LCR) (AERTS *et al*, 2014). Na DF o Gb3 converte-se em liso-Gb3 por ação da ceramidase ácida dentro dos tecidos e é detectável por biópsia de órgãos afetados, no sangue e na urina. Ambos parecem exercer um papel na gênese da fibrose, além de serem úteis na triagem, diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com DF (NOWAK *et al*, 2017; TOLDO, MARCONETTO & CAMACHO, 2017). A dosagem do liso-Gb3 tem sido utilizada como um marcador de patogenicidade, útil na decisão de início da terapêutica e na diferenciação das formas clássicas e das de início tardio, porém nas variantes de significado incerto (VUS) o seu valor é controverso (NOWAK *et al*, 2017; SMID *et al*, 2015; NIEMANN *et al*, 2014).

O papel biológico dos microRNAs (miRNAs) no sistema cardiovascular tornou-se um campo de pesquisa, e estudos têm demonstrado a importância destas micromoléculas na no endotélio vascular, no processo de inflamação e na fibrose dos tecidos, incluindo o rim e o coração (RONCARATI *et al*, 2014; CHUNG & LAN, 2015; GURHA, 2016; O'REILLY, 2016).

1.4 MICRORNAS

Os miRNAs foram identificados no soro e plasma humanos em 2008 e, posteriormente, detectados em outros fluidos biológicos, tais como a urina, a saliva e o cerebrospinal (ROMAINE *et al*, 2016). Por serem notavelmente estáveis no sangue, aparecerem em concentrações mensuráveis e por, provavelmente, se tornarem desregulados antes que os

sintomas físicos da doença se tornem aparentes, tornaram-se alvos atrentes para a pesquisa (CREEMERS, TIJSEN & PINTO, 2012).

Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de ácido ribonucleico (RNA) em cadeia simples, não codificantes, com cerca de 22 nucleótidos, que atuam como reguladores da expressão genética ao nível pós-transcricional, através da clivagem de um RNA mensageiro (mRNA) (NAVICKAS *et al*, 2016). O desenvolvimento do tecido cardíaco depende de uma expressão correta de determinados miRNAs específicos que estão presentes em diferentes células cardíacas (QUIAT & OLSON, 2013; THUM & CONDORELLI, 2015). O miR-1 é o miRNA mais abundante em cardiomiócitos, e foi o primeiro implicado no desenvolvimento cardíaco (ZHAO *et al*, 2007). Um grupo de miRNAs expresso de modo seletivo nos cardiomiócitos são os “myomirs” (do inglês, *muscle specific miRNAs*) miR-208a, miR-208b e miR499 (VAN ROOIJ, LIU & OLSON, 2008). Diversas experiências têm demonstrado que cada doença cardíaca apresenta um padrão de expressão de determinados miRNAs distintos, o que parece ser necessário para induzir o estado patológico (VAN ROOIJ, LIU & OLSON, 2008). O perfil de expressão dos miRNAs sofre alterações durante o desenvolvimento cardíaco e muitos significativamente expressos no coração fetal humano, serão reexpressos no estado de patologia (THUM *et al*, 2007). Alguns miRNAs já foram implicados em cardiopatias específicas, tais como o miR-1 e o miR133 em arritmias; o miR-21 e o miR-195 em apoptose; o miR-208 na diminuição da contractilidade; os miR-214, miR-29 e miR-21 em fibrose; o miR-21, o miR-133, o miR-195 e o miR-214 em hipertrofia dos cardiomiócitos (VAN ROOIJ *et al*, 2008; SMALL & OLSON, 2011; YANG *et al*, 2019); os miR-505, miR-214 na doença endotelial e hipertensão (JIN *et al*, 2014; ROMAINE *et al*, 2016; CHEN *et al*, 2019; WANG *et al*, 2017) e o miR-1291 na cardiopatia isquêmica (PENG *et al*, 2014; CHEN *et al*, 2021).

O coração é um órgão muito sensível a estímulos fisiológicos, e mesmo ligeiras perturbações podem levar a remodelações cardíacas graves e a situações patológicas, as quais envolvem uma alteração global no perfil de expressão de vários genes e leva à re-expressão de genes fetais (THUM *et al*, 2007). Esta mudança no perfil de expressão de determinados miRNAs em tecido cardíaco, alterando a regulação pós-transcricional dos seus genes alvo, assume um papel crucial no crescimento hipertrófico patológico, característico da hipertrofia cardíaca (SAYED *et al*, 2007). RONCARATI e colaboradores (2014) encontraram 12 miRNA circulantes significativamente aumentados em portadores de CMH, sendo um miR-29a associado tanto à hipertrofia quanto à fibrose miocárdicas. O perfil de expressão de miRNAs em tecido cardíaco foi estudado por VAN ROOIJ e colaboradores (2006), os resultados revelaram que os perfis de expressão de miRNAs dependem do estímulo responsável pela

hipertrofia cardíaca e da duração do tratamento. Isto sugere que diferentes estímulos hipertróficos e fases divergentes do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca requerem o envolvimento de miRNAs distintos. Outros resultados baseados em estudos utilizando modelos animais de hipertrofia cardíaca, indicam que alguns miRNAs são considerados como anti- ou pró-hipertróficos consoante o seu padrão de expressão (DA COSTA MARTINS & DE WINDT, 2012). Por esta razão, especula-se que os miRNAs podem ser considerados como biomarcadores moleculares com importantes aplicações clínicas nas doenças cardíacas (SMALL & OLSON, 2011). Desde a descoberta na corrente sanguínea, os miRNAs circulantes têm sido utilizados como biomarcadores para infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, doença coronariana crônica e diabetes mellitus, como exemplo o miR-214 e o miR-1291 implicado no processo de aterosclerose e doença arterial coronariana (DAC) (PENG *et al*, 2014; JIN *et al*, 2014; WANG *et al*, 2017).

A aterosclerose, caracterizada por lesão das células endoteliais, envolve inflamação crônica e formas de remodelação vascular. A disfunção das células endoteliais tem sido considerada como a fase inicial na progressão da aterosclerose, dando origem à formação de placas ateroscleróticas e subsequentes complicações cardiovasculares (DAVIGNON & GANZ, 2004). Portanto, o interesse pela aterosclerose levou a terapias inovadoras que visam prevenir ou reverter o processo fisiopatológico. A autofagia é um processo dinâmico no qual organelas são engolfadas dentro de uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo, o qual é responsável pela degradação e reciclagem das macromoléculas nos lisossomos (CHO *et al*, 2014). Recentemente, a autofagia é vista como um comportamento defensivo durante o desenvolvimento da aterosclerose, no entanto, os potenciais mecanismos moleculares que conectam a autofagia diminuída com a disfunção endotelial na aterosclerose não foram completamente investigados (MARTINET & De MEYER, 2009). Um número crescente de dados mostra que os miRNAs assumem um papel central na regulação da autofagia e, portanto, na disfunção endotelial relacionada à aterosclerose (XU *et al*, 2012).

Quanto a novas formas terapêuticas, uma alternativa prende-se com a regulação da expressão dos miRNAs que se apresentam super ou sub expressos na hipertrofia cardíaca e alteração endotelial, tentando normalizar o seu padrão de expressão. O nível de expressão de um determinado miRNA identificado como alterado, poderá ser normalizado, quer seja inibindo um miRNA super expresso quer seja induzindo a expressão de um miRNA sub expresso (THUM *et al*, 2007; VAN ROOIJ, LIU & OLSON, 2008).

1.4.1 miR-505

Estudos indicam que os miRNAs apresentam um papel importante na regulação do processo da proliferação, diferenciação, apoptose e inflamação celular (CHU *et al*, 2019; ZHU *et al*, 2019) e que alguns regulam negativamente a inflamação e afetam a expressão de proteínas sinalizadoras (MA *et al*, 2019). O miR-505 tem sido implicado como regulador importante na inflamação crônica e em um estudo a sua superexpressão neutralizou a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (LIU *et al*, 2020). CHEN e colaboradores (2019) demonstraram que o miR-505 está implicado no processo patológico da aterosclerose e outra pesquisa sugere que seja um marcador para hipertensão arterial e desempenhe um papel na angiogênese (YANG *et al*, 2014). ROMAINE *et al*. (2016) sugere que o miR-505 represente biomarcador de pré-hipertensão, bem como de hipertensão e YANG *et al*. (2014) demonstrou que o aumento dos níveis do miR-505 têm um papel na angiogênese e na doença endotelial.

1.4.2 miR-214

O miR-214 contribui para a patogênese de várias condições patológicas, incluindo as doenças cardiovasculares. Considerado um marcador promissor no prognóstico, diagnóstico e tratamento destes distúrbios (ZHAO *et al*, 2017), demonstrou exercer um papel nos estágios iniciais na patogênese da aterosclerose (WANG *et al*, 2017). Em um estudo que aborda a DAC, LU e colegas (2013) sugerem que o miR-214 apresenta um fator de proteção e que é um marcador promissor para alertar sobre DAC severa e a vulnerabilidade da placa e angiogênese, porém o seu papel definitivo requer investigação subsequente (CHAN *et al*, 2009), pois a redução da circulação do miR-214 pode ocorrer em decorrência de lesões ateroscleróticas (LU *et al*, 2013). Além destes achados, YANG *et al*. (2019) demonstraram que a deficiência do miR-214-3p pode ser um novo marcador para a fibrose cardíaca. Em outro estudo foi demonstrado que o miR-214 regula o efeito pró-hipertrofia cardíaca e exerce um efeito cardioprotetor reduzindo a área acometida no infarto agudo do miocárdio (LV *et al*, 2018).

1.4.3 miR-1291

PENG e colaboradores (2014) demonstraram que o miR-1291 apresenta-se superexpresso em pcts com infarto agudo do miocárdio (IAM) quando comparados com pcts com controles sadios e que após o tratamento cirúrgico apresentavam-se subexpressos, o que sugere

seu papel no prognóstico destes pcts. Um estudo através de análise de bioinformática também associaram o miR-1291 ao diagnóstico do IAM (WU *et al*, 2018), assim como uma pesquisa com 80 pcts com IAM sugerem que o miR-1291 é um biomarcador precoce para esta condição (CHEN *et al*, 2021).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Primário

Investigar a expressão do miR-505, miR-214 e do miR-1291 na forma tardia da DF com acometimento cardíaco

1.5.2 Secundários

- Correlacionar o resultado do miRNA com o liso-Gb3
- Comparar o resultado do miRNA entre os pacientes com HVE e os indivíduos sem HVE, ambos com mutação no gene *GLA*

2 HIPÓTESES

- Um miRNA pode ser um biomarcador precoce para a variante cardíaca da DF
- O biomarcador liso-Gb3 em pacientes com mutação no gene *GLA* que apresentam a variante cardíaca, não deve ser utilizado como único indicador de patogenicidade.

4 MÉTODOS

4.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

Estudo transversal com amostra de conveniência de pacientes atendidos no ambulatório de cardiologia do hospital das Clínicas da Universidade Federal de PE e no Rarus, serviço de doenças raras, em Recife, PE, Brasil entre março de 2018 e março de 2021.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes com diagnóstico ecocardiográfico de CMH com base nos critérios da *European Society of Cardiology* (OMMEN *et al*, 2020).

Para o grupo controle foram utilizadas 15 amostras de indivíduos controles, 7 do sexo feminino e 8 do masculino, com idades entre 12 e 58 anos, obtidos do Biorrepositório do Aggeu Magalhães que permitiram que fossem armazenadas e utilizadas para fins de pesquisa.

4.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos os pacientes que tenham sido submetidos à investigação da DF, através da análise do sequenciamento do gene *GLA* ou à avaliação do painel genético para CMH.

Foram excluídos pacientes com doença arterial coronariana, valvopatias e cardiomiopatia hipertensiva.

4.2.2 Coleta de dados

Os dados foram coletados dos prontuários dos pacientes à medida que foram incluídos no estudo. Aqueles que apresentaram mutação no gene *GLA* foram submetidos à realização do painel molecular para CMH ou ao painel para cardiomiopatias hereditárias e à dosagem do liso-Gb3.

Os familiares dos pacientes que apresentaram mutação no gene *GLA* foram submetidos à avaliação genética através do sequenciamento do gene *GLA*. Os familiares que apresentaram mutação no gene *GLA* foram submetidos à dosagem do biomarcador liso-Gb3.

As variáveis clínicas coletadas foram: idade, sexo, dados clínicos (sintomas cardíacos, sintomas gerais), dados dos exames complementares (hipertrofia miocárdica e percentual de fibrose miocárdica), dados moleculares (tipo da mutação, localização e classificação), dados do biomarcador liso- Gb3. Os pacientes e os familiares com mutação no gene GLA serão submetidos à extração do miRNA e será verificado se há correlação com a presença da HVE.

4.3 DEFINIÇÃO DE CMH

Foi definido como CMH, indivíduos que apresentem ao ecocardiograma transtorácico (ETT): hipertrofia ventricular máxima (HVM) inexplicável ≥ 15 mm em qualquer segmento cardíaco ou HVM ≥ 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 ≥ 30 mmHg em repouso ou após manobra de Valsalva ou em ortostatismo (OMMEN *et al*, 2020).

4.4 ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCIO

O ETT foi previamente realizado, por dois ecocardiografistas, 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 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 (NAGUEH *et al*, 2016; STEEDS *et al*, 2017).

4.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA CARDÍACA

A ressonância magnética cardíaca (RMc) foi analisada por um único examinador e a quantificação da fibrose miocárdica foi avaliada através da técnica de realce tardio com gadolínio. As imagens foram obtidas no eixo cardíaco curto, da base ao ápex, em cortes de 8 mm e intervalos de 2 mm usando a sequência de ecogradiante ponderada em T1. A aquisição foi feita 8-10 min após a infusão do contraste gadolínio (0,2 mmol/kg) utilizando um escâner de 1,5T (MAGNETOM Essenza, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) (SARA *et al*, 2014).

4.6 AVALIAÇÃO MOLECULAR

4.6.1 Sequenciamento do gene *GLA*

O sequenciamento do gene *GLA* foi realizado através de dois laboratórios. O Centogene Laboratory (Rostock, Alemanha) utilizou a técnica por PCR e sequenciamento de toda região codificante e das regiões de junção éxon-ínton altamente conservadas, através da dígito punção de sangue capilar coletadas em papel de filtro. O laboratório Mendelics, extraiu o DNA no SWAB bucal, cuja metodologia foi a captura de exons com *Nextera Rapid Capture Mendelics Custom Panel V2* seguida por sequenciamento de nova geração com Illumina HiSeq. Alinhamento e identificação de variantes utilizando protocolos de bioinformática, tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano.

O sequenciamento do gene *GLA* foi realizado nos indivíduos do sexo feminino como exame de triagem para investigação da DF, no masculino, apenas, após a evidência de baixa atividade de α -Gal A.

4.6.2. Painel molecular para cardiomiopatia hipertrófica

O laboratório responsável pelo painel para cardiomiopatia hipertrófica foi o DLE, no estado de São Paulo, Brasil. O DNA foi extraído através da técnica de dígito punção de sangue capilar coletadas em papel de filtro, então submetido à captura de regiões de interesse e sequenciamento de nova geração. Metodologia eficaz na detecção de variações de ponto e pequenas inserções e deleções (indels). Foram investigados 18 genes: ACTC1, DES, FLNC, GLA, LAMP2, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, MYPN, PLN, PRKAG2, PTPN11, TNNC1, TNNT1, TNNT2, TPM1 e TTR.

4.6.3. Painel molecular para cardiomiopatias hereditárias

O laboratório responsável pelo painel das cardiomiopatias foi laboratório Mendelics no estado de São Paulo, através da extração do DNA por SWAB bucal. A metodologia utilizada foi a captura de regiões alvo utilizando sondas para sequenciamento de nova geração com tecnologia Illumina. Alinhamento e identificação de variantes utilizando protocolos de bioinformática, tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano. Os parâmetros

de qualidade de sequenciamento foram: porcentagem de bases-alvo com pelo menos 10 leituras: 95,9%; número médio de vezes que cada base foi lida: 88 e o número de sequências geradas: 59.581.782. Foram analisados 206 genes (anexo 1): *AARS2, ABCC6, ABCC9, ACAD8, ACAD9, ACADS, ACADVL, ACTA1, ACTC1, ACTN2, ADCY5, AGK, AGL, AHCY, ALG1, ALG12, ALMS1, ALPK3, ANKS6, APOPT1, ARSB, ATAD3A, ATP5F1, ATPAF2, BAG3, BCS1L, BMP2, BOLA3, BRAF, BSCL2, C1QBP, CACNA1C, CALR3, CAV3, CAVIN1, CENPE, CEP19, CHKB, CLIC2, CLN3, COA5, COA6, COQ2, COQ4, COX10, COX14, COX15, COX20, COX6B1, COX7B, CPT1A, CPT2, CRYAB, CSRP3, D2HGDH, DCAF8, DES, DLD, DMD, DNAJC19, DOLK, DPM3, DPP6, DSG2, DSP, DTNA, ECHS1, ELAC2, EMD, EPG5, ERBB3, EYA4, FAH, FASTKD2, FBXL4, FHL1, FIG4, FKRP, FKTN, FLAD1, FLNC, FOXRED1, FTO, FUCA1, FXN, GAA, GATAD1, GBE1, GLA, GLB1, GMPPB, GNPTAB, GNS, GPC3, GSN, GTPBP3, GYS1, HADH, HADHA, HADHB, HCCS, HGSNAT, HPS1, HRAS, HSD17B10, IDH2, IDUA, ITPA, JPH2, JUP, KCNE1, KCNH1, KCNJ2, KCNQ1, LAMA4, LAMP2, LDB3, LIAS, LMNA, MAP2K1, MAP2K2, MCCC2, MGME1, MIB1, MLYCD, MRPL3, MRPL44, MRPS22, MRPS7, MTFMT, MTO1, MUT, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK2, MYO6, MYOT, MYOZ2, MYPN, NAGLU, NDUFA1, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA2, NDUFA6, NDUFA9, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFB11, NDUFB3, NDUFB8, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NEU1, NEXN, NKX2-5, NONO, NUBPL, PAM16, PCCA, PCCB, PET100, PGM1, PHYH, PIGT, PLN, PMM2, PNPLA2, POLG, POMT1, PPCS, PRDM16, PRG4, PRKAG2, PRKAR1A, PSEN1, PSMB4, PSMB8, PSMB9, RAB3GAP2, RAF1, RBCK1, RBM20, RIT1, RMND1, RYR2, SCN5A, SCO1, SCO2, SDHA, SDHAF1, SDHD, SELENON, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, SGSH, SHOC2, SLC19A2, SLC22A5, SLC25A20, SLC25A26, SLC25A3, SLC25A4, SOS1, SPEG, SURF1, SYNE1, SYNE2, TACO1, TANGO2, TAPT1, TAZ, TBX1, TBX3, TBX5, TCAP, TF, TIMMDC1, TMEM126A, TMEM126B, TMEM43, TMEM70, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNI3K, TNNT2, TOP3A, TPM1, TPM3, TRIT1, TRMT5, TRNT1, TSC1, TSFM, TTN, TTR, TWNK, UBR1, VCL, VPS33A, WFS1, XK, XPNPEP3, YARS2.*

4.7 DOSAGEM DO LISO-GB3 E ATIVIDADE DA α -GAL A

O laboratório responsável pela pesquisa do liso-Gb3 e da α -GAL A foi o DLE, em SP, Brasil. O nível de expressão do biomarcador liso-Gb3 e da atividade enzimática da α -GAL foram realizado através de sangue em papel filtro, identificados através da cromatografia

líquida/ espectrometria de massa Tandem (LC-MS/MS) e da espectrometria de massas de alta resolução (QTOF), respectivamente. Foram considerados normais valores entre 1,68 a 13,63 $\mu\text{mol/L/h}$ para a atividade da α -GAL e inferior a 2,0 ng/mL para a dosagem do liso-Gb3.

4.8 EXTRAÇÃO DO MIRNA

4.8.1 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) e isolamento de RNA

As células mononucleares do sangue foram isoladas a partir do sangue periférico coletado em tubo Edta, através do método de separação por gradiente, utilizando Ficoll-Paque, com centrifugação a 400g por 30 minutos em temperatura ambiente, as células coletadas foram lavadas em PBS (1x), sendo centrifugadas mais uma vez por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, o pellet de PBMC foi ressuspensionado em Trizol e armazenado em -80°C , por aproximadamente um ano, ao final do recrutamento de todos os indivíduos da pesquisa.

4.8.2 Purificação de RNA total, Síntese de cDNA e Ensaio de miRNA TaqMan

Logo após a purificação do RNA total, o cDNA foi preparado com 10 ng de RNA total usando TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit. A expressão diferencial de miR-1291, miR-214 e miR-505 foi avaliada em indivíduos com Doença de Fabry e com mutação no gene GLA, comparando entre os pacientes com HVE e os indivíduos sem HVE, usando Taqman MicroRNA Assay, seguindo instruções manufaturadas em QuantStudio 5™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Os dados foram normalizados usando RNU48 como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

4.8.3 Análises Estatísticas

As análises foram realizadas utilizando o *GraphPad Prism Software version 5*. Para análise de distribuição de variáveis foi utilizado *Shapiro–Wilk test*, e para calcular a significância foi realizado o *Student's t test*, exceto quando alguma variável não apresentou distribuição normal foi realizado o *Wilcoxon matched-pairs signed rank test (Two-tailed)*. Para análise de correlação entre os valores numéricos de liso-Gb3 e os microRNAs: miR-1291, miR-214 and miR-505 foi utilizado o coeficiente de correlação *Pearson* ou *Spearman* quando no

teste de distribuição normal a população não apresentou distribuição gaussiana. Também foi utilizado o *ExpressionSui Software Version 1.3 para Person's correlation, clustering method*.

4.8.4 Predição de genes e manifestações comuns na doença de Fabry associada à expressão de miR-1291, miR-214 e miR-505

Foi usada a plataforma miRNET 2.0 disponível através de uma interface web (<https://www.mirnet.ca/>) para busca de uma rede de genes envolvidos na regulação dos microRNAs estudados (tabela 1), o software escolhido foi o miRTarBase v8.0 e nenhum filtro foi adicionado. A partir dos genes encontrados, foi possível também utilizar esta plataforma para inferir doenças relacionadas aos genes da rede, através dos dados fornecidos, na versão 2.0, pela plataforma associada - DisGeNET (também acessível por <http://www.disgenet.org>). Selecionamos as manifestações clínicas relevantes na DF e avaliamos o valor de p, sendo considerado significativo $p \leq 0.05$.

Tabela 1 – Genes envolvidos na regulação dos hsa-miR-505; hsa-miR-1291; hsa-miR-214

miRBase ID	Chromosome location	Mature miRNA sequence	Targets (miRDB)
hsa-miR-505	chrX: 139924148-139924231 [-]	GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU	406 predicted targets
hsa-miR-1291	chr12: 48654444-48654530 [-]	UGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGU	636 predicted targets
hsa-miR-214	chr1: 172138798-172138907 [-]	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC	322 predicted targets

4.9 PADRÕES ÉTICOS

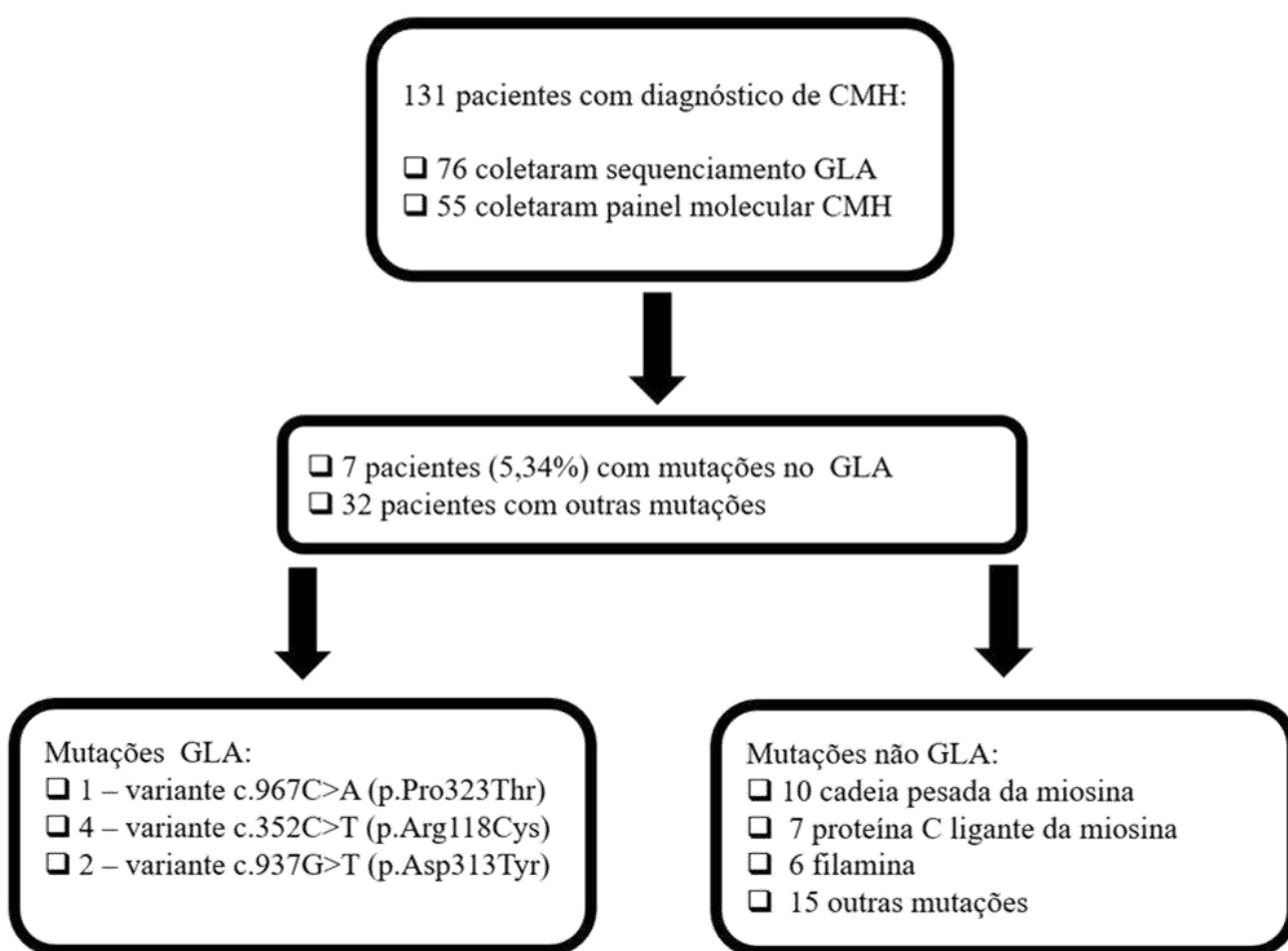
O estudo foi aprovado pelo Comitê que avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

CAEE: 02109018.0.0000.5190 (anexo 2).

5 RESULTADOS

Foram incluídos, 131 pacientes com o diagnóstico ecocardiográfico de CMH (OMMEN *et al*, 2020), dos quais 76 realizaram o sequenciamento do gene GLA e 55 o painel genético para CMH que inclui o sequenciamento do GLA (figura 1).

Figura 1 – Delineamento dos pacientes



CMH: cardiomiopatia hipertrófica; GLA: gene da alfa galactosidase A

Fonte: a autora (2021).

As mutações no gene *GLA* encontradas nos sete pacientes foram: c.937G>T (p.Asp313Tyr), c.967C>A (p.Pro323Thr) e c.352C>T (p.Arg118Cys). O painel molecular para CMH (18 genes) foi coletado nos sete pacientes, e em três, todos com a variante p.Arg118Cys, foram encontradas outras mutações (tabela 2). Naqueles que o painel molecular para CMH não encontrou variantes além das no gene *GLA*, foi coletado o painel molecular para cardiomiopatias hereditárias (206 genes), mas nenhuma outra variante foi identificada. Todos

os pacientes com mutações no gene *GLA* apresentaram nível do biomarcador liso-Gb3, dentro dos valores normais (tabela 2). As características e as localizações das mutações encontradas no painel encontram-se descritas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 2 - Pacientes com mutação no gene *GLA*

Pct	Idade	Sexo	GLA*	Outras mutações	Class.	Liso-GB3
1	68	F	c.967C>A (p.Pro323Thr)	NÃO		0,7
2	71	F	c.352C>T (p.Arg118Cys)	MYBPC3:c.484G>A (p.Arg495Gln)	Patog.	0,5
3	53	M	c.352C>T(p.Arg118Cys) [‡]	MYPNG>A (p.Ala1265Thr)	VUS	1,2
4	44	F	c.937G>T (p.Asp313Tyr)	NÃO		1,3
5	73	F	c.352C<T (p.Arg118Cys)	NÃO		1,4
6	71	F	c.352C<T (p.Arg118Cys)	TNNI3:c.347C>G(p.Ala116Gly)	VUS	2,0 ^π
7	70	F	c.937G>T (p.Asp313Tyr)	NÃO		1,0 ^π

Pct: paciente; GLA: gene da alfa galactosidase A; Class: classificação; F: feminino; M: masculino; Patog: patogênica; VUS: variantes de significado incerto.

* Todas as mutações no gene do GLA são consideradas VUS.

[‡] Exceto pela mutação GLA do paciente 3, todas as outras mutações são heterozigóticas.

^π Valor de referência: < 2 ng/ml; para as demais não sinalizadas: ≤ 1,8 ng/ml.

Fonte: a autora (2021).

Tabela 3 – Características e localização das mutações identificadas no painel genético para cardiomiopatia hipertrófica.

Gene	Ch	Local	Variante	Class.
MYH7: Cadeia pesada de miosina	14	Sarcômero	c.1357C>T;p.(Arg453Cys)	Patog.
			c.2155C>T;p.(Arg719Trp)	Patog
			c. [611G>A(;)4558G>A];p.[(Arg204His)	PP
			c. [611G>A(;)4558G>A];p.[(Gly1520Arg)]	VUS
			c.1750G>C;p.(Gly584Arg)	Patog
			c.2389G>A;p.(Ala797Thr)	Patog.
			c.2451C>A;p.(Asn817Lys)	VUS
			c.788T>C;p.(Ile263Thr)	PP
MYBPC3: proteína C3 ligadora de miosina	11	Sarcômero	c.1484G>A;p.(Arg495Gln)	Patog.
			c.1519G>A;p.(Gly507Arg)	VUS
			c.1526_1527delGA;p.(Arg509Thrfs*21)	Patog
			c.1565C>T;p.(Ala522Val) [‡]	VUS
FLNC: filamina C	7	Sarcômero	c.1348G>A;p.(Val450Met)	VUS
			c.1435G>A;p.(Ala479Thr	VUS
			c.5128G>A;p. (Glu1710Lys)	VUS
			c.6419G>A;p.(Arg2140Gln)	VUS
			c.7235C>T;p.(Thr2412Ile)	VUS
			c.5221G>A;p.(Glu1741Lys)	VUS
DES: desmina	2	Disco Z	c.635G>A (p.Arg212Gln)	VUS
			c.109C>T (p.Arg37Trp)	VUS
MYL2: cadeia leve reguladora de miosina 2	12	Sarcômero	c.112C>A;p.(Gln38Lys)	Patog
			c.484G>A;p.(Gly162Arg)	PP
TPM1: tropomiosina 1	15	Sarcômero	c.62G>T;p.(Arg21Leu)	VUS
			c.515T>C;p.(Ile172Thr)	VUS
MYPN: miopaldina	10	Sarcômero	Chr10 G > A p.Ala1265Thr	VUS
PRKAG2		Não-sarcomérica	c.521C>T;p.(Thr174Met)	VUS
PTPN11: tirosina fosfatase	12	Não-sarcomérica	c.1528C>G;p.(Gln510Glu)	Patog.
SYNE2	14	Transmembrana	Chr14 A>G p.Ile94Va	VUS
TNNI3: troponina I	19	Sarcômero	c.347C>G;p.(Ala116Gly)	VUS
TNNT2: troponina T	1	Sarcômero	c.305G>A;p.(Arg102Gln)	Patog.
VCL: vinculina	10	Sarcômero	Chr10 G>T p.Lys881Asn	VUS
LAMP2	X	Não-sarcomérica	c.973dupC;p.(Leu325Profs*25)	Patog.

Ch: cromossomo; N: número absoluto; class.: classificação; Patog: patogênica; PP: provavelmente patogênica; VUS: variante de significado incerto; SYNE2: *Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope Protein 2*; PRKAG2: *protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2*; [‡] Homozigose. Fonte: a autora (2021).

Tabela 4 – Frequência das mutações encontradas no painel genético para cardiomiopatia hipertrófica

Pacientes com painel genético	55 (42%)
Pacientes com mutações	32 (58%)
Total de mutações	45
Sarcoméricas	31 (70%)
Não sarcoméricas	14 (30%)
Proteínas afetadas	
Cadeia pesada da miosina	10 (22,2%)
Proteína C ligante de miosina	7 (15,5%)
Filamina	6 (13,3%)
Diversas	15 (33,3%)
2 ou + mutações	8
Patogênica ou provável	18 (40%)

Fonte: a autora (2021).

A triagem familiar identificou 17 indivíduos com mutações no gene GLA, dos quais 16 coletaram o lisoGb3, todos com valores dentro da normalidade (tabela 5). Dois familiares do sexo masculino e da mesma família, com a mutação p.Asp313Tyr, apresentaram hipertrofia miocárdica. Em um deles, foi coletado o painel para CMH e não foi identificada nenhuma outra mutação.

Tabela 5 – Características dos pacientes investigados a partir da triagem familiar dos casos-índice

Índice	Idade	Sexo	GLA	Liso-GB3	α -Gal
Caso 1	19	F	heterozigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,1ng/ml	ND
	4	F	heterozigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	0,8ng/ml	ND
	39	F	heterozigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,2ng/ml	ND
	16	F	heterozigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,0ng/ml	ND
	3	M	hemizigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,0ng/ml	ND
	37	M	hemizigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,3ng/ml	2,0
	42	M	hemizigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	0,9ng/ml	1,2
	33	F	heterozigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,3ng/ml	ND
	10	M	hemizigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,2ng/ml	ND
	18	M	hemizigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,3ng/ml	3,3
	58	F	heterozigótica c.937G>T (p.Asp313Tyr)	1,5ng/ml	ND
Caso 2	36	F	heterozigótica c.967C>A (p.Pro323Thr)	1,0ng/ml	ND
	37	M	hemizigótica c.967C>A (p.Pro323Thr)	1,0ng/ml	1,6
	16	M	hemizigótica c.967C>A (p.Pro323Thr)	0,9ng/ml	1,7
Caso 3	56	F	heterozigótica c.352C<T (p.Arg118Cys)	-	-
	51	F	heterozigótica c.352C<T (p.Arg118Cys)	-	-
	25	M	hemizigótica c.352C>T (p.Arg118Cys)	1,2ng/ml	ND

F: feminino; M: masculino; GLA: alfa-galactosidase A; α -Gal: atividade enzimática da alfa-galactosidase A; ND: não dosado. Valores de referência: Liso-Gb3 $\leq$ 1,8ng/ml; α -Gal $\geq$ 2,6mol/l/h.

Na comparação entre indivíduos com HVE e sem HVE, ambos apresentando mutações no gene GLA, não houve diferença significativa para o miR-1291, miR-214 e miR-505 (figura 2), entretanto a expressão relativa destes microRNAs demonstrou ser *upregulated* nos indivíduos que apresentaram HVE, principalmente para o miR-1291 (figura 3).

Figura 2 - Quantificação relativa de microRNAs, comparando indivíduos com HVE e sem HVE, ambos com mutações no gene GLA (A) hsa-miR-1291 (B) hsa-miR-214 (C) hsa-miR-505. Teste de classificação assinado de pares combinados de Wilcoxon.

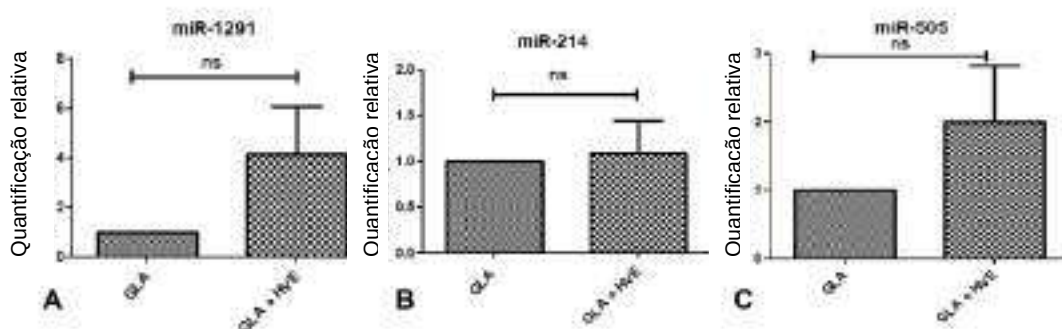
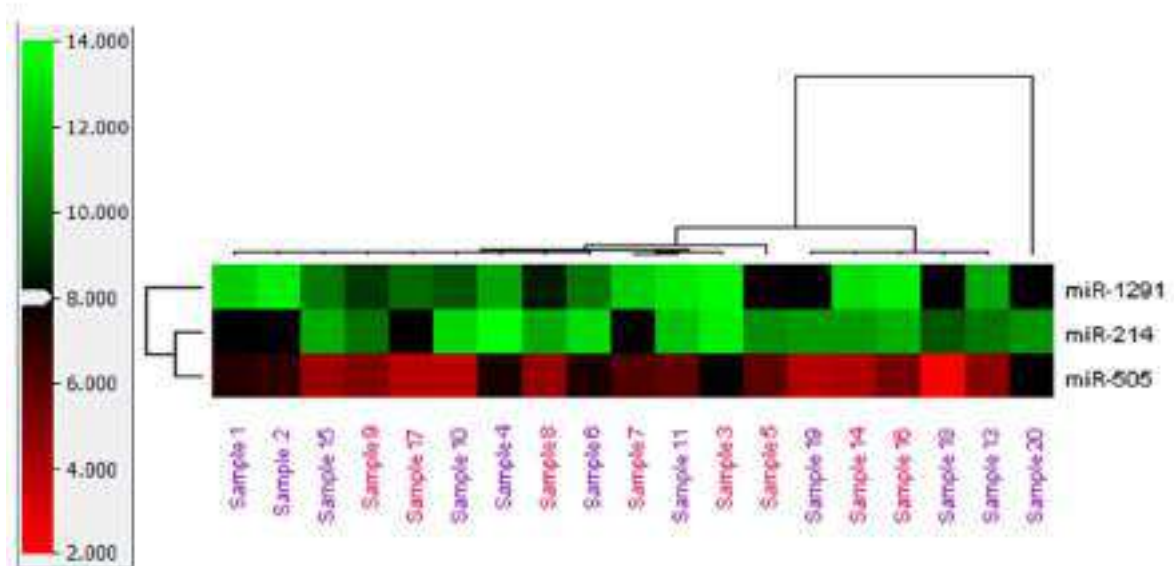


Figura 3 - *Heatmap* de hsa-miR-1291, hsa-miR-214 e hsa-miR-505. As amostras em roxo são indivíduos sem HVE e as amostras em rosa são indivíduos com HVE. Medida de distância: Correlação de *Pearson-s*, Método de agrupamento: Ligação média, Tipo de mapa: Global (Δ Ct) (*Software ExpressionSuite v1.3*).



Na figura 4 são apresentadas as comparações entre os indivíduos com mutações no gene *GLA* caracterizadas com e sem HVE (DF) e tendo como referência o perfil de expressão de indivíduos saudáveis. Na figura 5 os grupos são subdivididos, e o miR-214 apresenta um nível de expressão significativamente maior no grupo de indivíduos com a DF sem HVE quando comparado com indivíduos apresentando HVE ($p=0.0416$; $rs(\text{Spearman})$: 0.9, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Para o miR-505 não houve diferenças significativas quando subdivididos os grupos dos indivíduos com Doença de Fabry carregando o gene *GLA*, entretanto, ao unir os dois grupos de indivíduos com Doença de Fabry a expressão do miR-505 se apresentou aumentada quando comparado com indivíduos saudáveis (figura 5).

Figura 4- Quantificação Relativa (2- $\Delta\Delta CT$ method) dos microRNAs hsa-miR-214e hsa-miR-505) nos indivíduos com mutação no gene *GLA* + (com e sem HVE), comparado com indivíduos controle. *p:0.0195 (Wilcoxon test, rs Spearman: 0.9) and ns: não significante.

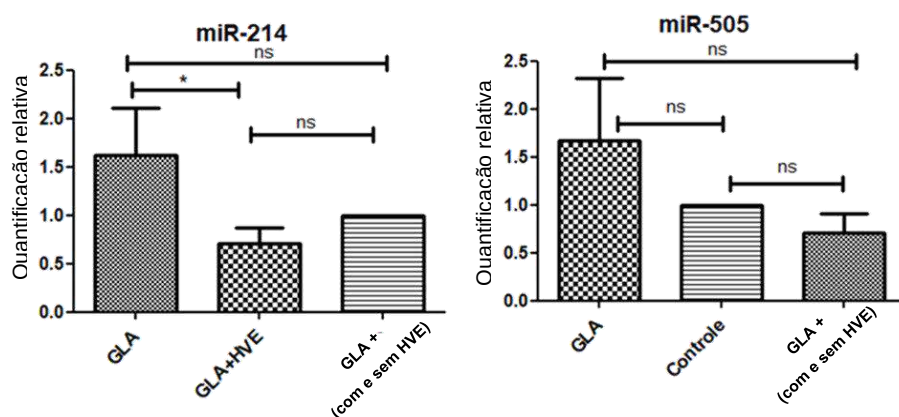
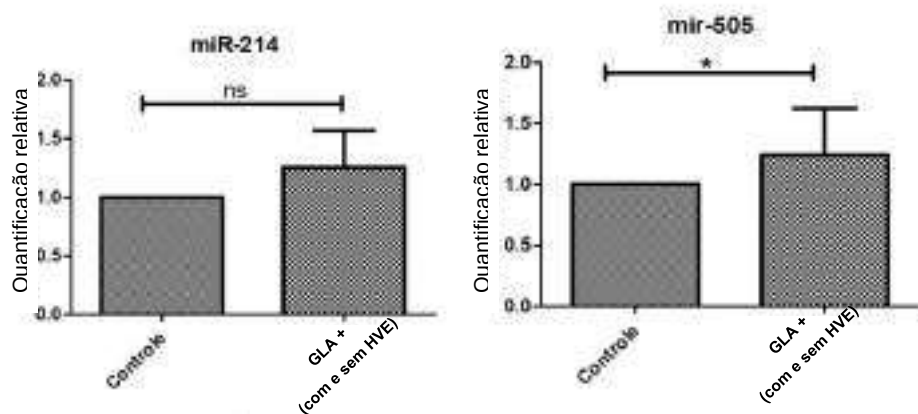
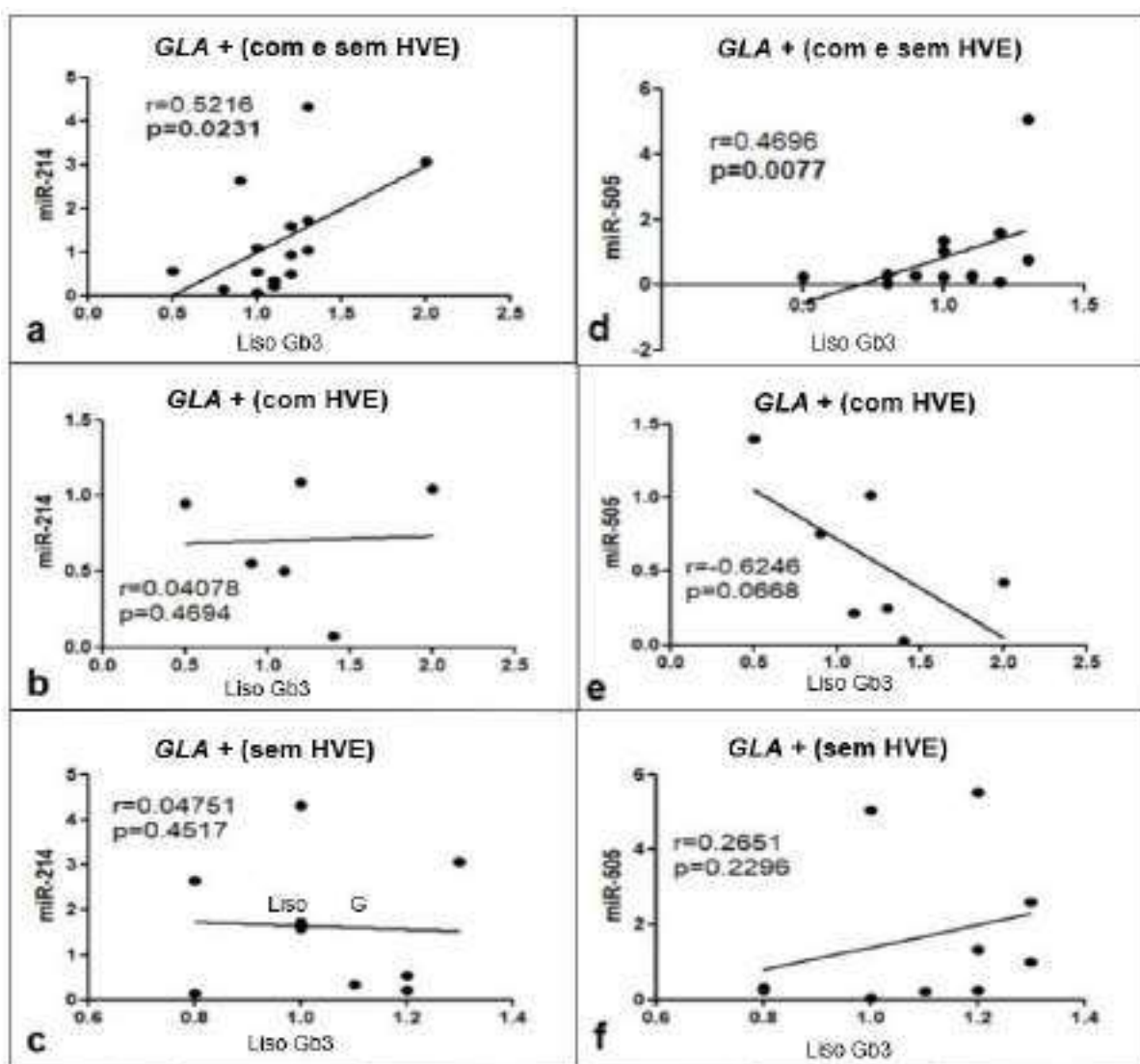


Figura 5 - Quantificação Relativa (2- $\Delta\Delta CT$ method) dos microRNAs hsa-miR-214e hsa-miR-505) nos indivíduos com Doença de Fabry (GLA + com e sem HVE), e indivíduos controle que não apresentam Doença de Fabry. *p:0.0417 (Wilcoxon test, rs Spearman: 0.9) and ns: não significante.



Na figura 6 são apresentadas as análises de correlação entre o miR-214 e o miR-505 com liso Gb3, onde é observada uma correlação significativa e diretamente proporcional nos indivíduos com mutações no gene GLA (quando agrupados com e sem HVE) (a,d), quando separados (b,c, e, f) não são observadas correlações significativas entre as duas variáveis.

Figura 6 - Análises de correlação entre a quantificação relativa do hsa-miR-214 e hsa-miR-505 com Liso-Gb3 nos grupos de indivíduos com mutação no gene *GLA* (*GLA* +). As correlações foram analisadas por Pearson's *r* (Unicaudal).



6 DISCUSSÃO

A deficiência da enzima α -Gal A na DF leva ao acúmulo do liso-Gb3 nos lisossomos de vários órgãos e tecidos, especialmente o endotelial (CAIRNS *et al*, 2018; CHAVES-MARKMAN *et al*, 2019; XIAU *et al*, 2019). Dentre as principais complicações da lesão endotelial na DF estão o AVC, a cardiopatia isquêmica, a hipertensão arterial resistente e a insuficiência renal progressiva (ZARATE & HOPKIN, 2008). O papel biológico dos miRNAs tem demonstrado a importância destas micromoléculas no processo de inflamação do endotélio vascular e na fibrose dos tecidos, incluindo o rim e o coração (RONCARATI *et al*, 2014; CHUNG & LAN, 2015; GURHA, 2016; O'REILLY, 2016). O presente estudo tem como população pcts com acometimento cardíaco na forma tardia da DF e indivíduos com mutações no gene *GLA*, identificados através da investigação dos familiares. Devido às controvérsias sobre a patogenicidade das variantes encontradas, os autores levantaram a hipótese de que outros biomarcadores poderiam ter maior sensibilidade nos estágios precoces da DF. Estudos sugerem que os miRNAs tornam-se desregulados antes da manifestação física de uma determinada doença, por esta razão estão sendo utilizados precocemente para identificação de processos biológicos (CREEMERS, TIJSEN & PINTO, 2012).

O objetivo deste estudo foi a investigação de miRNAs em pcts com a forma tardia da DF e acometimento cardíaco, pois apesar dos níveis do liso-Gb3 estarem normais, quatro pcts índices e dois decorrentes da triagem familiar não apresentavam mutações em outros genes que justificassem a HVE. Na DF a dosagem do liso-Gb3 tem sido utilizada como um marcador de patogenicidade, porém há controvérsias quanto ao seu papel na forma tardia e com variantes classificadas como VUS (NOWAK *et al*, 2017; SMID *et al*, 2015; NIEMANN *et al*, 2014).

Alguns miRNAs já foram implicados em cardiopatias específicas, como a isquemia miocárdica, além de doenças endoteliais e hipertensão, dentre os quais os miR-214, miR-505 e miR-1291 (VAN ROOIJ *et al*, 2008; SMALL & OLSON, 2011; JIN *et al*, 2014; PENG *et al*, 2014; ROMAINE *et al*, 2016; WANG *et al*, 2017; YANG *et al*, 2019; CHEN *et al*, 2019; CHEN *et al*, 2021). Na DF, XIAU e colaboradores (2019), verificaram que o miR-21 e o miR-210 apresentam expressão reduzida naqueles com insuficiência renal crônica. E desde 2006 VAN ROOIJ e colaboradores, em estudo com o tecido cardíaco revelaram que os perfis de expressão de miRNAs dependem do estímulo responsável pela hipertrofia miocárdica, além disso outros estudos indicam que alguns miRNAs são considerados como anti- ou pró-hipertrofos a depender do seu padrão de expressão (DA COSTA MARTINS & DE WINDT, 2012).

As mutações encontradas nos sete pcts índices são consideradas VUS, sendo a c.967C>A (p.Pro323Thr) por apresentar dados insuficientes na literatura, tendo sido citada pela primeira vez por CHAVES-MARKMAN *et al* em 2019. As outras mutações, a c.937G>T (p.Asp313Tyr) e a c.352C<T (p.Arg118Cys), vêm sendo citadas com dados controversos (KOULOUSIOS *et al*, 2017; ORTIZ *et al*, 2018). Em três pcts com a variante c.352C<T (p.Arg118Cys), foram identificadas mutações em outros genes que poderiam justificar a hipertrofia miocárdica, porém em apenas um, a mutação foi classificada como patogênica. Os autores levantam o questionamento sobre qual variante seria causadora do fenótipo da hipertrofia miocárdica naqueles que ambas foram classificadas como VUS, além do que em um dos pcts com a variante c.352C<T (p.Arg118Cys) não foi identificada nenhuma mutação no painel de 206 genes que justifique a HVE. No pct com a variante c.967C>A (p.Pro323Thr), cuja escassez literária a classifica como VUS, o painel molecular com 206 genes também não encontrou outra variante. Em relação a c.937G>T (p.Asp313Tyr), cuja literatura é bastante controversa (DU MOULIN *et al*, 2017; HASHOLT *et al*, 2017; KOULOUSIOS *et al*, 2017), inclusive com estudos que a classificam como benigna (ORTIZ *et al*, 2018) o painel molecular de 206 genes foi coletado na pct índice e em um dos seus irmãos com HVE, porém não foi identificada nenhuma variante. Ressalta-se que a pct índice encontra-se em tratamento com TRE e que seus sintomas prévios e a hipertensão arterial que era de difícil manuseio, estão totalmente controlados após a instituição da terapia específica. O questionamento relacionado à patogenicidade destas mutações levou os autores à investigações de novos biomarcadores.

Os miRNAs circulantes na corrente sanguínea têm sido utilizados como biomarcadores no processo da aterosclerose e devido ao acometimento endovascular na DF, neste estudo foi avaliada a expressão dos miR-1291, miR-214 e miR-505, os quais não apresentaram diferença significativa na comparação entre pcts com HVE e nos indivíduos sem HVE. Entretanto a expressão relativa destes microRNAs demonstrou ser *upregulated* nos pcts com HVE, principalmente para o miR-1291. Ao se usar indivíduos saudáveis como referência à expressão destes miRNAs, o miR-214 apresenta um nível de expressão significativamente aumentado naqueles com mutação no gene *GLA* sem HVE quando comparado com pcts com HVE. Já para o miR-505 não houve diferenças significativas entre os grupos com e sem HVE, porém a união destes dois grupos demonstrou que a expressão do miR-505 se apresenta aumentada quando comparado a indivíduos saudáveis. Além destes achados, o miR-505 e o miR-214 apresentaram uma correlação significativa e diretamente proporcional com o liso-Gb3, quando os agrupados os indivíduos com e sem HVE. Estes dados corroboram que os miRNAs apresentam um papel central na disfunção endotelial relacionada à aterosclerose (XU *et al*, 2012) e que podem

apresentar-se como uma nova forma terapêutica, pois o nível de expressão de um determinado miRNA alterado, poderá ser normalizado, quer seja inibindo um miRNA super expresso quer seja induzindo a expressão de um miRNA sub expresso (THUM *et al*, 2007; VAN ROOIJ, LIU & OLSON, 2008).

O aumento da expressão do miR-505 e do miR-214 nos indivíduos com mutação no gene *GLA* quando comparados a controles saudáveis, a correlação do miR-505 e do miR-214 com o liso-GB3 e a expressão aumentada do miR-214 nos indivíduos com mutação no gene *GLA* sem HVE, enfatiza a importância deste trabalho quanto à questão sobre a classificação das mutações tidas como VUS, devendo-se levar em consideração fatores epigenéticos e do meio ambiente e sugere que as variantes c.937G>T (p.Asp313Tyr), a c.352C<T (p.Arg118Cys) e a c.967C>A (p.Pro323Thr) não tenham tido seus estudos esgotados e possam ser patogênicas a depender da área geográfica e dos marcadores avaliados.

Este estudo apresenta como principal limitação o pequeno número de indivíduos com mutação no *GLA* quer seja com manifestação cardíaca ou, assintomáticos. Novas pesquisas devem ser direcionadas para novos biomarcadores, como os miRNAs que além de serem estáveis e encontrados em vários fluidos corporais, são fáceis de ser coletados, não necessitando de exames invasivos como a biópsia renal ou cardíaca.

7 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo corroboram que os miRNAs exercem um papel central na disfunção endotelial e podem ser biomarcadores na forma tardia da DF. Quanto às mutações p.Arg118Cys e p.Asp313Tyr devem ser considerados fatores epigenéticos, do meio ambiente e da área geográfica para definição de suas classificações.

REFERÊNCIAS

AERTS JW, Röling WFM, Elsaesser A, Ehrenfreund P. Biota and Biomolecules in Extreme Environments on Earth: Implications for Life Detection on Mars. *Life* 2014, 4, 535-65. <https://doi.org/10.3390/life4040535>.

ARENDS M, Biegstraaten M, Hughes DA, et al. Retrospective study of long-term outcomes of enzyme replacement therapy in Fabry disease: Analysis of prognostic factors. *PLoS ONE* 12(8): e0182379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182379>.

BIEGSTRAATEN M, Arngrímsson R, Barbey F, 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* 10, 36 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0253-6>.

BOUSTANY RM. Lysosomal storage diseases—the horizon expands. *Nat Rev Neurol* 9, 583–598 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.163>.

BURLINA AB, Polo G, Salviati L, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy. *J Inherit Metab Dis*. 2018 Mar;41(2):209-19. doi: 10.1007/s10545-017-0098-3. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29143201.

CAIRNS T, Müntze J, Gernert J, et al. Hot topics in Fabry disease. *Postgrad Med J*. 2018 Dec;94(1118):709-13. doi: 10.1136/postgradmedj-2018-136056. Epub 2018 Dec 17. PMID: 30559317; PMCID: PMC6581083.

CHAN LS, Yue PY, Mak NK, et al. Role of microRNA-214 in ginsenoside-Rg1-induced angiogenesis. *Eur J Pharm Sci* 2009; 38: 370–377.

CHAVES-MARKMAN AV, Markman M, Calado EB, et al. GLA Gene Mutation in Hypertrophic Cardiomyopathy with a New Variant Description: Is it Fabry's Disease? *Arq. Bras. Cardiol.[online]*. 2019, vol.113, n.1, pp.77-84. Epub July 10, 2019. ISSN 1678-4170. <https://doi.org/10.5935/abc.20190112>.

CHAVES AVF, Silva SM, Salemi VMC, Antunes MO. Doença de Fabry: o que sabemos hoje? *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2021;31(2):198-206. <http://dx.doi.org/10.29381/0103-8559/20213102198-206>.

CHEN L, Hu L, Li Q, et al. Exosome-encapsulated miR-505 from ox-LDL-treated vascular endothelial cells aggravates atherosclerosis by inducing NET formation. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, 51(12), 1233–1241. doi: 10.1093/abbs/gmz123.

CHEN L, Bai J, Liu J, et al. A Four-MicroRNA Panel in Peripheral Blood Identified as an Early Biomarker to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Front. Physiol.*(2021) 12:669590. doi: 10.3389/fphys.2021.669590

CHO MH, Cho K, Kang HJ, et al. Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* 10: 1761-1775; 2014

CHU Q, Yan X, Liu L, et al. The inducible microRNA-21 negatively modulates the

inflammatory response in teleost fish via targeting IRAK4, *Front. Immunol.* 10 (2019), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01623>.

CHUNG AC-K, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis. *Frontiers in Physiology* 2015; 6:50. doi:10.3389/fphys.2015.00050.

CREEMERS EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012, 110:483-495.

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.

DA COSTA MARTINS PA, De Windt LJ. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* 2012;93(4):563–72. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs013>.

DAVIGNON J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: I27-32; 2004.

DE DUVE C, Pressman BC, Gianetto R, et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1955 Aug;60(4):604-17. doi: 10.1042/bj0600604. PMID: 13249955; PMCID: PMC1216159.

DU MOULIN M, Koehn AF, Golsari A, et al. The mutation p. D313Y is associated with organ manifestation in Fabry disease. *Clinical Genetics* 92.5 (2017): 528-533.

ELLIOTT P, Baker R, Pasquale F, et al. Prevalence of Anderson–Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson–Fabry Disease Survey *Heart* 2011;97:1957- 60.

GERMAIN DP, Charrow J, Desnick RJ, et al. Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *J Med Genet* 2015;52:353-58. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102797 353.

GURHA P. MicroRNAs in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 2016;31: 249-54.

HASHOLT L, Ballegaard M, Bundgaard H, et al. The D313Y variant in the GLA gene – no evidence of a pathogenic role in Fabry disease, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory INVESTIGATION*, 2017. doi: 10.1080/00365513.2017.1390782

HOLLAK CEM, Wijburg FA. Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges. *J Inherit Metab Dis* 37, 587–98 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9718-3>.

HSU TR, Hung SC, Chang FP, et al. Later onset Fabry disease, cardiac damage progress in silence. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(23):2554-63.

HUGHES DA. Fabry disease: will markers of early disease enable early treatment and better outcomes? *Curr Opin Cardiol.* 2016;31(4):434-9.

HUGHES DA, Nicholls K, Shankar SP, et al. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *Journal of Medical Genetics* 2017;54:288-96.

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;10(125). <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0338-2>.

KAMINSKY P, Noel E, Jaussaud R, et al. Multidimensional analysis in Fabry's disease. *Int J Clin Pract*, February 2013, 67, 2, 120–127. doi: 10.1111/ijcp.12016.

KOULOUSIOS K, Stylianou K, Pateinakis P, et al. Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ Open* 2017;7:e017098. doi:10.1136/bmjopen-2017-017098

LIN HY, Chong KW, Hsu JH, et al. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:450–6.

LIU J, Guoa S, Zhanga T, et al. MiR-505 as an anti-inflammatory regulator suppresses HMGB1/NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-mediated endometritis by targeting HMGB1. *International Immunopharmacology* 88 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106912>.

LU H-Q, Liang C, He Z-Q, et al. Circulating miR-214 is associated with the severity of coronary artery disease. *J Geriatr Cardiol* 2013; 10: 34–38. doi: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.01.007.

LV L, Li T, Li X, et al. The lncRNA Plscr4 Controls Cardiac Hypertrophy by Regulating miR-214. *Molecular Therapy: Nucleic Acids* Vol. 10 March 2018. doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.018.

KUBO T, Ochi Y, Baba Y, et al. Prevalence and clinical features of Fabry disease in Japanese male patients with diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Cardiology* 69 2017;(303):302-7. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.05.014>.

LINHART A, Elliott PM. The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Heart* 2007;93:528-35. doi: 10.1136/hrt.2005.063818.

LINHART A, Germain DP, Olivetto I, et al. An expert consensus document on the management of cardiovascular manifestations of Fabry disease. *Eur J Heart Fail*, 2020;22: 1076-96. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1960>.

MA X, Guo S, Jiang K, et al. MiR-128 mediates negative regulation in *Staphylococcus aureus* induced inflammation by targeting MyD88, *Int. Immunopharmacol.* 70 (2019) 135–146.

MARIAN AJ, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res.* 2017 Sep 15;121(7):749-70. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311059. PMID: 28912181; PMCID: PMC5654557.

MARTINET W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circ Res* 104: 304-17; 2009

MECHTLER TP, Stary S, Metz TF, et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *The Lancet* 2012;379:335–41.

MONSERRAT L, Gimeno-Blanes JR, Francisco Marín F, et al. Prevalence of Fabry Disease in a Cohort of 508 Unrelated Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Dec, 50 (25), 2399–403.

NAVICKAS R, Gal D, Laucevičius A, et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review, *Cardiovascular Research*, Volume 111, Issue 4, September 2016, Pages 322–37, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw174>

NIEMANN M, Rolfs A, Störk S, et al. Gene mutations versus clinically relevant phenotypes: lyso-Gb3 defines Fabry disease. *Circulation. Cardiovascular Genetics*. 2014 Feb;7(1):8-16. DOI: 10.1161/circgenetics.113.000249.

NOWAK A, Mechtler T, Kasper DC, Desnick RJ. Correlation of Lyso-Gb3 levels in dried blood spots and sera from patients with classic and Later-Onset Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2017, 121(4), 320-24. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.06.006>.

OMMEN SR, Mital S, Burke MA, et al. 2020 AHA/ACC Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy: A Report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2020;Nov 20:[Epub ahead of Print].

O'REILLY S. MicroRNAs in fibrosis: opportunities and challenges. *Arthritis Research & Therapy* 2016;18(11):016-0929. doi: 10.1186/s13075-016-0929-x.

ORTIZ A, Germain DP, Desnick RJ, et al. Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Molecular Genetics and Metabolism* 123 (2018) 416–427

ORTOLANO S, Viéitez I, Navarro C, Spuch C. Treatment of Lysosomal Storage Diseases: Recent Patents and Future Strategies. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2014, Vol. 8, No.1, 9-25.

PENG L, Chun-guang Q, Bei-fang L, et al. Clinical impact of circulating miR-133, miR-1291 and miR-663b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Diagnostic Pathology* 2014, 9:89.

QUIAT D, Olson EN. MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest*. 2013;123(1):11-18. <https://doi.org/10.1172/JCI62876>.

ROMAINE SPR, Charchar FJ, Samani NJ, Tomaszewski M. Circulating microRNAs and hypertension — from new insights into blood pressure regulation to biomarkers of cardiovascular risk. *Current Opinion in Pharmacology* 2016, 27:1–7.

RONCARATI R, Viviani Anselmi C, Losi MA, et al. Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with

hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:920-27. doi: 10.1016/j.jacc.2013.09.041.

SARA L, Szarf G, Tachibana A, 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.* 103 (6 suppl 3) • Dez 2014. <https://doi.org/10.5935/abc.2014S006>

SAYED D, Hong C, Chen I-Y, et al. MicroRNAs Play an Essential Role in the Development of Cardiac Hypertrophy. *Circ Res.* 2007;100:416-24.

SMALL E, Olson, E. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469, 336–42. <https://doi.org/10.1038/nature09783>

SMID BE, van der Tol L, Biegstraaten M, et al. *J Med Genet* 2015;0:1–7. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102872.

TOLDO CM, Marconetto FH, Camacho L. Enfermedad de Anderson Fabry Perspectiva desde el cardiólogo “No se diagnostica lo que no se piensa, y no se piensa lo que no se conoce”. *Insuf Card* 2017;12(2): 51-61.

THUM T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the Human Heart: A Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure. *Circulation* 2007;116:258-267. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.687947>.

THUM T, Condorelli G. Long Noncoding RNAs and MicroRNAs in Cardiovascular Pathophysiology. *Circ Res.* 2015;116:751-62. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303549.

VAN ROOIJ E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *PNAS* November 28, 2006 103 (48) 18255-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608791103>

VAN ROOIJ E, Sutherland LB, Thatcher JE. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *PNAS* 2008;105(35 13027–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805038105>.

VAN ROOIJ E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*, 2008;24(4):159-66. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.01.007>.

WANG J, Wang W-N, Xu S-B, et al. MicroRNA-214-3p: A link between autophagy and endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Acta Physiologica* (2017) Volume 222, Issue 3 e12973. <https://doi.org/10.1111/apha.12973>

WANG R, Bodamer O, Watson M, et al. Lysosomal storage diseases: Diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med* 13, 457-84 (2011). <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e318211a7e1>.

WU K, Zhao Q, Li Z, et al. Bioinformatic screening for key miRNAs and genes associated with myocardial infarction. *FEBS Open Bio* 8 (2018) 897–913. doi:10.1002/2211-5463.12423

XIAO K, Lu D, Hoepfner J, et al. Circulating microRNAs in Fabry Disease. *Scientific Reports* | (2019) 9:15277 |<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51805-6>

XU J, Wang Y, Tan X, Jing H. MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis. *Autophag* 8: 873-82; 2012

YANG K, Shi J, Hu Z, Hu X. The deficiency of miR-214-3p exacerbates cardiac fibrosis via miR-214-3p/NLRC5 axis. *Clinical Science* (2019) 133 1845–1856. doi.org/10.1042/CS20190203.

YANG Q, Jia C, Wang P, et al. MicroRNA-505 identified from patients with essential hypertension impairs endothelial cell migration and tube formation. *International Journal of Cardiology* 177 (2014) 925–934.

ZARATE YA, Hopkin RJ. Fabry's disease. *Lancet* 2008;372: 1427–35.

ZHAO Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2. *Cell* 129, 303-17, April 20, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.030>.

ZHAO Y, Ponnusamy M, Zhang L, et al. The role of miR-214 in cardiovascular diseases, *European Journal of Pharmacology*, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.08.009>

ZHU H, Cao XX, Liu J, et al. MicroRNA-488 inhibits endometrial glandular epithelial cell proliferation, migration, and invasion in endometriosis mice via Wnt by inhibiting FZD7, *J. Cell. Mol. Med.* 23 (4) (2019) 2419–2430.

ANEXO A - LISTA DOS GENES

- AARS2 – Alanyl-TRNA Synthetase 2 (alanine tRNA sintetase 2)
- ABCC6 – ATP binding cassette subfamily C member 6 (membro 6 da Subfamília C do Cassete de ligação de ATP)
- ABCC9 – ATP binding cassette subfamily C member 9 (membro 9 da Subfamília C do Cassete de ligação de ATP)
- ACAD8 – Acyl-CoA dehydrogenase family member 8 (membro 8 da família acil-CoA desidrogenase)
- ACAD9 – Acyl-CoA dehydrogenase family member 9 (membro 9 da família acil-CoA desidrogenase)
- ACADS – Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (Acil-Coenzima A desidrogenase)
- ACADVL – Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain (Acil-Coenzima A desidrogenase, cadeia muito longa)
- ACTC1 – *actin alpha cardiac muscle 1*(α -actina cardíaca)
- ACTN2 – Actin alpha cardiac muscle 2 (Actina alfa 2 músculo cardíaco)
- ADCY5 – Adenylate cyclase 5 (adenilato ciclase 5)
- AGK – Acylglycerol kinase (Acilglicerol quinase)
- AGL – Amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (Amilo-alfa-1, 6-glicosidase, 4-alfa-glucanotransferase)
- AHCY – Adenosylhomocysteinase (Adenosilhomocisteínase)
- ALG1 – Asparagine-linked glycosylation 1 homolog (Asparagina ligada ao Homólogo de glicosilação 1)
- ALG12 – Asparagine-linked glycosylation 12 homolog (Asparagina ligada ao Homólogo de glicosilação 12)
- ALMS1 – Centrosome and basal body associated protein (centrossomo e proteína associada ao corpo basal)
- ALPK3 – Alpha kinase 3 (alfa quinase 3)
- ANKS6 – Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6 (domínio de motivo contendo alfa estéril 6)
- APOPT1 – Apoptogenic protein 1 (Proteína apoptogênica 1)
- ARSB – Arylsulfatase B (Arilsulfatase B)
- ATAD3A – ATPase family AAA domain containing 3A (família AAA contendo domínio 3A da ATPase)

ATP5F1 – ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1 (Fator 1 de montagem do complexo F1 mitocondrial ATP sintase)

ATPAF2 – ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 (Fator 2 de montagem do complexo F1 mitocondrial ATP sintase)

BAG3 – BAG cochaperone 3

BCS1L – BCS1 homolog, ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone (Homólogo BCS1, acompanhante do complexo ubiquinol-citocromo c redutase)

BMP2 – Bone morphogenetic protein 2 (Proteína 2 morfogenética óssea)

BOLA3 – bola family member 3 (membro da família bola 3)

BRAF – B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase (B-Raf proto-oncogene, serina/treonina quinase)

BSCL2 – BSCL2 lipid droplet biogenesis associated, seipin (Biogênese de gotículas lipídicas BSCL2)

C1QBP – Complement C1q binding protein (proteína de ligação do complemento C1q)

CACNA1C – Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C (subunidade alfa1 C do canal dependente de voltagem de cálcio)

CALR3 – Calreticulin 3 (calreticulina 3)

CAV3 – Caveolin 3 (caveolina 3)

CAVIN1 – Caveolae associated protein 1 (proteína 1 associada a caveolae)

CENPE – Centromere protein E (centrômero de proteína E)

CEP19 – Ventrosomal protein 19 (proteína 19 centrossomal)

CHKB – choline kinase beta (colina quinase beta)

CLIC2 – chloride intracellular channel 2 (canal intracelular de cloreto 2)

CLN3 – CLN3 lysosomal/endosomal transmembrane protein, battenin (CLN3 proteína transmembranar lisossomal/endossomal)

COA5 – Cytochrome c oxidase assembly factor 5 (fator 5 de montagem citocromo c oxidase)

COA6 – Cytochrome c oxidase assembly factor 6 (fator 6 de montagem citocromo c oxidase)

COQ2 – Coenzyme Q2, polyprenyltransferase (coenzima Q2, polipreniltransferase)

COQ4 – Coenzyme Q4 (coenzima Q4)

COX10 – Cytochrom c oxidase assembly factor heme A:farnesyltransferase COX10 (fator de montagem do citocromo c oxidase heme A:farnesiltransferase COX10)

COX14 – cytochrome c oxidase assembly factor COX14 (fator de montagem de citocromo c oxidase COX14)

COX15 – cytochrome c oxidase assembly homolog COX15 (homólogo de montagem de citocromo c oxidase COX15)

COX20 – cytochrome c oxidase assembly factor COX20 (fator de montagem do citocromo c oxidase COX20)

COX6B1 – cytochrome c oxidase subunit 6B1 (subunidade 6B1 de citocromo c oxidase)

COX7B – cytochrome c oxidase subunit 7B (subunidade 7B do citocromo c oxidase)

CPT1A – carnitine palmitoyltransferase 1A (carnitina palmitoiltransferase 1A)

CPT2 – carnitine palmitoyltransferase 2 (carnitina palmitoiltransferase 2)

CRYAB – crystallin alpha B (cristalino alfa B)

CSRP3 – cysteine and glycine rich protein 3 (proteína 3 rica em cisteína e glicina)

D2HGDH – D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (D-2-hidroxiglutarato desidrogenase)

DCAF8 – DDB1 and CUL4 associated factor 8 (Fator 8 associado a DDB1 e CUL4)

DDL – doença de depósito lisossomal

DES – desmina

DLD – dihydrolipoamide dehydrogenase (dihidrolipoamida desidrogenase)

DMD – dystrophin (distrofina)

DNAJC19 – DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C19 (Família de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) membro C19)

DOLK – dolichol kinase (dolicol quinase)

DPM3 – dolichyl-phosphate mannosyltransferase subunit 3 (subunidade 3 de dolícil-fosfato manosiltransferase)

DPP6 – dipeptidyl peptidase like 6 (dipeptidil peptidase 6)

DSG2 – desmoglein 2 (desmogleína 2)

DSP – desmoplakin (desmoplaquina)

DTNA – dystrobrevin alpha (distrobrevina alfa)

ECHS1 – enoyl-CoA hydratase, short chain 1 (cadeia curta 1 de enoil-CoA hidratase)

ELAC2 – elac ribonuclease Z 2

EMD – emerin

EPG5 – ectopic P-granules 5 autophagy tethering factor (fator de ancoragem de autofagia de grânulos P 5 ectópicos)

ERBB3 – erb-b2 receptor tyrosine kinase 3 (receptor erb-b2 tirosina quinase 3)

EYA4 – EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4 (Coativador de transcrição EYA e fosfatase 4)

FAH – fumarylacetoacetate hydrolase (fumarilacetoacetato hidrolase)

FASTKD2 – FAST kinase domains 2 (Domínios de quinase FAST 2)
 FBXL4 – F-box and leucine rich repeat protein 4 (F-box e proteína de repetição rica em leucina 4)
 FHL1 – four and a half LIM domains 1 (quatro domínios e meio LIM 1)
 FIG4 – FIG4 phosphoinositide 5-phosphatase (FIG4 fosfoinositida 5-fosfatase)
 FKRP – fukutin related protein (proteína relacionada à fukutina)
 FKTN – fukutin
 FLAD1 – flavin adenine dinucleotide synthetase 1 (flavina adenina dinucleotídeo sintetase 1)

 FLNC – filamina C
 FOXRED1 – FAD dependent oxidoreductase domain containing 1 (Domínio contendo oxidorreductase dependente de FAD 1)
 FTO – FTO alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase (Dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato de FTO)
 FUCA1 – alpha-L-fucosidase 1
 FXN – frataxin
 GAA – alpha glucosidase (alfa glicosidase)
 GATAD1 – GATA zinc finger domain containing 1 (Domínio contendo dedo de zinco GATA 1)
 GBE1 – 1,4-alpha-glucan branching enzyme 1 (Enzima de ramificação de 1,4-alfa-glucano 1)
 GLA – gene da alfa galactosidase A
 GLB1 – galactosidase beta 1
 GMPPB – GDP-mannose pyrophosphorylase B (GDP-manose pirofosforilase B)
 GNPTAB – N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase subunits alpha and beta (Subunidades alfa e beta da N-acetilglucosamina-1-fosfato transferase)
 GNS – glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (glucosamina (N-acetil)-6-sulfatase)
 GPC3 – glypican 3 (glipicano 3)
 GSN – gelsolina
 GTPBP3 – GTP binding protein 3, mitochondrial (Proteína 3 de ligação a GTP)
 GYS1 – glycogen synthase 1 (glicogênio sintase 1)
 HADH – hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (hidroxiacil-CoA desidrogenase)
 HADHA – hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha (Subunidade alfa do complexo multienzimático trifuncional hidroxiacil-CoA desidrogenase)

HADHB – hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta (Subunidade beta do complexo multienzimático trifuncional hidroxiacil-CoA desidrogenase)

HCCS – holocytochrome c synthase (holocitocromo c sintase)

HGSNAT – heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (heparan-alfa-glucosaminida N-acetiltransferase)

HPS1 – HPS1 biogenesis of lysosomal organelles complex 3 subunit 1 (Biogênese HPS1 de organelas lisossômicas complexo 3 subunidade 1)

HRAS – HRas proto-oncogene, GTPase (Proto-oncogene HRas, GTPase)

HSD17B10 - hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 10 (hidroxiesteróide 17-beta desidrogenase 10)

IDH2 – isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+) (isocitrato desidrogenase 2)

IDUA – alfa-L-iduronidase

ITPA – inosine triphosphatase (inosina trifosfatase)

JPH2 – junctofilina 2

JUP – junction plakoglobin (junção placoglobina)

KCNE1 – potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 1 (subunidade 1 da subfamília E reguladora do canal dependente de voltagem de potássio)

KCNH1 – potassium voltage-gated channel subfamily H member 1 (membro 1 da subfamília H do canal dependente de voltagem de potássio)

KCNJ2 – potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 2 (membro 2 da subfamília J do canal de retificação interna de potássio)

KCNQ1 – potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 (membro 1 da subfamília Q de canal dependente de voltagem de potássio)

LAMA4 – laminin subunit alpha 4 (subunidade alfa 4 de laminina)

LAMP2 – lysosomal associated membrane protein 2 (proteína 2 de membrana associada aos lisossomos)

LAMP2 – *lysosomal-associated membrane protein 2* (proteína 2 de membrana associada ao lisossoma)

LDB3 – LIM domain binding 3 (Ligação de domínio LIM 3)

LIAS – lipoic acid synthetase (ácido lipóico sintetase)

liso-Gb3 – globotriaosilesfingosina

LMNA – lamin A/C

MAP2K1 – mitogen-activated protein kinase kinase 1 (proteína quinase quinase 1 ativada por mitógeno)

MAP2K2 – mitogen-activated protein kinase kinase 2 (proteína quinase quinase 2 ativada por mitógeno)

MCCC2 – methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit 2 (subunidade 2 da metilcrotonil-CoA carboxilase)

MGME1 – mitochondrial genome maintenance exonuclease 1 (exonuclease 1 de manutenção do genoma mitocondrial)

MIB1 – MIB E3 ubiquitin protein ligase 1 (MIB E3 ubiquitina proteína ligase 1)

miRNAs – microRNAs

MLYCD - malonil-CoA descarboxilase

MRPL3 – mitochondrial ribosomal protein L3 (proteína L3 ribossomal mitocondrial)

MRPL44 – mitochondrial ribosomal protein L44 (proteína L44 ribossomal mitocondrial)

MRPS22 – mitochondrial ribosomal protein S22 (proteína ribossômica mitocondrial)

MRPS7 – proteína ribossômica mitocondrial S7 (proteína S22 ribossômica mitocondrial S7)

MTFMT – mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase (metionil-tRNA formiltransferase mitocondrial)

MTO1 – mitochondrial tRNA translation optimization 1 (otimização de tradução de tRNA mitocondrial 1)

MUT – methylmalonyl CoA mutase (metilmalonil CoA mutase)

MVT – *myocardial ventricular thickness* (espessura ventricular miocárdica)

MYBPC3 – proteína C de ligação à miosina

MYH6 – myosin heavy chain 6 (cadeia pesada de miosina cardíaca 6)

MYH7 – myosin heavy chain 7 (cadeia pesada de miosina cardíaca 7)

MYL2 – myosin light chain 2 (cadeia leve de miosina 2)

MYL3 – *myosin, light chain 3* (cadeia leve de miosina 3)

MYLK2 – myosin light chain kinase 2 (cadeia leve de miosina quinase 2)

MYO6 – myosin (miosina 6)

MYOT – myotilin (miotilina)

MYOZ2 – myozenin 2 (miozenina 2)

MYPN – *myopalladin* (miopaladina)

NAGLU – N-acetyl-alpha-glucosaminidase (N-acetil-alfa-glucosaminidase)

NDUFA1 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A1 (NADH: subunidade A1 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFA10 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A10 (NADH: subunidade A10 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFA11 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A11 (NADH: subunidade A11 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFA12 - NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A12 (NADH: subunidade A12 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFA2 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A2 (NADH: subunidade A2 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFA6 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A6 (NADH: subunidade A6 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFA9 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A9 (NADH: subunidade A9 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFAF1 – NADH: ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 1 (NADH: fator de montagem do complexo ubiquinona oxidorreductase 1)

NDUFAF2 – NADH: ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 2 (NADH: fator de montagem do complexo ubiquinona oxidorreductase 2)

NDUFAF3 – NADH: ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 3 (NADH: fator de montagem do complexo ubiquinona oxidorreductase 3)

NDUFAF4 – NADH: ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 4 (NADH: fator de montagem do complexo ubiquinona oxidorreductase 4)

NDUFAF5 – NADH: ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 5 (NADH: fator de montagem do complexo ubiquinona oxidorreductase 5)

NDUFAF6 – NADH: ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 6 (NADH: fator de montagem do complexo ubiquinona oxidorreductase 6)

NDUFB11 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit B11 (NADH: subunidade B11 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFB3 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit B3 (NADH: subunidade B3 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFB8 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit B8 (NADH: subunidade B8 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFB9 – NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit B9 (NADH: subunidade B9 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFS1 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S1 (NADH: subunidade central S1 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFS2 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S2 (NADH: subunidade central S2 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFS3 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S3 (NADH: subunidade central S3 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFS4 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S4 (NADH: subunidade central S4 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFS6 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S6 (NADH: subunidade central S6 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFS7 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S7 (NADH: subunidade central S7 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFS8 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S8 (NADH: subunidade central S8 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFV1 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit V1 (NADH: subunidade central V1 da ubiquinona oxidorreductase)

NDUFV2 – NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit V2 (NADH: subunidade central V2 da ubiquinona oxidorreductase)

NEU1 – neuraminidase 1

NEXN – nexilin F-actin binding protein (proteína de ligação à nexilina F-actina)

NKX2-5 – NK2 homeobox 5

NONO – non-POU domain containing octamer binding (domínio não POU contendo ligação de octâmero)

NUBPL – NUBP iron-sulfur cluster assembly factor (Fator de montagem de aglomerado de ferro-enxofre NUBP)

NYHA – *New York Heart Association* (associação do coração de Nova Iorque)

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man* (Herança Mendeliana Online no Homem)

PAM16 – presequence translocase associated motor 16 (motor 16 associado a translocase de pré-sequência)

PCCA – propionyl-CoA carboxylase subunit alpha (subunidade alfa da propionil-CoA carboxilase)

PCCB – propionyl-CoA carboxylase subunit beta (subunidade beta da propionil-CoA carboxilase)

PET100 – PET100 cytochrome c oxidase chaperone (PET100 citocromo c oxidase chaperona)

PGM1 – phosphoglucomutase 1 (fosfoglucomutase 1)

PHYH – phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (fitanoil-CoA 2-hidroxilase)

PIGT – phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T (fosfatidilinositol glicano âncora biossíntese classe T)

PLN – *phospholamban* (fosfolambano)

PMM2 – phosphomannomutase 2 (fosfomanomutase 2)

PNPLA2 – patatin like phospholipase domain containing 2 (domínio 2 de fosfolipase semelhante a patatina)

POLG – DNA polymerase gamma, catalytic subunit (subunidade catalítica da DNA polimerase gama)

POMT1 – protein O-mannosyltransferase 1 (proteína O-manosiltransferase 1)

PPCS – phosphopantothienoylcysteine synthetase (fosfopantotenoilcisteína sintetase)

PRDM16 – PR/SET domain 16 (domínio 16 de PR/SET)

PRG4 – proteoglycan 4 (proteoglicano 4)

PRKAG2 – *protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit* (A subunidade proteína-quinase gama-2 ativada por 5'-AMP)

PRKAR1A – protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha (subunidade reguladora alfa tipo I dependente de cAMP proteína quinase)

PSEN1 – presenilin 1 (presenilina 1)

PSMB4 – proteasome 20S subunit beta 4 (subunidade beta 4 do proteassoma 20S)

PSMB8 – proteasome 20S subunit beta 8 (subunidade beta 8 do proteassoma 20S)

PSMB9 – proteasome 20S subunit beta 9 (subunidade beta 9 do proteassoma 20S)

PTPN11 – *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11* (Não receptor de tirosina-proteína fosfatase tipo 11)

RAB3GAP2 – RAB3 GTPase activating non-catalytic protein subunit 2 (Subunidade 2 de proteína não catalítica ativadora de RAB3 GTPase)

RAF1 – Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (Raf-1 proto-oncogene, serina/treonina quinase)

RBCK1 – Proteína 1 contendo dedo de zinco do tipo RanBP e C3HC4

RBM20 – RNA binding motif protein 20 (Proteína 20 de ligação de RNA)

RIT1 – Ras like without CAAX 1 (Ras não similar a CAAX 1)

RMND1 – required for meiotic nuclear division 1 homolog (homólogo preciso para a divisão nuclear meiótica 1)

RYR2 – ryanodine receptor 2 (receptor 2 de rianodina)

SCN5A – sodium voltage-gated channel alpha subunit 5 (subunidade alfa 5 do canal dependente de voltagem de sódio)

SCO1 – synthesis of cytochrome C oxidase 1 (síntese de citocromo C oxidase 1)

SCO2 – synthesis of cytochrome C oxidase 2 (síntese de citocromo C oxidase 2)

SDHA – succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (subunidade A do complexo flavoproteína do succinato desidrogenase)

SDHAF1 – succinate dehydrogenase complex assembly factor 1 (fator de montagem do complexo succinato desidrogenase 1)

SDHD – succinate dehydrogenase complex subunit D (subunidade D do complexo succinato desidrogenase)

SELENON – selenoprotein N (selenoproteína N)

SGCA – sarcoglycan alpha (alfa sarcoglicano)

SGCB – sarcoglycan beta (beta sarcoglicano)

SGCD – sarcoglycan delta (delta sarcoglicano)

SGCG – sarcoglycan gamma (gama sarcoglicano)

SGSH – N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (N-sulfoglucosamina sulfohidrolase)

SHOC2 – SHOC2 leucine rich repeat scaffold protein (Proteína de andaime de repetição rica em leucina SHOC2)

SLC19A2 – solute carrier family 19 member 2 (membro 2 da família 19 de transportadores de soluto)

SLC22A5 – solute carrier family 22 member 5 (membro 5 da família 22 de transportadores de soluto)

SLC25A20 – solute carrier family 25 member 20 (membro 20 da família 25 de transportadores de soluto)

SLC25A26 – solute carrier family 25 member 26 (membro 26 da família 25 de transportadores de soluto)

SLC25A3 – solute carrier family 25 member 3 (membro 3 da família 25 de transportadores de soluto)

SLC25A4 – solute carrier family 25 member 4 (membro 4 da família 25 de transportadores de soluto)

SOS1 – SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1 (Fator 1 de troca de nucleotídeos de guanina SOS Ras/Rac)

SPEG – striated muscle enriched protein kinase (proteína quinase enriquecida de músculo estriado)

SURF1 – SURF1 cytochrome c oxidase assembly factor (Fator de montagem do citocromo c oxidase SURF1)

SYNE1 – spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1 (repetição de espectrina contendo proteína 1 do envelope nuclear)

SYNE2 – spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2 (repetição de espectrina contendo proteína 2 do envelope nuclear)

TACO1 – translational activator of cytochrome C oxidase I (ativador translacional da citocromo C oxidase I)

TANGO2 – transport and golgi organization 2 homolog (transporte e organização de golgi 2 homólogo)

TAPT1 – transmembrane anterior posterior transformation 1 (transformação anterior posterior transmembrana 1)

TAZ – Tafazzin

TBX1 – T-box transcription factor 1 (Fator 1 de transcrição T-box)

TBX3 – T-box transcription factor 3 (Fator 3 de transcrição T-box)

TBX5 – T-box transcription factor 5 (Fator 5 de transcrição T-box)

TCAP - titin-cap (capsula de titina)

TF – transferrin (transferrina)

TIMMDC1 – translocase of inner mitochondrial membrane domain containing 1 (translocase contendo o domínio da membrana mitocondrial interna 1)

TMEM126A – transmembrane protein 126A (proteína transmembrana 126A)

TMEM126B – transmembrane protein 126B (proteína transmembrana 126B)

TMEM43 – transmembrane protein 43 (proteína transmembrana 43)

TMEM70 – transmembrane protein 70 (proteína transmembrana 70)

TMPO – thymopoietin (timopoiatina)

TNNC1 – troponina C1

TNNI3 – troponina I 3

TNNI3K – TNNI3 interacting kinase (quinase de interação com TNNI3)

TNNT2 – troponina T 2

TOP3A – DNA topoisomerase III alpha (DNA topoisomerase III alfa)

TPM1 – α -tropomiosina 1

TPM3 – tropomyosin 3 (tropomiosina 3)

TRIT1 – tRNA isopentenyltransferase 1 (tRNA isopenteniltransferase 1)

TRMT5 – tRNA methyltransferase 5 (tRNA metiltransferase 5)

TRNT1 – tRNA nucleotidyl transferase 1 (tRNA nucleotidil transferase 1)

TSC1 – TSC complex subunit 1 (Subunidade 1 do complexo TSC)

TSFM – Ts translation elongation factor (Fator de alongamento de tradução Ts)

TTN – titin (titina)

TTR – transtirretina

TWINK – twinkle mtDNA helicase (cintilante mtDNA helicase)

UBR1 – ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1 (proteína ligase E3 da ubiquitina)

VCL – vinculin (vinculina)

VPS33A – VPS33A core subunit of CORVET and HOPS complexes (Subunidade central VPS33A dos complexos CORVET e HOP)

VSVE – via de saída do ventrículo esquerdo

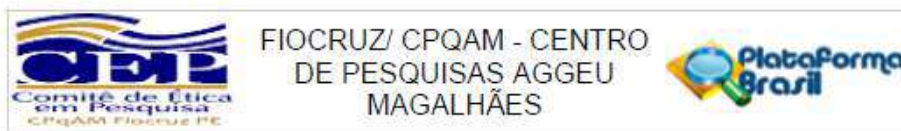
WFS1 – wolframin ER transmembrane glycoprotein (wolframina ER glicoproteína transmembrana)

XK – X-linked Kx blood group (Grupo sanguíneo Kx ligado ao X)

XPNPEP3 – X-prolyl aminopeptidase 3 (X-prolil aminopeptidase 3)

YARS2 – tyrosyl-tRNA synthetase 2 (tirosil-tRNA sintetase 2)

ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de MicroRNAs na doença de FABRY por sequenciamento de nova geração (NGS).

Pesquisador: LUYDSON RICHARDSON SILVA VASCONCELOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02109018.0.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: MULTICARE FARMACEUTICA DO BRASIL LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.076.174

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta a proposta de um Estudo transversal do tipo série de casos, prospectivo, descritivo e analítico. Tem previsão de início para janeiro de 2018 a abril de 2020.

Serão estudados os pacientes com diagnóstico molecular da doença de Fabry atendidos nos ambulatório de cardiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Consta no método que os pacientes serão atendidos no ambulatório de cardiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Os critérios de inclusão

serão os pacientes que apresentarem mutações no gene GLA e que preencham critério para o diagnóstico de doença de Fabry, idade > 18 anos, capacidade cognitiva de responder questionários e concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Identificação de miRNAs em pacientes com DF como biomarcadores da fibrose e/ou hipertrofia cardíaca.

Objetivos secundários:

a) Correlacionar o resultado do miRNA à hipertrofia cardíaca (índice de massa, espessura relativa da parede e medida do diâmetro da parede) através do ecocardiograma transtorácico (inter e intra

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



**FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO
DE PESQUISAS AGGEU
MAGALHÃES**



Continuação do Parecer: 3.076.174

observador).

- b) Avaliar eventuais associações entre o miRNA alterado à presença de fibrose diagnosticada através da técnica de realce tardio pela ressonância nuclear magnética (RNM)
- c) Correlacionar com liso Gb3 plasmático
- d) Correlacionar com as mutações

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios encontram-se devidamente descritos no projeto (Informações básicas do projeto) e no TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta mérito científico e visa a identificação de um novo biomarcador relacionado à hipertrofia e à fibrose na Doença Fabry na população de pacientes com diagnóstico molecular de DF atendidos no ambulatório de cardiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Serão incluídos pacientes que apresentarem mutações no gene GLA e idade > 18 anos.

O projeto de pesquisa está adequado a Resolução nº 466/12

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos e demais declarações exigidas pelo sistema CEP/CONEP, conforme RES. CNS 466/12 e suas complementares

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O referido projeto, nesta versão, apresenta todas as informações necessárias para compreensão do estudo, não foram observados óbices éticos que impeçam a realização do estudo, portanto apto para sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

UF: PE

Município: RECIFE

CEP: 50.670-420

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO
DE PESQUISAS AGGEU
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 3.076.174

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1243395.pdf	11/12/2018 15:01:34		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_VALIDO.doc	11/12/2018 15:01:17	LUYDSON RICHARDSON SILVA VASCONCELOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	23/10/2018 16:11:06	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termoConfidencialidadeAssinado.pdf	23/10/2018 16:10:01	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartaAnuenciaAssinada_HC.pdf	23/10/2018 16:08:27	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_participantes.pdf	23/10/2018 16:08:01	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Outros	IMG_20181022_152309146.jpg	22/10/2018 16:26:23	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Outros	Dinaldo.pdf	22/10/2018 16:25:19	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Outros	Marcelo.pdf	22/10/2018 16:21:06	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Outros	LUYDSON.pdf	22/10/2018 16:20:50	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Outros	Andrea.pdf	22/10/2018 16:20:25	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.docx	22/10/2018 16:18:02	LUYDSON RICHARDSON SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

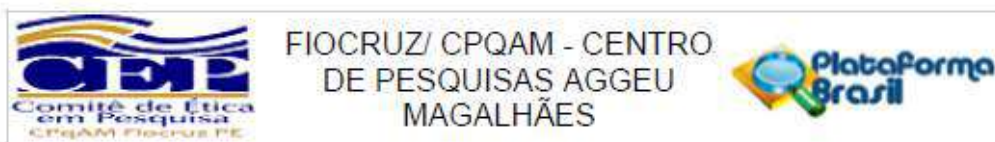
UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.076.174

RECIFE, 12 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n°
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br