

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE FABRY ANTES
E DURANTE A TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DE LONGA DURAÇÃO:
NOVOS ACHADOS FISIOPATOLÓGICOS E O EFEITO *IN VITRO*
DA GLOBOTRIAOSILESFINGOSINA**

GIOVANA BRONDANI BIANCINI

Porto Alegre, 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE FABRY ANTES
E DURANTE A TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DE LONGA DURAÇÃO:
NOVOS ACHADOS FISIOPATOLÓGICOS E O EFEITO *IN VITRO*
DA GLOBOTRIAOSILESFINGOSINA**

GIOVANA BRONDANI BIANCINI

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.**

Porto Alegre, 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

BIANCINI, GIOVANA BRONDANI

ESTUDOS BIOQUÍMICOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE
FABRY ANTES E DURANTE A TERAPIA DE REPOSIÇÃO
ENZIMÁTICA DE LONGA DURAÇÃO: NOVOS ACHADOS
FISIOPATOLÓGICOS E O EFEITO IN VITRO DA
GLOBOTRIAOSILESFINGOSINA / GIOVANA BRONDANI
BIANCINI. -- 2016.
146 f.

Orientadora: CARMEN REGLA VARGAS.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. DOENÇA DE FABRY. 2. ESTRESSE OXIDATIVO. 3.
DANO AO DNA. 4. REPARO DE DNA. 5. STATUS REDOX. I.
VARGAS, CARMEN REGLA, orient. II. Título.

*“O começo de todas as ciências
é o espanto de as coisas serem como são”*

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo.

À minha orientadora, professora Carmen Regla Vargas, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa nove anos atrás e desde então em mim depositado confiança e expectativas. Meu respeito, admiração e gratidão por todos os ensinamentos que vão muito além da vida acadêmica.

Aos colegas do Serviço de Genética Médica, especialmente as bioquímicas do Laboratório de Análises de Metabólitos (Angela e Daniella), os vizinhos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, a Marilda, a Cleia e a Zeniara. Aos médicos Dr. Roberto Giugliani, Dra. Cristina Netto e Dr. Filippo Vairo, pelo apoio.

Ao Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA), especialmente à professora Dinara, pela importante colaboração.

A todos os colegas do LabMet com quem tive o prazer de conviver e aprender muito, que pelo grupo passaram e aos que continuam. Especialmente à Marion, que assumiu junto as empreitadas no tandem, à Camila, minha companheira desde à iniciação científica, e à Angela, minha ponte de entrada no grupo e exemplo de profissional e ser humano.

Às colegas e amigas de faculdade que felizmente levo para a vida (Gabriela B., Agnes, Rosele, Christine, Kelly, Daniela, Gabriela M., Regina, Liliana, Érica, Denise e Ana).

Aos grandes amigos que a vida me deu, muitos deles já na infância. À minha fiel amiga Luciana, que fez por mim muito mais do que eu merecia.

Aos Brondani e Biancini, que me enchem de orgulho e me ensinam na prática o que realmente importa para sermos felizes.

Ao Paulo, meu amor, para quem eu quero voltar todos os dias.

Aos meu pais (Marcos e Irma) e meus irmãos (Daniel e Vitor), cujo amor, comprovadamente, transcende este plano.

SUMÁRIO

PARTE I	Página
1. RESUMO.....	1
1. <i>ABSTRACT</i>	2
2. LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
3.1. Estresse oxidativo.....	5
3.2. Erros inatos do metabolismo.....	8
3.3. Doenças lisossômicas de depósito.....	9
3.3.1. Estresse oxidativo e doenças lisossômicas de depósito.....	11
3.4. Doença de Fabry.....	12
3.4.1. Achados clínicos.....	14
3.4.2. Fisiopatologia.....	16
3.4.3. Diagnóstico.....	21
3.4.4. Tratamento.....	22
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo geral.....	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
 PARTE II	
<i>CAPÍTULO I - DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair</i>	26
<i>CAPÍTULO II - Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy</i>	33
<i>CAPÍTULO III - Globotriaosylsphingosine cytotoxicity: new insights from oxidative DNA damage</i>	62

CAPÍTULO IV – Resultados complementares: liso-Gb3 em pacientes com doença de Fabry.....	93
PARTE III	
1.DISSCUSSÃO.....	96
2. CONCLUSÕES.....	110
3. PERSPECTIVAS.....	111
REFERÊNCIAS.....	112
ANEXOS	
1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO (GPPG – HCPA).....	132
2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES.....	133
3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES.....	136
4. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO – CAPÍTULO II.....	139
5. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO – CAPÍTULO III.....	140

I.1. RESUMO

A doença de Fabry (DF, OMIM 301500) é uma doença lisossômica de depósito de herança ligada ao cromossomo X causada por mutações no gene GLA que levam à tradução da enzima lissomal α -galactosidase A (α -gal A, EC 3.2.1.22) com atividade deficiente ou nula. Como consequência, os substratos dessa enzima (majoritariamente globotriaosilceramida – Gb3 - e globotriaosilesfingosina – liso-Gb3) acumulam-se em diversos tecidos e fluidos corporais dos pacientes com DF. Estudos indicam que inflamação, estresse oxidativo e nitrosativo podem estar envolvidos na fisiopatologia da DF, que ainda não está completamente esclarecida. Foi descrito previamente um aumento de parâmetros inflamatórios e pró-oxidantes em pacientes com DF durante a terapia de reposição enzimática (TRE), todavia se faz necessário avaliar tais parâmetros antes do início da TRE. Através de ensaios *in vivo* e *in vitro* em amostras de sangue e de urina de pacientes com DF, avaliamos alterações de estado redox, dano oxidativo a biomoléculas (incluindo lipídeos, proteínas e DNA) e níveis urinários de Gb3. No intuito de investigar os efeitos biológicos do mais recente biomarcador proposto para a DF, o liso-Gb3, realizamos ensaios *in vitro* em células embrionárias de epitélio renal humano (HEK-293T). Demonstramos, pela primeira vez, aumento de dano ao DNA em pacientes com DF. Ainda, observamos aumento de geração de espécies reativas nas mesmas amostras (através da sonda diclorofluoresceína - DCF) e, através do ensaio cometa com endonucleases, verificamos que o dano ao DNA é de natureza oxidativa em purinas nesses pacientes. Para avaliar a capacidade de reparo de DNA frente a um insulto oxidativo, realizamos o ensaio de desafio com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual demonstrou que os pacientes possuíam reparo aumentado (provavelmente como resposta ao estresse crônico), porém não suficientemente eficaz para reduzir o dano oxidativo basal a purinas a nível de indivíduos saudáveis. Observamos também que pacientes com DF antes de iniciar a TRE já possuíam níveis aumentados de lipoperoxidação (através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS - e malondialdeído – MDA) e de estresse nitrosativo (medido através de nitrato e nitrito urinários), bem como desequilíbrios no sistema redox da glutathiona (GSH - principal antioxidante intracelular, avaliado através da medida de GSH e da atividade das enzimas glutathiona redutase, GR, e glutathiona peroxidase, GPx). Após a TRE de longa duração (aproximadamente cinco anos), a lipoperoxidação e o estresse nitrosativo continuaram aumentados, porém o metabolismo da GSH foi normalizado a nível de indivíduos saudáveis (provavelmente também como resposta adaptativa ao estresse). Os níveis urinários de Gb3 diminuíram com a TRE, porém permaneceram ainda significativamente aumentados em relação aos controles. Concentrações de liso-Gb3 similares às encontradas no plasma de pacientes com DF tiveram efeito citotóxico significativo nas células renais, causaram dano ao DNA (incluindo dano oxidativo a purinas e pirimidinas) e induziram aumento na atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) e na expressão da poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1, enzima-chave no reparo de dano ao DNA por excisão de bases - BER). Por fim, analisando em conjunto os dados *in vitro*, podemos sugerir um mecanismo de ação para o liso-Gb3 no qual o H_2O_2 , espécie reativa de conhecido papel sinalizador, atua como mediador. O H_2O_2 também ocupa papel central no mecanismo sugerido através dos estudos *in vivo*, de modo que os achados são complementares entre si e fornecem novos dados acerca da fisiopatologia da DF que podem ser úteis a estudos futuros na busca de terapias complementares à TRE, necessárias para a melhora clínica e de qualidade de vida dos pacientes com DF.

Palavras-chave: doença de Fabry, estresse oxidativo, dano ao DNA, reparo de DNA, status redox

I.1.ABSTRACT

Fabry disease (FD, OMIM 301500) is an X-linked lysosomal storage disorder caused by mutations in GLA gene that lead to translated lysosomal enzyme α -galactosidase A (α -gal A, EC 3.2.1.22) with deficient or absent activity. Consequently, the enzyme's substrates (mainly globotriaosylceramide – Gb3 and globotriaosylsphingosine – lyso-Gb3) accumulate in various tissues and body fluids of FD patients. Studies have pointed that inflammation, oxidative and nitrosative stress may be involved in FD pathophysiology, which is not completely known. It was previously described an increase of inflammatory and prooxidative parameters in FD patients during enzyme replacement therapy (ERT), although it is necessary to evaluate these parameters before the beginning of ERT. Using *in vivo* and *in vitro* assays in blood and urine samples of FD patients, we evaluated abnormalities of redox status, oxidative damage to biomolecules (including lipids, proteins and DNA) and Gb3 urinary levels. In order to investigate the biological effects of the latest described biomarker for FD, lyso-Gb3, we performed *in vitro* assays in human embryonic kidney epithelial cells (HEK-293T). We demonstrated, for the first time, increased DNA damage in FD patients. Then, we observed increased reactive species generation (by dichlorofluorescein – DCF - probe) in the same samples and, by comet assay with endonucleases, we verified that DNA damage has an oxidative origin in purines in these patients. In order to evaluate repair capacity towards an oxidative insult, a challenge assay with hydrogen peroxide (H_2O_2) was performed, which demonstrated that patients had increased repair (probably as response to chronic stress), but not sufficiently effective to reduce basal oxidative damage in purines to healthy individuals' levels. We also observed that FD patients even before initiating ERT already had increased lipid peroxidation levels (by thiobarbituric acid reactive species - TBARS - and malondialdehyde - MDA content) and nitrosative stress (by urinary nitrate and nitrite), as well as imbalances in glutathione (GSH) redox system (GSH – the main intracellular antioxidant, evaluated by GSH content and glutathione reductase, GR, and glutathione peroxidase, GPx, enzyme activities). After long-term ERT (approximately five years), lipid peroxidation and nitrosative stress remained increased, although GSH metabolism was restored to the level of healthy subjects (also probably as an adaptive response to stress). Gb3 urinary levels decreased after ERT, but remained already increased when compared to controls. Lyso-Gb3 levels similar to that found in plasma of FD patients caused significant cytotoxic effect on kidney cells, caused DNA damage (including oxidative damage to purines and pyrimidines) and induced increase in the antioxidant enzyme catalase (CAT) activity and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) expression (key enzyme in DNA base excision repair). To conclude, analysing together the *in vitro* data, we could suggest a mechanism of action to lyso-Gb3 in which H_2O_2 reactive specie with well known signaling function, acts as a mediator. H_2O_2 has also a central role in the mechanism proposed by the *in vivo* studies, so that the findings are complementary and provide new data about FD pathophysiology that could be useful to future studies looking for complementary therapies to ERT, necessary to improvement in clinical aspects and life quality of FD patients.

Keywords: Fabry disease, oxidative stress, DNA damage, DNA repair, redox status

I.2. LISTA DE ABREVIATURAS

α -gal A - α -galactosidase A;

BER – do inglês *base excision repair*, reparo por excisão de base;

CAT – catalase;

CAMKII - proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina;

DCF – diclorofluoresceína;

DCFH-DA – 2,7-diclorodi-hidrofluoresceína-diacetato;

DF – doença de Fabry (em inglês, *DF*);

DLD – doença lisossômica de depósito;

DSB – do inglês *double-strand break*, quebra de fita dupla;

EndoIII – endonuclease III;

ERN – espécie reativa de nitrogênio;

ERO – espécie reativa de oxigênio;

FPG – formamidopirimidina;

GCL – glutamato-cisteína-ligase;

Gb3 – globotriaosilceramida;

GLA – gene codificante da α -galactosidase A;

GPx – glutathione peroxidase;

GR - glutathione reductase;

GSH – glutathione;

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

Liso-Gb3 – globotriaosilceramida (em inglês, *lyso-Gb3*)

MDA – malondialdeído;

NER – do inglês *nucleotide excision repair*, reparo por excisão de nucleotídeo;

8-OHdG - 3-hidroxi-2-deoxiguanina;

PARP-1 - poli(ADP-ribose) polimerase -1;

PKA – proteína quinase A;

PKG – proteína quinase G;

SNC – sistema nervoso central;

SOD – superóxido dismutase;

SSB – do inglês *single-strand break*, quebra de fita simples;

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico;

TGF- β 1 - fator de crescimento transformador β 1;

TRE - terapia de reposição enzimática (em inglês *ERT*);

1.3. INTRODUÇÃO

3.1. Estresse oxidativo

O termo “estresse oxidativo” foi definido pela primeira vez há cerca de 30 anos, de maneira simplista, como sendo um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do formador, levando a um dano potencial (Sies, 1985; Sies 1986). Nas décadas subsequentes, tem sido amplamente estudado devido à sua relação com diversas patologias e com o processo de envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 2007). Todavia, além de seus aspectos deletérios, o estresse oxidativo é importante em processos fisiológicos e na própria evolução e sobrevivência da espécie humana (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011).

O termo “pró-oxidante” no conceito de Sies (Sies, 1985; Sies 1986) contempla as “espécies reativas” que são todas as moléculas radicalares (radicais livres) ou não (maioria) capazes de gerar dano oxidativo a moléculas vizinhas ou rapidamente formar novos radicais livres quando atacadas por um radical. As espécies reativas podem ser subclassificadas de acordo com o átomo gerador em espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN), que são predominantes, podendo ocorrer em menor escala também as espécies reativas de cloro, ferro e enxofre. Cada espécie possui sua reatividade particular (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell 2011). O metabolismo dos seres aeróbios gera espécies reativas em diversas situações, como na auto-oxidação de moléculas instáveis (p. ex. dopamina), vasodilatação (via óxido nítrico sintase) e mecanismos de defesa (neutrófilos ativados) (Babior, 2000; Halliwell 2011). Na respiração celular, intermediários reativos são formados durante o processo de redução do oxigênio molecular a água, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}). Já as espécies reativas de nitrogênio mais comuns são óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Já o termo “antioxidante” foi definido por Halliwell e Gutteridge como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato

oxidável, significativamente diminui ou previne a oxidação desse substrato” (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os sistemas biológicos possuem defesas antioxidantes classificadas como enzimáticas (p. ex. glutathione peroxidase – GPx , EC 1.11.1.9; catase – CAT, EC 1.11.1.6; e superóxido dismutase – SOD, EC 1.15.1.1) e não enzimáticas, essas subclassificadas de acordo com a sua origem - endógena (p. ex. glutathione - GSH- e ácido úrico) ou exógena (proveniente da dieta, como algumas vitaminas, minerais e compostos fenólicos). Essas defesas agem diminuindo a formação de espécies reativas ou removendo-as (ação de sequestro, amplamente conhecida como *scavenger*) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Em situações de ineficácia dos sistemas antioxidantes, portanto, o dano molecular que ocorre por ataque direto de espécies reativas em células e tecidos é chamado dano oxidativo (Halliwell e Whiteman, 2004).

Um bom exemplo da importância fisiológica da atuação dos sistemas antioxidantes é o da geração de O_2^- na respiração celular e a ação sequencial das enzimas antioxidantes evitando dano oxidativo. Esse ânion é gerado quando os elétrons da cadeia transportadora de elétrons são passados diretamente ao oxigênio (O_2), um por vez (redução parcial do O_2) e também através de NADPH oxidases (Nox, que transferem elétron do NADPH ao O_2). Na presença da enzima antioxidante SOD, esse radical O_2^- potencialmente danoso é dismutado a H_2O_2 e O_2 . Uma vez que o H_2O_2 pode se difundir pelas membranas, chegando a outros locais da célula e causando dano oxidativo, a atividade das enzimas antioxidantes peroxidativas (p. ex. CAT e GPx) torna-se fundamental para a manutenção do estado redox (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo (de glutamato, cisteína e glicina) de baixo peso molecular produzido por quase todas as células de mamíferos, cuja função antioxidante se dá através dos grupamentos tióis dos resíduos de cisteína que a conferem o papel de principal defesa antioxidante contra ERO e eletrófilos. A nível

intracelular, a GSH é a fonte majoritária de tióis não-protéicos e serve como cofator de enzimas antioxidantes (p. ex. GPx) e detoxificantes, sendo considerada uma das melhores ferramentas celulares para o processo de detoxificação (Ribas, García-Ruiz e Fernández-Checa, 2014). Tendo um papel importante em diversos processos celulares que impactam na sobrevivência, proliferação e morte celular, a GSH é considerada um protagonista da célula (Pompella *et al.*, 2003). O sistema redox da GSH (metabolismo da GSH) tem um papel crítico como mecanismo de defesa contra H₂O₂ e outros peróxidos, incluindo peróxidos lipídicos (Hayes e McLellan, 1999).

O estresse oxidativo é, portanto, o resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas formadas e as defesas antioxidantes decorrente de um aumento das espécies reativas e/ou diminuição de defesas antioxidantes teciduais. Como consequência, podem ocorrer danos oxidativos às mais variadas biomoléculas (alterando sua estrutura e função; p. ex. lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA), reações em cadeia e até mesmo a morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A lipoperoxidação é o dano oxidativo a lipídeos, majoritariamente representados pelos ácidos graxos poli-insaturados de membrana. O ataque de espécies reativas a essas moléculas, além de causar transtorno a funções de membrana, pode levar ao rompimento de membranas de organelas, com extravasamento de seu conteúdo (p.ex. lisossomos) e formação de produtos tóxicos (p. ex. malondialdeído – MDA) culminando em morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997).

O dano oxidativo ao DNA pode levar à formação de adutos que prejudicam o pareamento de bases e/ou bloqueiam os processos de replicação e transcrição do DNA, levam à perda de bases ou a quebras de fitas simples (do inglês, *single-strand breaks* – SSB). Quando duas SSB estão muito próximas ou quando o aparato de replicação do DNA detecta uma SSB ou outras lesões, são formadas quebras de fita dupla (do inglês, *double-strand*

breaks – DSB), que ocorrem com menos frequência, porém são mais difíceis de serem reparadas e extremamente deletérias (Khanna e Jackson, 2001; Jackson e Bartek, 2009). Assim como as defesas antioxidantes protegem as biomoléculas do dano causado por espécies reativas, os sistemas biológicos possuem mecanismos de reparo de DNA que garantem a integridade do genoma e a viabilidade de células e organismos (Jackson e Bartek, 2009).

Estudos tem evidenciado um papel importante do estresse oxidativo na fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias (Pang *et al.*, 2007), neurodegenerativas (Halliwell, 2006), neoplásicas (Toyokuni, 1995; López-Lázaro, 2010), e erros inatos do metabolismo (Vargas *et al.*, 2004; Mc Guire, Parikh e Diaz, 2009; Negretto *et. al*, 2014)

3.2. Erros inatos do metabolismo

O primeiro registro da utilização do termo “erros inatos do metabolismo” (EIM) data de 1908, quando o médico inglês Archibald Garrod descreveu a ocorrência de alcaptonúria com uma frequência maior em filhos de pais consanguíneos. Observando que os pais desses pacientes não manifestavam a doença e baseado nas leis de Mendel, Garrod sugeriu para alcaptonúria um padrão de herança autossômica recessiva (Childs, Valle e Jimenez-Sanchez, 2001).

Após anos de evolução científica, com o conhecimento da hipótese “um gene - uma enzima” - que rendeu um prêmio nobel aos pesquisadores George W. Beadle e Edward L. Tatum em 1958, o conceito atual de EIM integra medicina, bioquímica e genética, uma vez que define EIM como doenças metabólicas hereditárias monogênicas decorrentes de mutações que levam à tradução de uma proteína, geralmente uma enzima, com atividade deficiente ou nula. Conseqüentemente, essa deficiência gera um bloqueio metabólico com acúmulo dos substratos da enzima deficiente e seus possíveis subprodutos com repercussão

geralmente grave ou letal no indivíduo (Childs, Valle e Jimenez-Sanchez, 2001; Beaudet *et al.*, 2001).

Existem, atualmente, mais de 500 EIM descritos envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas (Childs, Valle e Jimenez-Sanchez, 2001). Mesmo com grande heterogeneidade entre si, os EIM podem ser classificados de acordo com a sua fisiopatologia em: a) distúrbios na síntese ou degradação de moléculas complexas (p. ex. doenças lisossômicas de depósito e peroxissomais); b) erros inatos do metabolismo intermediário (p. ex. EIM de aminoácidos e acidemias orgânicas); c) doenças com deficiência de energia (p. ex. defeitos de gliconeogênese, defeitos de oxidação de ácidos graxos e doenças mitocondriais) (Saudubray e Charpentier, 2001).

3.3. Doenças lisossômicas de depósito

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) compreendem mais de 50 EIM com uma frequência coletiva aproximada de 1:5.000 nascidos vivos. Na sua maioria monogênicas, as mutações das DLD podem acarretar em defeitos de enzimas lisossomais, proteínas lisossomais não enzimáticas (solúveis ou proteínas integrais de membrana) ou mesmo em proteínas não lisossomais que alteram a função do lisossomo (Futerman e Van Meer, 2004).

A classificação das DLD pode ser baseada na natureza bioquímica dos substratos acumulados no interior dos lisossomos: esfingolipidoses (acúmulo de esfingolipídeos), mucopolissacaridoses (MPS; acúmulo de mucopolissacarídeos/glicosaminoglicanos) e oligossacaridoses (acúmulo de oligossacarídeos). Outra maneira de classificá-las é pela natureza das proteínas deficientes, separando as deficiências de hidrolases solúveis (esfingolipidoses, MPS e oligossacaridoses) das deficiências de proteínas integrais de membrana (p. ex. cistinose e Niemann-Pick tipo C - NPC) (Futerman e Van Meer, 2004).

Cada DLD possui uma fisiopatologia distinta das demais e o curso natural da doença, na maioria dos casos, não pode ser pré-definido por uma relação genótipo-fenótipo. Algumas DLD são marcadas por sintomatologia predominantemente neurológica (p. ex. doença de Sanfilippo), enquanto em outras o envolvimento cerebral é muito menor que em órgãos periféricos (p. ex. doença de Fabry e doença de Gaucher). O tipo de substrato acumulado e as células onde se acumulam parecem determinar tais diferenças clínicas, embora o efeito celular desse acúmulo ainda seja uma grande questão a ser elucidada para a maioria das DLD (Futerman e Van Meer, 2004; Vitner, Platt e Futerman, 2010).

Mesmo distintas, as DLD possuem alguns aspectos clínicos, celulares e bioquímicos em comum, o que permite supor que avanços científicos elucidativos de uma DLD em particular possam contribuir para o entendimento de outras DLD (Vitner, Platt e Futerman, 2010). O acúmulo intralisossomal dos substratos - algumas enzimas podem ter mais de um substrato - leva à ativação de cascatas patogênicas já descritas para várias DLD, como alteração da homeostase do cálcio, inflamação, autofagia, estresse de retículo endoplasmático, resposta autoimune, alteração no tráfego de lipídeos e estresse oxidativo. Este último parece estar ativado nas DLD como uma via secundária (não um resultado direto do acúmulo primário de substrato) de integração de vias metabólicas celulares com processos de estresse e é apontado como mediador de morte celular nessas patologias (Vitner, Platt e Futerman, 2010).

O papel fundamental dos lisossomos no metabolismo celular é de degradar macromoléculas intra ou extracelulares através de autofagia ou heterofagia, respectivamente (Pivtoraiko *et al.*, 2009). O processo de autofagia, no qual autofagossomos fundem-se com lisossomos para que as hidrolases lisossomais degradem proteínas e organelas danificadas, garante a sobrevivência celular em situações de estresse. A autofagia também pode agir de maneira oposta, como um mecanismo de morte celular programada, através do acúmulo de

autofagossomos por indução exacerbada de autofagia ou desregulação da fusão autofagossomo-lisossomo (Vitner, Platt e Futerman, 2010).

3.3.1. Estresse oxidativo e doenças lisossômicas de depósito

Além de estar envolvido na fisiopatologia das DLD, o estresse oxidativo pode causar disfunção lisossomal e consequente morte celular por dano direto à organela ou indiretamente pela produção aumentada de macromoléculas ou outras organelas danificadas (posteriormente degradadas no lisossomo). Tal disfunção inclui alterações na autofagia, inibição da atividade de hidrolases lisossomais e danos à membrana lisossomal (Pivtoraiko *et al.*, 2009). Os neurônios são particularmente sensíveis à disfunção lisossomal e ao estresse oxidativo, tornando a estabilização de lisossomos um possível alvo terapêutico em doenças associadas ao envelhecimento e neurodegenerativas (Butler e Bahr, 2006; Pivtoraiko *et al.*, 2009).

Os lisossomos também possuem um papel decisivo no catabolismo de metaloproteínas, degradando-as e removendo ferro, sendo, portanto uma importante fonte de ferro livre para as funções intracelulares essenciais (Radisky e Kaplan, 1998). A compartimentalização de altas concentrações de metais nos lisossomos protege o restante da célula, porém, torna o ambiente intralisossomal altamente suscetível a danos e à indução de morte celular (Yu *et al.*, 2003). Além do alto conteúdo de ferro, o baixo pH intralisossomal, a presença de equivalentes redutores e ausência de enzimas antioxidantes antiperoxidativas (p. ex. CAT e GPx, que consomem H_2O_2), tornam o ambiente lisossomal bastante favorável para a ocorrência de reação de Fenton (que gera radical hidroxila – OH^\cdot - altamente danoso a biomoléculas, através da reação de íons Fe^{2+} e H_2O_2) (Kurz, Terman e Brunk, 2007; Kurz, Eaton e Brunk, 2010). Especialmente em condições de estresse oxidativo, o H_2O_2 difunde-se facilmente através da membrana lisossomal, do citoplasma para a luz do lisossomo, onde é

substrato da reação de Fenton (Pivtoraiko *et al.*, 2009). Como consequência, a ruptura lisossomal e o extravasamento do seu conteúdo no citoplasma podem ter efeito devastador na célula, levando a necrose e apoptose (Terman e Brunk, 2006; Terman *et al.*, 2006)

Estudos em pacientes têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo em DLD como um evento secundário ao acúmulo de substratos nos lisossomos e fluidos corporais. Em pacientes com MPS I, foi encontrado aumento de lipoperoxidação (Pereira *et al.*, 2008). O mesmo foi descrito em pacientes com MPS II, além de dano oxidativo a proteínas e diminuição de *status* antioxidante total (Filippon *et al.*, 2011). Pacientes com MPS IVA tratados também apresentaram alteração de parâmetros de estresse oxidativo e inflamação (Donida *et al.*, 2015). Em fibroblastos de pacientes com doença de Gaucher também foi observado um aumento no dano oxidativo a proteínas e uma resposta adaptativa ao estresse crônico de reparo ao dano oxidativo ao DNA (Deganuto *et al.*, 2007). Em células de pacientes com doença de Fabry cultivadas, foi observada a geração de ERO quando expostas ao próprio plasma de pacientes (Shen *et al.*, 2008). Um estudo em pacientes com doença de Fabry em tratamento com terapia de reposição enzimática observou correlação positiva entre o principal substrato acumulado na doença e parâmetros de estresse oxidativo e inflamação (Biancini *et al.*, 2012).

3.4. Doença de Fabry

A doença de Fabry (DF, OMIM 301500) é uma DLD de herança ligada ao cromossomo X causada por mutações no gene GLA que codifica a enzima lisossomal α -galactosidase A (α -gal A, EC 3.2.1.22). Como consequência, os substratos dessa enzima (glicoesfingolípídeos neutros com terminal α -galactosil) acumulam-se em fluidos corporais e nos mais diversos tipos celulares e órgãos dos pacientes (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Hoffmann, 2009) (Figura 1).

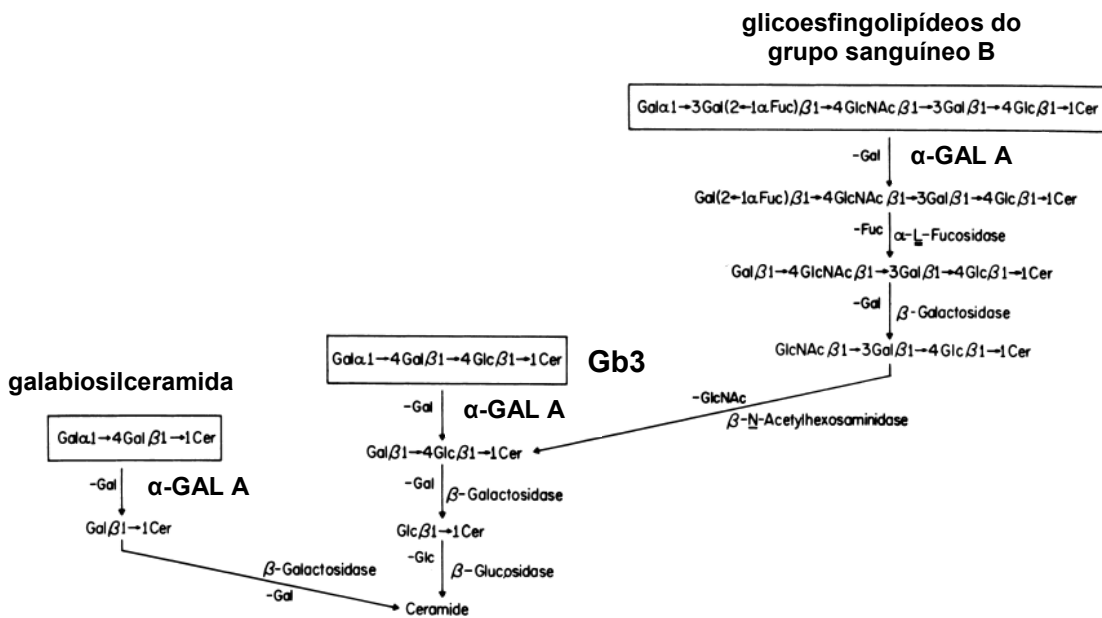


Figura 1. Via metabólica do catabolismo de glicosíngolípídeos neutros, destacando-se os metabólitos acumulados na DF: galabiosilceramida, globotriaosilceramida (Gb3) e glicosíngolípídeos do grupo sanguíneo B. Adaptado de Desnick, Iannou e Eng, 2001.

Estima-se que a incidência da DF seja aproximadamente 1: 40.000 homens (Desnick, Iannou e Eng, 2001). Meikle e colaboradores relatam uma incidência de 1: 55.000 nascidos homens na população australiana (Meikle *et al.*, 1999). Todavia, a incidência de fenótipos não-clássicos parece ser muito maior (Spada *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2014).

A DF também é conhecida como doença de Anderson-Fabry, nomenclatura que homenageia os primeiros médicos a descrevê-la: William Anderson (Anderson, 1898) e Johannes Fabry (Fabry, 1898). Ambos dermatologistas, de modo independente e em países diferentes (o primeiro na Inglaterra e o segundo na Alemanha), descreveram no mesmo ano casos clínicos de pacientes do sexo masculino com lesões dérmicas denominadas “angioqueratomas/*purpura nodularis*” e proteinúria. Posteriormente, a doença foi denominada “angioqueratoma corporal difuso”. De fato, tais lesões cutâneas são patognômicas da DF e proteinúria é o achado laboratorial que até os dias atuais contribui para o diagnóstico de insuficiência renal na DF (Desnick, Iannou e Eng, 2001).

3.4.1. Achados clínicos

Os sinais clínicos da DF começam a surgir nos primeiros anos de vida (6 anos em meninos e 9 anos em meninas) (Hopkin *et al.*, 2008), porém a maioria dos pacientes só é diagnosticada na idade adulta, quando já apresenta um quadro avançado de insuficiência renal. Durante a infância e adolescência, são comuns as chamadas “crises de Fabry” que podem erroneamente ser diagnosticadas como doença reumática (devido à associação de febre baixa e alta velocidade de sedimentação globular) (Desnick, Iannou e Eng, 2001). Tais crises de acroparestesias são caracterizadas por dores neuropáticas, provavelmente o sintoma mais debilitante na DF, que são dores severas em membros superiores e inferiores que agravam-se em temperaturas extremas, podendo durar de minutos a várias horas (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Clarke, 2007; Hoffmann, 2009).

Além dos sinais dérmicos, insuficiência renal e acroparestesias, os pacientes com DF apresentam classicamente sinais e sintomas oftalmológicos, gastrointestinais e cardiovasculares que tendem a se agravar com o passar do anos (o que é atribuído aos efeitos cumulativos de depósito dos glicosfingolípídeos). Similarmente ao acúmulo de alguns fármacos (p. ex. cloquina e amiodarona) na córnea, o depósito desses substratos lipídicos confere opacidade à córnea e leva à formação de córnea *verticillata*. Usualmente, pacientes com DF apresentam episódios de dor abdominal e diarreia que são atribuídos ao acúmulo de glicosfingolípídeos nos vasos sanguíneos intestinais de menor calibre (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Hoffmann, 2009).

As manifestações cardíacas, cerebrais e renais, que são as maiores responsáveis pela morbidade em pacientes com DF, parecem ser consequência da deposição cumulativa de glicosfingolípídeos no endotélio vascular do sistema cardiovascular-renal. Hipertrofia de ventrículo esquerdo e insuficiência mitral são achados comuns desde a infância e adolescência. As manifestações tardias mais comuns são *angina pectoris*, insuficiência

cardíaca congestiva, infarto e isquemia do miocárdio, agravadas pela hipertensão sistêmica atribuída à vasculatura renal (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Hoffmann, 2009).

Além do sistema nervoso periférico (nas dores neuropáticas), o sistema nervoso central (SNC) também é afetado na DF. Foi descrito que aproximadamente 72% dos pacientes com DF apresentam envolvimento do CNS (Buechner *et al.*, 2008), sendo que os eventos cerebrovasculares contribuem significativamente para as taxas de mortalidade na DF (mediana de 50 anos) (MacDermot, Holmes e Miners, 2001; Hoffmann, 2009). Sintomas neuropsiquiátricos também já foram descritos - pacientes com DF apresentaram maiores níveis de depressão e menor performance cognitiva. Ainda, foi descrita correlação significativa positiva entre intensidade de dor e lesão de substância branca nesses pacientes (Schermuly *et al.*, 2008; Cole *et al.*, 2007)

Embora seja uma doença de herança ligada ao X - na maioria dessas doenças as heterozigotas são assintomáticas, na DF estima-se que cerca de 70% das heterozigotas apresentem sintomas, muitas vezes tão severos quanto os homens afetados (Deegan *et al.*, 2006). Isso se deve ao mecanismo de inativação do cromossomo X, que ocorre randomicamente nos estágios precoces do desenvolvimento embrionário e tem como consequência nessas mulheres a existência de duas populações de células (em todos os órgãos): uma com o alelo normal ativo e outra com o alelo mutante ativo (Lyon, 1988).

Neste contexto, Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 2007) afirmam que heterozigotas assintomáticas na DF são a exceção e não a regra. Esses autores também propõem que níveis variados de inativação do X com atividade de α -gal A normal em tecidos diferentes sejam os responsáveis pela heterogeneidade clínica encontrada. Tal heterogeneidade também pode ser influenciada por um processo não-randômico de inativação enviesada do cromossomo X favorecendo o alelo mutante (Dobrovolny *et al.*, 2005).

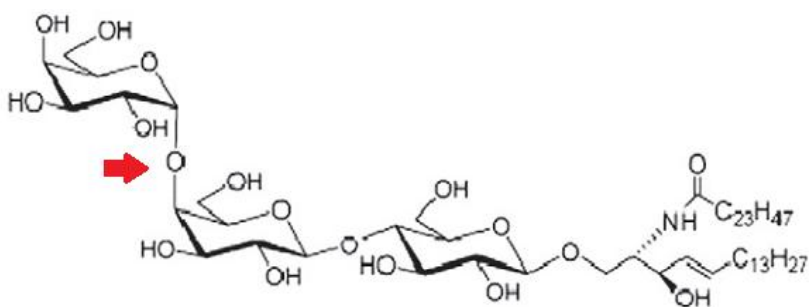
3.4.2. Fisiopatologia

O padrão de depósito de glicosfingolipídeos na DF, com predileção por endotélio vascular e células da musculatura lisa do sistema cardiovascular-renal, é muito particular em relação a outras esingolipidoses e correlaciona-se com os achados clínicos mais importantes nos pacientes com DF (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Hoffmann, 2009).

O mecanismo de origem dos glicosfingolipídeos depositados, porém, ainda não está completamente compreendido. Em células neurais e córnea, protegidas dos substratos circulantes pela barreira hemoencefálica, acredita-se que o acúmulo se dê por síntese endógena. Já em outros tecidos, há evidências de que os glicosfingolipídeos intracelulares derivem dos circulantes (cerca de sete vezes mais concentrados no plasma que intracelularmente) por endocitose ou difusão, majoritariamente através de receptores de alta afinidade para lipoproteínas (a maioria dos substratos circulam ligados às frações de lipoproteínas HDL e LDL). Intracelularmente, uma vez que não há atividade de α -gal A para sua hidrólise completa, os glicosfingolipídeos ficam armazenados em vesículas e, em estágios mais avançados, em massas livres que levam à disfunção e morte celular (Desnick, Iannou e Eng, 2001).

Os principais glicosfingolipídeos acumulados na DF são a globotriaosilceramida (Gb3) e seu derivado deacilado, globotriaosilesfingosina (liso-Gb3) (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Aerts *et al.*, 2008) (Figura 2). Em menor escala, acumulam-se também galabiosilceramida e glicosfingolipídeos do grupo sanguíneo B. Por esse motivo, pacientes com os tipos sanguíneos B e AB parecem ser mais severamente afetados, dado o acúmulo adicional desses substratos. Acredita-se que o *turnover* de glicosfingolipídeos de membrana de eritrócitos e de outras células contribua significativamente para o acúmulo desses substratos na DF (Desnick, Iannou e Eng, 2001).

A) Gb3



B) Liso-Gb3

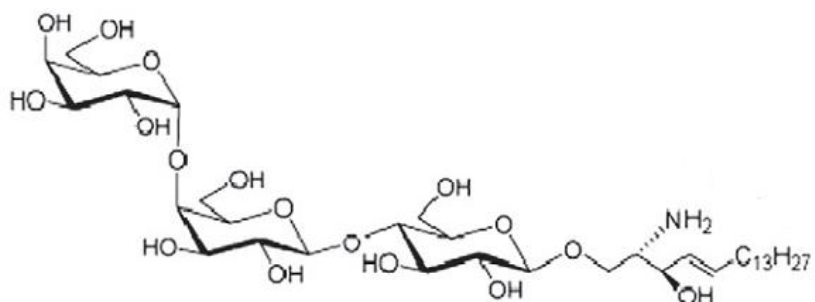


Figura 2. Estrutura molecular dos principais metabólitos acumulados na DF: A) Globotriaosilceramida (Gb3) e B) seu derivado deacilado, globotriaosilesfingosina (liso-Gb3). Seta indicando a ligação α -galactosil, cuja clivagem é catalisada pela α -GAL A. Adaptado de Auray-Blais et al., 2010.

Os primeiros sinais da DF, acroparestesias, podem ser consequência do acúmulo dos glicoesfingolípídeos, uma vez que os mesmos foram encontrados depositados no tecido nervoso, além do envolvimento vascular que também é proeminente no SN de pacientes com DF (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Moore *et al.*, 2007). Todavia, o mecanismo pelo qual esse acúmulo de lipídeos estaria causando as dores neuropáticas na DF ainda não está elucidado. Um estudo recente encontrou relação direta entre os níveis de liso-Gb3 e a sensibilização de neurônios sensoriais produzindo alodinia mecânica em ratos e aumento do influxo de cálcio intracelular em cultura de neurônios de gânglios da raiz dorsal (Choi *et al.* 2015).

A deposição desses substratos nos vasos sanguíneos, geralmente acompanhado de proliferação das células do endotélio vascular, leva a um estreitamento do lúmen, angioectasias, e aumento de sua fragilidade. Tais achados geralmente são precursores de infartos e trombozes cerebrais, que junto dos eventos renais são a maior causa de mortalidade em pacientes com DF (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Rombach *et al.*, 2010b).

Eventos secundários ao acúmulo de glicosfingolipídeos, como inflamação (De Francesco *et al.*, 2013) e estresse oxidativo (Shen *et al.*, 2008; Biancini *et al.*, 2012), parecem contribuir para a fisiopatologia da DF. Em pacientes com DF tratados, foram observadas correlações positivas entre os níveis urinários de Gb3 e parâmetros inflamatórios e de dano oxidativo a proteínas e lipídeos (Biancini *et al.*, 2012). Além desses achados *in vivo*, um estudo *in vitro* em células do endotélio vascular de pacientes com DF verificou um aumento de geração de espécies reativas e na expressão de moléculas de adesão após incubação com Gb3 (Shen *et al.*, 2008).

Eventos cardíacos também são uma importante causa de morte prematura em pacientes com DF e os mecanismos pelos quais o acúmulo de glicosfingolipídeos gera as alterações observadas ainda estão sendo elucidados. Em quadros de cardiomiopatia avançada, a fibrose de cardiomiócitos e alteração morfológica do miocárdio parecem contribuir para a insuficiência das válvulas cardíacas (Weidemann *et al.*, 2009; Hoffmann, 2009). Recentemente, um estudo em material de biópsia de miocárdio de pacientes com DF mostrou um possível envolvimento do estresse oxidativo na cardiomiopatia desses pacientes. Foi observado aumento na expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e imunocontéudo de nitrotirosina, ambos correlacionados com a expressão de 3-hidroxi-2-deoxiguanina (8-OHdG; refletindo dano oxidativo ao DNA) nos núcleos de cardiomiócitos (Chimenti *et al.*, 2015). As placas ateroscleróticas em pacientes com DF também parecem ser de um padrão

diferenciado e possuir maior número de núcleos lipídicos, características atribuídas ao acúmulo de glicosfingolípídeos (Kovarnik *et al.*, 2008).

Quanto à função renal na DF, os danos observados são primeiramente a nível de néfron, com a arquitetura renal ainda mantida e, posteriormente, a nível de vasculatura. As mudanças fisiopatológicas mais severas tardias nestes órgãos são consequência das lesões vasculares e da hipertensão sistêmica (Desnick, Iannou e Eng, 2001). Todavia, em biópsias renais de crianças com DF foi encontrado acúmulo de Gb3 independentemente de nefropatia, bem como alterações estruturais (incluindo glomeruloesclerose e fibrose intersticial) e vasculares (Tøndel *et al.*, 2008).

Assim como a nefropatia diabética, a nefropatia da DF é proteinúrica e de origem metabólica caracterizada por progressiva falência renal que em estágios finais requer diálise ou transplante (Weidemann *et al.*, 2013). Cortes histológicos nos órgãos-alvo da DF evidenciam que a fibrose parece ser um elemento fisiopatológico crucial e o fato de ser irreversível a torna um alvo importante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Todavia, ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo pelo qual o depósito de glicosfingolípídeos leva ao desencadeamento do processo fibrótico (Weidemann *et al.*, 2013). Estágios finais de cardiomiopatia na DF também são caracterizados pela presença de fibrose, bem como a fibrose parece estar associada a gliose em sítios de acidente vascular cerebral de pacientes com DF (Weidemann *et al.*, 2011; Kahn, 1973).

Em busca de mediadores do processo fibrótico, o liso-Gb3 tem se mostrado um bom candidato. Foi observado o efeito causador de fibrose em podócitos expostos ao liso-Gb3 (Sanchez-Niño *et al.*, 2011) com resposta fibrogênica muito similar à resposta de podócitos à alta concentração de glicose no meio extracelular na nefropatia diabética. Tal observação reforça as similaridades entre essa nefropatia e a da DF (Weidemann *et al.*, 2013).

Até o momento, não foi descoberto o biomarcador ideal para monitorar pacientes com DF. Foram desenvolvidas técnicas para quantificação dos dois principais metabólitos acumulados na doença, Gb3 e liso-Gb3, em sangue e urina, porém ainda não está bem estabelecido o quanto os seus níveis circulantes ou excretados podem predizer a situação clínica do paciente (*Bekri et al.*, 2006; *Aerts et al.*, 2011).

O Gb3 urinário tem sido utilizado como marcador diagnóstico e pode ser útil no rastreamento de populações de risco e no monitoramento da terapia (*Schiffmann et al.*, 2010, *Auray-Blais et al.*, 2008 e 2009), porém não demonstrou correlação com a taxa de filtração glomerular estimada em pacientes (*Auray-Blais et al.*, 2008).

O liso-Gb3, por sua vez, está cerca de mil vezes mais concentrado no plasma de pacientes que o Gb3 (*Aerts et al.*, 2008). Embora a literatura ainda esteja divergente quanto à sua utilização no monitoramento de pacientes, resultados interessantes já foram encontrados. Há evidências, além do efeito promotor de fibrose em podócitos (*Sanchez-Niño et al.*, 2011), de correlação com lesões de substância branca e, em heterozigotas, com o índice de severidade da doença e hipertrofia de ventrículo esquerdo (*Rombach et al.*, 2012). O tempo de exposição ao liso-Gb3 também parece ter correlação com as manifestações clínicas da DF (*Rombach et al.*, 2010a).

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação do liso-Gb3 em podócitos, uma vez que a nefropatia da DF se assemelha à diabética, *Sanchez-Niño* e colaboradores investigaram (em podócitos humanos cultivados) mediadores do dano glomerular comuns na nefropatia diabética (fator de crescimento transformador β 1, TGF- β 1, e receptor para fator de inibição de migração de macrófagos, CD74). O liso-Gb3 modulou a expressão desses mediadores, bem como a expressão de proteínas da matriz extracelular. Dessa maneira, os autores sugerem que uma estratégia terapêutica de proteção renal em DF possa se espelhar na nefropatia diabética (*Sanchez-Niño et al.*, 2011).

3.4.3. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da DF em homens é realizado através medida da atividade da α -gal A em plasma/soro, leucócitos e cultura de células de tecidos (p. ex. fibroblastos), que encontra-se muito baixa ou não detectável em hemizigotos clássicos. Variantes atípicos (p. ex. variante cardíaca) podem ser diagnosticados com uma atividade residual de 5 a 35% do valor de referência (Desnick, Iannou e Eng, 2001, Hoffmann, 2009).

As mulheres heterozigotas podem apresentar atividade da α -gal A muito baixa ou normal, não havendo correlação entre a atividade enzimática e a gravidade da doença. Portanto, o diagnóstico definitivo em mulheres é molecular, através da detecção de mutação no gene GLA (Desnick, Iannou e Eng, 2001, Hoffmann, 2009).

A incorporação do diagnóstico da DF em programas de triagem neonatal (através de espectrometria de massas em tandem – MS/MS) permitiria não somente um diagnóstico precoce, como também a obtenção de dados fidedignos sobre a real prevalência da doença (Hoffmann, 2009), uma vez que triagens em populações de risco (p. ex. pacientes com insuficiência renal de causa desconhecida; cardiomiopatia; acidente vascular cerebral) mostram que ainda existem muitos casos não diagnosticados (Porsch *et al.*, 2008; Kleinert *et al.*, 2009; Hoffmann, 2009). Estudos pilotos de triagem neonatal para DF – usando metodologia de fluorescência (Lin *et al.*, 2009) - e DLD - usando MS/MS (Liao *et al.*, 2014) - em Taiwan investigaram mais de 100 mil neonatos e encontraram uma alta incidência de variantes cardíacas naquela população (~ 1 : 1600 nascidos homens). Todavia, de modo geral, a triagem para DLD (incluindo DF) ainda não é disponibilizada em programas nacionais de triagem neonatal.

3.4.4. Tratamento

No ano de 2001, há aproximadamente 15 anos, houve o maior avanço no tratamento da DF: o surgimento da terapia de reposição enzimática (TRE). Trata-se da reposição endovenosa de α -gal A produzida por engenharia genética. Desde então, existem duas formas comerciais disponíveis: agalsidase alfa (Replagal[®], produzida pela Shire Human Genetic Therapies) e beta (Fabrazyme[®], produzida pela Genzyme Corporation). Ambas possuem a mesma sequência de aminoácidos, diferindo apenas na cadeia lateral de oligossacarídeos e na linhagem celular de origem - fibroblastos humanos (agalsidase alfa) ou células de ovário de hamster chinês (agalsidase beta). A dose recomendada é 0,2 e 1,0 mg/Kg de peso corporal para agalsidase alfa e beta, respectivamente, a cada 15 dias (Clarke, 2007; Hoffmann, 2009).

Estudos iniciais demonstraram a eficácia e segurança de ambas as formulações de TRE disponíveis, com resultados de diminuição de glicosfingolipídeos acumulados nos principais órgãos afetados na DF e uma aparente melhora clínica dos pacientes (Schiffmann *et al.*, 2001; Eng *et al.*, 2001). Foi também descrita diminuição das dores neuropáticas (Schiffmann *et al.*, 2001), sintomas gastrointestinais (Dehout *et al.*, 2004) e da velocidade de progressão das complicações renais, cardíacas e cerebrovasculares (Banikazemi *et al.*, 2007). Todavia, metanálises mais recentes têm apontado que a TRE, que custa aproximadamente 250 mil dólares/paciente/ano (Clarke, 2007), possui uma eficácia muito reduzida em relação ao que era esperado no seu advento. A primeira metanálise publicada, nove anos após o início da TRE para DF, concluiu que até então não haviam evidências suficientemente robustas para o uso de ambas as formulações (Replagal[®] e Fabrazyme[®]) (El Dib e Pastores, 2010). Em 2014, outra metanálise concluiu que a TRE não previne lesões de substância branca cerebral e que seus efeitos no agravamento da insuficiência renal são muito limitados (Rombach *et al.*, 2014).

Para as variantes atípicas da DF existe uma segunda opção terapêutica chamada chaperonas moleculares, que encontra-se atualmente em estudo clínico. Nessas variantes, as mutações do gene GLA do tipo *missense* levam à tradução de uma α -gal A com atividade catalítica, porém com estrutura instável, formando agregados, que é rapidamente degradada. As chaperonas moleculares são uma estratégia de estabilização farmacológica da estrutura da enzima, de modo a evitar sua rápida degradação e permitindo que se mantenha na sua conformação ativa para degradar os substratos. Tratando-se de moléculas de baixo peso molecular, as chaperonas teoricamente podem passar a barreira hematoencefálica (o que não ocorre na TRE) (Hoffmann, 2009).

Doses baixas profiláticas de difenil-hidantoína e sua combinação com carbamazepina são utilizadas para diminuir a frequência e a severidade das acroparestesias, uma vez que analgésicos convencionais não são eficazes (Desnick, Iannou e Eng, 2001).

I.4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Considerando-se que a fisiopatologia da DF ainda não está totalmente compreendida, que estudos prévios mostram alteração de estresse oxidativo em pacientes com DF durante a TRE e que o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas se faz necessário porém depende de um conhecimento aprofundado dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, o objetivo geral desta tese é investigar parâmetros de dano ao DNA, estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com DF no momento do diagnóstico e durante a TRE, quantificar Gb3 na urina destes pacientes bem como avaliar os efeitos *in vitro* do liso-Gb3 em células de epitélio renal humano.

4.2. Objetivos específicos

- a) Investigar o índice de dano ao DNA basal *in vivo* em leucócitos periféricos de pacientes com DF, bem como a sua possível natureza oxidativa em bases púricas e pirimídicas;
- b) Avaliar o conteúdo de espécies reativas *in vivo* em leucócitos periféricos de pacientes com DF;
- c) Avaliar a cinética de reparo de dano oxidativo ao DNA induzido *in vitro* em leucócitos periféricos de pacientes com DF em sítios de alquilação e abásicos, bem como especificamente em bases púricas e pirimídicas;
- d) Investigar parâmetros de dano oxidativo a lipídeos e proteínas em pacientes com DF no momento do diagnóstico e durante a TRE;
- e) Investigar o metabolismo do principal antioxidante não enzimático (glutathiona) em pacientes com DF no momento do diagnóstico e durante a TRE;
- f) Investigar estresse nitrosativo em pacientes com DF no momento do diagnóstico e durante a TRE;

g) Quantificar os níveis de Gb3 na urina de pacientes com DF no momento do diagnóstico e durante a TRE;

h) Investigar os efeitos *in vitro* do liso-Gb3, nas concentrações encontradas no plasma de pacientes com DF, em células cultivadas de epitélio renal humano quanto à citotoxicidade, dano ao DNA (incluindo dano oxidativo a bases púricas e pirimídicas), perda de potencial de membrana mitocondrial, atividade de enzimas antioxidantes e expressão de enzima de reparo por excisão de base.

Capítulo I:

DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair

Artigo publicado no periódico *Mutation Research / Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis*



DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair



Giovana Brondani Biancini^{a,b,*}, Dinara Jaqueline Moura^c, Paula Regina Manini^c,
 Jéssica Lamberty Faverzani^b, Cristina Brinckmann Oliveira Netto^b, Marion Deon^b,
 Roberto Giugliani^{a,b}, Jenifer Saffi^c, Carmen Regla Vargas^{a,b,d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2015

Received in revised form 29 March 2015

Accepted 27 April 2015

Available online 28 April 2015

Keywords:

Fabry disease
 DNA damage
 DNA repair
 Oxidative stress
 Reactive species

ABSTRACT

Fabry disease (FD) is a lysosomal storage disorder associated with loss of activity of the enzyme α -galactosidase A. In addition to accumulation of α -galactosidase A substrates, other mechanisms may be involved in FD pathophysiology, such as inflammation and oxidative stress. Higher levels of oxidative damage to proteins and lipids in Fabry patients were previously reported. However, DNA damage by oxidative species in FD has not yet been studied. We investigated basal DNA damage, oxidative DNA damage, DNA repair capacity, and reactive species generation in Fabry patients and controls. To measure oxidative damage to purines and pyrimidines, the alkaline version of the comet assay was used with two endonucleases, formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG) and endonuclease III (EndoIII). To evaluate DNA repair, a challenge assay with hydrogen peroxide was performed. Patients presented significantly higher levels of basal DNA damage and oxidative damage to purines. Oxidative DNA damage was induced in both DNA bases by H_2O_2 in patients. Fabry patients presented efficient DNA repair in both assays (with and without endonucleases) as well as significantly higher levels of oxidative species (measured by dichlorofluorescein content). Even if DNA repair be induced in Fabry patients (as a consequence of continuous exposure to oxidative species), the repair is not sufficient to reduce DNA damage to control levels.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fabry disease (FD, OMIM 301,500) is a multi-organ X-linked inborn error of metabolism (IEM) of glycosphingolipids. As a consequence of mutations in the coding gene, absent or deficient α -galactosidase A (EC 3.2.1.22) activity leads to progressive accumulation of its substrates, mainly globotriaosylceramide (Gb3), in lysosomes of various cell types and in body fluids [1]. Enzyme replacement therapy (ERT) is available for classic forms of FD,

consisting of intravenous infusion of recombinant human α -galactosidase A, every two weeks. Agalsidase alfa and beta are the two recombinant forms in use for FD [2].

Studies of FD pathophysiology have shown the occurrence of mechanisms additional to the accumulation of substrates, such as inflammation and oxidative stress [3–7]. In 2012, a study from our group showed positive correlations among oxidative stress, inflammation, and Gb3 in treated Fabry patients. Patients presented higher levels of oxidative damage to proteins and lipids, accompanied by lower antioxidant defenses and higher pro-inflammatory cytokines [3].

In addition to reacting with protein and lipids, reactive species can also attack DNA. DNA lesions have been associated with disease progression in cancer, diabetes, cardiovascular diseases, arthritis and many other chronic diseases [8]. However, no published study has examined DNA damage in Fabry disease.

The aim of this study was to investigate DNA damage and susceptibility to H_2O_2 in peripheral blood cells of Fabry patients and

Abbreviations: BER, base excision repair; DCF, dichlorofluorescein; DCFH, dihydrodichlorofluorescein; DI, damage index; EndoIII, endonuclease III; ERT, enzyme replacement therapy; FD, Fabry disease; FPG, formamidopyrimidine DNA-glycosylase; Gb3, globotriaosylceramide.

* Corresponding authors at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil. Tel.: +55 51 33598011; fax: +55 51 33598010.

E-mail address: cvargas@hcpa.edu.br (C.R. Vargas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.012>
 1383-5718/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

healthy individuals. The comet assay and DCFH oxidation assay were applied.

2. Material and methods

2.1. Subjects and samples

The study was performed with ten adult patients (five male hemizygotes and five female heterozygotes) with the classic form of FD (mean age 36 y; range 23–54) and six healthy controls matched by age and sex (mean age 49 y; range 26–67). Six patients were receiving ERT treatment (agalsidase alfa – Replagal 0.2 mg/kg or agalsidase beta – Fabrazyme® 1.0 mg/kg) every two weeks. Four patients were diagnosed but were not yet receiving ERT. Male patients' diagnosis was performed by detection of deficient α -galactosidase A activity in plasma and confirmed in leucocytes. For the heterozygotes, diagnosis was confirmed by molecular analysis of the GLA gene.

Informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Committee – project number 100,177. Heparinized blood samples were collected from patients and controls concomitantly. After homogenization, aliquots of total blood were separated and maintained on ice protected from light until the comet assay was performed. The remaining blood sample was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min and plasma was removed by aspiration, aliquoted, and frozen at -80°C for the DCF assay. To avoid false positive responses in the comet assay, cell viability determined by the trypan blue exclusion assay should be $>75\%$.

2.2. DNA damage - comet assay

Whole blood was used in the alkaline version of the comet assay, which was performed according to the method of Singh et al. [9] with minor modifications according to Speit and Hartman [10]. Briefly, an aliquot (10 μL) of freshly collected whole blood was mixed with 0.75% low-melting-point agarose (90 μL) and cast onto microscope slides precoated with 1.5% normal agarose. Slides were incubated in ice-cold lysis solution. After lysis for 24 h, the DNA was allowed to unwind for 30 min in electrophoresis solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH \sim 13). Electrophoresis was conducted at 4°C for 20 min at 0.94 V/cm. The slides were then neutralized with Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and stained with silver. For DNA damage evaluation, 100 cells per sample were analyzed by optical microscopy. Cells were visually scored by measuring the DNA migration length and the amount of DNA in the tail into five classes, from undamaged (0) to maximally damaged (4), and a damage index (DI) value was calculated for each sample. Damage index therefore ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4) [11,12].

In the whole comet assay experiment, each patient or control sample gave rise to 18 slides, 9 duplicates: 1. Basal damage; 2. Basal damage + FPG; 3. Basal damage + EndoIII; 4. 30 min H_2O_2 ; 5. 30 min H_2O_2 + FPG; 6. 30 min H_2O_2 + EndoIII; 7. 120 min H_2O_2 ; 8. 120 min H_2O_2 + FPG; 9. 120 min H_2O_2 + EndoIII.

2.2.1. Detection of oxidized bases

A digestion step with two bacterial repair enzymes was included in the alkaline comet assay before electrophoresis, in accordance with Collins et al. [13] and Dizdaroglu [14]. Briefly, after the lysis step, slides were washed three times in enzyme buffer (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 mM Na_2EDTA , 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0) and incubated with formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG, also known as MutM; 30 min at 37°C ; 100 mU per slide) and endonuclease III (EndoIII, also known as Nth; 45 min at 37°C ; 100 mU per slide), both enzymes obtained from New England Biolabs (NEB,

Ipswich, MA). Levels of FPG and EndoIII sensitive sites were calculated as the score obtained with enzymes minus the score without enzymes (basal).

2.2.2. Challenge assay

For assessment of susceptibility to exogenous DNA damage and to evaluate capacity of DNA repair, samples were treated with the oxidizing agent hydrogen peroxide (H_2O_2 , 100 μM) for 30 and 120 min at 37°C prior to preparation of slides (500 μL total reaction volume: 100 μL total heparinized blood; H_2O_2 , 50 μL 1 mM; pH 7.4 phosphate-buffered saline, PBS, 350 μL) according to Au et al. [15]. Subsequent steps were the same as in the alkaline version of the comet assay (see Section 2.2.).

2.3. DCFH-DA assay

The DCFH-DA assay was used to estimate the intracellular generation of reactive species in a cell-free assay according to Ko et al. [16] and Yin et al. [17]. Briefly, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) stock solution was prepared and stored at -20°C . Prior to each experiment, 0.1 M NaOH, 1 mL, was added to stock DCF-DA, 250 μL , and incubated at room temp. for 30 min. In a 96-well plate, 5 μL heparinized plasma, DCF-DA solution (50 μM) and phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, total volume 200 μL), were incubated at 37°C for 30 min. The neutralizing effect of PBS converts DCF-DA to dihydrodichlorofluorescein (DCFH). DCFH oxidation by reactive species from plasma sample generates DCF; fluorescence intensity was read (with a Spectramax® reader) at excitation wavelength = 485 nm and emission wavelength = 530 nm. All experiment was performed in a dark room to prevent the oxidation of DCFH. Results were expressed as fluorescence units normalized to protein content measured by Bradford assay [18] (FU/ mg protein).

2.4. Statistical analysis

Normal distribution was tested by the Shapiro–Wilk test. All data from the comet assay were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. The DCFH-DA assay was analyzed by the unpaired Student's *t* test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Analyses and graphics were performed by using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc.–San Diego, CA, USA – version 5.0).

3. Results

3.1. Basal DNA damage

The basal DI in the alkaline comet assay, which detects DNA single- and double-strand breaks (SB) and alkali-labile sites, showed that Fabry patients presented significantly higher DNA damage levels when compared to controls (Fig. 1a, $p < 0.001$).

3.2. Oxidative DNA damage

Fabry patients presented significantly higher oxidative DNA damage than controls, after DNA digestion with FPG (Fig. 1b, $p < 0.05$), specific for oxidized purines (including 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, and other ring-opened purines), but not with EndoIII (Fig. 1c), which recognizes oxidized pyrimidines (including thymine glycol and uracil glycol).

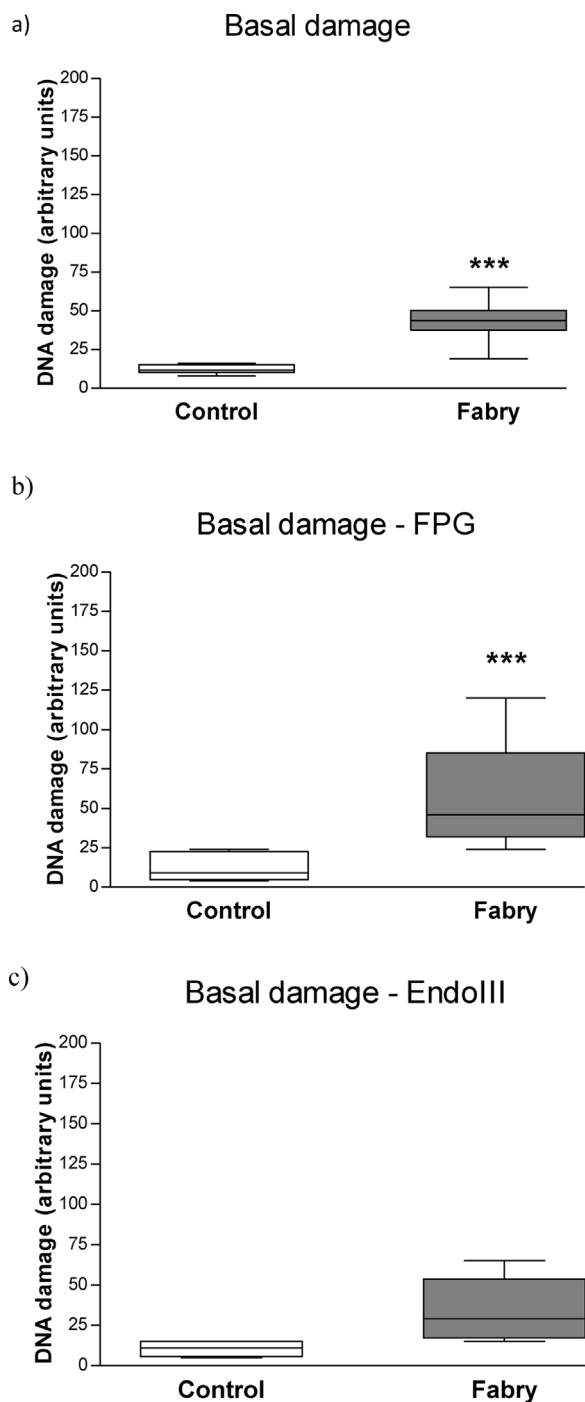


Fig. 1. Basal DNA damage (a), basal damage in purines (b) and pyrimidines (c) in controls and Fabry patients. Data represent minimum, median and maximum values (controls: $n = 6$; patients: $n = 7-10$). *** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

3.3. Oxidative challenge assay

When compared to the basal damage, DI after 30 min of H_2O_2 treatment was significantly higher in both controls (Fig. 2a, $p < 0.001$) and patients (Fig. 2b, $p < 0.05$), which means that treatment with H_2O_2 induced DNA damage in this assay. In order to investigate DNA repair capacity after H_2O_2 treatment, statistical differences between the DI after 30 min (peak of DNA damage) and the DI after 120 min (residual DNA damage after base excision repair) incubation were analyzed. Once comet tails are formed due

to breaks in DNA, misrepaired lesions that do not lead to breaks are not detected by the comet assay [19].

In the assay with endonucleases, the control group showed induction of DNA damage in purines only (Fig. 3a, $p < 0.05$) but not in pyrimidines (Fig. 4a). Also in the control group, no statistically-significant difference was seen between the DI after 120 min and after 30 min of H_2O_2 treatment, nor between the basal DI and DI after 120 min. This plateau effect between 30 min and 120 min occurred in the assay with FPG (Fig. 3a), EndoIII (Fig. 4a) and without endonucleases (Fig. 2a).

In samples of Fabry patients, however, H_2O_2 -induced damage in both DNA bases (purines Fig. 3b, $p < 0.001$; pyrimidines Fig. 4b, $p < 0.001$). DI after 120 min was significantly lower when compared to DI after 30 min of incubation in the assay without endonucleases (Fig. 2b, $p < 0.001$) and with Endo III (Fig. 4b, $p < 0.05$), showing that DNA repair occurred between these two times. Since statistically-significant differences between ID after 120 min and basal ID were not found, patients were able to repair induced lesions to basal levels in both assays, with (Fig. 3b. and Fig. 4b) and without (Fig. 2b) endonucleases.

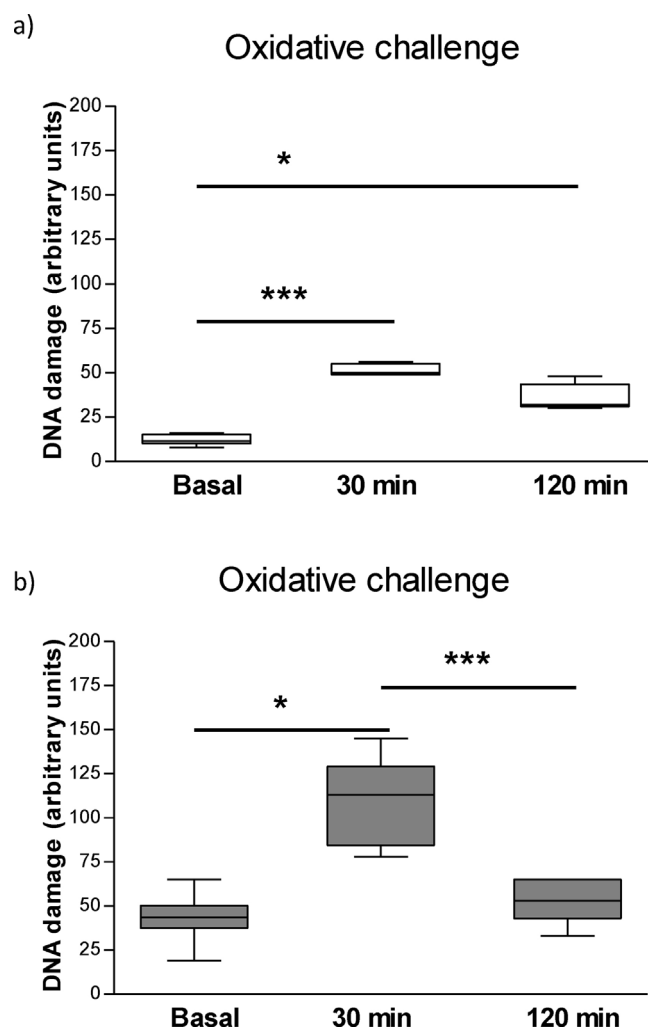


Fig. 2. Oxidative challenge assay in controls (a) and Fabry patients (b), after 30 and 120 min of H_2O_2 treatment. Data represent minimum, median and maximum values (controls: $n = 5-6$; patients: $n = 5-10$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

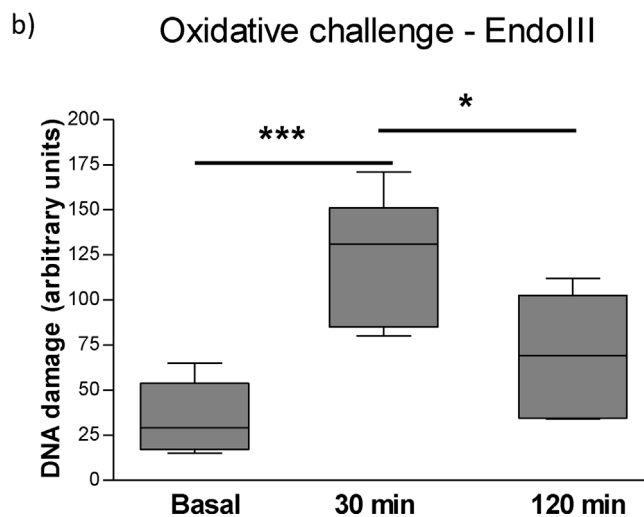
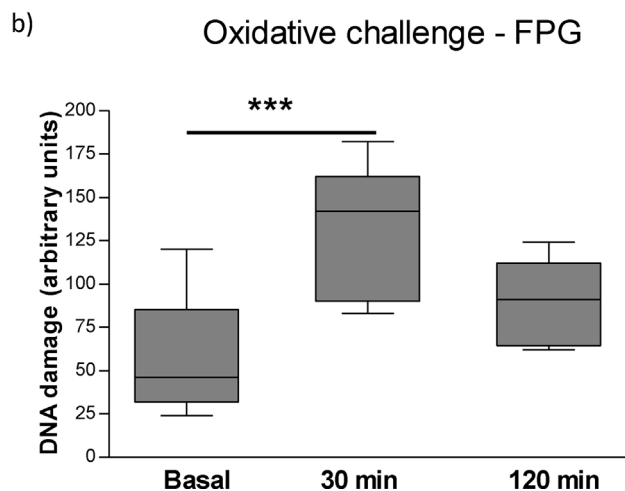
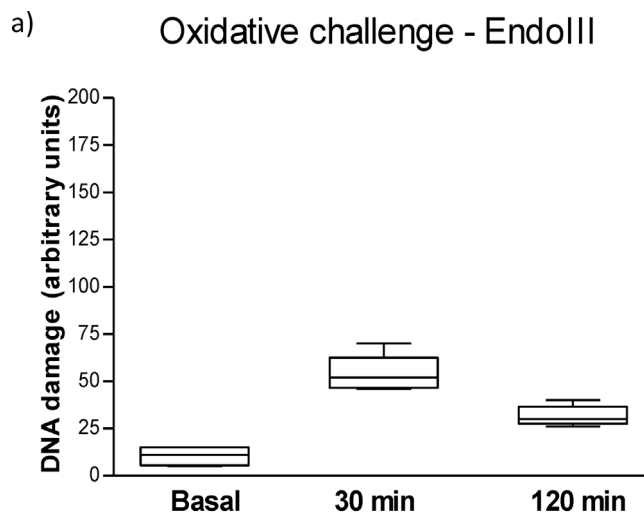
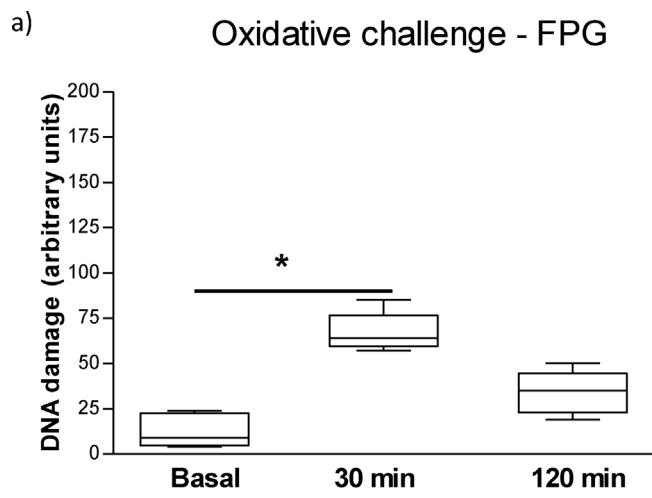


Fig. 3. DNA damage in purines measured by oxidative challenge assay modified with FPG in controls (a) and Fabry patients (b), after 30 and 120 min of H_2O_2 treatment. Data represent minimum, median and maximum values (controls: $n=5-6$; patients: $n=5-10$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

Fig. 4. DNA damage in pyrimidines measured by oxidative challenge assay modified with EndoIII in controls (a) and Fabry patients (b), after 30 and 120 min of H_2O_2 treatment. Data represent minimum, median and maximum values (controls: $n=5-6$; patients: $n=5-10$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

3.4. DCFH-DA assay

To access reactive species formation, the widely used probe DCFH-DA indicated that Fabry patients presented significantly higher levels of reactive species than controls (Fig. 5) [$t(12) = 5.646$, $p < 0.001$]. Although this probe cannot be used as a direct measure of H_2O_2 and is susceptible to artefacts [20], it can be used as a redox indicator probe that responds to changes in intracellular iron signaling or peroxynitrite formation [21].

4. Discussion

FD pathophysiology involves processes beyond substrate accumulation, such as chronic inflammation [4,5], fibrosis [22], and oxidative stress [3,6]. A study in Fabry patients under ERT showed lower antioxidant defenses and higher oxidative damage to proteins and lipids, accompanied by increased proinflammatory cytokines levels, when compared to controls. Also, positive correlations of the main metabolite accumulated in FD, Gb3, were found with protein and lipid damage biomarkers, as well as with cytokines in those patients [3].

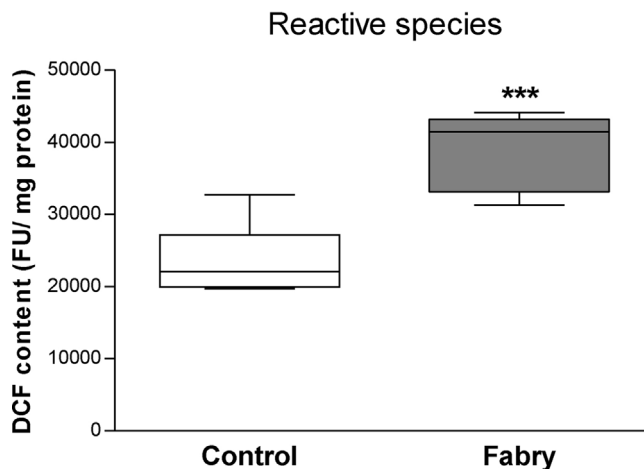


Fig. 5. Reactive species content in controls and Fabry patients. Data represent minimum, median and maximum values (controls: $n=6$; patients: $n=8$). *** $p < 0.001$ (unpaired Student's t test).

Since oxidative species can attack proteins, lipids and DNA [23], in this study, DNA damage was investigated in Fabry patients. In order to elucidate the mechanisms involved in DNA damage, an oxidative challenge assay for DNA repair assessment was performed and endonucleases were used to investigate oxidative damage to DNA bases. A modified version of the comet assay was used, in which two lesion-specific endonucleases are added after lysis, to increase sensibility and specificity. Both enzymes, FPG and EndoIII, recognize oxidized bases and convert them into breaks reflected in the comet tail [24].

Our results show that Fabry patients have higher basal DNA damage levels than controls and this damage has an oxidative origin in purines but not in pyrimidines. No statistically-significant difference in basal DNA damage between Fabry patients before and during ERT treatment was found (data not shown). Also, the amount of reactive species generated in Fabry patients, determined by the DCFH-DA assay, was significantly higher than in controls, which corroborates previous findings showing induction of oxidative stress in Fabry patients [3,6]. The observed effect on purines can be explained by the fact that, among the four DNA bases, purines (first guanine, followed by adenine) are preferentially oxidized, due to lower reduction potentials [25].

Reactive species, most notably •OH, react with DNA by adding an H atom to heterocyclic bases (purines and pyrimidines) double bonds or by removing an H atom from the thymine methyl group and from sugar moiety C–H bonds. However, DNA damage has harmful consequences for cell metabolism only if it is not sufficiently repaired. Unrepaired DNA lesions can accumulate in the genome [26]. The comet assay can be used to evaluate oxidative DNA damage repair kinetic by the so-called ‘challenge assay’ [15,27].

In this work, residual DNA damage was evaluated after treatment with H₂O₂, which induces single strand breaks (SB), assessing SB rejoining, in which oxidized bases are removed by base excision repair (BER). Induction of DNA damage by H₂O₂ occurs due to OH• formation, which oxidizes base and sugar moieties of DNA [28]. Hydrogen peroxide could induce DNA damage in both controls and Fabry patients. In controls, induced damage was found in the simple assay (without endonucleases) and with FPG (reflecting damage to purines), while in Fabry patients induced damage was also found in pyrimidines.

Although, in the control group, there was a decrease in DNA damage after 120 min of H₂O₂-treatment, in the simple assay and with FPG, this reduction was not significant. Considering that repair of DNA strand breaks induced by H₂O₂ in several cell types is a rapid process, with a half-time of a few minutes [29,30], one can speculate that repair has occurred before 30 min in the control group, and it was efficient, since basal DNA damage levels were restored. As well as the controls, Fabry patients presented efficient but slower DNA repair, since there was a peak of damage after 30 min, and at 120 min, the DNA DI returned to basal levels. Thus, repair mechanisms occurred in Fabry patients concerning oxidative DNA damage of all kinds: in phosphodiester linkages, purines, and pyrimidines.

DNA repair plays a fundamental role in maintenance of genome integrity against exogenous and endogenous insults, avoiding accumulation of genetic damage, and its detrimental consequences on cell survival and function [31]. Many different damaging agents, including oxidative stress, can induce an adaptive response [32]. In general, adaptation appears to involve modulation of the expression of many genes, including those involved in the response to DNA damage [33]. In this study, higher reactive species levels were found in the same patients who presented higher basal DNA damage and efficient repair mechanisms in response to an oxidative agent *in vitro*. Fabry patients may display induction of DNA repair systems due to chronic exposure to oxidative stress. However, probably due to higher generation of reactive species (DCFH-DA

assay) and insufficient removal, this induced repair system is not sufficiently effective *in vivo*. Taken together, our results indicate that Fabry patients present higher reactive species levels and DNA damage than do controls. This damage has an oxidative origin, and even if chronic exposure to oxidative stress induces repair mechanisms, this is insufficient to reduce DNA damage to normal levels *in vivo*.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

Funding

CNPq, CAPES and FIPE/HCPA were the sources of funding of this study. All sources had no involvement in the study.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq, CAPES and FIPE/HCPA. Authors are grateful to the staff of Medical Genetics Service of HCPA as well as to the patients and controls.

References

- [1] R.J. Desnick, Y.A. Ioannou, C.M. Eng, α -Galactosidase A deficiency: a Fabry disease, in: C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc, New York, 2001, pp. 3733–3774.
- [2] R.P. El Dib, G.M. Pastores, Enzyme replacement therapy for Anderson–Fabry disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2010) CD006663, <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD006663.pub2>.
- [3] Biancini, C.S. Vanzin, D.B. Rodrigues, et al., Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 226–232, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadi.2011.11.001>.
- [4] P.N. De Francesco, J.M. Mucci, R. Ceci, C.A. Fossati, P.A. Rozenfeld, Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide, *Mol. Genet. Metab.* 109 (2013) 93–99, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.02.003>.
- [5] C.S. Pereira, O. Azevedo, M.L. Maia, A.F. Dias, C. Sa-Miranda, M.F. Macedo, Invariant natural killer T cells are phenotypically and functionally altered in Fabry disease, *Mol. Genet. Metab.* 108 (2013) 241–248, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.01.018>.
- [6] J.S. Shen, X.L. Meng, D.F. Moore, et al., Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 163–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.06.016>.
- [7] E.B. Vitner, F.M. Platt, A.H. Futerman, Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 20423–20427, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R110.134452>.
- [8] A. Collins, G. Koppen, V. Valdiglesias, et al., The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project, *Mutat. Res.* 759 (2014) 27–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrv.2013.10.001>.
- [9] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- [10] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, *Methods Mol. Biol.* 314 (2006) 275–286, <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275>.
- [11] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit et al., Fourth international workgroup on genotoxicity testing: Results of the *in vivo* comet assay workgroup, *Mutat. Res.* 627 (2007) 31–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.011>.
- [12] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, et al., Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3).
- [13] A.R. Collins, S.J. Duthie, V.L. Dobson, Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis* 14 (1993) 1733–1735, <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/14.9.1733>.
- [14] M. Dizdaroglu, Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases, *Mutat. Res.* 591 (2015) 45–59, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.033>.
- [15] W.W. Au, A.K. Giri, M. Ruchirawat, Challenge assay: a functional biomarker for exposure-induced DNA repair deficiency and for risk of cancer, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213 (2010) 32–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2009.09.002>.
- [16] S.H. Ko, S.W. Choi, S.K. Ye, B.L. Cho, H.S. Kim, M.H. Chung, Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma, *J. Med. Food* 8 (2005) 41–46, <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2005.8.41>.

- [17] F. Yin, G. Ramanathan, M. Zhang, J.A. Araujo, Prooxidative effects of ambient pollutant chemicals are inhibited by HDL, *J. Biochem. Molec. Toxicol.* 27 (2015) 172–183, <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.21475>.
- [18] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [19] T. Gichner, I. Znidar, E.D. Wagner, M.J. Plewa, The use of higher plants in the comet assay, in: A. Dhawan, D. Anderson (Eds.), *The Comet Assay in Toxicology*, RSC Publishing, Cambridge, UK, 2009, pp. 98–119.
- [20] S.I. Dikalov, D.G. Harrison, Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 372–382, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4886>.
- [21] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J.A. Davies, et al., Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.
- [22] F.M.D.J. Weidemann Sanchez-Niño Politei, et al., Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications, *Orphanet J. Rare Dis.* 8 (2013) 116, <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-8-116>.
- [23] B. Halliwell, O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett.* 281 (1991) 9–19, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80347-6](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(91)80347-6).
- [24] M. Dusinska, A.R. Collins, The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions, *Mutagenesis* 23 (2008) 191–205, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen007>.
- [25] S. Steenken, S.V. Jovanovic, How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 617–618, <http://dx.doi.org/10.1021/ja962255b>.
- [26] M. Dizdaroglu, Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease, *Cancer Lett.* 327 (2012) 26–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016>.
- [27] A.R. Collins, A. Azqueta, DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay, *Mutat. Res.* 736 (2012) 122–129, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.005>.
- [28] M. Dizdaroglu, G. Rao, B. Halliwell, E. Gajewski, Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions, *Arch. Biochem. Biophys.* 285 (1991) 317–324, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90366-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(91)90366-Q).
- [29] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [31] E.C. Friedberg, A. Aguilera, M. Gellert, et al., DNA repair: from molecular mechanism to human disease, *DNA Repair* 5 (2006) 986–996, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.005>.
- [32] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature* 461 (2009) 1071–1078, <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>.
- [33] K.J.A. Davies, A.G. Weise, R.E. Pacifici, J.M.S. Davies, Regulation of gene expression in adaptation to oxidative stress, in: G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani (Eds.), *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhauser-Verlag, Basel, Switz, 1993, pp. 18–30.

Capítulo II:

Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy

Artigo submetido ao periódico *Clinica Chimica Acta*

(manuscript number CCA-D-16-00144)

Title: Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy

Authors: Giovana Brondani Biancini^{a,b,*}, Carlos Eduardo Jacques^{b,c}, Tatiane Hammerschmidt^b, Heryk Motta de Souza^b, Bruna Donida^{a,b}, Marion Deon^b, Filippo Pinto Vairo^b, Charles Marques Lourenço^d, Roberto Giugliani^{a,b,e}, Carmen Regla Vargas^{a,b,c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding authors at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil. Tel.: +55 51 33598011. Fax: +55 51 33598010
E-mail addresses: giovana.bb@gmail.com (G. B. Biancini), crvargas@hcpa.edu.br (C. R. Vargas)

Abstract

Fabry disease (FD) is caused by deficient activity of the lysosomal enzyme α -galactosidase A. Its substrates, mainly globotriaosylceramide (Gb3), accumulate and seem to induce other pathophysiological findings of FD. Once enzyme replacement therapy (ERT) is not completely efficient on preventing disease progress in FD patients, elucidating the underlying mechanisms in FD pathophysiology is essential to the development of additional therapeutic strategies. We investigated 58 Fabry patients (23 male and 35 female) subdivided into two groups (at diagnosis and during long-term ERT) and compared them to healthy individuals. Fabry patients at diagnosis presented altered glutathione (GSH) metabolism (higher GSH levels, lower glutathione peroxidase – GPx – and normal glutathione reductase – GR - activities), higher lipid peroxidation levels (thiobarbituric acid reactive species - TBARS - and malondialdehyde - MDA), nitric oxide (NO) equivalents and urinary Gb3. Fabry patients on ERT presented GSH metabolism similar to controls, although lipid peroxidation and urinary levels of NO equivalents remained higher whereas Gb3 levels were lower than at diagnosis but still higher than controls. These data demonstrated that redox impairment occurs in Fabry patients before and after ERT, probably as a consequence of Gb3 accumulation, providing targets to future therapy approaches using antioxidants in combination with ERT in FD.

Keywords

Fabry disease; Lysosomal diseases; Globotriaosylceramide; Antioxidant defenses; Oxidative stress; Reactive species

Abbreviations

α -gal A, α -galactosidase A; Cr, creatinine; ERT, enzyme replacement therapy; FD, Fabry disease; GCL, glutamate cysteine ligase; Gb3, globotriaosylceramide; GLA, α -galactosidase A coding gene; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; H₂O₂, hydrogen peroxide; Lyso-Gb3, globotriaosylsphingosine; MDA, malondialdehyde; NO₃⁻, nitrate; NO, nitric oxide; NO₂⁻, nitrite; ONOO⁻, peroxytrite; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric acid reactive species.

Highlights

Fabry patients at diagnosis and during long-term ERT were studied

Patients present altered oxidative and nitrosative stress profile even before ERT

Glutathione metabolism is altered as an adaptive response to stress

Lipid peroxidation and nitric oxide equivalents remain higher after ERT

Urinary Gb3 decrease after ERT but not to control levels

1. Introduction

Fabry disease (FD, OMIM 301500) is a lysosomal disorder caused by mutations on α -galactosidase A (α -gal A, EC 3.2.1.22) coding gene (GLA), with systemic deposition of its substrates (glycosphingolipids with terminal α -galactosyl, mainly globotriaosylceramide – Gb3). The estimated incidence of classical FD is about one in 40,000 males [1], but non-classical phenotypes are much more frequent [2] and [3].

Differently from how it seems to be in the early FD descriptions [4] and [5], studies in last decades have shown a multi-organ complex disease [1], [6], [7] and [8]. Beyond direct accumulation of substrates, other mechanisms are now known to play an important role in FD pathophysiology, such as inflammation, oxidative stress and DNA damage [1], [7], [9], [10], [11] and [12]. Moreover, Gb3 was capable to induce proinflammatory profile in cultured peripheral blood mononuclear cells [11] and increased intracellular reactive oxygen species (ROS) in cultured vascular endothelial cells [10].

Also, major complications in FD – cerebrovascular, renal and cardiac disease - are due to vasculopathy that seems to involve cascade events in adhesion molecules, cytokines and pro-inflammatory effect on leucocytes, endothelial cells and vascular smooth muscle cells [1] and [6]. Studies in an animal model of FD [13] and in dermal and cerebral vessels of Fabry patients [7] are in line with the hypothesis that nitric oxide and nitrosative stress may be key elements in FD vasculopathy.

Oxidative stress has been pointed as an important element in physiological and pathological processes, including inflammatory ones [14] as well as other lysosomal disorders [15], [16] and [17]. Our research has been focusing in the mechanisms by which oxidative stress occurs in Fabry disease and demonstrated in Fabry patients under ERT (for about 24 months) interesting data supporting the idea of oxidative and inflammatory imbalance [9], although a deep investigation in patients before treatment remains necessary. Therefore, in the present study we investigated in Fabry patients, before and during long-term ERT, the following parameters: the metabolism of the main intracellular antioxidant system (glutathione), the oxidative damage to lipids and proteins, the nitrosative stress and the levels of the major accumulated substrate in FD (Gb3).

2. Material and Methods

2.1. Subjects

The study was performed in 23 male and 35 female Fabry patients (all of them with the classical phenotype), with results compared to the obtained in 48 healthy individuals. Subjects were divided into three groups: 1) 12 Fabry patients (median age 34.5 years; range 19-64) diagnosed but not receiving ERT yet – called “Fabry” group; 2) 11 Fabry patients under ERT treatment (agalsidase alfa — Replagal® 0.2 mg/kg or agalsidase beta — Fabrazyme® 1.0 mg/kg; median ERT time period 5.5 years) every two weeks (median age 44 years; range 24-67) – called “Fabry ERT” group; 3) 10 healthy individuals matched by age and sex (median age 33.5 years; range 20-67) – called “Control” group. Some patients collected only urine samples, then medians and number of subjects in each group was bigger for urine biochemical determinations: Fabry group (n=17; median age 27 years; range 4-64); Fabry ERT group (n=22; median age 39.5 years; range 20-67; median ERT time period 2.1 years); Control group (n=38; median age 45 years; range 14-67).

Male patients' diagnosis was performed by identification of deficient α -gal A activity in plasma and confirmed in leucocytes. For the females, diagnosis was confirmed by molecular analysis of the GLA gene and identification of a pathogenic mutation.

The study was approved by the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* Ethics Committee (number 100177). Informed consent was obtained from all the participants.

2.2. Samples

Heparinized blood and urine samples were collected from patients and controls concomitantly. Whole blood was separated by centrifugation (1000 ×g for 10 min), plasma removed by aspiration, aliquoted and frozen at –80 °C until analysis. Cells were washed three times with cold saline solution and then erythrocyte lysates prepared by addition of 1 mL distilled water to 100 μ L erythrocytes aliquot. Lysate aliquots were maintained at –80 °C until analysis. Urine samples were collected in sterile flasks, homogenized, deposited on 10-10 cm virgin filter papers (Whatman 903) to Gb3 quantification and the remaining volume aliquoted and frozen at –80 °C until nitrate and creatinine determinations.

2.3. Biochemical determinations

2.3.1. Erythrocyte Glutathione (GSH) Metabolism Parameters

2.3.1.1. Reduced Glutathione (GSH)

GSH erythrocyte levels were measured as described by Browne and Armstrong [18] adapted to microplate. The resulting sample fluorescence was measured ($\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 420 \text{ nm}$) and compared to calibration curve prepared with GSH solutions. Results were expressed as nmol/mg protein.

2.3.1.2. Glutathione Peroxidase (GPx)

Erythrocyte GPx activity was measured by using RANSEL® kit (Randox lab), that is based on GPx catalysis of GSH oxidation to GSSG (oxidized GSH) and subsequent reduction to GSH in the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH concomitantly oxidated to NADP. Absorbance decrease after 1 and 2 min at 340 nm was measured and results were expressed as mU/mg protein.

2.3.1.3. Glutathione Reductase (GR)

Erythrocyte GR activity was determined as described by Carlberg and Mannervik [19] in which GR catalyses GSSG reduction to GSH with NADPH oxidation to NADP. Absorbance was monitored at 340 nm and results were expressed as U/mg protein.

2.3.2. Lipid peroxidation parameters

2.3.2.1. Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) plasma levels

Lipid peroxidation was firstly estimated by measuring TBARS according to the method described by Ohkawa, Ohishi and Yagi [20] in which samples are heated with TBA at low pH and a pink chromogen is read at 535 nm. Results were expressed as nmol/mg protein.

2.3.2.2. Malondialdehyde (MDA) plasma levels

To confirm the results found by TBARS technique, we also measured lipid peroxidation by the high performance liquid chromatography (HPLC) method described by Esterbauer and Cheeseman [21] with slight modifications. This method is more specific than TBARS, once it detects only the lipid peroxidation end product MDA. Briefly, to a plasma aliquot were added

28% trichloroacetic acid and distilled water. After centrifugation, supernatant MDA was removed and measured by HPLC using an amino-phase column with 30mM acetonitrile, pH 7.4 tris buffer (1:9, v/v). Effluent was monitored at 267 nm and calibration curve was done with MDA standard solutions. Results were expressed as log of mM MDA.

2.3.3. Thiol (SH) groups plasma levels

Total plasma thiol content, an indirect method to determine oxidative damage to proteins, was measured as described by Aksenov and Markesbery [22]. The method is based on reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) into a yellow product (TNB) by sample thiols. TNB absorption was measured spectrophotometrically at 412 nm. Results were expressed as nmol TNB/mg protein.

2.3.4. Nitric Oxide (NO) Urinary levels

NO[•] is measured in biological fluids indirectly by quantifying the NO[•] stable products nitrate and nitrite. It was used a commercial nitrate/nitrite kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) that is based on nitrate conversion to nitrite by nitrate reductase and subsequent Griess reaction with nitrite leading to an azo product formation which absorption was read in 540 nm. Results were expressed as μmol/mg creatinine.

2.3.5. Urinary Globotriaosylceramide (Gb3)

A 5-cm diameter filter paper disc was punched from each sample and processed as described by C. Auray-Blais et al. [23] with some modifications. The internal standard (IS) C_{17:0}-Gb3 was added to the urine samples before injection into the LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) system. For LC, it was used an Alliance 2695 system with stepwise gradient elution with mobile phases A (ammonium acetate 2mM + 0.1% formic acid in water) and B (ammonium acetate 2mM + 0.1% formic acid in methanol). A Discovery[®] C8, 5μm column (577508-U) was used for separation, at 45 °C and the total analysis run time was 4.5 min. MS/MS was carried out using a Quattro micro tandem quadrupole instrument (Waters Micromass, Manchester, UK) with electrospray ionization operated in positive ion mode. The multiple reaction monitoring mode was used for the measurement of IS and total Gb3 isoforms. Results were expressed as μg/mg creatinine.

2.3.6. Protein quantification

Plasma and erythrocyte protein levels were determined respectively, by Biuret method – using Labtest® kit (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil) and by Lowry method [24], both measured in spectrophotometer.

2.3.7. Urinary creatinine (Cr)

Cr was quantified by Picric Acid method using Creatinine K Labtest® kit (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil), which is based on creatinine reaction with picric acid under alkaline conditions and the resulting colored product determined spectrophotometrically at 492 nm. Results were expressed as mg/mL.

2.3.8. Statistical analysis

Normal distribution was tested by the Shapiro-Wilk test. Not normally distributed data were converted into parametric by logarithmic (log) transformation. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan post hoc test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Analyses were performed by using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA – SPSS version 19.0) software. Graphics were constructed by using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA — version 5.0).

3. Results

3.1. *Glutathione (GSH) Metabolism Parameters*

To investigate the main antioxidant system in human beings, we quantified GSH erythrocyte levels and measured the erythrocyte activity of two enzymes of GSH metabolism – glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx). Results are shown in Table 1. Fabry patients at diagnosis moment presented higher GSH levels [F (2, 20) = 9.221; p = 0.001] and lower GPx activity [F (2, 15) = 5.347; p = 0.018] when compared to controls and Fabry patients under ERT. No statistical difference was found in GR activity between patients and controls (p > 0.05).

3.2. *Lipid peroxidation*

Fabry patients presented higher levels of lipid peroxidation in both measured parameters at diagnosis and during ERT when compared to controls: TBARS (Fig. 1A) [F (2, 28) = 8.313; p = 0.001]; MDA (Fig. 1B) [F (2, 18) = 6.289; p = 0.008].

3.3. *Thiol content*

Concerning to total plasma thiol content, it was found no significant difference between the three studied groups (Fig. 2, p > 0.05).

3.4. *Nitric Oxide (NO)*

Nitrosative stress was accessed by measuring nitrate/nitrite content in urine samples. Fabry patients presented higher levels of NO[•] equivalents at the moment of diagnosis and during ERT treatment when compared to controls (Fig. 3) [F (2, 49) = 3.209; p = 0.049].

3.5. *Gb3 levels*

It was found significant difference in urinary Gb3 levels between the three studied groups (Table 2). Fabry patients at diagnosis moment presented higher levels of Gb3, which were decreased during ERT and even lower in controls [F (2, 82) = 12.67; p < 0.0001].

4. Discussion

In recent years, studies have been developed in order to elucidate the mechanisms involved in FD pathophysiology. Major conclusions showed that probably as a consequence of α -gal A substrates accumulation, cascade reactions of inflammation, nitrosative and oxidative stress may contribute to disease progression [1], [6], [7], [9], [10] and [11]. In this context, the aim of this study was to complement our previous findings in treated Fabry patients [9] comparing now the oxidative profile (antioxidant defenses, nitrosative stress and oxidative damage to biomolecules) of Fabry patients before and after long-term ERT. Moreover, we also investigated Gb3 levels in these patients.

First, we investigated the main intracellular antioxidant – GSH – metabolism. Surprisingly, reduced GSH, which is the main non-enzymatic antioxidant in human beings [14], is increased in Fabry patients at diagnosis when compared to patients on ERT and to controls. GSH synthesis depends on the availability of its amino acid precursor, cysteine, and mainly on the activity of the rate-limiting enzyme, glutamate cysteine ligase (GCL, EC 6.3.2.2; γ -glutamylcysteine synthetase), that catalyses the first step of GSH biosynthesis [25]. GCL activity is regulated by GSH competitive inhibition [26] and by the availability of its precursor, L-cysteine [27]. Also, oxidative stress is capable to induce the expression of GSH synthetic enzymes, GCL catalytic subunit (GCLC) mRNA and GCLC gene transcription [25] and [28]. So, the higher GSH levels found in Fabry patients could be interpreted as a physiological response to oxidative injury.

On the other hand, Fabry patients before ERT treatment presented lower GPx activity. Comparing this result with the data from previous study [9], it can be concluded that lower GPx is not a consequence of ERT once it occurs even at diagnosis. Then, GSH increased levels before ERT could also be a consequence of decreased GPx activity. Differences found in the ERT group between both studies can be explained by the ERT time period. Most Fabry patients on ERT in our first study were also enrolled in the present study, so the median ERT time now is much higher (almost three fold – 2 to 5.5 years). This phenomenon can be occurring as an adaptive response to oxidative injury that occurred for a longer ERT time.

We found no statistical differences in GR activity. GR is an NADPH:GSSG oxidoreductase (EC 1.8.1.7) that catalyses the reduction of GSSG to GSH. This enzyme has an important role in glutathione metabolism linking the cellular NADPH pool with the thiol/disulfide pool and

maintaining the intracellular reducing environment of high GSH and low GSSG level [29]. Once Fabry patients presented statistically higher GSH levels and equal GR activity compared to controls, it can be supposed that GSH is probably raised due to high GCL activity and lower GPx activity and not due to GR alterations.

There is a well known relationship between GSH system and nitrosative stress. NO[•] inhibits GPx [30]. Also, GSH itself regulates NO[•] homeostasis [31] and can react with NO[•] leading to S-nitrosoglutathione formation [32]. In this work, we found higher levels of nitrate/nitrite – reflecting NO[•] imbalance – in Fabry patients before and during ERT. This result is in line with the results of previous study [7] and lead us to believe that the low GPx activity found before and during the first years of ERT treatment [9] could be a consequence of higher levels of NO[•] found in these patients.

GPx is found in most mammalian cells playing an important role in redox homeostasis, once it uses GSH as electron donor to reduce hydrogen peroxide (H₂O₂) to water. Besides being a selective oxidant, H₂O₂ also acts as signaling molecule carrying information about cell redox status in health and during stress adaptation, which is particularly relevant in vascular endothelial cells [33], [34] and [35]. High H₂O₂ levels also stimulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS), resulting in endothelium-dependent vasorelaxation via NO[•] [36]. Considering our results, in Fabry patients at diagnosis H₂O₂ is probably in higher levels due to low GPx activity and could be acting as a second messenger in this context of stress adaptation.

As a consequence of endothelial dysfunction, that is secondary to Gb3 and minor substrates accumulation, Fabry patients present higher susceptibility to stroke [1] and [8]. Then, considering the well known cardiovascular function of NO [37], investigations about oxidative stress and NO[•] metabolism in Fabry patients has gained importance [7], [8], [9] and [10]. Although Moore and colleagues [7] have found excessive nitrotyrosine staining in Fabry skin reversible by ERT, they have not found differences concerning to plasma levels of nitrate and nitrite between Fabry patients and controls. These authors explained that this could have occurred due to a lack of statistical power and/or by the hypothesis of NO[•] consumption by excessive superoxide (O₂^{•-}) to form peroxynitrite (ONOO⁻). The stable products of NO[•] – nitrate (NO₃⁻) and nitrite (NO₂⁻) - can easily be measured in plasma and urine to quantify NO systemic production *in vivo* [38]. In this study we found higher levels of

urinary NO_3^- and NO_2^- in Fabry patients before and after ERT, which reinforces the hypothesis of excessive NO^\cdot production and its association with FD vasculopathy. Interestingly, there is some evidence that NO_3^- and NO_2^- accumulate in sites of inflammation [39] and [40], what can be occurring in FD since there are studies showing pro-inflammatory processes in this disease [9] and [11].

Concerning to oxidative damage to biomolecules, in this study we investigate damage to proteins and lipids. Proteins are major targets for oxidants and its oxidation plays important role in several human diseases [41]. Once reactive species react with protein thiol groups, the total thiol content is inversely related to oxidative damage [42]. In this study we found no statistical difference in thiol content between the three groups of subjects studied. In our previous findings there were no differences in thiol groups between Fabry patients under ERT and controls either. In cases of chronic oxidative stress, thiol content measurement could give misleading data on the extend damage because repair mechanisms may compete with formation [42]. Also, once we found higher GSH levels in Fabry patients before ERT, even if thiol groups were being oxidized, the higher GSH could be masking this result (because of GSH molecular thiol content).

Lipid peroxidation was considered the most studied biologically relevant free radical chain reaction and seems to occur as a late consequence of oxidative injury process, not a first damage [14] and [43]. Reactive species attack to membrane lipids is well described in pathological processes related to FD such as atherosclerosis [44], inflammation [45] and ischemic brain damage [46]. In the present study, both assays performed to evaluate lipid peroxidation – MDA and TBARS – showed that it is raised in Fabry patients before and after ERT initiation when compared to controls.

Researchers are still looking for the ideal biomarker to diagnose and monitor FD [47]. The first biomarker proposed was Gb3 and in recent years, its deacylated form - globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) has been studied [23], [48], [49] and [50]. In our previous study we demonstrated that Gb3 is correlated with oxidative stress and inflammation in FD treated patients [9]. In this work we measured urinary Gb3 levels in Fabry patients and noticed that ERT was capable to reduce Gb3, but not sufficiently to control levels. Considering these findings, it is possible to suggest that Gb3 accumulation could induce

nitrosative stress and lipid peroxidation found in these patients (both of them higher before and after ERT).

In conclusion, our results provide new data about the oxidative stress profile of Fabry patients, mainly at diagnosis (Fig. 4) complementing our previous study in ERT Fabry patients [9] and demonstrating nitrosative stress before and during ERT. Then, it is possible to suggest that the oxidative damage we found in patients under ERT in both studies is not a consequence of ERT itself, once they present it before initiating ERT. Also, in this study we found an important increase in GSH levels at diagnosis moment that can be interpreted as an adaptive response to oxidative injury in patients. The incomplete effectiveness of ERT in lowering Gb3 levels is also an important result that reinforces the hypothesis that Gb3 could be inducing oxidative stress in this disease, once we found in both studies urinary Gb3 about seven (this study) to ten (previous study) fold higher in treated patients when compared to controls accompanied by higher levels of oxidative damage to biomolecules. Then, taking in mind that diagnosis of FD usually occurs in adult life [1] after years of Gb3 (and others metabolites) accumulation and considering that a recent meta-analysis about ERT effectiveness in FD concluded that improved treatment options are needed [51], it is possible to suggest that an adjuvant therapy with antioxidants probably may have beneficial effects for these patients.

5. Conflicts of interest disclosure

RG received speaker honoraria, travel grants, educational grants and/or investigator fees from Actelion, Akexion, Amicus, Biomarin, Genzyme, Pfizer, Protalix, Shire and Ultragenyx. CML received speaker honoraria fees from Actelion, Genzyme and Shire HGT (all fees are donated to the CML Medical Foundation for Research and Diagnosis Support). The fees received by RG and CML did not influence this work outcomes. GBB, CEJ, TH, HMS, BD, MD, FPV, CRV declare that they have no conflict of interest.

6. Acknowledgements

This study was supported by Brazilian Foundation *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (FIPE/HCPA). The authors also thank patients, control subjects and the staff from *Serviço de Genética Médica/Hospital de Clínicas de Porto Alegre*.

7. References

- [1] R.J. Desnick, Y.A. Ioannou, C.M. Eng, α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease, In: C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc, New York, 2001, pp. 3733–3774.
- [2] M. Spada, S. Pagliardini, M. Yasuda, T. Tukel, G. Thiagarajan, H. Sakuraba, A. Ponzzone, R.J. Desnick, High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening, *Am. J. Hum. Genet.* 79(1) (2006) 31-40.
- [3] H. Liao, C. Chiang, D. Niu, C. Wang, S. Kao, F. Tsai, Y. Huang, H. Liu, H., Gao, C. Yang, M. Chan, W. Lin, Y. Chen, Detecting multiple lysosomal storage diseases by tandem mass spectrometry - A national newborn screening program in Taiwan, *Clin. Chim. Acta*, 431 (2014) 80-86.
- [4] W. Anderson, A case of angiokeratoma, *Br. J. Dermatol.* 10 (1898) 113.
- [5] J. Fabry, Ein Beitrag Zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa hemorrhagica Habrae), *Arch. Dermatol. Syph.* 43 (1898) 187.
- [6] S.M. Rombach, T.B. Twickler, J.M.F.G. Aerts, G.E. Linthorst, F.A. Wijburg, C.E.M. Hollak, Vasculopathy in patients with Fabry disease: Current controversies and research directions, *Mol. Genet. Metab.* 99(2) (2010) 99-108.
- [7] D.F. Moore, L.T.C. Scott, M.T. Gladwin, G. Altarescu, C. Kaneski, K. Suzuki, M. Pease-Fye, R. Ferri, R.O. Brady, P. Herscovitch, R. Schiffmann, Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: Reversal by enzyme replacement therapy, *Circulation* 104(13) (2001) 1506-1512.
- [8] D.F. Moore, C.R. Kaneski, H. Askari, R. Schiffmann, The cerebral vasculopathy of Fabry disease, *J. Neurol. Sci.* 257(1-2) (2007) 258-263.
- [9] G.B. Biancini, C.S. Vanzin, D.B. Rodrigues, M. Deon, G.S. Ribas, A.G. Barschak, V. Manfredini, C.B.O. Netto, L.B. Jardim, R. Giugliani, C.R. Vargas, Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy, *Biochim. Biophys. Acta* 1822, (2012) 226-232.

- [10] J. Shen, X. Meng, D.F. Moore, J.M. Quirk, J.A. Shayman, R. Schiffmann, C.R. Kanetski, Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 163-168.
- [11] P.N. De Francesco, J.M. Mucci, R. Ceci, C.A. Fossati, P.A. Rozenfeld, Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: Role of globotriaosylceramide, *Mol. Genet. Metab.* 109(1) (2013) 93-99.
- [12] G.B. Biancini, D.J. Moura, P.R. Manini, J.L. Faverzani, C.B.O. Netto, M. Deon, R. Giugliani, J. Saffi, C.R. Vargas, DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair, *Mutat. Res.* 784-785 (2015) 31-36.
- [13] L. Shu, J.L. Park, J. Byun, S. Pennathur, J. Kollmeyer, J.A. Shayman, Decreased nitric oxide bioavailability in a mouse model of Fabry disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(9) (2009) 1975-1985.
- [14] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed, Oxford University Press, New York, 2007.
- [15] B. Donida, D.P. Marchetti, G.B. Biancini, M. Deon, P.R. Manini, H.T. da Rosa, D.J. Moura, J. Saffi, F. Bender, M.G. Burin, A.S. Coitinho, R. Giugliani, C.R. Vargas, Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy, *Biochim. Biophys. Acta* 1852(5) (2015) 1012-1019.
- [16] L. Filippon, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, I.N. Pereira, V. Manfredini, A. Sitta, M.C.R. Peralba, I.V.D. Schwartz, R. Giugliani, C.R. Vargas, Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy, *Mol. Genet. Metab.* 103(2) (2011) 121-127.
- [17] G. W. Negretto, M. Deon, G.B. Biancini, M.G. Burin, R. Giugliani, C.R. Vargas, Glycosaminoglycans can be associated with oxidative damage in mucopolysaccharidosis II patients submitted to enzyme replacement therapy, *Cell Biol. Toxicol.* 30(4) (2014) 189-193.
- [18] R.W. Browne, D. Armstrong, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods Mol. Biol.* 108 (1998) 347-352.

- [19] I. Carlberg, B. Mannervik, Glutathione reductase, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 484-90.
- [20] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351-8.
- [21] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407-421.
- [22] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141-145.
- [23] C. Auray-Blais, D. Cyr, A. Ntwari, M.L. West, J. Cox-Brinkman, D.G. Bichet, D.P. Germain, R. Laframboise, S.B. Melançon, T. Stockley, J.T.R. Clarke, R. Drouin, Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease, *Mol. Genet. Metab.* 93(3) (2008) 331-340.
- [24] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.I. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [25] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Mol. Aspects Med.* 30(1-2) (2009) 42-59.
- [26] P.G. Richman, A. Meister, Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1422-1426.
- [27] A. Meister, M.E. Anderson, Glutathione, *Ann. Rev. Biochem.* 52 (1983) 711-760.
- [28] R.T. Mulcahy, M.A. Wartman, H.H. Bailey, J.J. Gipp, Constitutive and naphthoflavone-induced expression of the human γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7445-7454.
- [29] M. Deponce, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 1830(5) (2013) 3217-3266.

- [30] M. Asahi, J. Fujii, K. Suzuki, H.G. Seo, T. Kuzuya, M. Hori, M. Tada, S. Fuji, N. Taniguchi, Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: Implication for cytotoxicity, *J. Biol. Chem.* 270(36) (1995) 21035-21039.
- [31] K.A. Broniowska, A.R. Diers, N Hogg, S-nitrosoglutathione, *Biochim. Biophys. Acta* 1830(5) (2013) 3173-3181.
- [32] A. Schrammel, A.C.F. Gorren, K. Schmidt, S. Pfeiffer, B. Mayer, S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and $\bullet\text{NO}/\text{O}_2 \bullet$ -, *Free Radic. Biol. Med.* 34(8) (2003) 1078-1088.
- [33] J.R. Burgoyne, S. Oka, N. Ale-Agha, P. Eaton, Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system, *Antioxid. Redox Signal.* 18(9) (2013) 1042-52.
- [34] E. Panieri, M.M. Santoro, ROS signaling and redox biology in endothelial cells, *Cell. Mol. Life Sci.*, 72 (2015) 3281–3303.
- [35] B. D’Autréaux, M.B. Toledano, ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8(10) (2007) 813–24.
- [36] H. Cai, Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences, *Cardiovasc. Res.* 68(1) (2005) 26–36.
- [37] A. Dejam, C.J. Hunter, A.N. Schechter, M.T. Gladwin, Emerging role of nitrite in human biology, *Blood Cells Mol. Dis.* 32(3) (2004) 423-429.
- [38] N.S. Bryan, M.B. Grisham, Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free Radic. Biol. Med.* 43(5) (2007) 645-657.
- [39] B.M. Babior, Phagocytes and oxidative stress, *Am. J. Med.* 109(1) (2000) 33-44.
- [40] Y. Ueki, S. Miyake, Y. Tominaga, K. Eguchi, Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 23(2) (1996) 230-236.
- [41] M.J. Davies, The oxidative environment and protein damage, *Biochim. Biophys. Acta* 1703(2) (2005) 93-109.

- [42] M.J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T. Dean, Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1151-1163.
- [43] B. Halliwell, S. Chirico, Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance, *Am. J. Clin. Nutr.* 57(SUPPL. 5) (1993) 715S-725S.
- [44] B. Shao, J.W. Heinecke, HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis, *J. Lipid Res.* 50(4) (2009) 599-601.
- [45] B. Pang, X. Zhou, H. Yu, M. Dong, K. Taghizadeh, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, P.C. Dedon, Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation, *Carcinogenesis*, 28(8) (2007) 1807-1813.
- [46] M.C. Polidori, B. Frei, A. Cherubini, G. Nelles, G. Rordorf, J. F. Keaney Jr., L. Schwamm, P. Mecocci, W.J. Koroshetz, M.F. Beal, Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke, *Free Radic. Biol. Med.* 25(4-5) (1998) 561-567.
- [47] S. Bekri, O. Lidove, R. Jaussaud, B. Knebelmann, F. Barbey, The role of ceramide trihexoside (globotriaosylceramide) in the diagnosis and follow-up of the efficacy of treatment of Fabry disease: A review of the literature, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, 4(4) (2006) 289-297.
- [48] J.M. Aerts, J.F. Groener, S. Kuiper, W.E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Ottenhoff, C. Van Roomen, M. Mirzaian, F.A. Wijburg, G.E. Linthorst, A.C. Vedder, S.M. Rombach, J. Cox-Brinkman, P. Somerharju, R.G. Boot, C.E. Hollak, R.O. Brady, B.J. Poorthuis, Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease, *PNAS* 105(8) (2008) 2812-2817.
- [49] T. Togawa, T. Kodama, T. Suzuki, K. Sugawara, T. Tsukimura, T. Ohashi, N. Ishige, K. Suzuki, T. Kitagawa, H. Sakuraba, Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease, *Mol. Genet. Metab.* 100(3) (2010) 257-261.
- [50] S.M. Rombach, N. Dekker, M.G. Bouwman, G.E. Linthorst, A.H. Zwinderman, F.A. Wijburg, S. Kuiper, M.A. vd Bergh Weerman, J.E.M. Groener, B.J. Poorthuis, C.E.M.

Hollak, J.M.F.G. Aerts, Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1802(9) (2010) 741-748.

[51] S.M. Rombach, B.E. Smid, G.E. Linthorst, M.G.W. Dijkgraaf, C.E.M. Hollak, Natural course of Fabry disease and the effectiveness of enzyme replacement therapy: A systematic review and meta-analysis: Effectiveness of ERT in different disease stages, *J.Inherit. Metab. Dis.* 37(3) (2014) 341-352.

Figure Captions

Fig.1. Lipid peroxidation plasma parameters [TBARS (A) and MDA (B)] in controls (n=5-8) and Fabry patients before (n=4-12) and during ERT (n=11-12). Data represent median, minimum and maximum values. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test).

Fig.2. Total thiol content in plasma of controls (n=10) and Fabry patients before (n=11) and during ERT (n=10). Data represent median, minimum and maximum values. Groups were statistically equal (one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test).

Fig.3. Nitric oxide urine equivalents in controls (n=12) and Fabry patients before (n=21) and during ERT (n=19). Data represent median, minimum and maximum values. * $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test).

Fig.4. Pathophysiological mechanism proposed for Fabry patients before ERT. Low/absent activity α -GAL A lead to high Gb3 accumulation, which is probably inducing oxidative stress (including lipid peroxidation) and inflammation. As an adaptive response to oxidative injury, GCL is probably induced, leading to higher GSH levels that can also be a consequence of lower GPx activity. Nitrosative stress, evaluated by high NO^\cdot levels, inhibits GPx. Low GPx activity may be leading to high levels of H_2O_2 which is a second messenger in endothelial dysfunction and could be playing this role in FD vasculopathy linking the whole pathophysiological process.

Table 1- Glutathione (GSH) metabolism parameters in erythrocytes of Fabry patients and controls.

	Control (n=8-10)	Fabry (n=4-10)	Fabry TRE (n=4-9)
GSH (mmol/L)	4.613 ± 0.826	6.241 ± 0.475 **	5.384 ± 0.779
GPx (U/mg prot)	0.107 ± 0.020	0.075 ± 0.013 *	0.088 ± 0.096
GR (mU/mg prot)	4.945 ± 0.9	5.025 ± 1.0	4.581 ± 1.0

Values correspond to mean ± standard deviation.

* p < 0.05 different from controls and Fabry patients on ERT.

** p < 0.01 different from controls and Fabry patients on ERT.

Table 2 - Urinary Gb3 levels in Fabry patients and controls.

	Control (n=38)	Fabry (n=17)	Fabry TRE (n=22)
Gb3 (µg/mg Cr)	6.43 ± 1.70 ^a	84.62± 106.28 ^b	44.46 ± 39.58 ^c

Values correspond to mean ± standard deviation.

Gb3 significantly different between all groups (p < 0.0001; one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test).

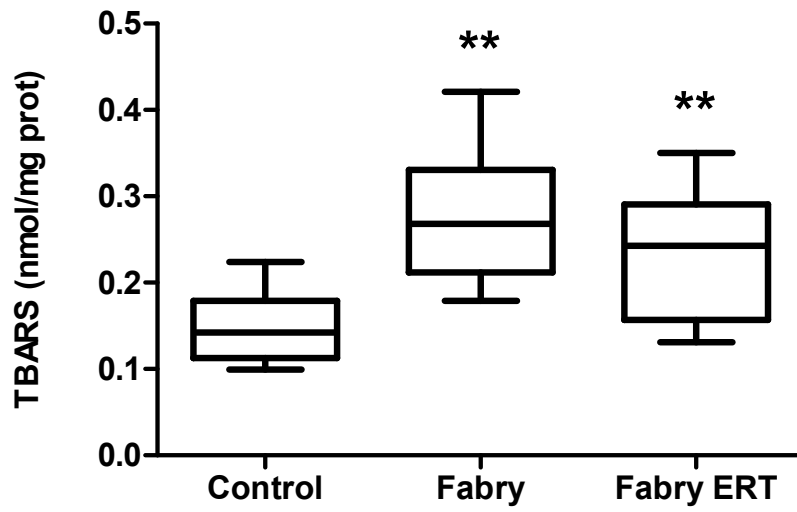
^a different from Fabry and Fabry TRE.

^b different from Control and Fabry TRE.

^c different from Control and Fabry.

Figure 1

A)



B)

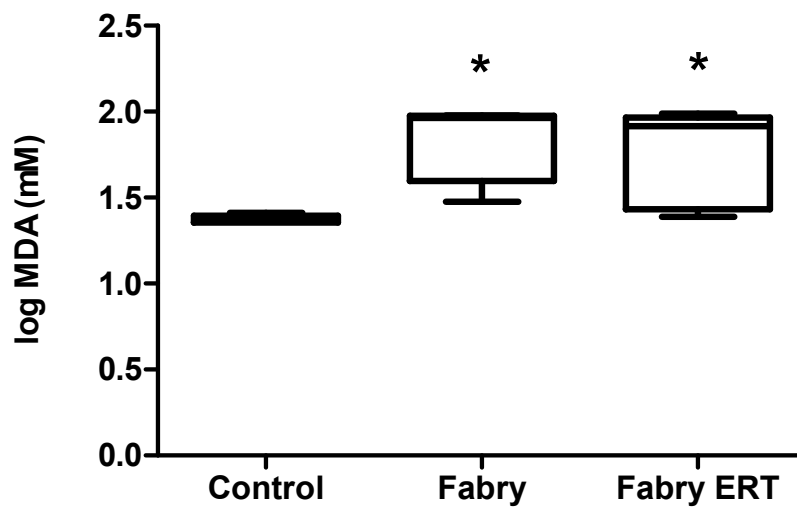


Figure 2

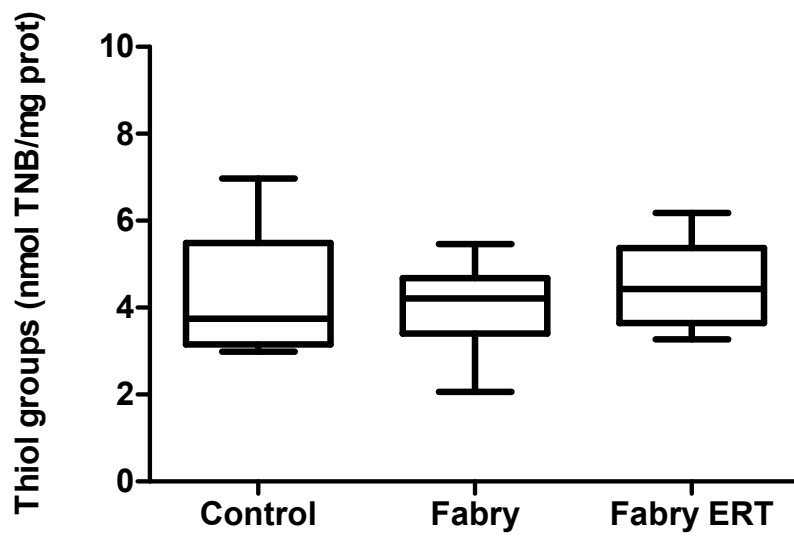


Figure 3

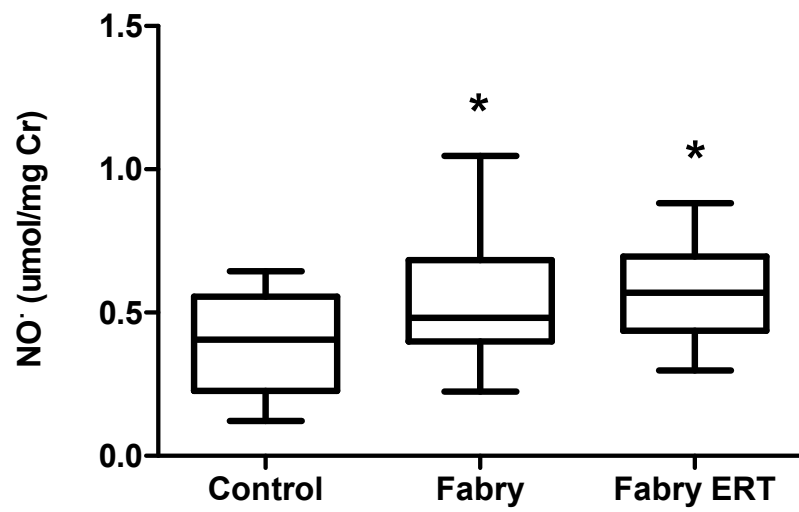
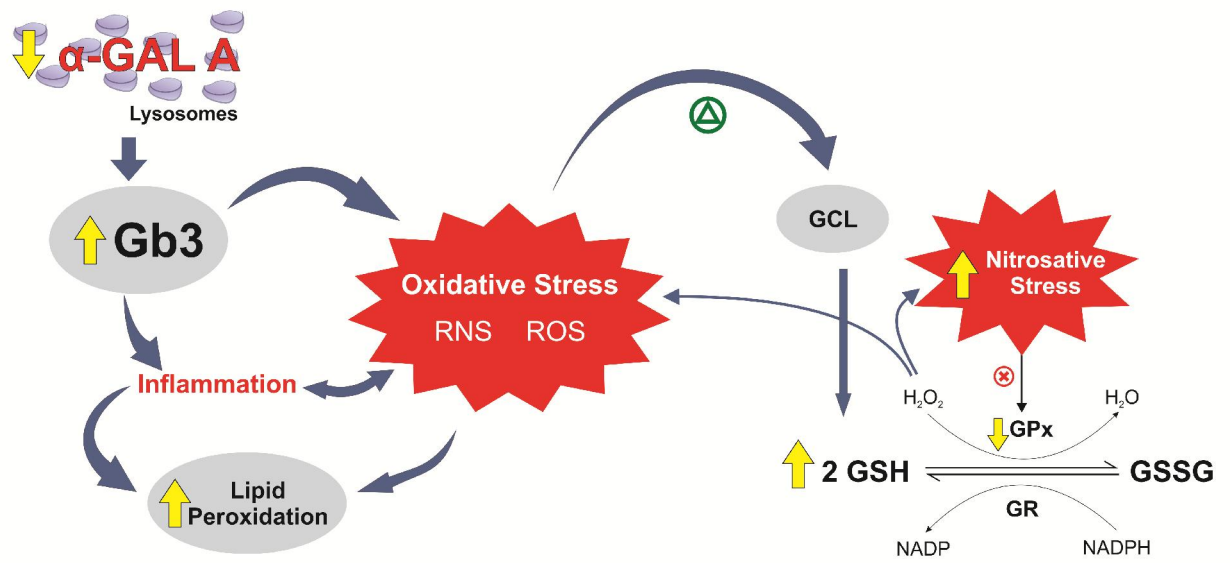


Figure 4



Capítulo III:

Globotriaosylsphingosine cytotoxicity: new insights from oxidative DNA damage

Artigo submetido ao periódico *Mutation Research / Fundamental and Molecular*

Mechanisms of Mutagenesis

(manuscript number MUT-D-16-00036)

Title: Globotriaosylsphingosine cytotoxicity: new insights from oxidative DNA damage

Authors: Giovana Brondani Biancini^{a,b}, Ana Moira Morás^c, Luiza Steffens Reinhardt^c, Franciele Faccio Busatto^c, Nathalia Denise de Moura Sperotto^c, Jenifer Saffi^c, Dinara Jaqueline Moura^c, Roberto Giugliani^{a,b,e}, Carmen Regla Vargas^{a,b,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding authors at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil. Tel.: +55 51 33598011. Fax: +55 51 33598010

E-mail addresses: giovana.bb@gmail.com (G. B. Biancini), crvargas@hcpa.edu.br (C. R. Vargas)

Abstract

Fabry disease (FD) is a lysosomal disorder caused by mutations that lead to a deficient activity α -galactosidase A with progressive and systemic accumulation of its substrates. Although FD is considered a systemic disorder, the vascular-renal complications are major causes of morbidity in Fabry patients. The knowledge of pathophysiological mechanisms involved in tissue damage is primordial to development of additional therapeutic strategies in order to slow disease progression. Evidences show that substrates deposition is directly related to tissue damage in FD, but the underlying molecular mechanisms remain not completely understood. We investigated some effects of the latest described potential biomarker for FD - globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) in cultured human embryonic kidney cells (HEK-293T). In concentrations found in plasma of Fabry patients, lyso-Gb3 presented a significant cytotoxic effect (viability measured by trypan blue exclusion), induced DNA damage in a dose-dependent manner (by alkaline comet assay) and this damage has an oxidative origin in purines and pyrimidines (by comet assay with endonucleases). Also, lyso-Gb3 in all tested concentrations induced the expression of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) (by western blotting), which is involved in detecting and repairing DNA damage, and also induced the activity of the antioxidant enzyme catalase (CAT) but not superoxide dismutase (SOD). Mitochondrial potential (by MitoStatus[®]) was not altered by lyso-Gb3. Considering all data obtained in this study, we suggest that these *in vitro* effects of lyso-Gb3 (citotoxicity and oxidative DNA damage) may be occurring mediated by a peroxisomal overproduction of hydrogen peroxide. These data provide new information about the biological activity of lyso-Gb3 and could be useful to studies looking for new therapeutic strategies to FD.

Keywords

Fabry disease; Globotriaosylsphingosine; DNA damage; Oxidative stress; Kidney

Abbreviations

α -gal A, α -galactosidase A; CAT, catalase; ERT, enzyme replacement therapy; FD, Fabry disease; Gb3, globotriaosylceramide; H₂O₂, hydrogen peroxide; Lyso-Gb3, globotriaosylsphingosine; PARP-1, poly(ADP-ribose) polymerase 1; ROS, Reactive oxygen species; SB, strand breaks; SOD, superoxide dismutase;

Highlights

Globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) effects were investigated in human renal cells

Lyso-Gb3 tested concentrations were the usually found in plasma of Fabry patients

Cytotoxic effects and DNA damage (including oxidative) were found

Parameters of antioxidant activity and DNA repair mechanism were induced

The effects may be mediated by peroxisomal overproduction of hydrogen peroxide

1. Introduction

Fabry disease (FD, OMIM 301500) is an X-linked genetic disorder caused by deficient/absent activity of the lysosomal enzyme α -galactosidase A (EC3.2.1.22). Consequently, enzyme substrates - glycosphingolipids (as globotriaosylceramide – Gb3) – progressively accumulate in lysosomes of various cell types and body fluids [1]. Fabry patients present as main pathological features vascular complications [2] and [3], including chronic kidney disease [1] and [4] and increased risk of ischemic stroke [5]. The main organs affected by glycosphingolipids endothelial deposition - kidney, heart and central nervous system – present as major findings ischemia and fibrosis [1] and [6]. Although it is known that tissue injury is directly related to substrates deposition [1] and [6], the molecular mechanisms by which it occurs are not completely understood. Noteworthy, oxidative damage was demonstrated to be correlated to Gb3 levels [7] and [8].

Therapy for FD consisted in symptomatic management until 2001, when enzyme replacement therapy (ERT) became available for Fabry patients. Although ERT seems to slow the natural course of FD, it apparently does not completely prevent organ damage, stroke events and renal failure [9]. Studies have been done in order to find a reliable biomarker to monitor and even diagnose FD. In recent years, globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3), the deacylated form of Gb3 has gained much attention as a possible biomarker of FD [10] and [11]. Lyso-Gb3 is a cationic amphiphilic molecule with a large polar sugar moiety (relatively hydrophilic and water soluble) found in plasma of Fabry patients in an amount of more than an order of magnitude higher than Gb3 and can also be easily measured in urine samples [10]. Based on investigations in European Fabry Cohort, a lyso-Gb3 cutoff value was proposed to stratify subjects at risk (classical mutations) [12], indicating that this accumulated metabolite could be used to diagnose and monitor FD patients.

Before lyso-Gb3 has been investigated in Fabry patients, studies had suggested that other molecules than Gb3 may have biological activity in FD [13]. Possibly, lyso-Gb3 is one of them, since *in vitro* studies have shown its effects promoting proliferation in podocytes [14] and vascular smooth muscle cells [10] and [13] and even increasing Gb3 levels in fibroblasts [10].

Considering that studies have pointed oxidative stress as an important factor on FD pathophysiology [7] and [8] and [15] and [16] and lyso-Gb3 as an active metabolite [10] and [14], the aim of this study was to investigate the *in vitro* effects of lyso-Gb3 (at concentrations found in plasma of Fabry patients) on cultured human embryonic kidney cells (HEK293T) concerning to cytotoxicity, DNA damage (including oxidative DNA damage),

mitochondrial depolarization, antioxidant enzymes activity and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) expression.

2. Material and Methods

Chemicals and Materials

Lyso-Gb3 was obtained from Matreya (Pleasant Gap, PA). Culture materials and trypan blue stain were acquired from Gibco. 2',7'-Dichlorofluorescein (35845), catalase from bovine liver (C1345), epinephrine (E4250), mitoxantronedihydro-chloride and methyl methanesulfonate were acquired from Sigma Aldrich. Formamidopyrimidine (FPG) and Endonuclease III (Endo III) were purchased from BioLabs Inc.(New England). Hydrogen peroxide 30% was purchased from Merck (Darmstadt, German). PARP-1 (SC1561) and Actin (SC-8432) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology.

Lyso-Gb3 solution

Lyso-Gb3 was prepared as described previously for Gb3 [8] and [17]. An aliquot of lyso-Gb3 was dissolved in chloroform: methanol (2:1, v/v), air-dried with heating (50°C) and resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO). Then, lyso-Gb3 was heated at 90°C for 10 min with occasional vortexing and stored at -20°C. Before use, an aliquot of lyso-Gb3 was added to same amount of bovine serum albumin (1mg/mL dissolved in phosphate buffered saline - PBS) and sonicated for 5 minutes.

Cell culture and treatments

Human embryonic kidney cells (HEK-293T) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) bank. Cell lines were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained in an incubator with humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂.

For all treatments, the lyso-Gb3/albumin solution was diluted in DMEM supplemented with 10% FBS. Cell viability, comet assay, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activity and mitochondrial membrane potential (MitoStatus[®]) assays were performed with 1x10⁵ cells in 12 wells plate. For protein extract preparation, 5x10⁶ cells were plated in petri dish. When reached 80–90% confluency, cells were treated for 3 (for protein expression) or 24 h (for all other experiments) with different concentrations of lyso-Gb3 (10, 50 and 100 nM) similar to those found in plasma of Fabry patients [10] and [11] and [18] and [19] and [20] and [21]. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in DMEM 10% FBS.

Cell viability assay

Cell viability was measured by trypan blue exclusion, as previously described by Uliasz and Hewett [22]. After being treated, cells were stained with 10 μ L of 0.4% trypan blue (1:1). The assay is based in live cells capacity to expel the trypan blue dye. Viable cells were counted using Countess® Automated Cell Counter and viability was calculated as percentage of negative control.

Comet assay

The comet assay for evaluation of genotoxicity was performed as described by Tice and Strauss [23] and Speit and Hartmann [24]. An aliquot of cell suspension (20 μ l) was dissolved in 0.75% low-melting point agarose and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Methyl methane sulphonate (MMS) was used as positive control. Slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0). After lysis for 24 h at 4°C, slides were washed three times in enzyme buffer (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 mM Na₂EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), and incubated with FPG (30 min at 37°C) , EndoIII (45 min at 37°C). Slides were incubated with electrophoresis solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13.0) for 20 min to unwind the DNA. Electrophoresis was conducted at 4°C for 20 min at 0.94 V/cm. The slides were then neutralized with Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and stained with silver. For the DNA damage evaluation, 100 cells per slide were analyzed by optical microscopy [25]. Cells were visually scored by measuring the DNA migration length and the amount of DNA in the tail into five classes, from undamaged (0) to maximally damaged (4). Damage index (DI) value was calculated for each sample and ranges from 0 (no tail: 100 cells x 0) to 400 (with maximum migration: 100 cells x 4).

Protein extract

After treatments, HEK-293T cells were harvested and resuspended in RIPA buffer buffer (NaCl 600mM, triton X-100 10%, protease inhibitor, sodium dodecyl sulfate, tris 500mM, PMSF). After 30 min in ice cold, cells were subjected to 6 cycles of 30 seconds in ice cold and vortex mixer. The disrupted cells were centrifuged for 10 min at 16000 rpm to separate the cell debris (pellet) from cell extracts (supernatant). Protein concentration was determined by Lowry method [26] with minor modifications and expressed in mg/mL.

Protein expression by western blot analysis

For protein expression analysis, 25 µg of proteins were first separated by SDS-PAGE gel (10%) and blotted to a nitrocellulose membrane, using a semi-dry transference model (Bio-Rad). After transferred, membranes were blocked for 2 hours at room temperature (BSA 5% and Tween 20 0.05%) and then incubated overnight at 4°C with monoclonal primary antibodies against poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) (1:500) and β-actin (1:500; loading control). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:3000) were used to visualize proteins using ECL western blotting substrate system and detected with Carestream® Kodak® BioMax® light film (Sigma-Aldrich).

Determination of SOD and CAT activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of superoxide dependent autoxidation of adrenaline, according to the method described by Misra and Fridovich [27]. Firstly, sample aliquots of protein extract were added in 50 mM glycine buffer pH 10.2 and 10 mM catalase. Then 10 µL 60 mM adrenaline was added and absorbance was immediately read each 36 seconds for 15 minutes at 32°C and 480 nm with SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Results were calculated considering one unit of SOD the amount required to inhibit 50% of adrenaline autoxidation. SOD activity was expresses as U/mg protein.

Catalase (CAT) activity was assessed through H₂O₂ disappearance at 240 nm, according to the method described by Aebi [28]. Briefly, 50 mM phosphate buffer pH 7.0 was added to protein extract aliquot. Subsequently, 25 mM H₂O₂ was added and the absorbance immediately read each 36 seconds for 5 minutes at 240 nm in SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Based in the definition that one CAT unit correspond to one µmol of H₂O₂ consumed per minute, CAT activity was expressed as U/mg protein.

For both assays, H₂O₂ was used as positive control.

Mitochondrial membrane potential assay

Mitochondrial membrane potential assay was executed conform manufacturer's recommendations with minor modifications. MitoStatus® TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester) is a cationic and lipophilic fluorescent dye that is readily sequestered by active mitochondria. When mitochondria membrane is depolarized, the fluorescence shows diminished levels. An aliquot of suspension cell was incubated with MitoStatus® TMRE (57 nM) for 30 min at 37°C, protected from light. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as

positive control. Then, samples were analyzed in FACs Calibur Cytometer. The Cell Quest software was used to calculate the median fluorescence. The MitoStatus fluorescence was measured using 488 nm excitation and 585/42 nm band pass emission filters. A total of 10,000 events were measured per sample and the percentage of mitochondrial depolarization determined.

Statistical analysis

Each experiment was done in duplicate or triplicate and the mean was used for statistical analysis. Graphs report the mean of the experiments \pm standard error of the mean (S.E.M). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett test. Unpaired Student's *t* test was used for protein expression analysis. Data were considered statistically different when $p < 0.05$. Statistics were performed using Graph Pad Prism® software version 5.

3. Results

3.1 Effect of lyso-Gb3 on HEK-293T viability

As shown in Figure 1, cells growth was significantly decreased when compared to negative control in the presence of 50 and 100 nM lyso-Gb3 ($p < 0.01$).

3.2. Effect of lyso-Gb3 on DNA damage

The effect of lyso-Gb3 on the generation of single-strand, double-strand and alkali-labile breaks in HEK293T cells was analyzed using the alkaline comet assay (Figure 2). Lyso-Gb3 induced significant increases in damage index values when compared with the values obtained for the negative control in all tested concentrations (10, 50 and 100 nM lyso-Gb3), exhibiting a dose-dependent profile ($p < 0.001$).

3.3. Effect of lyso-Gb3 on oxidative DNA damage in purines and pyrimidines

In order to verify a possible oxidative nature to the observed effect of lyso-Gb3 on DNA damage (Figure 2) in HEK293T cells, the modified comet assay was also used. This assay is more specific and includes an incubation step with lesion-specific endonucleases that recognize oxidized purines (FPG) or oxidized pyrimidines (EndoIII). EndoIII and FPG sensitive sites levels were calculated as the score obtained with enzymes minus the score without enzymes after treatment with lyso-Gb3. Results indicate that lyso-Gb3 does induce significant oxidative damage to purines and pyrimidines at all tested concentrations (Table 1, $p < 0.001$).

3.4. PARP expression

Various enzyme systems combat the damage caused by reactive species, among them, poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1). Then, in this work we examined whether lyso-Gb3 could affect PARP-1 expression in HEK293T cells. All lyso-Gb3 concentrations were able to increase in PARP-1 expression after 3h incubation (Figure 3) [$t(5.801) = -4.076$, $p < 0.01$].

3.5. Effect of Lyso-Gb3 on SOD and CAT activities

To investigate lyso-Gb3 effect on antioxidant enzymes, HEK293T cells were exposed to lyso-Gb3 for 24h, and CAT and SOD activities were measured in protein extract aliquots. CAT activity was significantly increased when exposed to 100 nM lyso-Gb3 (Figure 4A, $p <$

0.05) and presented an increase tendency profile in lower doses while no significant changes were observed in SOD activity (Figure 4B) when compared to the negative control.

3.6. Effect of lyso-Gb3 in mitochondrial potential

To examine a possible effect of lyso-Gb3 in mitochondrial function on HEK293T cells, the mitochondrial potential was determined by MitoStatus® cell incorporation after 24h incubation with increasing lyso-Gb3 concentrations. Flow cytometry results showed that lyso-Gb3 had no effect on mitochondrial depolarization (Figure 5).

4. Discussion

FD is a disorder with systemic involvement, mainly affecting the renal and cardiovascular systems [1]. In this sense, in this work we chose a human embryonic kidney cell-line 293T (HEK293T) to evaluate the cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage of the latest described potential biomarker for FD - lyso-Gb3, in order to elucidate the involvement of this metabolite in FD pathophysiology. To reproduce pathological conditions, all experiments were done using lyso-Gb3 in concentrations found in plasma of Fabry patients: 10, 50 and 100 nM [10] and [11] and [18] and [19] and [20] and [21]. To the best of our knowledge, this is the first study focusing on these effects of lyso-Gb3.

The viability assay showed that lyso-Gb3 in concentrations of 50 and 100 nM presented a significant cytotoxic effect, reducing viability to 50 percent. Aerts and colleagues [10] also tested these concentrations in fibroblasts and smooth muscle cells during the same time period than our experiment (24 hour incubation) and found completely different results for these two cell lines: no effect on fibroblasts and proliferation in smooth muscle cells.

In all tested concentrations (10, 50 and 100 nM) and in a dose-dependent manner, lyso-Gb3 induced DNA damage assessed by the alkaline comet assay. This assay detects DNA single (SSB) and double-strand breaks (DSB), as well as alkali-labile sites [24]. DNA damage, if not efficiently repaired, leads to drastic consequences to cell metabolism [29]. A recent study of our group showed that Fabry patients present higher basal levels of DNA damage even with induced repair mechanisms [30].

We performed the modified protocol of alkaline comet assay, using lesion-specific endonucleases to investigate if lyso-Gb3 causes DNA damage by oxidating purines and/or pyrimidines. The results showed that lyso-Gb3, even in the lowest concentration (10 nM), was capable to induce DNA damage by oxidative mechanism in both DNA bases. Our previous study in Fabry patients found higher basal levels of oxidative DNA damage in purines but not pyrimidines [30]. Purines, because of its lower reduction potential, are more easily oxidizable [31] and it could also be seen in our present results. Lyso-Gb3 induced high levels of oxidative lesions in purines even in the lowest concentration (10 nM) while in pyrimidines the effect was less acute. Taken together, these *in vitro* findings suggest that lyso-Gb3 causes DNA damage by an oxidative mechanism. Then, it could be hypothesized that the *in vivo* findings [30] could be also consequence of lyso-Gb3 accumulation. A recent study from Chimenti et al. reinforces this hypothesis, once they found, in cardiomyocytes from biopsy of Fabry patients, glycosphingolipids bodies and increased expression of nuclear 8-OHdG (biomarker of oxidative damage to purines – guanine) correlated with biomarkers of

nitrosative stress. Also, in females, the immunostaining of nitrosative parameters were increased only in affected cardiomyocytes (those with glycosphingolipids deposits) [32], showing a closely relationship that is confirmed by our present findings in embryonic renal cells.

DNA damage is the primer activator of the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), which catalyzes a post-translational modification of histones and proteins - poly(ADP-ribosylation) – that contributes to the survival of proliferating cells [33] and [34]. Historically, PARP-1 is studied because of its action on detecting and repairing DNA damage (base excision repair - BER), although being involved in many cellular processes as a regulator of chromatin structure, transcription, and genomic integrity [33] and [35]. PARP-1 increase reflects an early cellular reaction especially to SSB [36], so in this work we evaluated this protein expression after three hours of lyso-Gb3 treatment. We found enhanced PARP-1 expression after incubation with lyso-Gb3 in all tested concentrations, which reinforces our results of oxidative DNA damage, probably inducing the formation of single SB and activation of BER machinery.

Oxidative damage occurs when antioxidant defenses do not scavenge efficiently the amount of reactive species generated, leading to chain reactions, oxidative damage to biomolecules and even cell death [37]. So, besides verifying the effect of lyso-Gb3 in cell viability and DNA damage, it became essential to investigate its effects on antioxidant defenses. For that, we measured two antioxidant enzymes activities (SOD and CAT) after lyso-Gb3 incubation. It was verified an increase on CAT activity but no effect on SOD. Catalase expression is regulated by a complex mechanism which involves transcription factors binding, genetic, epigenetic, and posttranscriptional processes [38]. Also, oxidative stress activates CAT *via* non-receptor tyrosine kinases (c-Abl and Arg) binding to CAT induced by H₂O₂ [39]. H₂O₂ and lipid peroxides induced CAT expression in cultured vascular cells, suggesting that moderate oxidative stress can induce cellular antioxidant response [40]. Once CAT activity could also be enhanced by its own substrate, H₂O₂, it is possible that the lyso-Gb3 effect we found increasing CAT activity is mediated by oxidative species and/or H₂O₂.

Indeed, H₂O₂ is the product of superoxide anion (O₂⁻) dismutation catalized by SOD, but in this study lyso-Gb3 did not alter SOD activity. However, H₂O₂ is not exclusively produced by that reaction of SOD, but by a range of oxidases as well by peroxisomal pathway of fatty acid β -oxidation [41]. Also, peroxisomes - full of oxidases generating H₂O₂ [42] - are abundant in kidneys and are thought to play important roles in renal diseases, including diabetic nephropathy and renal fibrosis [43] – both of them widely linked to FD pathophysiology [6]

and [44]. Sanchez-Niño and colleagues [14] found that lyso-Gb3 (in the same concentration we studied) increased the expression of diabetic nephropathy mediators in human glomerular podocytes (key cells in proteinuric kidney diseases, including FD [45]).

It is largely known that CAT is mainly located in peroxisomes [42] and is the most abundant antioxidant enzyme in these organelles [46], so the CAT induction by lyso-Gb3 we found allow us to suppose that the H₂O₂ is being overproduced in peroxisomes in response to lyso-Gb3. The higher peroxisome H₂O₂ levels may be giving rise to hydroxyl radicals (OH[•]) excessive formation (through Fenton reaction - process that is well described in these organelles because of its environmental characteristics [46]). Actually, the mechanism by which H₂O₂ causes DNA damage is indirectly, by OH[•] (radical that is extremely harmful to DNA) [47] and then it could explain the effect we found of lyso-Gb3 on DNA damage.

Once we verified that lyso-Gb3 induced damage to DNA by an oxidative mechanism and it is largely known that the major sites of reactive species generation in cells are mitochondria [37] and [48], we measured mitochondrial membrane potential after lyso-Gb3 24 hours incubation. No differences were found after that, so it can be speculated that lyso-Gb3 effects are not directly related to mitochondrial depolarization. This finding is reinforced by no observed changes on SOD activity, because if depolarization occurred, probably mitochondrial SOD activity would have changed and would be reflected in the total SOD activity we measured. Then, it can be supposed that the ROS origin in this study was not mitochondria but probably peroxisomes. Again, this result in renal cells is different from the ones of Lücke et al. [49] in fibroblasts of Fabry patients, that demonstrated impairment of mitochondrial function - assessed by reduced activity of respiratory chain enzymes, and is in agreement with Aerts hypothesis of lyso-Gb3 effects being lineage-dependent [10].

It is important to emphasize that the effects we found occurred even from 10 nM (DNA damage), 50 nM (viability) or only after 100 nM (CAT) lyso-Gb3 exposure. Although there is a wide range of variability in lyso-Gb3 plasma levels of Fabry patients, the proposed mechanism *via* hydrogen peroxide - that was just capable to induce significantly CAT activity in the higher concentration (100 nM lyso-Gb3) - may be occurring in FD, once the mean/median lyso-Gb3 plasma levels in male Fabry patients is around this concentration or even higher. Togawa et al. [11] found 97±60 nM (mean ± standard deviation) lyso-Gb3 in men with FD (134±44 for classic mutations), while Rombach et al. [18] described a wider range (range 51-489 nM) and higher median (286 nM) and Smid et al. [21] found a shorter range (45-150 nM) for classic men. Classic Fabry men before ERT also presented median values of around 200 nM and the range decreased to 50 – 100 nM after the first year of ERT

[19]. Boutin et al. [20] also found mean of 170 nM (range 105-241) in males that decreased to 40 nM (mean; range 1.2-85.6) after ERT. Although in female FD heterozygotes, lyso-Gb3 plasmatic level is around the lower doses we tested: Rombach et al. [18] found median of 18 nM, van Breemen et al. [19] found values around 15 nM, Aerts et al.[10] found ranges between 22-76 nM and Smid et al. [21] between 1.5-41.5 nM. Boutin et al. [20] found mean of 9.7 nM (range 0.5-20.5) in females, decreasing to 7.5 nM (mean; range 1.2-15.3) after ERT.

The present study provides new data about the in vitro effects of lyso-Gb3 in cultured human renal cells and can serve to further studies looking for new therapeutic strategies to FD. Once we used a renal cell lineage and nephropathy is a major cause of morbidity in FD [1] and [6], the results we found are relevant and complement the findings of Aerts (in smooth muscle cells [10]), Sanchez-Niño (in podocytes [14]) and Chimenti (in cardiomyocytes [32]). As previously discussed [14] and [50] and [51], the knowledge of secondary mediators of renal injury in FD nephropathy is necessary to provide additional therapeutic tools to slow progression of renal injury. The findings of our study demonstrated DNA oxidative damage induced by lyso-Gb3, allowing us to suggest that peroxisomal overproduction of H₂O₂ could be leading to OH⁻ high levels and consequent increase in DNA injury that may be related to FD physiopathology.

5. Conflicts of interest disclosure

RG received speaker honoraria, travel grants, educational grants and/or investigator fees from Actelion, Alexion, Amicus, Biomarin, Genzyme, Pfizer, Protalix, Shire and Ultragenyx. GBB, AMM, LS, FFB, NDMS, JS, DJM and CRV declare that they have no conflict of interest.

6. Acknowledgements

This study was supported by Brazilian Foundation *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (FIPE/HCPA).

7. References

- [1] Desnick, R. J., Ioannou, Y. A., Eng, C. M. (2001) α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver, C. R., Sly, W. A., Beaudet, A. L., Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc: New York, 3733–3774.
- [2] Rombach, S. M., Twickler, T. B., Aerts, J. M. F. G., Linthorst, G. E., Wijburg, F. A., Hollak, C. E. M. (2010). Vasculopathy in patients with Fabry disease: Current controversies and research directions. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99(2), 99-108. doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.004
- [3] Moore, D. F., Kaneski, C. R., Askari, H., Schiffmann, R. (2007). The cerebral vasculopathy of Fabry disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 257(1-2), 258-263. doi:10.1016/j.jns.2007.01.053
- [4] Brady, R. O., Schiffmann, R. (2000). Clinical features of and recent advances in therapy for Fabry disease. *Journal of the American Medical Association*, 284(21), 2771-2775.
- [5] Rolfs, A., Böttcher, T., Zschesche, M., Morris, P., Winchester, B., Bauer, P., Walter, U., Mix, E., Löhr, M., Harzer, K., Strauss, U., Pahnke, J., Grossmann, A., Benecke, R. (2005). Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: A prospective study. *Lancet*, 366(9499), 1794-1796. doi:10.1016/S0140-6736(05)67635-0
- [6] Weidemann, F., Sanchez-Niño, M. D., Politei, J., Oliveira, J., Wanner, C., Warnock, D. G., Ortiz, A. (2013). Fibrosis: A key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1). doi:10.1186/1750-1172-8-116
- [7] Biancini G.B., Vanzin C.S., Rodrigues D.B., Deon, M., Ribas, G.S., Barschak, A.G., Manfredini, V., Netto, C.B.O, Jardim, L.B., Giugliani, R., Vargas, C.R. (2012) Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta* 1822:226-232. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.11.001
- [8] Shen J, Meng X, Moore D. F, Quirk, J. M., Shayman, J. A., Schiffmann, R., Kaneski, C. R. (2008) Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab*, 95, 163-168. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.06.016

- [9] Rombach, S.M., Smid, B.E., Linthorst, G.E., Dijkgraaf, M.G.W., Hollak, C.E.M. (2014). Natural course of Fabry disease and the effectiveness of enzyme replacement therapy: A systematic review and meta-analysis: Effectiveness of ERT in different disease stages. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(3), 341-352. doi: 10.1007/s10545-014-9677-8
- [10] Aerts, J. M., Groener, J. E., Kuiper, S., Donker-Koopman, W. E., Strijland, A., Ottenhoff, R., Van Roomen, C., Mirzaian, M., Wijburg, F.A., Linthorst, G.E., Vedder, A.C., Rombach, S.M., Cox-Brinkman, J., Somerharju, P., Boot, R.G., Hollak, C.E., Brady, R.O., Poorthuis, B. J. (2008). Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2812-2817. doi: 10.1073/pnas.0712309105
- [11] Togawa, T., Kodama, T., Suzuki, T., Sugawara, K., Tsukimura, T., Ohashi, T., Ishige, N., Suzuki, K., Kitagawa, T., Sakuraba, H. (2010). Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(3), 257-261. doi:10.1016/j.ymgme.2010.03.020
- [12] Niemann, M., Rolfs, A., Störk, S., Bijmens, B., Breunig, F., Beer, M., Ertl, G., Wanner, C., Weidemann, F. (2014). Gene mutations versus clinically relevant phenotypes lyso-gb3 defines Fabry disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(1), 8-16. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000249
- [13] Barbey, F., Brakch, N., Linhart, A., Rosenblatt-Velin, N., Jeanrenaud, X., Qanadli, S., Steinmann, B., Burnier, M., Palecek, T., Bultas, J., Hayoz, D. (2006). Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: Evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), 839-844. doi:10.1161/01.ATV.0000209649.60409.38
- [14] Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B., Carrasco, S., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Valdivielso, J. M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A. (2011). Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: Implications for Fabry nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(6), 1797-1802. doi: 10.1093/ndt/gfq306
- [15] Moore, D. F., Ye, F., Brennan, M., Gupta, S., Barshop, B. A., Steiner, R. D., Rhead, W. J., Brady, R. O., Hazen, S. L., Schiffmann, R. (2004). Ascorbate decreases Fabry cerebral

hyperperfusion suggesting a reactive oxygen species abnormality: An arterial spin tagging study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 20(4), 674-683. doi:10.1002/jmri.20162

[16] Vitner, E. B., Platt, F. M., Futerman, A.H. (2010) Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases, *J. Biol. Chem.*, 285, 20423–20427. doi:10.1074/jbc.R110.134452

[17] Namdar, M., Gebhard, C., Studiger, R., Shi, Y., Mocharla, P., Schmied, C., Brugada, P., Lüscher, T. F., Camici, G. G.(2012) Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease. *PLoS One*,7(4): e36373. doi: 10.1371/journal.pone.0036373.

[18] Rombach, S. M., Dekker, N., Bouwman, M. G., Linthorst, G. E., Zwinderman, A. H., Wijburg, F. A., Kuiper, S., vd Bergh Weerman, M. A., Groener, J. E. M., Poorthuis, B. J., Hollak, C. E. M., Aerts, J. M. F. G. (2010). Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(9), 741-748. doi:10.1016/j.bbadis.2010.05.003

[19] van Breemen, M. J., Rombach, S. M., Dekker, N., Poorthuis, B. J., Linthorst, G. E., Zwinderman, A. H., Breunig, F., Wanner, C., Aerts, J. M., Hollak, C. E. (2011). Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in patients with classic Fabry disease following enzyme replacement therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(1), 70-76. doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.007

[20] Boutin, M., Gagnon, R., Lavoie, P., Auray-Blais, C. (2012). LC-MS/MS analysis of plasma lyso-gb 3 in Fabry disease. *Clinica Chimica Acta*, 414, 273-280. doi:10.1016/j.cca.2012.09.026

[21] Smid, B. E., Van der Tol, L., Biegstraaten, M., Linthorst, G. E., Hollak, C. E. M., Poorthuis, B. J. H. M. (2015). Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease. *Journal of Medical Genetics*, 52(4), 262-268. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102872

[22] Uliasz, T. F., Hewett, S. J. (2000) A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of excitotoxic neuronal injury in cell culture. *J.Neurosci. Meth.*, 100, 157–163

- [23] Tice, R. R., Strauss, G. H. (1995) The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*, 13, 207–214.
- [24] Speit, G., Hartmann, A. (1999) The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods MolBiol*, 113, 203–212.
- [25] Hartmann, A., Speit, G. (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*, 90, 183–188.
- [26] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193(1), 265-75
- [27] Misra, H.P, Fridovich I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.*, 247(10), 3170-3175.
- [28] Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *MethodsEnzymol.*, 105, 121-126.
- [29] Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*, 327(1-2), 26-47.
- [30] Biancini, G. B., Moura, D. J. , Manini, P.R., Faverzani, J. L., Netto, C. B. O., Deon, M., Giugliani, R., Saffi, J., Vargas, C. R. (2015) DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair, *Mutat. Res.*, 784-785, 31-36. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.04.012
- [31] Steenken, S., Jovanovic, S.V. (1997) How easily oxidizable is DNA? one-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 119:617-618. doi: 10.1021/ja962255b
- [32] Chimenti, C., Scopelliti, F., Vulpis, E., Tafani, M., Villanova, L., Verardo, R., De Paulis, R., Russo, M. A., Frustaci, A. (2015). Increased oxidative stress contributes to cardiomyocyte dysfunction and death in patients with Fabry disease cardiomyopathy. *Human Pathology*, 46(11), 1760-1768. doi: 10.1016/j.humpath.2015.07.017

- [33] Krishnakumar, R., Kraus, W. L. (2010). The PARP side of the nucleus: Molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular Cell*, 39(1), 8-24. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.017
- [34] Huber, A., Bai, P., Murcia, J. M. D., Murcia, G. D. (2004). PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: Functional synergy in mouse development. *DNA Repair*, 3(8-9), 1103-1108. doi:10.1016/j.dnarep.2004.06.002
- [35] Bai, P., Cantó, C. (2012). The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metabolism*, 16(3), 290-295. doi:10.1016/j.cmet.2012.06.016
- [36] Cantó, C., Sauve, A. A., Bai, P. (2013). Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. *Mol. Aspects Med.* 34, 1-62. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.004
- [37] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed, Oxford University Press: New York.
- [38] Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J. M., Verrax, J., Calderon, P. B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 84-97. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017
- [39] Cao, C., Leng, Y., Kufe, D. (2003). Catalase activity is regulated by c-abl and arg in the oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29667-29675. doi:10.1074/jbc.M301292200
- [40] Meilhac, O., Zhou, M., Santanara, N., Parthasarathy, S. (2000). Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *Journal of Lipid Research*, 41(8), 1205-1213.
- [41] Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486(1), 10-13. doi:10.1016/S0014-5793(00)02197-9
- [42] Schrader, M., Yoon, Y. (2007). Mitochondria and peroxisomes: Are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *BioEssays*, 29(11), 1105-1114. doi:10.1002/bies.20659
- [43] Lee, S., Kim, S. I., Choi, M. E. (2015). Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. *Translational Research*, 165(4), 512-530. doi:10.1016/j.trsl.2014.07.010

- [44] Schiffmann, R., Waldek, S., Benigni, A., Auray-Blais, C. (2010). Biomarkers of Fabry disease nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(2), 360-364. doi: 10.2215/CJN.06090809
- [45] Moreno, J. A., Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B., Lassila, M., Holthofer, H., Blanco-Colio, L. M., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A. (2008). A slit in podocyte death. *Current Medicinal Chemistry*, 15(16), 1645-1654. doi:10.2174/092986708784911542
- [46] Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1363-1373. doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.001
- [47] Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E. (1991) Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch Biochem Biophys* 317-324.
- [48] Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 552, 335–344.
- [49] Lücke, T., Höppner, W., Schmidt, E., Illsinger, S., Das, A. M. (2004). Fabry disease: Reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism*, 82(1), 93-97. doi:10.1016/j.ymgme.2004.01.011
- [50] Torra, R. (2008). Renal manifestations in Fabry disease and therapeutic options. *Kidney International.Supplement*, (111), S29-32. doi: 10.1038/ki.2008.522.
- [51] Ortiz, A., Oliveira, J. P., Wanner, C., Brenner, B. M., Waldek, S., Warnock, D. G. (2008). Recommendations and guidelines for the diagnosis and treatment of Fabry nephropathy in adults. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 4(6), 327-336. doi:10.1038/ncpneph08

Figure captions

Figure 1. Cytotoxic effects of lyso-Gb3 in HEK293T cells after 24 h exposure by trypan blue exclusion assay. Data represent mean percentage in treated cells compared to negative control (NC) \pm S.E.M. of three independent experiments. ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test) compared to NC.

Figure 2. Effect of lyso-Gb3 on DNA damage in HEK293T cells after 24 h incubation determined by comet assay. Bars represent mean \pm S.E.M of three independent experiments. *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test) compared to negative control (NC) treatment. MMS was used as a positive control (PC).

Figure 3. Lyso-Gb3 effect on PARP-1 expression in HEK293T cells by western blotting. Cells were treated with increasing concentration of lyso-Gb3 for 3 h before the experiment. β -Actin was used as a loading control. Representative western blot (A) and quantification (B) expressed as the ratio between PARP-1 and β -Actin expression (background corrected values). Bars represent mean \pm S.E.M of two independent experiments. ** $p < 0.01$ (Student's *t* test for unpaired samples) compared to negative control (NC) treatment.

Figure 4. Antioxidant enzymes CAT (A) and SOD (B) activities in HEK293T cells 24h exposed to lyso-Gb3. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was used as positive control (PC). Bars represent mean \pm S.E.M. of three independent experiments. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test) compared to negative control (NC) treatment.

Figure 5. Lyso-Gb3 effect on HEK293T cells mitochondrial depolarization after 24 h incubation. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was used as positive control (PC). Bars represent mean \pm S.E.M. of three independent experiments. * $p < 0.05$; (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test) compared to negative control (NC) treatment.

Table 1. Oxidative DNA damage in purines and pyrimidines measured in HEK293T cells 24h exposed to lyso-Gb3.

Treatment	FPG (purines)		Endo III (pyrimidines)	
	DI	± S.E.M	DI	± S.E.M.
NC	7,33	1,33	3,00	1,53
Lyso- Gb3 10 nM	172,33***	10,49	49,00***	11,53
Lyso- Gb3 50 nM	182,33***	13,12	133,33***	2,19
Lyso- Gb3 100 nM	192,67***	7,67	160,33***	13,96
MMS 80 µM (PC)	84,33***	3,38	11,00	6,11

EndoIII and FPG sensitive sites levels were calculated as the score obtained with enzymes minus the score without enzymes after treatment with lyso-Gb3 or MMS.

Mean and S.E.M. values determined from an average of 100 cells per replicate, with three replicates per concentration.

*** p < 0.001 (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test) compared to NC treatment

DI= damage index; NC=negative control; PC= positive control

Figure 1

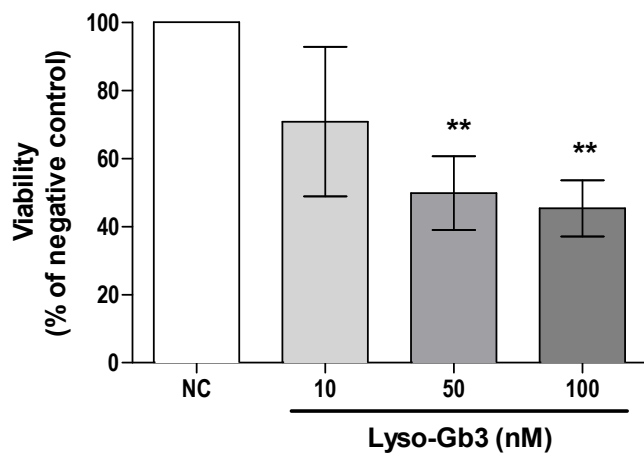


Figure 2

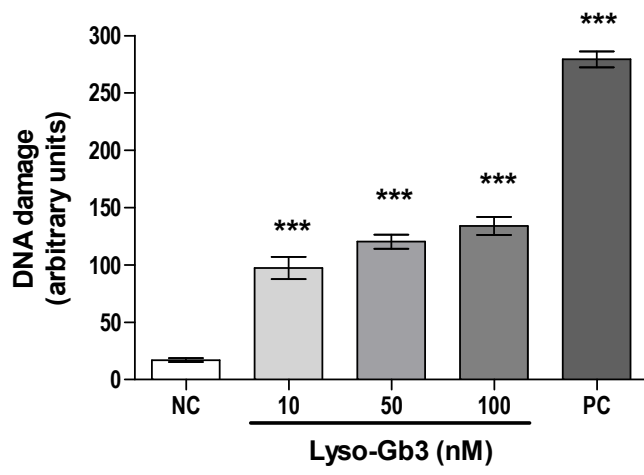


Figure 3

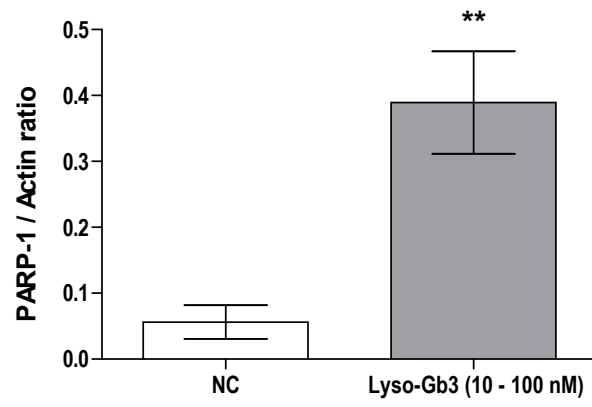
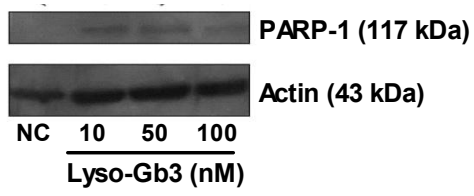
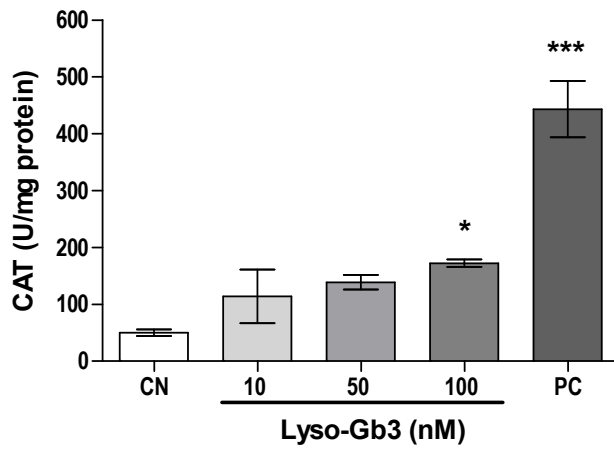


Figure 4

A)



B)

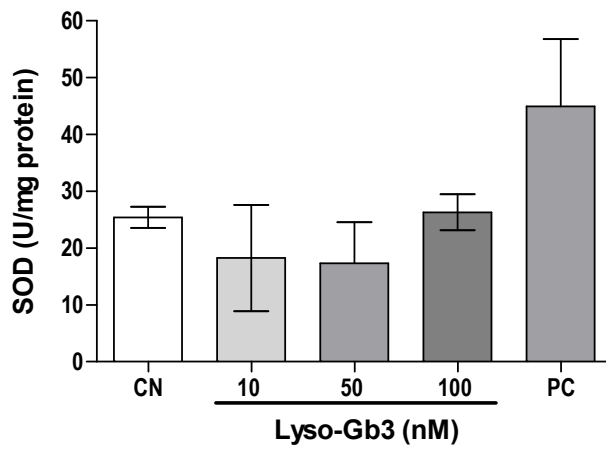
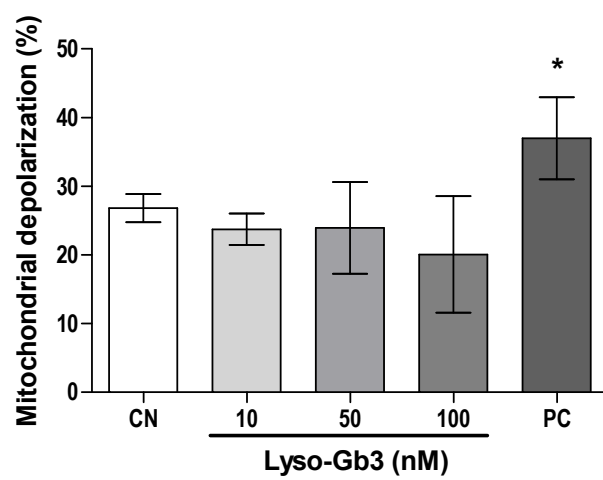


Figure 5



Capítulo IV:
Resultados complementares: liso-Gb3 em pacientes
com doença de Fabry

Resultados de liso-Gb3 em pacientes com DF no momento do diagnóstico e durante a TRE

Seis pacientes investigados no capítulo II possuíam dosagem de liso-Gb3 (em sangue total impregnado em papel filtro), realizada no exterior, no mesmo ano das análises realizadas nesta tese. Uma vez que no capítulo III investigamos efeitos biológicos desse metabólito, apresentamos abaixo as dosagens, na forma de dados complementares.

Tabela 1. Liso-Gb3 em sangue impregnado em papel filtro em pacientes com DF

Momento da coleta da amostra biológica	Sexo	Liso-Gb3 (nM)	Média de liso-Gb3(nM) do grupo
Diagnóstico	M	46,2	
Diagnóstico	F	9,9	22,9
Diagnóstico	F	12,5	
TRE	M	14,3	
TRE	F	5,1	13,2
TRE	F	20,4	

Valor de referência: inferior a 2,3 nM

M = masculino

F = feminino

Observa-se que todos os pacientes possuíam liso-Gb3 acima dos valores de referência, antes ou durante a TRE . Nesses mesmos pacientes, observamos uma forte correlação positiva entre o Gb3 urinário e o liso-Gb3 em sangue total (coeficiente de Pearson $p = 0,933$; $p < 0,01$) (Figura 1).

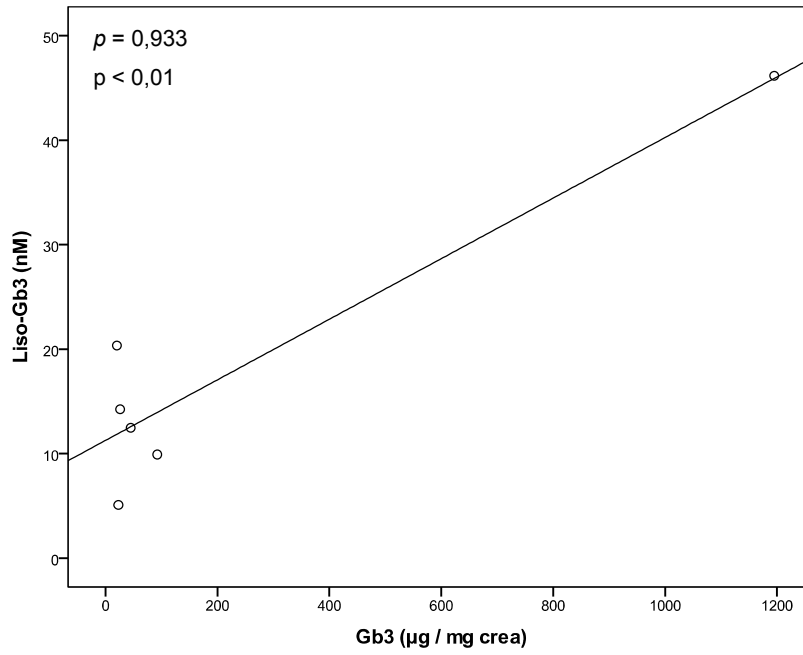


Figura 1. Correlação entre liso-Gb3 (sangue total em papel filtro) e Gb3 (urina) de pacientes com DF.

III. 1. DISCUSSÃO

O presente estudo foi idealizado a partir dos resultados de um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa em pacientes com DF durante o tratamento com TRE, no qual verificamos que os pacientes apresentavam alterações pró-inflamatórias e pró-oxidantes importantes (dano a lipídeos, proteínas e diminuição de defesas antioxidantes) e tais alterações foram positivamente correlacionadas com os níveis urinários de Gb3 (Biancini *et al.*, 2012). A partir desses resultados em pacientes em tratamento, surgiu o questionamento de como seria o *status* redox bem como o dano oxidativo a lipídeos e proteínas dos pacientes antes de iniciarem a TRE (o que investigamos no capítulo II) e se os níveis urinários de Gb3 dos mesmos pacientes eram mais altos antes de iniciar este tratamento preconizado. Além disso, visto que as espécies reativas são potencialmente danosas aos mais variados tipos de biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 2007) e que ainda não havia sido publicada nenhuma investigação de dano ao DNA em pacientes com DF, realizamos o uma investigação aprofundada acerca do dano ao DNA nesses pacientes (capítulo I).

Nos últimos anos, têm sido de grande interesse dos estudiosos de DF compreender a fisiopatologia da doença no que tange à ação de seus biomarcadores (Shen *et al.*, 2008; Aerts *et al.*, 2008). Cientes da necessidade de novas investigações acerca do mais recente biomarcador proposto para DF, o liso-Gb3, realizamos um estudo *in vitro* para avaliar o seu efeito em células de epitélio renal humano (capítulo III) abordando, entre outros aspectos, o dano ao DNA.

Quando não reparado de maneira eficiente, o dano ao DNA tem consequências deletérias para o metabolismo celular. Dependendo dos genes afetados pelo dano, podem se desenvolver tumores, as funções celulares essenciais podem ser comprometidas e a célula pode até mesmo entrar em processo de morte celular programada (Jackson e Bartek, 2009; Dizdaroglu, 2012). Já foi identificado dano ao DNA em diversas doenças neoplásicas,

crônicas e inflamatórias, em especial no diabetes (Collins *et al.*, 2014). Uma vez que a nefropatia diabética é bastante similar à nefropatia da DF (Weidemann *et al.*, 2013), o fato de já estar descrito dano ao DNA em diabetes pode ser interpretado como um indício de que o mesmo poderia ocorrer na DF.

Uma metodologia amplamente utilizada para avaliação do dano ao DNA é o ensaio cometa alcalino, através do qual os sítios álcali-lábeis, abásicos e lesões oxidativas geram quebras de fita simples na estrutura do DNA. Quando submetidos à eletroforese, os fragmentos resultantes dessas quebras migram em direção ao ânodo e o nucleóide fica com aspecto de cometa. O cometa alcalino, todavia, apenas detecta essas lesões e não é suficiente para afirmar a sua natureza (oxidativa ou não). Acrescentando-se um passo de digestão com endonucleases - que reconhecem purinas (formamidopirimidina-DNA-glicosilase – FPG; também conhecida como 8-oxoguanina-DNA-glicosilase) e pirimidinas (endonuclease III - Endo III; também conhecida como Nth) oxidadas - imediatamente antes da eletroforese no cometa alcalino, é possível determinar se há dano oxidativo a essas bases (Collins, 2014; Collins *et al.*, 2014).

No capítulo I, realizamos o ensaio cometa alcalino, através do qual verificamos que os pacientes com DF apresentavam dano ao DNA aumentado, sem esclarecer, a partir desse ensaio, o tipo de dano. As quebras de fita observadas no ensaio simples podem ocorrer por diversas fontes: dano direto ao DNA, intermediários de reparo incompleto, sítios álcali-lábeis e apoptose (Cemeli, Baumgartner e Anderson, 2009). Assim, também utilizamos a incubação com FPG e EndoIII para verificar dano oxidativo às bases do DNA. Como não houve diferença estatística entre os pacientes no momento do diagnóstico e durante a TRE quanto ao dano ao DNA basal, neste capítulo os pacientes foram analisados em conjunto, em um único grupo. O ensaio foi realizado em leucócitos de sangue total fresco de pacientes. Mesmo não sendo células somáticas típicas, o fato de serem circulantes os confere um estado metabólico

(inclusive o estado de seu DNA) que reflete o ambiente do corpo com um todo ao qual foram expostos (Gaivão *et al.*, 2009).

Através do ensaio com as endonucleases, observamos que os pacientes com DF apresentavam dano oxidativo somente em purinas (não em pirimidinas). O dano oxidativo a purinas é o tipo de dano oxidativo mais investigado, através de métodos que quantificam a 8-OHdG. Todavia, a 8-OHdG quantifica apenas um subproduto da oxidação de apenas uma purina (guanina), sendo esse um subproduto provavelmente minoritário, e as técnicas cromatográficas demonstram a formação de artefatos (Cemeli, Baumgartner e Anderson, 2009; Gedik e Collins, 2005). Diferentemente, o ensaio com FPG mede o dano a ambas as purinas (guanina e adenina) e com a EndoIII às pirimidinas (citosina e timina), uma vez que as endonucleases reconhecem as bases oxidadas e fazem a sua excisão, gerando quebras de fita que são diretamente proporcionais ao tamanho da cauda do cometa formado após a eletroforese (Dusinska e Collins, 2008).

Ainda não existe um padrão-ouro para a investigação de dano oxidativo ao DNA, porém a inclusão de um passo de digestão com endonucleases no ensaio cometa é considerado o método mais conveniente e confiável (Collins, 2005; Cemeli, Baumgartner e Anderson, 2009). O resultado encontrado apenas em purinas é explicado pelo fato de tais bases, por possuírem um potencial de redução menor, são mais facilmente oxidadas que pirimidinas (Steenken e Jovanovic, 1997).

Os mecanismos de reparo de dano ao DNA são determinantes para a sobrevivência e o funcionamento normal da célula, pois a exposição a agentes mutagênicos, quando não compensada por mecanismos de reparo leva ao aparecimento de lesões cumulativas no genoma humano (Friedberg *et al.*, 2006). Existem algumas vias metabólicas de reparo já descritas, cada qual com diferentes modos de regulação (p. ex. reparo por excisão de base - BER; reparo por excisão de nucleotídeo - NER; reparo de pareamentos errados) (Collins,

Azqueta e Langie, 2012). Alguns reparos podem ocorrer por ação direta de uma proteína, porém, a maioria ocorre por reações sequenciais de múltiplas enzimas, como é o caso da BER, mecanismo essencial frente ao dano oxidativo ao DNA (Gaivão *et al.*, 2009; Jackson e Bartek, 2009).

Avaliamos a eficiência de reparo de dano oxidativo ao DNA nos pacientes com DF através do método de desafio com H₂O₂. Este método, desenvolvido por Collins e colaboradores para a avaliação do BER (Collins *et al.*, 2001), consiste em induzir um dano oxidativo através da incubação da amostra com um agente oxidante (neste caso, o H₂O₂) e medir o dano ao DNA através do ensaio cometa após um tempo suficiente para que o mecanismo de BER atue nas bases oxidadas. O mecanismo de indução de dano pelo H₂O₂ não é direto, se dá através da formação (por reação de Fenton, na presença de metais de transição) de OH[•], que, por sua vez, ataca as bases púricas e pirimidínicas e a molécula de desoxirribose (Dizdaroglu *et al.*, 1991). O ensaio do desafio também foi realizado com as endonucleases FPG e EndoIII para melhor elucidar o mecanismo de ação deste tipo de reparo em pacientes com DF.

Para avaliar a cinética de reparo, o ensaio cometa foi realizado 30 e 120 min após a indução de dano com H₂O₂. Observamos que em controles houve a indução de dano ao DNA (aumento do índice de dano em 30 min no ensaio cometa simples - sem as endonucleases) e esse dano foi observado em purinas (FPG) no tempo de 30 min, mas não em pirimidinas (EndoIII). No tempo de 120 min, tanto no ensaio simples como no ensaio com FPG, houve uma diminuição na mediana de dano no grupo controle em relação ao tempo de 30 min, porém não significativa. Uma vez que há relatos de que o reparo por BER de danos induzidos por H₂O₂ seja um processo rápido (Friedberg *et al.*, 2006; Jackson e Bartek, 2009), acreditamos que no tempo de 30 min este reparo já tivesse ocorrido no grupo controle e pode-se considerar o reparo como eficiente, já que os níveis de dano oxidativo às bases em 120 min

foram iguais aos danos basais. Já nos pacientes com DF, o H_2O_2 causou um pico de dano a purinas e pirimidinas em 30 min e em ambas as bases o reparo foi eficiente, revertendo o dano aos níveis basais em 120 min. Além do dano oxidativo às bases, o H_2O_2 pode causar dano às ligações fosfodiéster (o que é visto no cometa simples) gerando quebras de fita (Dizdaroglu *et al.*, 1991; Dizdaroglu, 2012). Uma vez que o reparo dos pacientes com DF no ensaio simples também retornou o dano aos níveis basais em 120 min, pode-se afirmar que os mecanismo de reparo nesses pacientes foram eficientes em todos os tipos - ligações fosfodiéster, purinas e pirimidinas.

No capítulo I, uma vez que estudamos dano oxidativo ao DNA, também investigamos a geração de espécies reativas nas mesmas amostras através do método da sonda fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Essa sonda é a mais utilizada para medir a geração de espécies reativas, todavia a sua interpretação deve ser cautelosa, uma vez que, contrariamente ao que muitos interpretam, não pode ser avaliada como uma medida direta do conteúdo de H_2O_2 (Dikalov e Harrison, 2014). Várias espécies reativas são capazes de oxidar a sonda e gerar fluorescência, entre elas $OH\cdot$ e peroxinitrito ($ONOO\cdot$) (ambas capazes de também de oxidar o DNA). O aumento da oxidação da sonda observado em pacientes com DF, portanto, pode ser um reflexo da geração mitocondrial de espécies reativas, bem como de $ONOO\cdot$ e também indicar sinalização intracelular de íons de ferro com atividade redox (Kalyanaraman *et al.*, 2012).

Os dados obtidos no capítulo I mostram que os pacientes com DF possuem um sistema de reparo contra dano oxidativo ao DNA eficiente, porém mesmo assim apresentam taxas basais de dano ao DNA (incluindo oxidativo) aumentadas. Tendo como base o resultado de DCFH-DA que corrobora com os achados do estudo prévio em pacientes sob TRE (Biancini *et al.*, 2012), podemos sugerir que os mecanismos de reparo nesses pacientes podem estar induzidos como uma resposta adaptativa à injúria oxidativa crônica.

A resposta adaptativa, que envolve a modulação de vários genes, incluindo os envolvidos na resposta ao dano ao DNA, pode ocorrer frente a agentes causadores de dano (entre eles, estresse oxidativo) (Jackson e Bartek, 2009; Davies *et al.*, 1993). Todavia, provavelmente devido à geração exacerbada de espécies reativas, os dados *in vivo* mostram que essa resposta adaptativa dos pacientes com DF ainda não é suficiente para reduzir o dano ao DNA a nível de controles.

No capítulo II, através de ensaios *in vivo*, avaliamos pacientes com DF no momento do diagnóstico (ou seja, antes de iniciar a TRE) e durante a TRE. Neste capítulo, o grupo de pacientes em TRE incluiu indivíduos que já haviam participado do nosso estudo anterior (Biancini *et al.*, 2012) e seguiram com o tratamento. Dessa maneira, uma diferença fundamental entre os dois estudos é a duração do tratamento de TRE – a mediana de tempo de TRE quase triplicou de um estudo para outro (aumentou de cerca de dois para 5,5 anos).

Uma vez que no estudo anterior (Biancini *et al.*, 2012) já havíamos investigado defesas antioxidantes enzimáticas (observamos aumento da razão SOD/CAT e diminuição de GPx nos pacientes com DF em TRE), neste trabalho focamos no metabolismo da GSH, que é o sistema antioxidante mais importante no metabolismo em humanos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Para tanto, quantificamos GSH e medimos a atividade de duas enzimas envolvidas no seu metabolismo – GPx e GR. Em pacientes com DF no momento do diagnóstico, encontramos aumento no conteúdo de GSH e diminuição na atividade da GPx em relação aos pacientes em TRE e controles. Não houve diferença entre os grupos quanto à atividade da GR.

A regulação do conteúdo de GSH ocorre, principalmente, através da atividade da primeira enzima de sua síntese - glutamato-cisteína-ligase (GCL) (Lu, 2009). Estudos mostram que o estresse oxidativo induz a expressão de outras enzimas envolvidas na síntese de GSH, além da subunidade catalítica da própria GCL. Dessa maneira, o aumento de GSH

observado nos pacientes no momento diagnóstico, assim como o reparo de dano ao DNA observado nos pacientes, pode ser interpretado como uma resposta adaptativa ao estresse crônico. Cabe salientar que os pacientes com DF estudados tiveram um diagnóstico tardio, tendo sido expostos ao acúmulo dos substratos da α -gal A por vários anos até o seu diagnóstico e posterior tratamento.

No presente estudo, observamos que a GPx está com atividade diminuída nos pacientes com DF apenas no momento do diagnóstico e não durante a TRE. No estudo anterior (Biancini *et al.*, 2012), todavia, havíamos encontrado essa diminuição nos pacientes em TRE. Uma vez que a TRE deste estudo é de mais longa duração, pode-se sugerir que a restauração da atividade da GPx também seja uma resposta adaptativa neste tempo maior de TRE. Ainda, mesmo que minoritariamente, a baixa atividade da GPx no diagnóstico pode contribuir para a manutenção dos níveis elevados de GSH - já que a atividade antioxidante da GPx se dá através da transferência de elétrons dos grupamentos tióis da GSH para o substrato eletrofilico (Meister e Anderson, 1983).

Embora tenhamos encontrado um aumento de GSH no momento do diagnóstico e que grande parte do conteúdo de tióis do organismo esteja na molécula da GSH (Halliwell e Gutteridge, 2007), não encontramos diferença significativa entre pacientes e controles, quanto ao conteúdo de tióis totais. Já está descrito na literatura que, em casos de estresse crônico, a quantificação de tióis totais pode não fornecer resultados fidedignos à real extensão do dano oxidativo proteico (Davies, Wang e Dean, 1999). Portanto, mesmo que tióis estejam sendo oxidados na DF, a grande concentração de GSH encontrada poderia estar mascarando esses resultados.

Em relação ao dano a biomoléculas, encontramos aumento nos dois parâmetros de lipoperoxidação avaliados - TBARS e MDA - em pacientes com DF no momento do diagnóstico e durante a TRE de longa duração. A peroxidação lipídica é considerada um

processo tardio de injúria oxidativa (não um dano primário) e é descrita por Halliwell como a reação em cadeia de radicais livres com maior relevância biológica (Halliwell e Chirico, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2007). O ataque de espécies reativas a lipídeos de membrana está bem descrito em patologias associadas à DF, como aterosclerose (Shao e Heinecke, 2009), inflamação (Pang *et al.*, 2007) e dano cerebral isquêmico (Polidori *et al.*, 1998). O achado de lipoperoxidação persistente aos mais de cinco anos de TRE sugere que esses processos patológicos associados à DF também possam estar ocorrendo nos pacientes com DF em decorrência da ação de espécies reativas.

Embora, num primeiro momento, a observação do conteúdo aumentado de GSH pudesse ser interpretada como benéfica para os pacientes com DF, o fato de a GPx estar com atividade diminuída não torna o aumento de GSH vantajoso. Isso porque sem a atividade da GPx, a GSH não tem ação antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos (substratos da GPx) (Flohé, 2013). Pelo contrário, experimentos clássicos mostram a GSH com efeito pró-oxidante quando deprivada de seu contexto enzimático. Nessas condições, a GSH não pode fazer uso de seu potencial redutor e pode causar dano oxidativo através de auto-oxidação e reações em cadeia (Beutler, 1967; Misra, 1974; Brownlee *et al.*, 1977; Flohé, 2013). Esses achados, somados aos resultados de dano a lipídeos – aumento de MDA e TBARS – e DNA nos pacientes com DF antes e durante a TRE, corroboram com a ideia de que a GSH aumentada não tem efeito protetor nesses pacientes.

Uma vez que a disfunção endotelial é peça-chave da fisiopatologia da DF (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Hoffmann, 2009) e alguns estudos propuseram uma possível ação do estresse nitrosativo nesse contexto da doença (Moore *et al.*, 2001; Bodari *et al.*, 2005; Chimenti *et al.*, 2015) - baseados na sua atividade cardiovascular amplamente conhecida (Dejam *et al.*, 2004), no capítulo II também investigamos a geração de NO através da medida de seus equivalentes estáveis (nitrito e nitrito) na urina. Observamos que os pacientes com

DF apresentavam aumento da geração de NO[•] no momento do diagnóstico e durante a TRE de longa duração. Moore e colaboradores também encontraram aumento de nitrotirosina (uma medida indireta de estresse nitrosativo) na vasculatura dérmica e cerebral (amostras de biópsia) de pacientes com DF e a TRE de curta duração (seis meses) reverteu esses achados nas amostras de pele. Todavia, tais pesquisadores não encontraram diferença significativa entre níveis plasmáticos de nitrato e nitrito de pacientes com DF e controles e sugeriram que o NO[•] pudesse ter sido consumido rapidamente pelo O₂⁻, formando ONOO⁻ (Moore et al., 2001). Cabe salientar que no nosso estudo, o estresse nitrosativo foi medido em material biológico diferente (urina) e a duração da TRE também difere entre os estudos. Um estudo em modelo animal de aterosclerose combinada com deficiência de α-gal A também encontrou aumento de nitrotirosina, Gb3 e na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em placas ateroscleróticas, sugerindo que a desregulação do metabolismo do NO[•] deve acelerar o processo de formação de aterosclerose (Bodary *et al.*, 2005).

Existe uma relação bem descrita na literatura entre o metabolismo da GSH e o estresse nitrosativo, a qual pode ser observada em nossos achados. Foi demonstrado que o NO[•] inibe a atividade da GPx (Asahi *et al.*, 1995). A atividade da GPx diminuída no diagnóstico, simultaneamente com o aumento de equivalentes de NO[•] que persistiu durante a TRE de longa duração, verificados nos pacientes em nosso estudo, permitem supor que o estresse nitrosativo pode ser a causa da inibição da GPx no diagnóstico e no início da TRE (primeiros dois anos) (Biancini *et al.*, 2012). Passado esse período, já em cinco anos de TRE, o processo adaptativo pode estar se sobrepondo à ação do estresse nitrosativo sobre a GPx, normalizando sua atividade. A própria GSH também regula a homeostase de NO[•] (Broniowska, Diers e Hogg, 2013) e pode reagir com NO[•] formando s-nitrosoglutathione (Schrammel *et al.*, 2003).

A permeabilidade dinâmica das membranas em relação ao H₂O₂ é uma característica fundamental para desempenhar o seu papel de sinalizador do estado redox celular em

situações fisiológicas e no processo de adaptação ao estresse (Halliwell e Gutteridge, 2007; Panieri e Santoro, 2015; D'Autréaux e Toledano, 2007). Muitas proteínas importantes na transdução de sinal (p. ex. quinases com atividade no sistema cardiovascular: proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina – CAMKII; proteína quinase A - PKA; e proteína quinase G - PKG) sofrem modificações pós-traducionais oxidativas, sendo, portanto, sensíveis à ação do H_2O_2 (Burgoyne et al., 2013). Partindo do princípio de que o H_2O_2 é substrato da GPx e que essa está com atividade reduzida nos pacientes com DF no momento do diagnóstico e também nos primeiros anos de TRE (Biancini *et al.*, 2012), pode-se supor que haja um aumento na quantidade H_2O_2 . O fato de a relação SOD/CAT também encontrar-se aumentada nos primeiros anos de TRE (Biancini *et al.*, 2012) reforça essa hipótese, uma vez que H_2O_2 é produto da SOD e substrato da CAT (Halliwell e Gutteridge, 2007). Altos níveis de H_2O_2 também estimulam a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), provocando vasodilatação mediante ação do NO (Cai, 2005). Assim, analisando os resultados do nosso estudo de uma maneira integrada, é possível supor que uma espécie reativa com papel sinalizador (Stone e Yang, 2006) - o H_2O_2 - esteja contribuindo na fisiopatologia da DF. Nossos resultados descritos nos capítulos I e II mostram que pacientes com DF apresentam disfunções oxidativas e nitrosativas mesmo antes de iniciarem a TRE (portanto, tais disfunções não são consequência da TRE). Também observamos que processos adaptativos ocorrem nesses pacientes, porém, possivelmente em virtude da geração exacerbada de espécies reativas, não são suficientes para evitar o dano a biomoléculas (DNA e lipídeos).

Ainda, no capítulo II, quantificamos o principal metabólito acumulado na DF – o Gb3. Observamos que pacientes com DF antes de iniciarem a TRE possuíam níveis significativamente elevados de Gb3 urinário (cerca de 14 vezes maior que de controles) e que foram diminuídos com a TRE de longa duração, porém ainda elevados em relação aos controles (cerca de 7 vezes maior). Comparativamente ao nosso estudo prévio, pode-se

observar que os três anos a mais de TRE foram efetivos em baixar ainda mais os níveis de Gb3, uma vez que naquele estudo os pacientes em TRE apresentavam Gb3 cerca de 10 vezes maior que controles (Biancini et al., 2012). Esse resultado está de acordo com outros trabalhos, que demonstraram que a TRE é capaz de diminuir os níveis de Gb3 (Whitfield *et al.*, 2005; Hoffmann, 2009; Piraud, Maire e Froissart, 2010; Rombach *et al.*, 2012). Partindo-se do pressuposto que o ponto inicial da fisiopatologia da DF é o acúmulo dos substratos da α -gal A (Desnick, Iannou e Eng, 2001) e considerando já termos encontrado uma correlação positiva entre o Gb3 urinário e parâmetros inflamatórios e oxidativos (Biancini, et al., 2012), o fato de os níveis de Gb3 dos pacientes estarem ainda bastante aumentados após mais de cinco anos de TRE, ao mesmo tempo que os níveis de dano a biomoléculas (DNA e lipídeos - “marcas digitais” da ocorrência de dano oxidativo) também continuam aumentados, reforça a importância do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas complementares à TRE na DF. Estudos acerca da fisiopatologia da DF, como é o caso desta tese, são essenciais para o desenvolvimento dessas novas abordagens terapêuticas e têm sua relevância aumentada à medida que as metanálises acerca da TRE na DF mostram resultados de eficácia aquém dos esperados no advento da TRE (El Dib e Pastores, 2010; Rombach *et al.*, 2014).

Desta forma, no intuito de contribuir cientificamente para a elucidação da fisiopatologia da DF, no capítulo III avaliamos o efeito *in vitro* do liso-Gb3 (em concentrações encontradas no plasma de pacientes com DF) em células embrionárias de epitélio renal humano (HEK293T).

Desde a primeira publicação científica sobre o liso-Gb3 foi evidenciada a importância de se investigar suas possíveis atividades biológicas para elucidar a fisiopatologia dessa complexa desordem metabólica que é a DF (Aerts *et al.*, 2008). Desde então, o liso-Gb3 tem sido proposto como sendo um fator importante na interposição entre o acúmulo de Gb3 e os achados fisiopatológicos da DF (Barbey *et al.*, 2006; Aerts *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostram que o liso-Gb3 nas concentrações de 50 e 100 nM (observadas em pacientes sintomáticos com DF) reduz a viabilidade celular dessa linhagem de epitélio renal em aproximadamente 50%. Aerts e colaboradores já haviam testado as mesmas concentrações de liso-Gb3 no mesmo tempo de incubação e encontraram resultados opostos em diferentes linhagens celulares (efeito proliferador em células da musculatura lisa vascular e nenhum efeito em fibroblastos) (Aerts *et al.*, 2008). Dessa maneira, o resultado de nosso teste de viabilidade corrobora para afirmar que os efeitos do liso-Gb3 quanto à viabilidade celular são linhagem-específicos.

No capítulo I, através do ensaio cometa alcalino em leucócitos periféricos, observamos que pacientes com DF antes e durante a TRE possuíam altos níveis basais de dano ao DNA de natureza oxidativa em purinas. No capítulo III, investigamos novamente dano ao DNA na linhagem de células epiteliais renais expostas ao liso-Gb3. Observamos que todas as concentrações de liso-Gb3 testadas (10, 50 e 100 nM) induziram dano ao DNA apresentando um perfil dose-dependente e este dano de natureza oxidativa foi observado em ambas as bases – purinas e pirimidinas. Assim como observado *in vivo*, o efeito oxidativo em purinas foi maior que em pirimidinas. Analisando em conjunto os resultados de dano ao DNA dos capítulos I e III, podemos sugerir que os achados *in vivo* do primeiro capítulo podem ser devido à ação do liso-Gb3 circulante nesses pacientes.

O dano oxidativo às bases gera quebras de fita simples no DNA que são reparadas pelo sistema BER. Assim, o dano ao DNA é o primeiro ativador da enzima poli(ADP-ribose) polimerase -1 (PARP-1), que age na detecção do dano e no reparo (via BER) do DNA. Neste contexto, no intuito de investigar o mecanismo de ação do liso-Gb3, no capítulo III encontramos o efeito *in vitro* deste metabólito na expressão de PARP-1 em células de epitélio renal humano. Observamos que todas as concentrações de liso-Gb3 testadas, além do dano ao DNA, também induziram a expressão da PARP-1. De fato, a indução de mecanismos de

reparo foi observada também *in vivo* nos pacientes com DF (capítulo I). Desta maneira, os resultados são complementares e reforçam a ideia de que o liso-Gb3 causa dano ao DNA através de mecanismo oxidativo.

Já que as maiores fontes de geração de espécies reativas nas células são as mitocôndrias, no capítulo III também investigamos um possível efeito do liso-Gb3 na despolarização mitocondrial. De maneira intrigante, os resultados mostraram que nenhuma das concentrações de liso-Gb3 testadas causou efeito significativo no metabolismo mitocondrial que se refletisse na sua despolarização. Mais uma vez, nossos resultados nessas células renais são diferentes dos anteriormente publicados em fibroblastos - atividade reduzida de enzimas da cadeia transportadora de elétrons (Lücke *et al.*, 2004), reforçando a hipótese do efeito do liso-Gb3 ser linhagem-dependente.

No nosso estudo, não verificou-se efeito *in vitro* do liso-Gb3 na atividade da enzima antioxidante SOD, o que complementa a hipótese de que a geração de espécies reativas induzida pelo liso-Gb3 não ocorre a nível mitocondrial - se ocorresse, a despolarização provavelmente alteraria a atividade da SOD mitocondrial e se refletiria na atividade medida no experimento. Por outro lado, o liso-Gb3 aumentou a atividade de outra enzima antioxidante, a CAT. A atividade desta enzima é regulada por mecanismos complexos (Glorieux, 2015) e é ativada pelo estresse oxidativo através do seu próprio substrato, H₂O₂. A origem do H₂O₂ pode ser via SOD ou através de diversas oxidases abundantes em peroxissomos. Essas organelas, por sua vez, são abundantes nos rins e parecem estar envolvidas nos processos fisiopatológicos de doenças renais, incluindo aqueles relacionados à DF - fibrose e nefropatia diabética (Lee *et al.*, 2015; Weidemann *et al.*, 2013; Schiffmann *et al.*, 2010). Assim, tendo como base os já descritos efeitos do H₂O₂ na oxidação de bases do DNA e na indução da atividade da CAT, somado ao fato de não termos observado efeito do liso-Gb3 na atividade da SOD nem na despolarização mitocondrial, acreditamos que os

efeitos do liso-Gb3 poderiam estar sendo mediados pela geração exacerbada de H₂O₂ nos peroxissomos.

No capítulo IV, constituído de dados complementares, observamos que seis pacientes com DF que participaram do estudo (capítulo II) possuíam níveis de liso-Gb3 em sangue total maiores que os valores de referência no momento do diagnóstico (cerca de 10 vezes, média de 23 nM) e mesmo durante a TRE (cerca de cinco vezes, média de 13 nM). Johnson e colaboradores (Johnson *et al.*, 2013) encontraram valores de liso-Gb3 em níveis semelhantes também em sangue total - homens com média de 52,8 (± 17,0) e mulheres 4,5 nM (± 2,4). Ainda, nesse capítulo, observamos uma forte correlação positiva entre os níveis sanguíneos de liso-Gb3 e os níveis urinários de Gb3 - correlação também descrita por Aerts e colaboradores no plasma (Aerts *et al.*, 2008). Esses dados complementares de liso-Gb3 reforçam nossos achados, uma vez que no capítulo III observamos que o liso-Gb3, já na dose de 10 nM, induziu dano oxidativo ao DNA - o qual já havíamos observado *in vivo* no capítulo I e as alterações de estresse oxidativo e nitrosativo encontradas no capítulo II foram concomitantes com níveis aumentados de Gb3.

Em conclusão, os resultados obtidos nesta tese a partir de estudos *in vivo* (antes e durante a TRE) e *in vitro* se complementam e mostram o papel dos metabólitos acumulados na fisiopatologia da DF no que se refere ao dano oxidativo celular, sugerindo um papel do H₂O₂ como mediador deste dano.

III. 2. CONCLUSÕES

Verificamos que os pacientes com DF, em resposta à injúria oxidativa, possuem mecanismos de reparo de dano ao DNA ativados, porém não suficientemente eficazes a ponto de normalizar os níveis basais de dano a níveis de indivíduos saudáveis. Este processo adaptativo também foi observado em pacientes com DF em TRE de longa duração, através do reestabelecimento do metabolismo normal da glutathiona.

Observamos alterações de estresse oxidativo nos pacientes com DF mesmo antes de iniciarem a TRE e que essas alterações não se normalizam após a terapia, o que nos permite inferir que a TRE não corrige tais distúrbios, porém também não é causadora desses. O aumento de estresse nitrosativo e o dano a lipídeos encontrados antes da TRE e durante os cinco primeiros anos de terapia, concomitantes com altos níveis urinários de Gb3, sugerem que este metabólito acumulado desencadeie processos fisiopatológicos através de estresse oxidativo e nitrosativo.

Através da investigação dos efeitos *in vitro* do liso-Gb3 em cultura de células renais, observamos efeito citotóxico e de oxidação do DNA, este último similar ao encontrado *in vivo* nos pacientes com DF. Propusemos, então, que o excesso de H₂O₂ possivelmente gerado nas células renais em resposta ao liso-Gb3 possa estar contribuindo para a progressiva perda de função renal na DF.

Analisando em conjunto os resultados obtidos nos estudos *in vivo* e *in vitro*, sugerimos uma hipótese de mecanismo de injúria oxidativa desencadeada pelos dois principais metabólitos acumulados na DF - Gb3 e liso-Gb3 – e mediada por uma espécie reativa sabidamente com papel sinalizador - o H₂O₂.

Nossos resultados fornecem novas informações acerca da fisiopatologia da DF, que podem servir como base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas complementares visando uma melhora na qualidade de vida dos pacientes com DF.

III. 3. PERSPECTIVAS

O presente trabalho gerou as seguintes perspectivas:

- Quantificar liso-Gb3 no plasma de pacientes com DF no diagnóstico e ao longo da TRE, para posterior investigação de possíveis correlações com parâmetros de estresse oxidativo;
- Correlacionar os achados de estresse oxidativo com o índice de severidade da doença nos pacientes com DF antes e durante a TRE;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com DF submetidos à TRE de mais longa duração;
- Testar o efeito *in vitro* de antioxidantes antes e após a incubação com Gb3 e liso-Gb3;
- Realizar ensaio *in vivo* com antioxidantes em pacientes com DF associado ou não com a TRE.

REFERÊNCIAS

Aerts, J.M., Groener, J.E., Kuiper, S., Donker-Koopman, W.E., Strijland, A., Ottenhoff, R., Van Roomen, C., Mirzaian, M., Wijburg, F.A., Linthorst, G.E., Vedder, A.C., Rombach, S.M., Cox-Brinkman, J., Somerharju, P., Boot, R.G., Hollak, C.E., Brady, R.O., Poorthuis, B.J. (2008). Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2812-2817.

Aerts, J.M.F.G., Kallemeijn, W. W., Wegdam, W., Joao Ferraz, M., Van Breemen, M.J., Dekker, N., Kramer, G., Poorthuis, B.J., Groener, J.E.M., Cox-Brinkman, J., Rombach, S.M., Hollak, C.E.M., Linthorst, G.E., Witte, M.D., Gold, H., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., Boot, R. G. (2011). Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: Proteins, lipids, and inhibodies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(3), 605-619.

Anderson, W. (1898). A case of angiokeratoma. *British Journal of Dermatology*, 10:113.

Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo, H.G., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., Fuji, S., Taniguchi, N. (1995). Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: Implication for cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 21035-21039.

Auray-Blais, C., Ntwarim A., Clarke, J.T., Warnock, D.G., Oliveira, J.P., Young, S.P., Millington, D.S., Bichet, D.G., Sirrs, S., West, M.L., Casey, R., Hwu, W.L., Keutzer, J.M., Zhang, X.K., Gagnon, R. (2010). How well does urinary lyso-Gb3 function as a biomarker in Fabry disease? *Clinica Chimica Acta.*, 411(23-24), 1906-1914.

Auray-Blais, C., Cyr, D., Ntwari, A., West, M. L., Cox-Brinkman, J., Bichet, D.G., Germain, D.P., Laframboise, R., Melançon, S.B., Stockley, T., Clarke, J.T.R., Drouin, R. (2008). Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(3), 331-340.

Auray-Blais, C., Millington, D.S., Young, S.P., Clarke, J.T.R., Schiffmann, R. (2009). Proposed high-risk screening protocol for Fabry disease in patients with renal and vascular disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(2), 303-308.

Babor, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 109(1), 33-44.

Banikazemi, M., Bultas, J., Waldek, S., Wilcox, W. R., Whitley, C. B., McDonald, M., Finkel, R., Packman S., Bichet, D.G., Warnock, D.G., Desnick, R.J. (2007). Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 146(2), 77-86.

Barbey, F., Brakch, N., Linhart, A., Rosenblatt-Velin, N., Jeanrenaud, X., Qanadli, S., Steinmann, B., Burnier, M., Palecek, T., Bultas, J., Hayoz, D. (2006). Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: Evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), 839-844.

Bekri, S., Lidove, O., Jaussaud, R., Knebelmann, B., Barbey, F. (2006). The role of ceramide trihexoside (globotriaosylceramide) in the diagnosis and follow-up of the efficacy of treatment of

Fabry disease: A review of the literature. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 4(4), 289-297.

Beaudet, A.L., Scriver, C.R., Sly, W.S., Valle, D. (2001). Genetics, Biochemistry and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes, In: Scriver, C.R., Sly, W.A., Beaudet, A.L., Valle, D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc: New York, 3-43.

Beutler, E. (1967). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Diagnosis, clinical and genetic implications, *American Journal of Clinical Pathology*, 47, 303–311.

Biancini, G.B., Vanzin, C.S., Rodrigues, D.B., Deon, M., Ribas, G.S., Barschak, A.G., Manfredini, V., Netto, C.B.O, Jardim, L.B., Giugliani, R., Vargas, C.R. (2012). Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822, 226-232.

Bodary, P.F., Shen, Y., Vargas, F.B., Bi, X., Ostenso, K.A., Gu, S., Shayman, J.A., Eitzman, D.T. (2005). α -Galactosidase A deficiency accelerates atherosclerosis in mice with apolipoprotein E deficiency. *Circulation*, 111(5), 629-632.

Broniowska, K., Diers, A.R., Hogg, N. (2013). S-nitrosoglutathione. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3173-3181.

Brownlee, N.R, Huttner, J.J., Panganamala, R.V., Cornwell, D.G. (1977). Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: methemoglobin, lipid peroxidation, and hemolysis, *Journal of Lipid Research*, 18, 635–644.

Buechner, S., Moretti, M., Burlina, A.P., Cei, G., Manara, R., Ricci, R., Mignani, R., Parini, R., Di Vito, R., Giordano, G.P., Simonelli, P., Siciliano, G., Borsini, W. (2008). Central nervous system involvement in Anderson-Fabry disease: A clinical and MRI retrospective study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(11), 1249-54.

Burgoyne, J.R., Oka S., Ale-Agha N., Eaton P. (2013). Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(9), 1042-52.

Butler, D., Bahr, B.A. (2006). Oxidative stress and lysosomes: CNS-related consequences and implications for lysosomal enhancement strategies and induction of autophagy. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(1-2), 185-196.

Cai, H. (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research*, 68(1), 26–36.

Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D. (2009). Antioxidants and the comet assay. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 681(1), 51-67.

Chimenti, C., Scopelliti, F., Vulpis, E., Tafani, M., Villanova, L., Verardo, R., De Paulis, R., Russo, M.A., Frustaci, A. (2015). Increased oxidative stress contributes to cardiomyocyte

dysfunction and death in patients with Fabry disease cardiomyopathy. *Human Pathology*, 46(11), 1760-1768.

Choi, L., Vernon, J., Kopach, O., Minett, M.S., Mills, K., Clayton, P.T., Meert, T., Wood, J.N. (2015). The Fabry disease-associated lipid lyso-Gb3 enhances voltage-gated calcium currents in sensory neurons and causes pain. *Neuroscience Letters*, 594, 163-168.

Clarke, J.T.R. (2007). Narrative review: Fabry Disease. *Annals of Internal Medicine*, 146, 425-433.

Cole, A.L., Lee, P.J., Hughes, D.A., Deegan, P.B., Waldek, S., Lachmann, R.H. (2007). Depression in adults with Fabry disease: a common and under-diagnosed problem. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30, 943-951.

Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Moller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S. (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet project. *Mutation Research*, 759, 27-39.

Collins, A.R. (2005). Assays for oxidative stress and antioxidant status: Applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 261S-267S.

Collins, A.R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(2), 794-800.

Collins, A.R., Azqueta, A., Langie, S.A.S. (2012). Effects of micronutrients on DNA repair. *European Journal of Nutrition*, 51(3), 261-279.

Collins, A.R., Dušinská, M., Horváthová, E., Munro, E., Savio, M., Stětina, R. (2001). Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis*, 16(4), 297-301.

D'Autréaux, B., Toledano, M.B. (2007). ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813–24.

Davies, K.J.A., Weise, A.G., Pacifici, R.E., Davies, J.M.S. (1993). Regulation of gene expression in adaptation to oxidative stress, in: Poli, G., Albano, E., Dianzani, M.U., eds. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhauser-Verlag, Basel, Switz: pp. 18–30.

Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1151-1163.

De Francesco P.N, Mucci J.M, Ceci R, Fossati C.A, Rozenfeld P.A (2013). Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: Role of globotriaosylceramide. *Molecular Genetics and Metabolism*, 109, 93-99.

Deegan, P.B., Baehner, A.F., Barba Romero, M., Hughes, D.A., Kampmann, C., Beck, M. (2006). Natural history of Fabry disease in females in the Fabry outcome survey. *Journal of Medical Genetics*, 43(4), 347-352.

Deganuto, M., Pittis, M.G., Pines, A., Dominissini, S., Kelley, M.R., Garcia, R., Quadrifoglio, F., Bembi, B., Tell, G. (2007). Altered intracellular redox status in gaucher disease fibroblasts

and impairment of adaptive response against oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*, 212(1), 223-235.

Dehout, F., Roland, D., de Granseigne, S. T., Guillaume, B., Van Maldergem, L. (2004). Relief of gastrointestinal symptoms under enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27(4), 499-505.

Dejam, A., Hunter, C.J., Schechter, A.N., Gladwin, M.T. (2004). Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32(3), 423-429.

Desnick, R.J., Ioannou, Y.A., Eng, C.M. (2001). α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver, C.R., Sly, W.A., Beaudet, A.L., Valle, D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc: New York, 3733–3774.

Dikalov, S.I., Harrison, D.G. (2014). Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species, *Antioxidants and Redox Signaling*, 20, 372–382,

Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E. (1991). Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285, 317-324.

Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*, 327(1-2), 26-47.

Dobrovolny, R., Dvorakova, L., Ledvinova, J., Magage, S., Bultas, J., Lubanda, J.C., Elleder, M., Karetova, D., Pavlikova, M., Hrebicek, M. (2005). Relationship between X-inactivation and

clinical involvement in Fabry heterozygotes. eleven novel mutations in the α -galactosidase a gene in the czech and slovak population. *Journal of Molecular Medicine*, 83(8), 647-654.

Donida, B., Marchetti, D.P., Biancini, G.B., Deon, M., Manini, P.R., da Rosa, H.T., Moura, D.J., Saffi, J., Bender, F., Burin, M.G., Coitinho, A.S., Giugliani, R., Vargas, C. R. (2015). Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(5), 1012-1019.

Dusinska M, Collins A.R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23, 191-205.

El Dib R.P., Pastores G.M. (2010). Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD006663

Eng, C.M., Guffon, N., Wilcox, W.R., Germain, D.P., Lee, P., Waldek, S., Caplan, L., Linthorst, G.E., Desnick, R.J. (2001). Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase a replacement therapy in Fabry's disease. *New England Journal of Medicine*, 345(1), 9-16.

Fabry, J. (1898). Ein Beitrag Zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa hemorrhagica Habrae). *Archiv für Dermatologie und Syphilis*, 43, 187.

Ferreira, A.L., Matsubara, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 61-68.

Filippon, L., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Pereira, I.N., Manfredini, V., Sitta, A., Peralba, M.C., Schwartz, I.V., Giugliani, R., Vargas, C.R. (2011). Oxidative stress in patients with

mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 103(2), 121-127.

Flohé, L. (2013). The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3139-3142.

Forni, S., Fu, X., Schiffmann, R., Sweetman, L. (2009). Falsely elevated urinary Gb3 (globotriaosylceramide, CTH, GL3). *Molecular Genetics and Metabolism*, 97(1), 91.

Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., Wood, R.D. (2006). DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5:986-996.

Futerman, A.H., Van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7), 554-565.

Gaivão, I., Piasek, A., Brevik, A., Shaposhnikov, S., Collins, A.R. (2009). Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 45-52.

Gedik, C.M., Grant, G., Morrice, P.C., Wood, S.G., Collins, A.R. (2005). Effects of age and dietary restriction on oxidative DNA damage, antioxidant protection and DNA repair in rats. *European Journal of Nutrition*, 44(5), 263-272.

Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J., Calderon, P.B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 84-97.

Guffon, N. (2003). Clinical presentation in female patients with Fabry disease. *Journal of Medical Genetics*, 40(4):e38

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.

Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125-130.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4 ed), Oxford University Press: New York.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231-255.

Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(SUPPL. 5), 715S-725S.

Hayes, J.D., McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31, 273–300.

Hoffmann, B. (2009). Fabry disease: Recent advances in pathology, diagnosis, treatment and monitoring. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4, 21.

Hopkin, R.J., Bissler, J., Banikazemi, M., Clarke, L., Eng, C.M., Germain, D.P., Lemay, R., Tylki-Szymanska, A., Wilcox, W.R. (2008). Characterization of Fabry Disease in 352 Pediatric Patients in the Fabry Registry. *Pediatric Research*, 64(5), 550-555.

Jackson, S.P., Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071-1078.

Johnson, B., Mascher, H., Mascher, D., Legnini, E., Hung, C. Y., Dajnoki, A., Chien, Y., Maródi, L., Hwu, W., Bodamer, O. A. (2013). Analysis of lyso-globotriaosylsphingosine in dried blood spots. *Annals of Laboratory Medicine*, 33(4), 274-278.

Kahn, P. (1973). Anderson Fabry disease: A histopathological study of three cases with observations on the mechanism of production of pain. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 36(6), 1053-1062.

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1-6.

Khanna, K.K., Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27, 247–254.

Kleinert, J., Kotanko, P., Spada, M., Pagliardini, S., Paschke, E., Paul, K., Voigtlander, T., Wallner, M., Kramar, R., Stummvoll, H.K., Schwarz, C., Horn, S., Holzer, H., Fodinger, M.,

Sunder-Plassmann, G. (2009). Anderson-Fabry disease: a case-finding study among male kidney transplant recipients in Austria. *Transplant International*, 22(3), 287-292.

Kovarnik, T., Mintz, G.S., Karetova, D., Horak, J., Bultas, J., Skulec, R., Skalicka, H., Aschermann, M., Elleder, M., Linhart, A. (2008). Intravascular ultrasound assessment of coronary artery involvement in Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31(6), 753-760.

Kurz, T., Eaton, J.W., Brunk, U.T. (2010). Redox activity within the lysosomal compartment: Implications for aging and apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 13(4), 511-523.

Kurz, T., Terman, A., Brunk, U.T. (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), 220-230.

Lee, S., Kim, S.I., Choi, M.E. (2015). Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. *Translational Research*, 165(4), 512-530.

Liao, H., Chiang, C., Niu, D., Wang, C., Kao, S., Tsai, F., Huang, Y., Liu, H., Huang, C., Gao, H., Yang, C., Chan, M., Lin, W., Chen, Y. (2014). Detecting multiple lysosomal storage diseases by tandem mass spectrometry - A national newborn screening program in Taiwan. *Clinica Chimica Acta*, 431, 80-86.

Lin, H., Chong, K., Hsu, J., Yu, H., Shih, C., Huang, C., Lin, S., Chen, C., Chiang, C., Ho, H., Lee, P., Kao, C., Chen, K., Hsueh, C., Niu, D. (2009). High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the taiwan chinese population. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(5), 450-456.

López-Lázaro, M. (2010). A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Molecular Medicine*, 16(3-4), 144-153.

Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 42-59.

Lücke, T., Höppner, W., Schmidt, E., Illsinger, S., Das, A.M. (2004). Fabry disease: Reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism*, 82(1), 93-97.

Lyon, M.F. (1988). The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *American Journal of Human Genetics*, 42(1), 8-16.

MacDermot K.D., Holmes A., Miners A.H. (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *Journal of Medical Genetics*, 38, 750-760

Mc Guire, P.J., Parikh, A., Diaz, G.A. (2009). Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 98(1-2), 173-180.

Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., Carey, W F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *Journal of the American Medical Association*, 281(3), 249-254.

Meister, A., Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711–760.

Misra, H.P. (1974). Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols, *Journal of Biological Chemistry*, 249: 2151–2155

Moore, D.F., Kaneski, C.R., Askari, H., Schiffmann, R. (2007). The cerebral vasculopathy of Fabry disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 257(1-2), 258-263.

Moore, D.F., Scott, L.T.C., Gladwin, M.T., Altarescu, G., Kaneski, C., Suzuki, K., Pease-Fye, M, Ferri, R, Brady, R.O., Herscovitch, P., Schiffmann, R. (2001). Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: Reversal by enzyme replacement therapy. *Circulation*, 104(13), 1506-1512

Negretto, G.W., Deon, M., Biancini, G.B., Burin, M.G., Giugliani, R., Vargas, C.R. (2014). Glycosaminoglycans can be associated with oxidative damage in mucopolysaccharidosis II patients submitted to enzyme replacement therapy. *Cell Biology and Toxicology*, 30(4), 189-193.

Pang, B., Zhou, X., Yu, H., Dong, M., Taghizadeh, K., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Dedon, P.C. (2007). Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. *Carcinogenesis*, 28(8), 1807-1813.

Panieri, E., Santoro, M.M. (2015). ROS signaling and redox biology in endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 3281–3303.

Pereira, V.G., Martins, A.M., Micheletti, C., D'Almeida, V. (2008). Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clinica Chimica Acta*, 387(1-2), 75-79.

Piraud, M., Maire, I., Froissart, R. (2010). Contribution of the measurement of globotriaosylceramide in urine to the diagnosis and follow-up of Fabry disease. [Intérêt du dosage du globotriaosylcéramide urinaire pour le diagnostic et le suivi du traitement de la maladie de Fabry] *Revue De Medecine Interne*, 31(SUPPL. 2), S270-S274.

Pivtoraiko, V.N., Stone, S.L., Roth, K.A., Shacka, J.J. (2009). Oxidative stress and autophagy in the regulation of lysosome-dependent neuron death. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(3), 481-496.

Polidori, M.C., Frei, B., Cherubini, A., Nelles, G., Rordorf, G., Keaney Jr., J.F., Schwamm, L., Mecocci, P., Koroshetz, W.J., Beal, M.F. (1998). Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(4-5), 561-567.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499-1503.

Porsch, D.B., Nunes, A.C., Milani, V., Rossato, L.B., Mattos, C.B., Tsao, M., Netto, C., Burin, M., Pereira, F., Matte, U., Giugliani, R., Barros, E.J. (2008). Fabry disease in hemodialysis patients in southern Brazil: prevalence study and clinical report. *Renal Failure*, 30, 825-830.

Radisky, D.C., Kaplan, J. (1998). Iron in cytosolic ferritin can be recycled through lysosomal degradation in human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 336(1), 201-205.

Ribas, V., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5 JUL, 151.

Rombach, S.M., Aerts, J.M.F.G., Poorthuis, B.J.H.M., Groener, J.E.M., Donker-Koopman, W., Hendriks, E., Mirzaian, M., Kuiper, S., Wijburg, F.A., Hollak, C.E., Linthorst, G.E. (2012). Long-term effect of antibodies against infused alpha-galactosidase A in Fabry disease on plasma and urinary (lyso)Gb3 reduction and treatment outcome. *Public Library of Science One*, 7(10).

Rombach, S.M., Dekker, N., Bouwman, M.G., Linthorst, G.E., Zwinderman, A.H., Wijburg, F.A., Kuiper, S., vd Bergh Weerman, M.A., Groener, J.E.M., Poorthuis, B.J., Hollak, C.E.M., Aerts, J.M.F.G. (2010a). Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(9), 741-748.

Rombach, S.M., Smid, B.E., Linthorst, G.E., Dijkgraaf, M.G.W., Hollak, C.E.M. (2014). Natural course of Fabry disease and the effectiveness of enzyme replacement therapy: A systematic review and meta-analysis: Effectiveness of ERT in different disease stages. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(3), 341-352.

Rombach, S.M., Twickler, T.B., Aerts, J. M. F. G., Linthorst, G. E., Wijburg, F. A., Hollak, C. E. M. (2010b). Vasculopathy in patients with Fabry disease: Current controversies and research directions. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99(2), 99-108.

Rombach, S.M., Van Den Bogaard, B., De Groot, E., Groener, J.E.M., Poorthuis, B.J., Linthorst, G.E., van den Born, B.J., Hollak, C.E., Aerts, J.M.F.G. (2012). Vascular aspects of Fabry

disease in relation to clinical manifestations and elevations in plasma globotriaosylsphingosine. *Hypertension*, 60(4), 998-1005.

Sanchez-Niño, M.D., Sanz, A.B., Carrasco, S., Saleem, M.A., Mathieson, P.W., Valdivielso, J.M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A. (2011). Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: Implications for Fabry nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(6), 1797-1802.

Saudubray, J.M., Charpentier, C. (2001). Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver, C.R., Sly, W.A., Beaudet, A.L., Valle, D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc: New York, 1327-1403.

Schermuly, I., Müller, M.J., Müller, K., Albrecht, J., Keller, I., Yakushev, I., Beck, M., Fellgiebel, A. (2011). Neuropsychiatric symptoms and brain structural alterations in Fabry disease. *European Journal of Neurology*, 18(2), 347-353.

Schiffmann, R., Kopp, J. B., Austin III, H.A., Sabnis, S., Moore, D.F., Weibel, T., Balow, J.E., Brady, R.O. (2001). Enzyme replacement therapy in Fabry disease a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 285(21), 2743-2749.

Schiffmann, R., Waldek, S., Benigni, A., Auray-Blais, C. (2010). Biomarkers of Fabry disease nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(2), 360-364.

Schrammel, A., Gorren, A.C.F., Schmidt, K., Pfeiffer, S., Mayer, B. (2003). S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and $\cdot\text{NO}/\text{O}_2 \cdot^-$. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(8), 1078-1088.

Childs, B., Valle, D., Jimenez-Sanchez, G. (2001). The Inborn Error and Biochemical Individuality. In: Scriver, C.R., Sly, W.A., Beaudet, A.L., Valle, D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, eighth ed., McGraw-Hill Inc: New York, 155-166.

Shao, B., Heinecke, J.W. (2009). HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 50(4), 599-601.

Shen J, Meng X, Moore D.F, Quirk, J.M., Shayman, J.A., Schiffmann, R., Kaneski, C.R. (2008). Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, 95, 163-168.

Sies, H. (1985). Introductory remarks. In: Sies, H., ed. *Oxidative stress*. Academic, London, 1–8.

Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition*, 25, 1058–1071.

Spada, M., Pagliardini, S., Yasuda, M., Tükel, T., Thiagarajan, G., Sakuraba, H., Ponzzone, A., Desnick, R.J. (2006). High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *American Journal of Human Genetics*, 79(1), 31-40.

Steenken, S., Jovanovic, S.V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution, 119, 617–618,

Stone, J. R., Yang, S. (2006). Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(3-4), 243-270.

Terman, A., Brunk, U.T. (2006). Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(1-2), 197-204.

Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B., Brunk, U.T. (2006). Lysosomal labilization. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 58(9), 531-539.

Tøndel, C., Bostad, L., Hirth, A., Svarstad, E. (2008). Renal biopsy findings in children and adolescents with Fabry disease and minimal albuminuria. *American Journal of Kidney Diseases*, 51(5), 767-776.

Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 358(1), 1-3.

Vargas, C.R., Wajner, M., Sirtori, L.R., Goulart, L., Chiochetta, M., Coelho, D., Latini, A., Lliesuy, S., Bello-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M., Mello, C.F. (2004). Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1688(1), 26-32.

Vitner, E.B., Platt, F.M., Futerman, A.H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 20423–20427.

Wang, R. Y., Lelis, A., Mirocha, J., Wilcox, W.R. (2007). Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genetics in Medicine*, 9(1), 34-45.

Weidemann, F., Niemann, M., Warnock, D.G., Ertl, G., Wanner, C. (2011). The Fabry cardiomyopathy: Models for the cardiologist. *Annual Review of Medicine*, 62, 59-67.

Weidemann, F., Sanchez-Niño, M.D., Politei, J., Oliveira, J., Wanner, C., Warnock, D.G., Ortiz, A. (2013). Fibrosis: A key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1).

Weidemann, F., Strotmann, J. M., Niemann, M., Herrmann, S., Wilke, M., Beer, M., Voelker, W., Ertl, G., Emmert, A., Wanner, C., Breunig, F. (2009). Heart valve involvement in Fabry cardiomyopathy. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 35(5), 730-735.

Whiteman, M., Rose, P., Halliwell, B. (2003). Inhibition of hypochlorous acid-induced oxidative reactions by nitrite: Is nitrite an antioxidant? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(4), 1217-1224.

Whitfield, P.D., Calvin, J., Hogg, S., O'Driscoll, E., Halsall, D., Burling, K., Maguire, G., Wright, N., Cox, T.M., Meikle, P.J., Deegan, P.B. (2005). Monitoring enzyme replacement therapy in Fabry disease - role of urine globotriaosylceramide. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(1), 21-33.

Yu, Z., Persson, H.L., Eaton, J.W., Brunk, U.T. (2003). Intralysosomal iron: A major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(10), 1243-1252.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 100177

Versão do Projeto: 05/05/2010

Versão do TCLE: 17/06/2010

Pesquisadores:

ANGELA SITTA

MARION DEON

ALETHEA GATTO BARSCHAK

IZABELA NETTO PEREIRA

DAIANE GRIGOLO BARDEMAKER RODRIGUES

DIANA MONTI ATIK

GIOVANA BRONDANI BIANCINI

LAURA BANNACH JARDIM

ROBERTO GIUGLIANI

CRISTINA BRINCKMANN OLIVEIRA NETTO

CARMEN REGLA VARGAS

Título: Investigação de estresse oxidativo em pacientes com Doença de Fabry: o efeito da terapêutica

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 14 de julho de 2010.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pacientes com Doença de Fabry

Projeto de Pesquisa: Investigação de estresse oxidativo em pacientes com Doença de Fabry: o efeito da terapêutica

Investigador Responsável: Carmen Regla Vargas

Colaboradores: Giovana Brondani Biancini, Marion Deon, Jéssica L. Faverzani, Angela Sitta, Alethéa Barschak, Cristina B. O. Netto, Laura Jardim, Roberto Giugliani

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Grupo de Pesquisa de Erros Inatos do Metabolismo e Estresse Oxidativo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). A participação neste projeto deve-se ao fato de você ser portador(a) da Doença de Fabry.

Recentemente foi demonstrado que pessoas com esta doença apresentam um aumento do estresse oxidativo e inflamação crônica, que dependendo da sua extensão podem causar danos ao nosso organismo. Além disso, estudos identificaram substâncias acumuladas (Gb3 e liso-Gb3) no organismo dos pacientes com Doença de Fabry que parecem contribuir para o agravamento da doença. Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o estresse oxidativo, inflamação e a quantidade dessas substâncias acumuladas no sangue e na urina de pacientes com Doença de Fabry antes e depois de iniciar a terapia de reposição enzimática.

A participação nessa pesquisa é voluntária. Cabe salientar que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com os procedimentos envolvidos. Serão coletadas células da parte interna da boca, sangue periférico e urina após as suas consultas de rotina ou imediatamente antes de suas infusões no Hospital Dia (aproveitando a mesma punção realizada para a infusão, não sendo necessária uma punção adicional). No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele, porém complicações são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A coleta de células do interior da boca é rápida e feita por esfoliação com uma escova. As coletas serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e

urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome e do paciente pelo qual você é responsável não serão revelados. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os registros médicos do paciente a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no hospital.** A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, não terá penalização (a).

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico. Este estudo pode, entretanto, contribuir no futuro, para um tratamento mais efetivo para os pacientes com Doença de Fabry e melhor entendimento de como funciona a própria Doença de Fabry.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis.

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar os pesquisadores responsáveis (Profa Dra Carmen Regla Vargas e a doutoranda Giovana Brondani Biancini), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8011 ou poderá contatar o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7640 de segunda à sexta, das 8 às 17h.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada,

bem como da liberdade de decisão sobre participar ou não do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ___/___/___

Nome do Paciente: _____ **Assinatura:** _____

Nome do Responsável legal: _____ **Assinatura:** _____

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ___/___/___

Pesquisador que aplica o termo: _____

Assinatura: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Indivíduos Controle

Projeto de Pesquisa: Investigação de estresse oxidativo em pacientes com Doença de Fabry: o efeito da terapêutica

Investigador Responsável: Carmen Regla Vargas

Colaboradores: Giovana Brondani Biancini, Marion Deon, Jéssica L. Faverzani, Angela Sitta, Alethéa Barschak, Cristina B. O. Netto, Laura Jardim, Roberto Giugliani

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Grupo de Pesquisa de Erros Inatos do Metabolismo e Estresse Oxidativo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Para este estudo, é necessário comparar os resultados dos pacientes que tem a Doença de Fabry com um grupo de indivíduos que não tem a doença. Por isso, a sua participação neste projeto deve-se ao fato de você não ter sinais e sintomas, nem história familiar compatíveis com a de Doença de Fabry.

Recentemente foi demonstrado que pessoas com esta doença apresentam um aumento do estresse oxidativo e inflamação crônica, que dependendo da sua extensão podem causar danos ao nosso organismo. Além disso, estudos identificaram substâncias acumuladas (Gb3 e liso-Gb3) no organismo dos pacientes com Doença de Fabry que parecem contribuir para o agravamento da doença. Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o estresse oxidativo, inflamação e a quantidade dessas substâncias acumuladas no sangue e na urina de pacientes com Doença de Fabry antes e depois de iniciar a terapia de reposição enzimática e comparar com os achados em indivíduos controle.

A participação nessa pesquisa é voluntária. Cabe salientar que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com os procedimentos envolvidos. Serão coletadas da boca, sangue periférico e urina após as suas consultas de rotina ou no momento de coleta de outros exames laboratoriais. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele, porém complicações são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A coleta de células da boca é rápida e feita por esfoliação com uma escova. As coletas serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão

feitas pelo próprio indivíduo ou com o auxílio de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

() autoriza o armazenamento.

() não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome e do paciente pelo qual você é responsável não serão revelados. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os registros médicos do paciente a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu atendimento no hospital.** A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, não terá penalização (a).

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico. Este estudo pode, entretanto, contribuir no futuro, para um tratamento mais efetivo para os pacientes com Doença de Fabry e melhor entendimento de como funciona a própria Doença de Fabry.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis.

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar os pesquisadores responsáveis (Profa Dra Carmen Regla Vargas e a doutoranda Giovana Brondani Biancini), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8011 ou poderá contatar o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7640 de segunda à sexta, das 8 às 17h.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____ . Declara ter sido esclarecido que não

receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de decisão sobre participar ou não do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ___/___/___

Nome: _____ **Assinatura:** _____

Nome do responsável legal: _____ **Assinatura:** _____

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ___/___/___

Pesquisador que aplica o termo: _____

Assinatura: _____



Giovana Brondani Biancini <giovana.bb@gmail.com>

A manuscript number has been assigned: CCA-D-16-001441 mensagem

Alan Wu <us-cca@comcast.net>
Para: giovana.bb@gmail.com

7 de fevereiro de 2016 20:29

Ms. Ref. No.: CCA-D-16-00144

Title: Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy
Clinica Chimica Acta

Dear Miss. Giovana Brondani Biancini,

Your submission entitled "Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy" has been assigned the following manuscript number: CCA-D-16-00144.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/cca/>. Your username is: giovana.bb@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/cca/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Clinica Chimica Acta



Giovana Brondani Biancini <giovana.bb@gmail.com>

A manuscript number has been assigned: MUT-D-16-000231 mensagem

Mutation Research <Jan.Vijg@einstein.yu.edu>

18 de fevereiro de 2016 09:44

Para: giovana.bb@gmail.com

Ms. Ref. No.: MUT-D-16-00023

Title: Globotriaosylsphingosine cytotoxicity: new insights from oxidative DNA damage
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

Dear Dr. Brondani Biancini,

Your submission "Globotriaosylsphingosine cytotoxicity: new insights from oxidative DNA damage" has been assigned manuscript number MUT-D-16-00023.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/mut/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.

Kind regards,

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.