

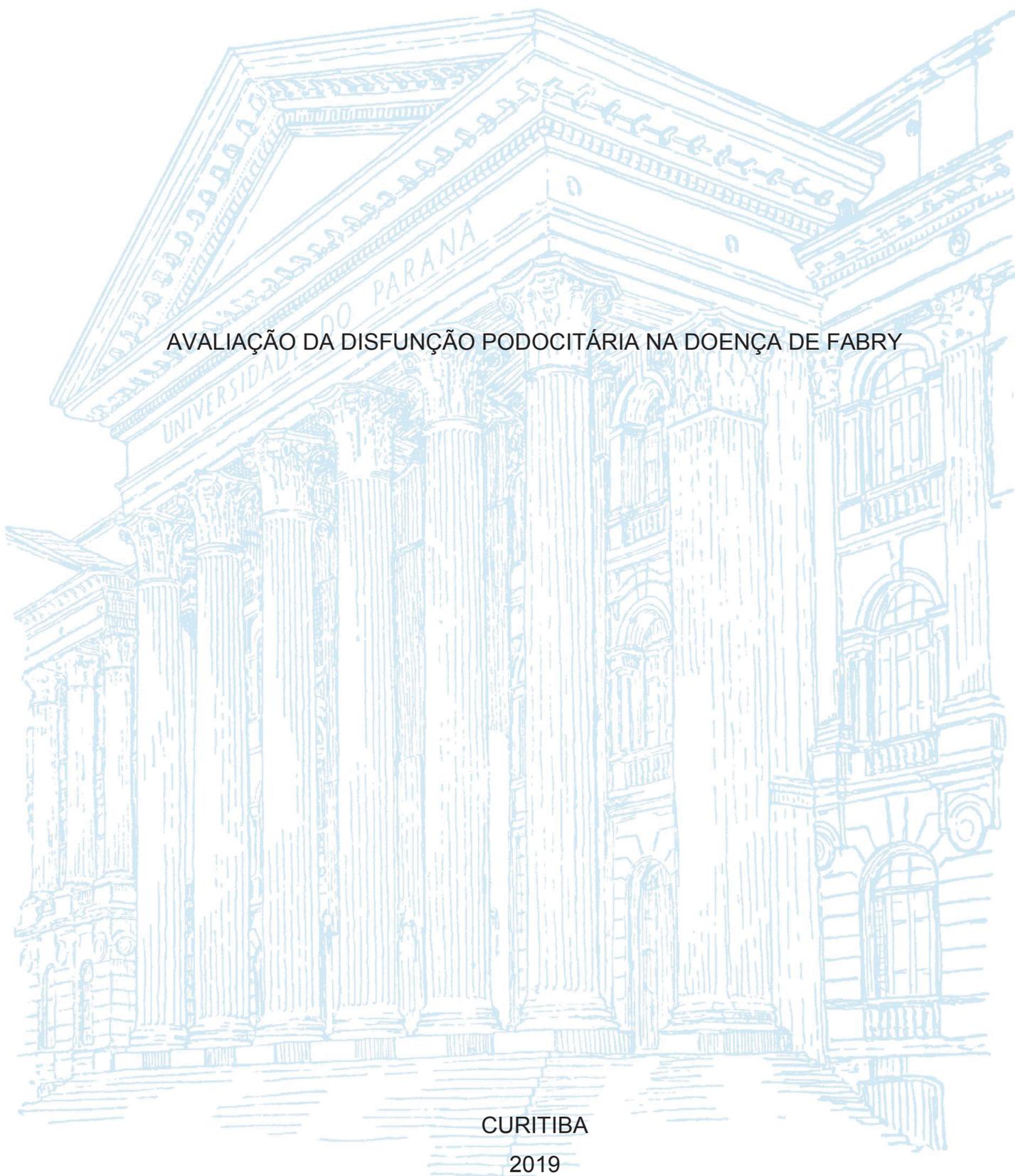
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA BOSQUETTI

AVALIAÇÃO DA DISFUNÇÃO PODOCITÁRIA NA DOENÇA DE FABRY

CURITIBA

2019



## AVALIAÇÃO DA DISFUNÇÃO PODOCITÁRIA NA DOENÇA DE FABRY

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Emília Marques Stinghen

Co-orientador: Prof. Dr. Felype Barreto

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

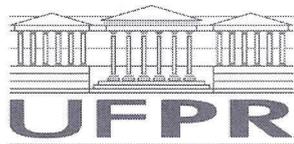
Bosquetti, Bruna  
Avaliação da disfunção podocitária na Doença de Fabry. / Bruna  
Bosquetti. – Curitiba, 2019.  
59 p.: il.

Orientador: Andréa Emília Marques Stinghen  
Coorientador: Fellype Barreto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia.

1. Doença de Fabry I. Título II. Stinghen, Andréa Emília Marques III.  
Barreto, Fellype de Carvalho IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 616.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA BOSQUETTI** intitulada: **Avaliação da disfunção podocitária na Doença de Fabry**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Abril de 2019.

ANDREA EMILIA MARQUES STINGHEN  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

RAFAEL LUIZ PEREIRA  
Avaliador Externo (UFPR)

JULIANA FERREIRA DE MOURA  
Avaliador Interno (UFPR)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carmen e Claudio.

A minha avó, Yonice.

Ao meu amor, Anderson.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pelo amor e apoio incondicional, por sempre estarem presentes em todas as fases da minha vida. Palavras não seriam suficientes para demonstrar o tamanho de minha gratidão.

Ao meu amor, Anderson, por dar um novo sentido para minha vida e tornar minha jornada muito mais feliz. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Stinghen, por me apresentar ao mundo da ciência desde a primeira vez que entrei em um laboratório e pelas várias oportunidades que me deu no decorrer da vida, sempre me apoiando e incentivando nos caminhos que escolhi. Você é um exemplo para mim e sempre fará parte da minha história.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fellype Barreto, por suas sábias contribuições na construção desse trabalho.

Aos meus colegas do LabNefro, Giane, Julia, Rayana, Regiane, Paulo e Renato, por toda a amizade, ajuda, conselhos e inúmeros momentos de alegria compartilhados.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, por contribuírem de diversas maneiras na minha formação acadêmica e profissional.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Célia Regina Cavichiolo Franco, por sempre auxiliar e aconselhar os melhores caminhos na microscopia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, em especial a técnica Débora, por me auxiliar imensamente nas condições especiais para o cultivo das minhas células.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela minha formação e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por tornar esse trabalho factível.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram na realização desse trabalho.

Muito obrigada!

## EPÍGRAFE

“Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas! ”

**Mário Quintana**

## RESUMO

A doença de Fabry (DF) é definida como uma doença rara, de caráter hereditário, ligada ao cromossomo X. É causada por diferentes mutações no gene GALA que codifica a enzima  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GLA). A falta dessa enzima ou sua baixa atividade gera acúmulo lisossomal de glicoesfingolípídeos, sobretudo de globotriaocilceramida (Gb3). A deposição Gb3 nos lisossomos ocorre de modo progressivo e atinge diferentes tipos celulares, levando ao acometimento renal, cardíaco e/ou cerebrovascular nesses pacientes. A disfunção podocitária está ligada ao processo de lesão renal e é apontada como uma das principais causas da proteinúria. Devido a sua morfologia, os podócitos possuem papel chave no processo fisiológico dos rins. O principal objetivo desse trabalho foi investigar os mecanismos fisiopatológicos levam a perda de adesão podocitária na DF, por meio da investigação *in vitro* de alterações morfológicas e expressão gênica da integrina  $\alpha 3\beta 1$ , principal molécula de adesão fical dessa célula. Desta forma, uma linhagem de podócitos murinos foi utilizada para os experimentos. A fim de induzir o acúmulo lipídico lisossomal, mimetizando a DF, realizou-se o bloqueio farmacológico da  $\alpha$ -GLA dos podócitos por meio do composto cloroquina, sendo que a concentração de uso da droga foi estabelecida em ensaio de viabilidade após construção de uma curva dose-resposta, padronizando-se a concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para confirmar o acúmulo lisossomal induzido pela cloroquina, foram realizados os experimentos de vermelho neutro e imunofluorescência com marcação para lisossomos que confirmaram o aumento significativo dessa organela ( $P < 0,0001$ ). Mudanças conformacionais puderam ser observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura e imunofluorescência com marcação para actina-F e núcleo. A expressão gênica da integrina  $\alpha 3\beta 1$  foi avaliada por meio de RT-qPCR, demonstrando um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) da expressão das duas cadeias que a compõe. Nosso trabalho propõe um novo modelo *in vitro* para o estudo da nefropatia de Fabry secundário ao bloqueio farmacológico da  $\alpha$ -GLA pela cloroquina, o qual induz a modulação da expressão da integrina  $\alpha 3\beta 1$  e a alteração morfológica da célula. Esses resultados são semelhantes a trabalhos anteriores *in vitro* para a nefropatia diabética, corroborando com estudos *in vivo* que sugerem um histórico fisiopatológico similar dessas duas nefropatias. Sintomas como podocitúria, microalbuminúria e proteinúria são achados comuns a essas duas doenças. Dessa forma, esse trabalho abre perspectivas para elucidar os mecanismos celulares e moleculares da nefropatia de Fabry, podendo contribuir no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas, visando melhorar a sobrevida dos pacientes.

Palavras chave: Doença de Fabry. Podócitos. Integrina  $\alpha 3\beta 1$ .

## ABSTRACT

Fabry disease (FD) is defined as a rare, hereditary, X-linked pathology. It is caused by different mutations in the GALA gene that encodes the  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GLA) enzyme. The lack of this enzyme or its low activity generates lysosomal accumulation of glycosphingolipids, especially of globotriaocilceramide (Gb3). Gb3 deposition in lysosomes occurs progressively and reaches different cell types, leading to renal, cardiac and / or cerebrovascular involvement in these patients. Podocyte dysfunction is linked to the process of renal injury and is indicated as one of the main causes of proteinuria. The podocytes play a key role in the physiological process of the kidneys, due its morfology. The aim of the present study was investigate the pathophysiological mechanisms leading to loss of podocyte adhesion in the DF through in vitro investigation of morphological alterations and gene expression of the  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin, main podocyte's adhesion molecule. Therefore, a line of murine podocytes was used for the experiments. In order to induce lysosomal lipid accumulation, a pharmacological blockade of the podocyte's  $\alpha$ -GLA was made using the chloroquine compound, mimicking FB. The concentration used of the drug was established by a cell viability test after the construction of a dose-response curve and was standarted the concentration of 1  $\mu$ g / mL. To confirm lysosomal accumulation induced by chloroquine, neutral red and immunofluorescence experiments were performed with lysosomal labeling, that confirmed a significant increase of this organelle (P <0.0001). Conformational changes could be observed by scanning electron microscopy and immunofluorescence with F-actin and nucleus marking. Gene expression of the  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin was evaluated by RT-qPCR, demonstrating a significant increase (P <0.01) in the expression of the two chains that compose it. Our work proposes a new in vitro model for the study of Fabry nephropathy secondary to the pharmacological blockade of  $\alpha$ -GLA by chloroquine, which induces modulation of  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin expression and morphological alteration of the cell. These findings corroborate with previous in vivo studies that have suggested a similar pathophysiologic background of these two nephropathies. Symptoms such as podocytria, microalbuminuria and proteinuria are common findings in these two diseases. Thus, this work opens perspectives to elucidate cellular and molecular mechanisms of Fabry nephropathy and may contribute to the development of new therapeutic targets to this disease, aiming the survival improvement of these patients.

Key words: Fabry Disease. Podocytes.  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Arquitetura celular podocitária .....	23
<b>Figura 2</b> – Redes de interação dos podócitos entre célula-célula e célula-matriz (adesão focal).....	25
<b>Figura 3</b> - Cultivo celular dos podócitos.....	34
<b>Figura 4</b> - Avaliação da viabilidade celular frente a diferentes concentrações de cloroquina.....	35
<b>Figura 5</b> - Quantidade de lisossomos frente ao tratamento com cloroquina.....	36
<b>Figura 6</b> - Avaliação do acúmulo lisossomal após tratamento com cloroquina.....	37
<b>Figura 7</b> - Análise morfológica e ultraestrutural dos podócitos após tratamento com cloroquina.....	39
<b>Figura 8</b> - Avaliação do citoesqueleto de actina após tratamento com cloroquina ...	42
<b>Figura 9</b> - Expressão relativa do gene ITGB1 determinada por RT-qPCR .....	44
<b>Figura 10</b> - Expressão relativa do gene ITGA3 determinada por RT-qPCR .....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais órgãos/sistemas afetados pela DF .....	19
<b>Tabela 2</b> – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

BFG	Barreira de Filtração Glomerular
CV	Cristal Violeta
DF	Doença de Fabry
DRC	Doença Renal Crônica
EPM	Erro Padrão da Média
Gb3	Globotriaocilceramida
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
ITGA3	<i>Integrin Subunit Alpha 3</i>
ITGB1	<i>Integrin Subunit Beta 1</i>
Liso-Gb3	Globotriaocilesfingolisina
MBG	Membrana Basal Glomerular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
ND	Nefropatia Diabética
RT-PCR	Reação de cadeia da polimerase com transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação de cadeia da polimerase quantitativo com transcriptase reversa
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
VN	Vermelho Neutro
$\alpha$ -GLA	$\alpha$ -Galactosidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1 DEFINIÇÃO .....	15
3.2 EPIDEMIOLOGIA .....	17
3.3 ASPECTOS GENÉTICOS .....	17
3.4 FISIOPATOLOGIA .....	18
3.5 TRATAMENTO .....	20
3.6 ENVOLVIMENTO RENAL .....	21
3.6.1 Disfunção podocitária .....	22
3.7 INTEGRINA $\alpha 3\beta 1$ .....	24
3.8 CLOROQUINA .....	26
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
5.1 CULTIVO CELULAR .....	28
5.2 VIABILIDADE CELULAR.....	28
5.3 VERMELHO NEUTRO E CRISTAL VIOLETA.....	29
5.4 VISUALIZAÇÃO DE LISOSSOMOS E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	30
5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	30
5.6 VISUALIZAÇÃO DE ACTINA E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	31
5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INTEGRINA $\alpha 3\beta 1$ POR RT-qPCR.....	32
5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	33

<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>6.1 CULTIVO CELULAR</b> .....	<b>34</b>
6.2 VIABILIDADE CELULAR.....	34
6.3 VERMELHO NEUTRO E CRISTAL VIOLETA.....	36
6.4 VISUALIZAÇÃO DE LISOSSOMOS E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	37
6.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	38
6.6 VISUALIZAÇÃO DE ACTINA E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	41
6.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INTEGRINA $\alpha 3\beta 1$ POR RT-qPCR.....	43
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>50</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Fabry (DF) pode ser definida como uma doença de caráter hereditário, ligada ao cromossomo X. É causada por diferentes mutações no gene GALA, que codifica a expressão da enzima hidrolase  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GLA). A falta dessa enzima ou sua baixa atividade gera acúmulo lisossomal de glicoesfingolipídeos, sobretudo de globotriaocilceramida (Gb3). A deposição celular ocorre de modo progressivo e atinge diferentes tipos celulares, afetando tecidos por todo o organismo. O espectro de apresentações clínicas é amplo e inclui o fenótipo masculino clássico, fenótipos variantes de início tardio e apresentações clínicas variáveis em pacientes do sexo feminino (BOGGIO et al., 2009; NAKAO et al., 2003; NAGAMATSU et al., 2017; SHU et al., 2014).

A DF pertence a um grupo de pelo menos 50 distúrbios de armazenamento lisossomal. É considerada uma doença rara, a incidência estimada na população é de 1:117.000 nascidos vivos. Porém, acredita-se que esse número possa estar subestimado graças a sintomatologia inespecífica que os pacientes apresentam, levando a certa dificuldade diagnóstica (GERMAIN, 2010; MEIKLE et al., 1999).

Os primeiros sintomas da doença aparecem, principalmente, na pele (angioqueratomas) e nas inervações periféricas (acroparestesia). Com o decorrer do tempo, pode levar a morte na idade adulta devido a complicações renais, cardíacas ou cerebrovasculares. O diagnóstico laboratorial é baseado na detecção da baixa atividade da enzima  $\alpha$ -GLA nos pacientes. Porém, como existem diferentes mutações, esse nível de atividade pode ser variável. Além disso, as mulheres heterozigotas podem possuir resultados semelhantes à população normal. Por isso, como confirmação, devem ser realizados testes de biologia molecular para encontrar a mutação no gene GALA (BOGGIO et al., 2009 e ROZENFELD et al., 2006). O tratamento específico para a DF pode ser realizado por meio da terapia de reposição enzimática (TRE) e, quando o tipo de mutação permite, por chaperonas farmacológicas (GERMAIN et al., 2016; GUCE, 2011; SHII, 2012; BROUNS et al., 2007; DEGIRMENCI et al., 2017).

O acometimento dos rins é uma das principais causas de morte e incapacidade na DF. Os principais danos encontrados, na versão clássica da doença, são a lesão glomerular, glomerulosclerose, proteinúria e microalbuminúria, culminando na doença renal terminal (NAGAMATSU et al., 2017). Dados da literatura demonstram que a disfunção podocitária está ligada a esse processo de lesão renal e é uma das principais causas da proteinúria que acomete esses pacientes (NAJAFIAN et al., 2011). Estudos clínicos demonstram que a podocitúria ocorre de forma acentuada nos indivíduos portadores da DF, mesmo na ausência de proteinúria e albuminúria, sendo um evento que antecede a diminuição da função renal e pode ser utilizada como um parâmetro de prognóstico para a avaliação do estágio de comprometimento nesses pacientes (FALL et al., 2016 ;TRIMARCHI et al., 2016). Os mecanismos fisiopatológicos que levam ao destacamento dos podócitos da Membrana Basal Glomerular (MBG) ainda não são claros. Sabe-se que a principal molécula que medeia a ligação entre o citoesqueleto de actina e os componentes da MBG é a integrina  $\alpha3\beta1$ , que será o principal alvo de investigação nesse estudo (SACHS; SONNENBERG, 2013).

Nesse contexto, o principal objetivo desse trabalho foi investigar *in vitro* os mecanismos celulares e moleculares que levam à diminuição da adesão podocitária a membrana basal glomerular, que caracteriza os quadros de podocitúria e proteinúria nos pacientes com DF. Avanços nessa área podem contribuir no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas, visando melhorar a sobrevida dos pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar os mecanismos que levam a perda de adesão podocitária devido ao acúmulo lisossomal de Gb3.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar *in vitro* os efeitos da DF induzida farmacologicamente sobre o processo de adesão podocitária;
- Avaliar inclusões lisossomais por meio de imunofluorescência e ensaio de vermelho neutro (VN) normalizado por cristal violeta (CV);
- Detectar alterações morfológicas celulares por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e imunofluorescência com marcação para actina-F e núcleo;
- Avaliar a expressão gênica da integrina  $\alpha3\beta1$  por meio de RT-qPCR.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DEFINIÇÃO

A DF é uma condição patológica genética ligada ao cromossomo X. É causada por diferentes mutações no gene que codifica para a  $\alpha$ -GLA. A ausência ou baixa atividade dessa enzima resulta em acúmulo lisossomal de glicoesfingolipídeos como a globotriaocilceramida, galabioilceramida e globotriaocilesfingolisina (liso-Gb3) (NAGAMATSU et al., 2017; SHU et al., 2014). Na DF, ocorre deposição progressiva, sobretudo de Gb3, em uma variedade de células, incluindo células endoteliais, renais (podócitos, células tubulares, células mesangiais e células intersticiais), cardíacas (cardiomiócitos e fibroblastos) e células nervosas (BOGGIO et al., 2009; NAKAO et al., 2003).

A DF é classificada em três subtipos principais: clássica, tardia e feminina. O fenótipo clássico se desenvolve em homens hemizigotos que tem pouca ou nenhuma atividade enzimática da  $\alpha$ -GLA, alguns sintomas nesses pacientes aparecem já durante a infância, como: acroparestesia, hipohidrose e angioqueratoma. Com o avançar da idade, a ocorrência de falência renal, doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (AVC) os levam a morte prematura. Estima-se que os pacientes clássicos da DF apresentam uma redução em 20 anos da expectativa de vida em relação a população normal. O fenótipo tardio se desenvolve em homens que ainda possuem certa atividade enzimática da  $\alpha$ -GLA e maioria dos sintomas aparecem durante a idade adulta (MACDERMOT et al., 2001; NAGAMATSU et al., 2017). Inicialmente, acreditava-se que as pacientes do sexo feminino heterozigotas com mutação de  $\alpha$ -GLA não eram clinicamente afetadas. Porém, um estudo envolvendo 1077 mulheres portadoras do gene GALA mutante, mostrou que 69,4% delas apresentaram sintomatologia e sinais da DF no decorrer da vida, caracterizando, assim, o fenótipo feminino dessa doença (WILCOX et al., 2008).

Os primeiros sintomas da DF ocorrem principalmente na pele e nas inervações periféricas, sendo achados comuns nesses pacientes: angioqueratoma, angioma, telangiectasia, linfedema, hipoidrose, acroparestesia e córnea verticilata (DEGIRMENCI et al., 2017). A DF normalmente leva a morte na idade adulta devido a complicações renais, cardíacas ou cerebrovasculares (TURKMEN et al., 2016).

O diagnóstico é feito com base no quadro clínico, na história familiar e na procura ativa da doença em grupos de risco (“*screenings*”), como pacientes em diálise, pacientes com hipertrofia miocárdica sem causa aparente e pacientes com acidente vascular encefálico precoce (ABENSUR; REIS, 2016). O diagnóstico laboratorial da DF é baseado na detecção da baixa atividade da enzima  $\alpha$ -GLA no plasma, leucócitos, fibroblastos ou na técnica de gotas de sangue no papel de filtro. A determinação da atividade enzimática em homens classicamente afetados é viável. Porém, nas mulheres ou homens de fenótipo tardio pode ser inconclusiva já que alguns portadores da doença podem possuir níveis enzimáticos semelhantes aos da população geral. Neste caso, como teste confirmatório, deve ser realizado biologia molecular para encontrar a mutação específica no gene GALA (BOGGIO et al., 2009 e ROZENFELD et al., 2006). Os portadores da DF, de início tardio e feminino, têm o aparecimento dos sintomas somente na idade adulta e frequentemente carecem de histórico familiar relevante, existe a preocupação de que muitos pacientes de DF são subdiagnosticados e classificados como portadores de outras doenças (NAGAMATSU et al., 2017).

Segundo Schiffmann et al. (2013), os níveis de Gb3 estão frequentemente elevados na urina dos pacientes com DF e esses autores defendem a sua utilização como um biomarcador de diagnóstico. No caso da concentração plasmática de Gb3, ela mostra-se consistentemente elevada nos homens hemizigotos mas em níveis variáveis em homens com atividade enzimática residual e em mulheres heterozigotas. Não sendo, portanto, um biomarcador plasmático ideal (SCHIFFMANN et al., 2013). Alguns autores demonstraram que um metabólito de Gb3, o liso-Gb3, possui níveis séricos marcadamente elevados nos pacientes com DF e esses níveis diminuem quando inicia-se a TRE. Dessa forma, o liso-Gb3 pode ser considerado um bom biomarcador circulante para o monitoramento da doença (AERTS et al., 2008).

### 3.2 EPIDEMIOLOGIA

A DF pertence a um grupo de pelo menos 50 distúrbios de armazenamento lisosomal geneticamente distintos. É considerada uma doença rara, a incidência estimada na população mundial é de 1:117.000 nascidos vivos. Porém, acredita-se que esse número possa estar subestimado graças a sintomatologia inespecífica que os pacientes apresentam (GERMAIN, 2010; MEIKLE et al., 1999). Na Itália, foi demonstrado em estudos de triagem neonatal uma alta incidência da DF (1:3100) com a variante de início tardio em recém-nascidos masculinos (SPADA et al., 2006).

Alguns estudos epidemiológicos identificaram DF em 6,3% dos pacientes com cardiomiopatia hipertrófica idiopática de início tardio e em 0,02-1,2% dos pacientes submetidos a terapia renal substitutiva (diálise) (BROUNS et al., 2007). Estima-se que a DF seja a causa de 1% de doenças cerebrovasculares de origem desconhecida nos pacientes jovens (BROUNS et al., 2010) e o AVC foi descrito em 13-25% dos pacientes portadores da DF (MACDERMOT et al., 2001).

Estudo realizado por Turkmen *et al.* (2016) em um grupo de 313 pacientes portadores de Doença Renal Crônica (DRC) foram submetidos a um exame de atividade enzimática da  $\alpha$ -GLA, no qual 3 pacientes foram diagnosticados pela primeira vez com DF. Os autores demonstraram como essa doença pode estar sendo subdiagnosticada e os valores epidemiológicos podem estar subestimados.

### 3.3 ASPECTOS GENÉTICOS

O gene afetado na DF denomina-se GALA e é encontrado na região Xq22.1 do cromossomo X. O GALA tem cerca de 12kb de comprimento e contém cerca de sete éxons que variam entre 92 e 291 pares de bases (BOGGIO et al., 2009; CHIMENTI et al. 2004). A anomalia genética que causa DF é muito heterogênea. Foram relatadas mais de 900 mutações no gene GALA, que ocorrem geralmente em famílias isoladas. Sendo as mutações mais comuns, aquelas em que existe a troca de

apenas um aminoácido ou o bloqueio da expressão devido a inserção de um *stop codon* (ORTIZ; SANCHEZ-NIÑO, 2016; YALIN et al., 2019). Também, são relatadas condições genéticas como o mosaïcismo na ocorrência da DF (MAUER et al., 2014).

Devido a constituição cromossomal dos seres humanos, a DF apresenta alta penetrância nos hemizigotos e manifestações variáveis nas heterozigotas (FELLGIEBEL et al., 2014). Sabe-se que as heterozigotas não são apenas carreadoras da mutação, também apresentam sinais e sintomas da doença no decorrer da vida (VON DER LIPPE et al., 2016; WANG et al., 2007).

A correlação genótipo-fenótipo na DF ainda permanece controversa. Dentro de uma família, a mesma mutação pode gerar fenótipos diferentes e, ainda, novas mutações são constantemente documentadas. Portanto, a ausência de histórico familiar não exclui o diagnóstico de DF (BOGGIO et al., 2009; ROZENFELD et al., 2006).

### 3.4 FISIOPATOLOGIA

A DF faz parte de um conjunto de doenças denominadas de “doenças de depósito lisossomal” (SUN, 2009). O acúmulo lisossomal de glicoesfingolipídeos, devido ao mal funcionamento da  $\alpha$ -GLA, é o evento patológico inicial na DF e começa desde a vida intrauterina nos pacientes classicamente afetados (VEDDER et al., 2006; WANNER, 2007). Estudos mostram que o excesso de Gb3, induz ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio por células endoteliais e o consequente estresse oxidativo, além de promover o aumento da expressão de moléculas de adesão como MCP-1, VCAM-1 e E-selectina (SHEN et al., 2008). Francesco *et al.* (2013), demonstraram que altos níveis de Gb3 induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas e monócitos, gerando um estado altamente inflamatório nesses pacientes. Em alguns tecidos específicos, outros mecanismos adicionais contribuem para o desenvolvimento da doença. Estudos mostram que no coração, por exemplo, vias de sinalização determinantes de hipertrofia, apoptose, necrose e fibrose são ativadas devido ao acúmulo lisossomal e no sistema nervoso

ocorre uma reação anormal da vasculatura e ativação da cascata de coagulação (MEHTA; GINSBERG, 2005).

Achados histopatológicos demonstram que os depósitos lisossomais na DF ocorrem predominantemente no endotélio e na camada média de pequenos vasos, túbulos renais e glomérulos, músculo cardíaco e fibras condutoras, gânglios autônomos e estruturas cerebrais (MACDERMOT et al., 2001). Dados que corroboram com o envolvimento patológico renal, cardíaco e do sistema nervoso encontrados nesses pacientes (ORTIZ; SANCHEZ-NIÑO, 2016). Portanto, o acúmulo lipídico nas células desencadeia uma cascata progressiva de processos que levam à alteração da estrutura celular, injúria tecidual e à consequente falência do órgão (SEYDELMANN et al., 2015).

Na Tabela 1 pode ser observado os diferentes órgãos/sistemas afetados pela DF, demonstrando o caráter pleiotrópico dessa doença.

**Tabela 1 – Principais órgãos/sistemas afetados pela DF**

SISTEMA	COMPLICAÇÃO
Oftalmológico	Córnea <i>verticillata</i> , vasos tortuosos, catarata
Dermatológico	Angioqueratoma, hipo/anidrose, telangiectasia, linfedema
Neurológico	Dor neuropática, ataque hisquêmico transitório, acidente vascular cerebral, complicações psiquiátricas (depressão)
Cardíaco	Hipertrofia ventricular esquerda, anormalidades na frequência cardíaca, morte súbita
Renal	Proteinúria, redução da taxa de filtração glomerular
Gastrointestinal	Diarreia, constipação. saciedade precoce, náusea
Respiratório	Tosse, chiado, limitação no fluxo de ar

FONTE: adaptado de CAIRNS et al. (2018).

### 3.5 TRATAMENTO

Uma das formas de tratamento específico para a DF é a TRE. Atualmente, existem duas formulações da enzima: a agalsidase alfa (Replagal, Shire HGT, Cambridge, MA, USA) e agalsidase beta (Fabrazyme, Genzyme Corporation) que são baseadas em preparações de enzimas produzidas em fibroblastos humanos e em cultura de células de ovário de hamster chinês, respectivamente (NEUMANN et al., 2013; ROZENFELD, 2009). A TRE é realizada através de infusão endovenosa e deve ser administrada a cada duas semanas no decorrer da vida dos pacientes. A dose a ser utilizada é de 0,2 mg/kg para os preparos com agalsidase alfa e 1mg/kg para a agalsidase beta. Essas enzimas são capazes de serem incorporadas pelas células e, assim, catabolizar os glicosfingolipídeos acumulados, reduzindo os sintomas da doença (FELLGIEBEL et al., 2014; SEYDELMANN et al., 2015; TONDEL et al., 2013). Um estudo recente demonstrou que a enzima agalsidase beta possui melhor desempenho do que a agalsidase alfa e é mais recomendada para a prevenção de efeitos renais, cardiovasculares e cerebrovasculares na DF. Não havendo diferença significativa nos efeitos colaterais (DIB et al., 2017).

A importância da TRE é elucidada por meio de estudos como o realizado por Tondel et al. (2013), por exemplo, em que foi monitorado o impacto a longo prazo desse tratamento na morfologia de células renais. Uma coorte de 12 pacientes (idade entre 7 – 33 anos) foram submetidos a TRE durante 5 anos (utilizando ambas as enzimas disponíveis no mercado) e foram realizadas biopsias renais antes e após o tratamento. Os resultados mostraram que, após decorrido esse tempo de TRE, ocorreu uma depuração total das inclusões lipídicas glomerulares endoteliais e mesangiais em todos os indivíduos e, aqueles pacientes que receberam a dose mais alta da enzima, tiveram uma depuração significativa (mas não total) das inclusões podocitárias de Gb3. Além disso, a TRE com início durante a infância pode trazer uma melhora na qualidade de vida e atenuação da progressão da doença (HOPKIN et al., 2016).

Uma outra abordagem de tratamento, passível de ser utilizada somente em alguns tipos de mutação, é a administração oral de uma chaperona farmacológica. Conhecida comercialmente como Galafold™ (Amicus Therapeutics, Cranbury, Nova Jersey, USA) essa molécula é capaz de se ligar a enzima  $\alpha$ -GLA e deixa-la na conformação correta para que consiga adentrar nos lisossomos e desempenhar sua função na metabolização dos glicosfingolipídeos (GERMAIN et al., 2016; GUCE, 2011; SHIL, 2012). Um estudo realizado por Hughes et al. (2017), com 54 pacientes durante o período de 18 meses, comparou o efeito do Galafold™ em relação a TRE avaliando os parâmetros renais, cardíacos, níveis séricos de Gb3 e relatos de sintomatologia dos pacientes. Não houve diferença significativa entre as duas abordagens em todos esses parâmetros. Isso mostra, que nas mutações em que a chaperona farmacológica é possível de ser utilizada, pode ser considerada como droga de primeira escolha por ser segura, bem tolerada e de mais fácil administração (HUGHES et al., 2017).

Além dos tratamentos específicos, como uma tentativa de aliviar os sintomas mais gerais da doença, como as dores periféricas e os sintomas gastrointestinais, são administrados medicamentos como analgésicos, anti-inflamatórios, carbamazepina, gabapentina, pregabalina, antiespasmódicos, antidiarreicos, entre outros (NEUMANN et al., 2013; ROZENFELD et al., 2006).

### 3.6 ENVOLVIMENTO RENAL

O envolvimento renal da DF foi reportado desde as primeiras descobertas sobre a doença pelos pesquisadores Anderson e Fabry no final do século XIX (MAHMUD, 2014). O acometimento dos rins é uma das principais causas de morte e incapacidade nessa doença, ocorre devido ao acúmulo do Gb3 em praticamente todos os tipos de células renais, como nas células endoteliais, mesangiais, podocitárias e tubulares. Portanto, os pacientes podem apresentar distúrbios tanto das funções glomerulares como nas tubulares (GERMAIN D.P. , 2010). Os principais danos encontrados, na versão clássica da doença, são a lesão glomerular, glomerulosclerose, proteinúria,

microalbuminúria e hematúria, culminando na doença renal terminal (NAGAMATSU et al., 2017). Ultraestruturalmente, além da glomerulosclerose, outra característica marcante da DF é a vacuolização das células epiteliais e dos podócitos. Esses achados histopatológicos podem ser encontrados mesmo naqueles pacientes que possuem taxa de filtração glomerular (TFG) normal e proteinúria mínima (GUBLER et al., 1978; WALDEK; FERIOZZI, 2014). A biópsia renal é uma abordagem importante pois permite fazer uma avaliação das lesões renais e, além disso, ajuda a avaliar a eficácia terapêutica da TRE. Em indivíduos, sem histórico familiar, afetados inexplicavelmente com proteinúria ou insuficiência renal, essa abordagem pode revelar a DF (PISANI et al., 2014; MALADES, 2005).

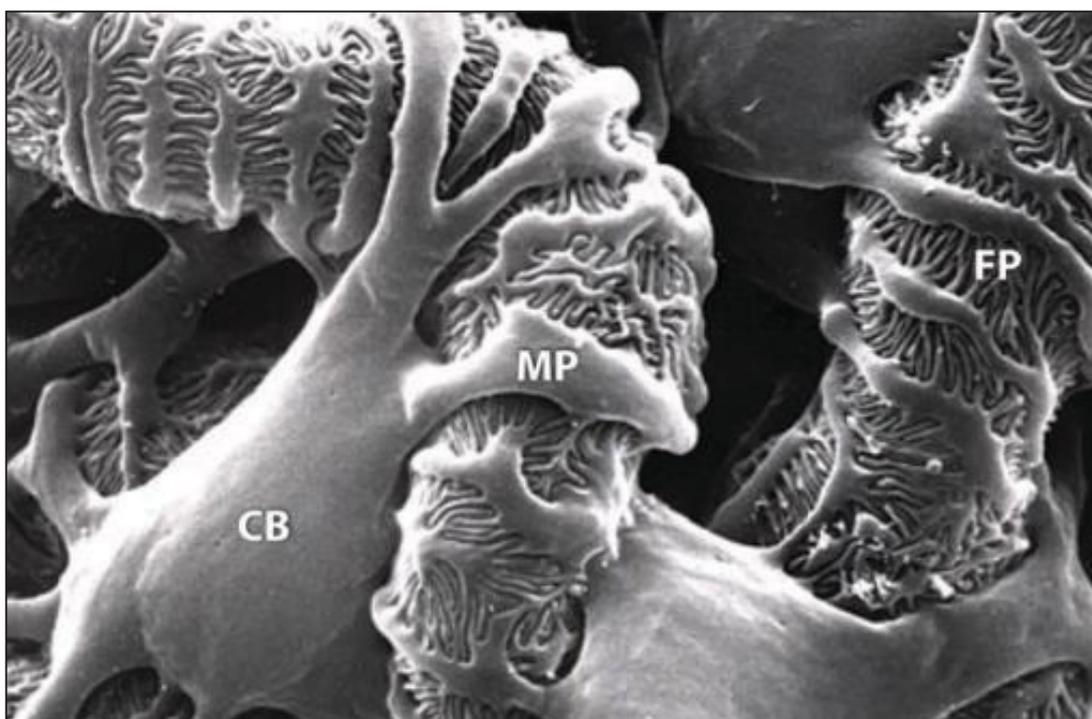
Tøndel *et al.* (2015) realizaram biópsia renal em oito crianças com DF que apresentavam apenas acroparestesia como sintomatologia. Mesmo com a função renal normal, já foram encontrados depósitos de Gb3 nos podócitos e o apagamento de seus pedicelos (TØNDEL et al., 2015). Além disso, estudos mostram que os pacientes com DF que atingem o estágio de insuficiência renal possuem um risco aumentado no acometimento de outros órgãos, apresentando uma incidência maior de problemas cardiovasculares e cerebrovasculares (ORTIZ et al., 2010). Uma investigação proposta por Yalin et al. (2019), em que foram avaliados 5657 pacientes receptores de transplante de rim, foram encontrados 17 pacientes portadores da DF. Nesse estudo, foram encontradas mutações em pacientes em que já se presumia haver uma outra doença primária que levou ao acometimento renal. Esses estudos, ressaltam a importância do correto e precoce diagnóstico da DF para que o tratamento possa conter a progressão da doença e para que um aconselhamento genético previna seu aparecimento em gerações futuras (YALIN et al., 2019; TØNDEL et al., 2013).

### 3.6.1 Disfunção podocitária

Podócitos são células epiteliais altamente especializadas que cobrem a membrana basal glomerular (MBG) através de seus prolongamentos celulares, chamados pedicelos. A morfologia celular dos podócitos consiste em basicamente três

divisões principais: o corpo celular, processos primários e processos secundários (pedicelos), como pode ser observado na Figura 1. Os podócitos são um componente de grande importância na BFG, pois estão envolvidos nos processos de síntese da MBG e interagem com o endotélio mantendo sua viabilidade, assim formam a estrutura em que ocorre o processo de filtração do sangue (NAGATA, 2016). Nesse sentido, a disfunção podocitária possui papel chave no desenvolvimento da nefropatia de Fabry e se assemelha muito a nefropatia diabética (ND) (ORTIZ, SANCHEZ-NIÑO, 2016; GREKA, MUNDEL, 2013).

**Figura 1** – Arquitetura celular podocitária



NOTA: MEV mostrado a estrutura celular dos podócitos, em que: CB = *cell body* (corpo celular); MP = major process (processo primário); FP = foot process (pedicelo).

FONTE: adaptado de Greka e Mundel (2013).

Por serem células completamente diferenciadas, o acúmulo lipídico é mais acentuado do que em células que possuem uma taxa de multiplicação relativamente maior, como é o caso do endotélio. Mesmo após o início da TRE, a depleção dos estoques de Gb3 não ocorre totalmente nos podócitos, diferentemente das outras

células renais (NAJAFIAN et al., 2011; ORTIZ; SANCHEZ-NIÑO, 2016; TØNDEL et al., 2013).

Foi demonstrado, por meio de microscopia eletrônica, que o processo de proteinúria está associado a mudanças na arquitetura dos podócitos. Tais mudanças compreendem a perda ou o apagamento de seus pedicelos, que são estruturas essenciais para a seletividade da BFG (VAN DEN BERG et al., 2004). Em um estudo de histologia renal realizado antes da TRE em 14 pacientes jovens (faixa etária: 4-19 anos), portadores da DF, foi observado que o volume e a densidade da inclusão podocitária de Gb3 aumentou junto com a idade. O mesmo ocorreu com o aumento do distanciamento dos podócitos em relação aos capilares e foi diretamente correlacionado com proteinúria (NAJAFIAN et al., 2011). O apagamento dos pedicelos podocitários na biópsia é considerado, por alguns autores, como um marcador precoce da nefropatia de Fabry nos pacientes classicamente afetados, ressaltando a importância dessa estrutura celular no desempenho de sua atividade (TØNDEL et al., 2015).

Estudos clínicos demonstram que a podocitúria ocorre de forma acentuada nos indivíduos portadores da DF, mesmo na ausência de proteinúria e albuminúria. Portanto, a podocitúria é um evento que antecede a diminuição da função renal e pode ser utilizada como um parâmetro de prognóstico para a avaliação do estágio de comprometimento nesses pacientes (FALL et al., 2016 ;TRIMARCHI et al., 2016). Porém, os mecanismos que levam ao destacamento dos podócitos da membrana basal ainda não são claros.

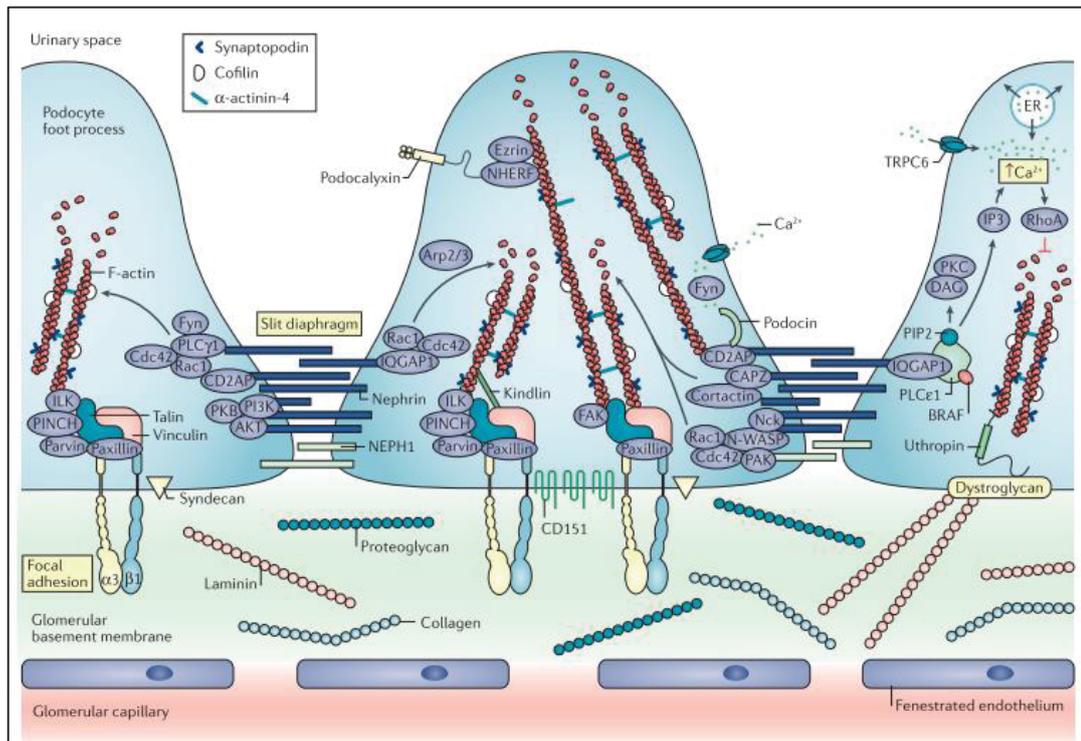
### 3.7 INTEGRINA $\alpha 3\beta 1$

As integrinas são uma das maiores famílias de receptores de adesão celular, promovendo a ligação entre o citoesqueleto de actina com a matriz extra celular. Além das funções de adesão, também funcionam como transdutoras de sinal e contribuem com processos de diferenciação celular, morfogênese, proliferação e migração. Portanto, as integrinas influenciam na embriogênese, cicatrização, inflamação e

câncer (MAARTENS; BROWN, 2015; HUMPHRIES, 2000; HYNES, 2002; JONES; WALKER, 1999). Molecularmente, são proteínas transmembrana constituídas por duas cadeias, a  $\alpha$  e a  $\beta$ , que interagem entre si por ligações não covalentes. Hoje, estão descritas 8 tipos de cadeia  $\beta$  e 18 de cadeias  $\alpha$ , que combinam-se entre si gerando 24 heterodímeros diferentes. A integrina  $\beta 1$  é a subunidade mais comum nesses os receptores (HUMPHRIES, 2006; MORENO-LAYSECA et al., 2019). Enquanto algumas integrinas se ligam a locais específicos da matriz extra celular, outras possuem múltiplos ligantes e a expressão dessas integrinas na membrana plasmática é altamente influenciada pelas mudanças no ambiente em que as células se encontram (MORENO-LAYSECA et al., 2019).

As integrinas constituem as adesões focais celulares, complexos formados por agregados de proteínas da matriz extra celular, integrinas e proteínas de citoesqueleto (FERRAZ; FERNANDEZ, 2014). No caso dos podócitos, sabe-se que a integrina  $\alpha 3\beta 1$  é principal molécula que medeia a ligação entre o citoesqueleto de actina e os componentes da MBG como mostra a Figura 2 (SACHS; SONNENBERG, 2013).

**Figura 2** – Redes de interação dos podócitos entre célula-célula e célula-matriz (adesão focal)



FONTE: adaptado de Perico, Benigni e Remuzzi (2016).

Camundongos com inativação genética das cadeias  $\alpha 3$  ou  $\beta 1$  tem falência renal durante o período neonatal, isso destaca o protagonismo dessa integrina para a adesão focal dos podócitos (KREIDBERG et al., 1996; PERICO et al., 2016). Como ainda não são claros quais são os mecanismos que levam ao destacamento dos podócitos da MBG na DF, esse trabalho propôs estudar de que forma o acúmulo lisossomal pode influenciar nas atividades dessa integrina.

### 3.8 CLOROQUINA

Além de seu uso tradicional como droga antimalárica, a cloroquina e a hidroxicloroquina, são fármacos que também podem ser utilizados no tratamento de doenças crônicas como: artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (RAINSFORD et al., 2015). Na literatura, existem diversos relatos de caso em que pacientes que fazem o uso contínuo desses medicamentos começam a apresentar sinais e sintomas, assim como alterações celulares, muito similares a DF, tais como: cardiomiopatia, proteinúria e inclusões lisossomais em biópsias de tecidos renais e cardíacos (ALBAY et al., 2005; COSTA et al., 2013; LINTHORST et al., 2003; YOGASUNDARAM et al., 2018). Esse efeito colateral é causado devido a característica anfifílica dessas moléculas faz com que sejam capazes de se acumular nos lisossomos e elevar o pH lisossomal, causando alteração na permeabilidade da membrana dessa organela assim como disfunção enzimática (ALBAY et al., 2005; DUCHARME, FARINOTTI, 1996; GONZALEZ-NORIEGA et al., 1980).

Inagaki et al. (1993) demonstraram, utilizando células endoteliais imortalizadas, que a cloroquina é capaz de reduzir especificamente a atividade da  $\alpha$ -GLA causando alterações ultraestruturais nessas células, como as inclusões lisossomais, propondo assim um modelo *in vitro* para o estudo da DF (INAGAKI et al., 1993). Neste trabalho, foi utilizado esse modelo experimental como base para a indução de acúmulo lisossomal nos podócitos.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

Devido a falta de estudos sobre os mecanismos patofisiológicos da DF, em especial sobre o acometimento renal dessa doença, esse trabalho foi realizado com o intuito de elucidar os mecanismos celulares e moleculares que levam à diminuição da adesão podocitária à MBG na DF. Esse processo leva ao prejuízo das funções renais e caracteriza os processos de podocitúria, proteinúria e microalbuminúria encontrados nesses pacientes. Dessa forma, os resultados aqui obtidos poderiam futuramente contribuir para o desenvolvimentos de novos alvos terapêuticos, buscando melhorar o tratamento e a qualidade de vida dos portadores da DF.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CULTIVO CELULAR

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a linhagem celular E11 de podócitos de camundongo proveniente do *Cell Lines Service* (Eppelheim, Alemanha), cultivadas de acordo com o método de Schiwiek et al. (2004), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Primeiramente, os podócitos indiferenciados foram cultivados em condições permissivas, em meio RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e INF- $\gamma$  na concentração de 20-50 UI/mL, em uma incubadora a 33°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem uma confluência de 70 – 80%, as células foram expostas a uma condição não permissiva para que ocorresse o processo de diferenciação celular. Para isso, as células foram colocadas em uma estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com meio de cultura sem a adição do INF- $\gamma$ . Após 14 dias de cultivo, as células estavam prontas para os experimentos (FUJINO; HASEBE, 2016).

### 5.2 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), segundo o método previamente descrito por (MOSMANN, 1983). Basicamente, os podócitos, após processo de diferenciação, foram cultivados em placas de 96 poços (10<sup>3</sup> células/poço) e tratados com diferentes concentrações de difosfato de cloroquina (Cristália, Itapira, São Paulo) para a geração de uma curva dose-resposta (1, 2, 3, 4 e 5  $\mu$ g/mL) durante o período de 72 h (INAGAKI et al., 1993). Posteriormente, o meio foi substituído por meio novo contendo solução de MTT (5 mg/mL em tampão salino fosfato (PBS) na proporção de 1:10 (Sigma, St. Louis, EUA), por um período de 3h a 37°C e 5% de

CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio foi retirado e substituído por dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, EUA) para a dissolução dos cristais de formazan, sob agitação (700 rpm, 15 min). A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplaca Bio-Rad 680 (Califórnia, EUA). Foram realizados 4 experimentos em duplicata.

### 5.3 VERMELHO NEUTRO E CRISTAL VIOLETA

Para avaliação do acúmulo lisossomal, os podócitos foram plaqueados em placas de 96 poços (10<sup>3</sup> células/poço). Após diferenciação, as células foram tratadas com difosfato de cloroquina nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL durante 72 h. Após finalização do período de tratamento, todo o meio foi removido dos poços e foram adicionados 100 µL de solução de vermelho neutro (VN) na concentração de 40 µg/mL. Posteriormente, a placa foi incubada por 3h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, o meio contendo VN foi removido, as células foram lavadas com 150 µL de PBS por poço e foram adicionados 150 µL de solução de revelação (50% etanol 96% + 49% de água deionizada + 1% de ácido acético glacial). A placa foi agitada por 10 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro no filtro de 540 nm. Esse ensaio foi realizado segundo protocolo de Repetto et al. (2008). Após o ensaio de VN, a solução foi retirada dos poços e foram lavados 1x com água destilada (200 µL/poço), foram adicionados 100 µL de solução de CV (0,25 mg/mL) por poço e as placas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente (22 °C). Depois, os poços foram lavados 2x com água deionizada e solubilizados com ácido acético à 33%. Finalmente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O resultado final foi obtido por meio na normalização do ensaio de VN com o CV. Foram realizados 3 experimentos em duplicata.

#### 5.4 VISUALIZAÇÃO DE LISOSSOMOS E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a visualização das inclusões lisossomais, foi utilizada a sonda LysoTracker® DND-99 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Desta forma, as células foram plaqueadas em lamínulas e após o processo de diferenciação, foram tratadas com difosfato de cloroquina na concentração de 1 µg/mL por 72h. O meio de tratamento foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x estéril. Após esse processo, as células foram incubadas a 37°C com LysoTracker® DND-99 a 50 nM diluído em meio de cultivo. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, fixadas com PFA a 2% por 20 minutos e lavadas novamente com PBS 1x. As lamínulas foram montadas em lâminas histológicas, com meio de montagem Fluoromont-G™ *with* DAPI (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), seladas com esmalte incolor isento de formol e observadas em microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japão). Foram realizados 3 experimentos em duplicata.

#### 5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com a finalidade de verificar possíveis alterações morfológicas e ultra estruturais induzidas pelo acúmulo lisossomal nos podócitos, foi empregado a MEV. Foram plaqueadas 100.000 células em lamínulas circulares (13 mm de diâmetro), em placas de 24 poços e tratadas com difosfato de cloroquina na concentração de 1 µg/mL por 72h. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com tampão salino fosfato (PBS), fixadas com Solução de Karnovski (glutaraldeído 2%, paraformaldeído (PFA) 4%, CaCl<sub>2</sub> 0,1M, pH 7,4) por 1 h. Posteriormente foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH

7,4) por 1 h. Após a fixação, as células foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes com 100%), por um período de 10 minutos em cada concentração. A seguir, as células foram submetidas ao ponto crítico no aparelho CPD 010 (Critical Point Dryer) 030-Balzers, metalizadas com ouro no aparelho (SCD 030-Balzers) e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (Tescan-Vega3-LMU-Scanning electron microscope, Kohoutovice, Czech Republic) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) Guimarães et al. (2009). As imagens foram capturadas nos aumentos de 500x, 1000X, 4000X, 6.000X e 15.000X. Foram realizados 4 experimentos em duplicata.

## 5.6 VISUALIZAÇÃO DE ACTINA E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a visualização do citoesqueleto de actina-F e núcleo, as células foram plaqueadas em lamínulas e tratadas com difosfato de cloroquina na concentração de 1 µg/mL por 72h. Posteriormente, o meio foi removido e as lamínulas lavadas 2 vezes em PBS. As células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 2% diluído em PBS por 20 minutos, a temperatura ambiente (22 °C). Após a fixação, as células foram lavadas 2 vezes em PBS e adicionou-se Alexa Fluor® 647 *Phalloidin* diluída em uma solução de 0,01% de saponina em PBS por 30 minutos. As lamínulas foram montadas sobre uma lamina histológica contendo Fluoromont-G™ com DAPI. Após esse processo as lamínulas foram seladas com esmalte isento de formol e a visualização foi realizada em microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japão). Foram realizados 3 experimentos em duplicata.

## 5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INTEGRINA $\alpha 3\beta 1$ POR RT-qPCR

O RNA total dos podócitos foi isolado das células lisadas com Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foram verificadas pela razão da absorvância mensurada a 260 nm e 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose. As moléculas de RNAm foram convertidas em DNA complementar (cDNA), utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 1000 ng do RNA total da amostra. O cDNA foi submetido à análise por RT-PCR para verificar a presença ou ausência da expressão do gene e, posteriormente, ao RT-qPCR para obtenção da quantificação mais precisa dos genes alvos. Para a RT-PCR, o cDNA foi amplificado com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes alvos utilizando o kit de PCR Taq Polymerase Recombinant (Invitrogen, Califórnia, EUA). O produto da PCR foi aplicado em gel de poliacrilamida 8% e corado com nitrato de prata. Para a RT-qPCR, o cDNA foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizando o SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) no termociclador StepOnePus<sup>TM</sup> Real Time PCR System (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). As expressões relativas dos genes foram analisadas por meio do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , seguindo parâmetros anteriormente preconizados (BUSTIN et al., 2009; HUGGETT et al., 2013; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Sendo os genes analisados o HGPRT (Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase), ITGB1 (*Integrin Subunit Beta 1*) e ITGA3 (*Integrin Subunit Alpha 3*). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvos estão descritas na Tabela 2. Foram realizados 5 experimentos em duplicata.

**Tabela 2** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR

<b>Gene alvo</b>	<b>Oligonucleotídeos iniciadores</b>	<b>Amplicon</b>
ITGB1	5'-ATGCCAAATCTTGCGGAGAAT-3' (F)	209 pb
	5'-TTTGCTGCGATTGGTGACATT-3' (R)	
ITGA3	5'-CCTCTTCGGCTACTCGGTC-3' (F)	112 pb
	5'-CCGGTTGGTATAGTCATCACCC-3' (R)	
HGPRT	5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' (F)	101 pb
	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3' (R)	

NOTA: F, *forward*; R, *reverse*.

FONTE: O autor (2018).

## 5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

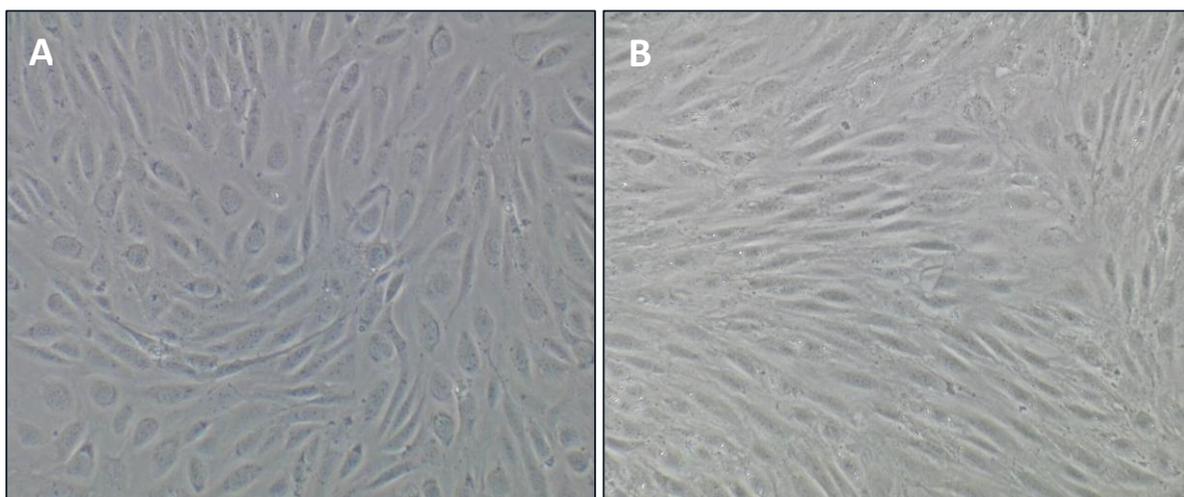
Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para avaliar o resultado entre os grupos serão realizados os testes t de Student ou Anova para dados pareados e Mann-Whitney e Anova on Rank"s para dados não paramétricos. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Os dados foram analisados com auxílio do pacote estatístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CULTIVO CELULAR

As células podocitárias foram cultivadas segundo protocolo de Fujino, Hasebe (2016). Os experimentos foram realizados entre as passagens 19 e 21. As imagens das duas condições de cultivo podem ser observadas na Figura 3.

**Figura 3** - Cultivo celular dos podócitos



NOTA: Fotomicrografia dos podócitos em condições permissivas (A) e não-permissivas (B). Aumento de 100x.

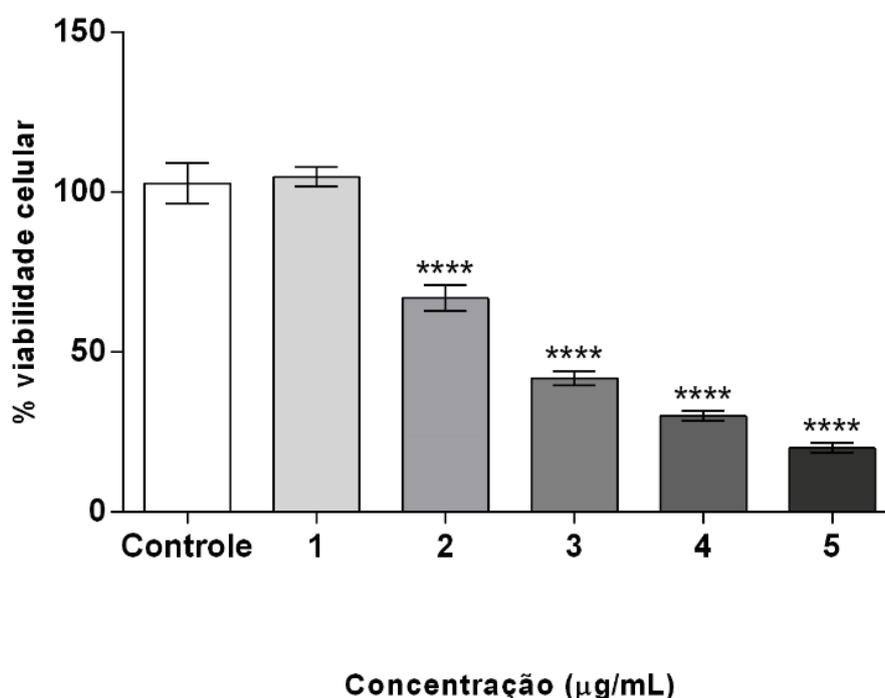
FONTE: O autor (2018).

### 6.2 VIABILIDADE CELULAR

A fim de se escolher uma concentração ideal de difosfato de cloroquina, foi realizada uma curva dose-resposta avaliando a viabilidade celular dos podócitos frente a diferentes concentrações desse fármaco, as concentrações escolhidas para

o experimento foram baseadas em outro estudo para indução de acúmulo lisossomal (INAGAKI et al.; 1993). A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT, no qual as células com metabolismo ativo são capazes de reduzir o sal de MTT em cristais de formazan pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Como pode ser observado na Figura 4, os podócitos tiveram a viabilidade celular diminuída significativamente ( $P < 0,0001$ ) nas concentrações de 2, 3, 4 e 5  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  não alterou a viabilidade celular de forma significativa e, portanto, foi a concentração escolhida para todos os experimentos.

**Figura 4** - Avaliação da viabilidade celular frente a diferentes concentrações de difosfato de cloroquina



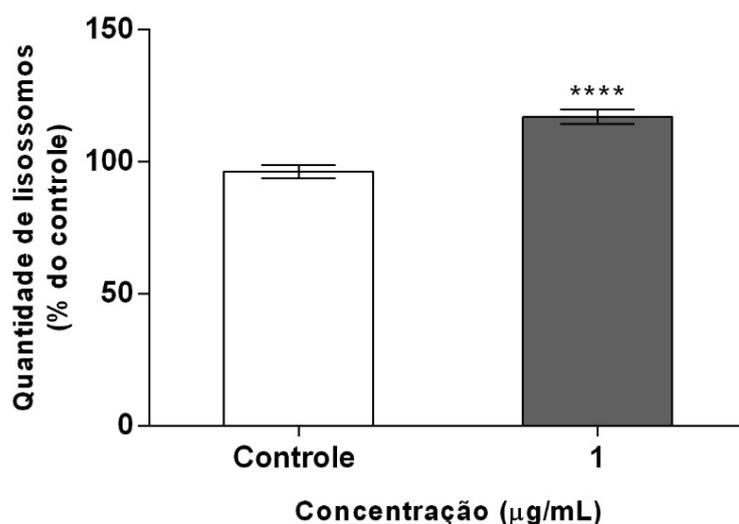
NOTA: Curva dose-resposta das células podocitárias em diferentes concentrações de difosfato de cloroquina. Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Os resultados foram analisados por ANOVA ( $P > 0,001$ ) e teste de múltiplas comparações de Dunnet's, em que: \*\*\*\* $P < 0,0001$ : 2  $\mu\text{g/mL}$  vs Controle + 3  $\mu\text{g/mL}$  vs Controle + 4  $\mu\text{g/mL}$  vs Controle + 5  $\mu\text{g/mL}$  vs Controle.

FONTE: O autor, 2018.

### 6.3 VERMELHO NEUTRO E CRISTAL VIOLETA

O ensaio de VN foi utilizado com o intuito de verificar a incorporação desse corante pelos lisossomos de células viáveis afim de se quantificar essas organelas após tratamento com difosfato de cloroquina. Para que fosse observada somente a produção de lisossomos eliminando-se o viés da viabilidade celular, foi realizado em seguida o ensaio de CV nas mesmas placas de cultivo. O CV, por sua vez, é um corante capaz de se ligar a DNA e fornece informação sobre a quantidade de células aderidas no fundo do poço de uma placa de cultura. O resultado observado na Figura 5 é obtido por meio da normalização da absorção obtida nos dois ensaios.

**Figura 5** - Quantidade de lisossomos frente ao tratamento com difosfato de difosfato de cloroquina



NOTA: Quantidade de lisossomos frente ao tratamento com difosfato de cloroquina (1 µg/mL). Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Os resultados foram paramétricos (teste de normalidade de D'Agostino & Pearson) e analisados por *test* T em que: \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

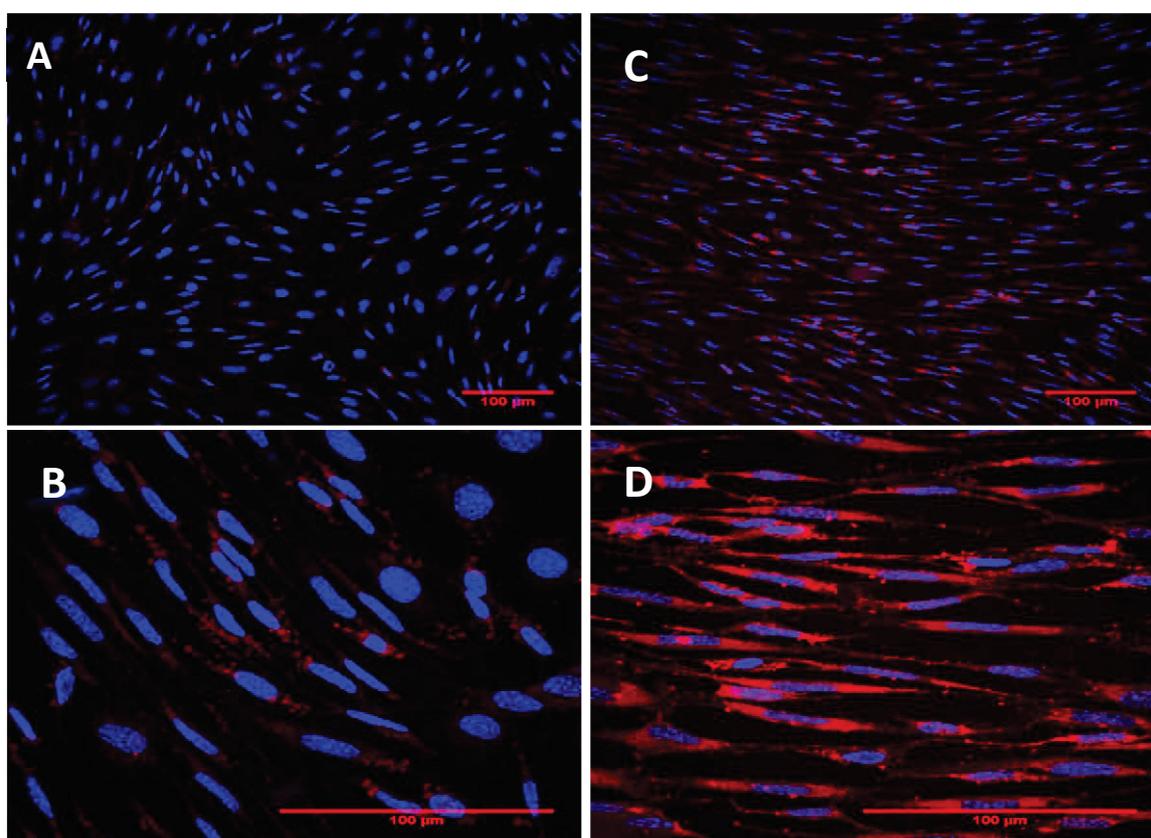
FONTE: O autor, 2018.

Foi observado aumento significativo ( $P < 0,001$ ) da quantidade e/ou tamanho dos lisossomos nos podócitos na concentração de 1 µg/mL. Esse resultado condiz com o obtido por Inagaki et al. (1993).

#### 6.4 VISUALIZAÇÃO DE LISSOSSOMOS E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A fim de avaliar, de forma visual e qualitativa, o aumento das inclusões lisossomais após tratamento das células com difosfato de cloroquina, foi realizada a marcação dos lisossomos por meio da sonda LysoTracker® DND-99 como pode ser observado na Figura 6.

**Figura 6** - Avaliação do acúmulo lisossomal após tratamento com difosfato de cloroquina



NOTA: Os podócitos foram tratados com difosfato de cloroquina 1 µg/mL ou não tratados (controle) por 72h à 37°C e os lisossomos (vermelho) e núcleo (azul) marcados com as sondas LysoTracker® DND-99 e DAPI, respectivamente. (A) Células controle (não tratadas) – aumento de 600x; (B) Células controle (não tratadas) – aumento de 200x; (C) Células tratadas – aumento de 600x; (D) Células tratadas – aumento de 600x

FONTE: O autor, 2018.

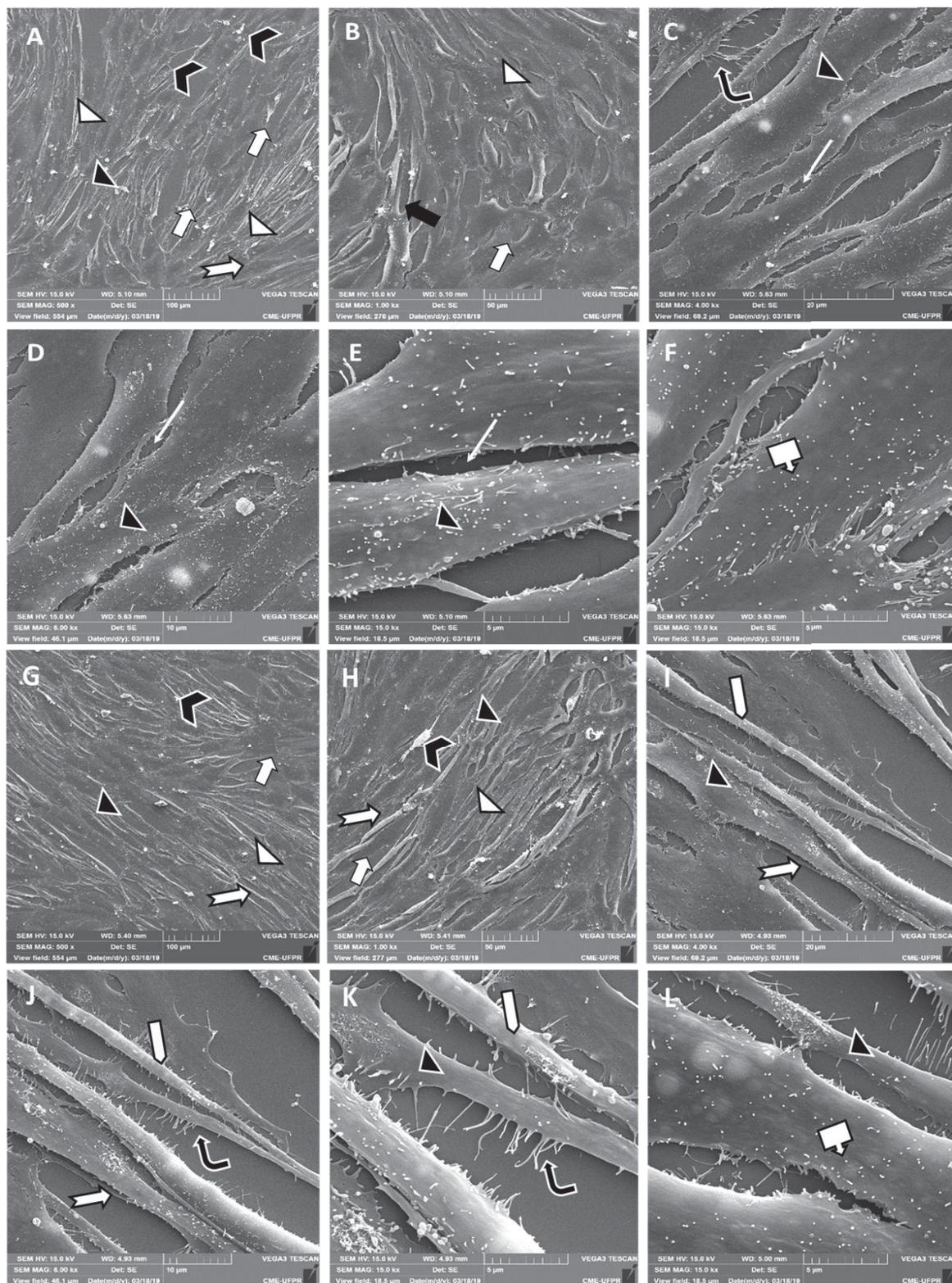
Na Figura 6 é demonstrado a marcação para os lisossomos em vermelho e em azul a marcação para o núcleo. Nas imagens 5A e 5B, a marcação lisossomal reflete

a constituição celular normal, com os lisossomos dispersos de forma equilibrada no citoplasma celular. Nas imagens 5C e 5D, a marcação celular se torna muito mais acentuada, demonstrando que há um grande aumento na quantidade de lisossomos. Isso reflete a indução de acúmulo lisossomal provocada pela cloroquina. Além, disso nas células tratadas há diferenças morfológicas em relação as células controle, após o tratamento apresentam-se de forma mais alongada e menor interação célula-célula, além da mudança morfológica do núcleo. Resultado que converge com o observado na MEV e imunofluorescência com marcação para actina-F e núcleo, como pode ser observado nas Figura 7 e 8, respectivamente.

#### 6.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Com a finalidade de se observar possíveis alterações morfológicas e ultra estruturais nos podócitos induzidas pelo acúmulo lisossomal foi realizada a MEV, como pode ser observado na Figura 7.

**Figura 7 - Análise morfológica e ultraestrutural dos podócitos após tratamento com cloroquina**



Células justapostas

Células em subconfluência, aderidas e espriadas por sobre o substrato

Células com inibição de contato

Células alongadas de morfologia fusiforme

Projeções membranares

Debris celulares

Filopódios

Microespículas

Células tratadas mais alongadas, mais afiladas e menos espriadas

Células tratadas com maior menor adesão das bordas celulares

NOTA: Análise ultraestrutural de células controle e tratadas com difosfato de cloroquina (1 µg/mL) em MEV. As imagens A, B, C, D, E, e F representam células controle mantidas no cultivo celular por 17 dias somente na presença de meio e soro fetal bovino (14 dias período de manutenção para indução da diferenciação celular). As imagens G, H, I, J, K e L evidenciam células mantidas em cultivo por 14 dias somente em presença de meio e soro fetal bovino para diferenciação celular, posteriormente foram expostas a difosfato de cloroquina (1 µg/mL) por período de 72 horas. As imagens A e G estão com aumento de 500x, B e H de 1000x, C e I de 4000x, D e J de 6000x, e E, F, K e L de 15000x.

FONTE: O autor, 2019.

Na Figura 7, as imagens 7A, 7B, 7C, 7D, 7E e 7F evidenciam as células controle, ou seja, não expostas a nenhum tratamento. As imagens 7G, 7H, 7I, 7J e 7K mostram as células expostas ao tratamento com difosfato de cloroquina na concentração de 1 µg/mL, como já descrito anteriormente. Desta forma, este resultado evidencia células controle e mantidas por 17 dias em cultivo celular.

Pode-se observar que as células controle em menor magnitude (imagens panorâmicas 7A e 7B), mostram células justapostas ou em subconfluência, aderidas e espaiadas por sobre o substrato, apresentam inibição de contato, não há sobreposição celular. Observa-se semelhante padrão morfológico, são células alongadas de morfologia fusiforme, que emitem projeções membranares, mas em quase totalidade apresentam-se com semelhante extensão e largura do corpo celular. Nas imagens 7A e 7B pode-se observar *debris* celulares em decorrência da manutenção por um longo período de tempo destas em cultivo celular, podendo ser células mortas ou mesmo restos membranares. Na imagem 7C, em maior magnitude, observa-se características projeções membranares de percepção do substrato, os filopódios. Por toda a superfície do corpo celular evidenciam-se microespículas, imagens 7C, 7D e 7E. Estas células mantêm íntimo contato e adesão por sobre o substrato.

As imagens 7G-L, são células expostas a difosfato de cloroquina em menor magnitude, e as imagens 7G e 7H, evidenciam padrão morfológico e organização do cultivo semelhante ao padrão observado para células controle. Observam-se células aderidas, espaiadas, com morfologia alongada, padrão fusiforme, células que mantêm inibição de contato, não empilham uma sobre as outras, observam-se também *debris* celulares por sobre o cultivo celular. Nas imagens de maior magnitude 7I e 7J, fica evidente que os corpos celulares destas células, em especial a borda

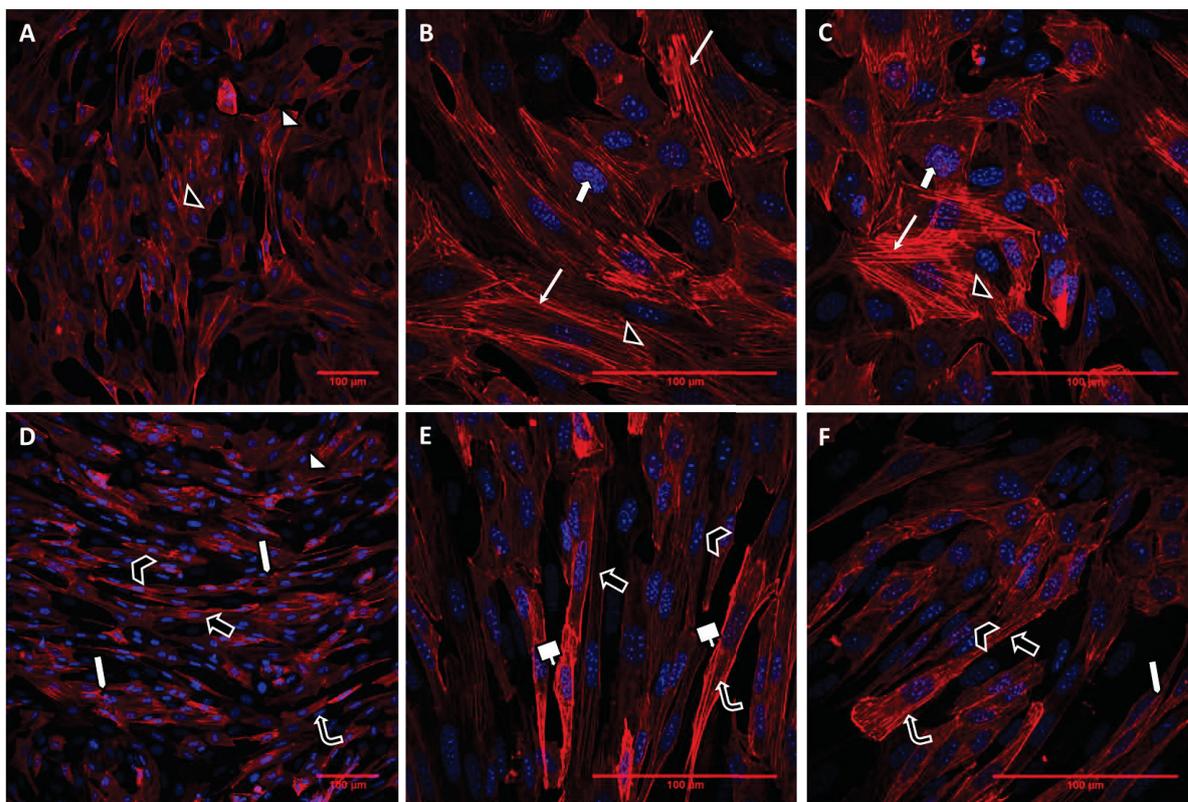
destes corpos em toda a sua extensão, estão perdendo a adesividade ao substrato, com células de aparência menos espalhadas e menos aderidas ao substrato. As imagens 7J e 7K evidenciam também que estas células se mantêm alongadas, porém mais afiladas e estreitas, com menor expansão lateral do corpo celular, observa-se ainda na imagem 7K que após a exposição a difosfato de cloroquina há um aumento de expansões membranares por toda extensão lateral do corpo celular, característico de filopódios. Estas apresentam por sobre a superfície celular microespículas semelhantes morfológicamente e quantitativamente ao das células controle.

O tratamento com difosfato de difosfato de cloroquina pela análise ultraestrutural evidencia perda de adesão e menor grau de espalhamento e da expansão lateral do corpo celular destas células quando comparadas com as células controle.

## 6.6 VISUALIZAÇÃO DE ACTINA E NÚCLEO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A fim de avaliar o citoesqueleto de actina-F após tratamento das células com difosfato de difosfato de cloroquina, foi realizada a marcação com a sonda Alexa Fluor® 647 *Phalloidin*, como pode ser observado na Figura 8.

**Figura 8** - Avaliação do citoesqueleto de actina após tratamento com difosfato de cloroquina



	Microfilamentos de actina
	Predomínio de núcleo central e esférico
	Fibras de <i>stress</i> por toda a extensão do corpo celular
	Células aderidas, espalhadas, apresentam extensão lateral do corpo celular, íntima interação com o substrato
	Células tratadas com diminuição do espalhamento lateral do corpo celular
	Predomínio no núcleo central, alongado e fusiforme
	Células tratadas alongadas e fusiformes
	Predomínio de microfilamentos de actina no córtex submembranar
	Redução da organização dos microfilamentos de actina em fibras de <i>stress</i>

NOTA: Análise de imunofluorescência de células controle e tratadas com difosfato de cloroquina em microscopia confocal. As imagens A, B e C representam células controle mantidas no cultivo celular por 17 dias somente na presença de meio e soro fetal bovino (14 dias período de manutenção para indução da diferenciação celular). As imagens D, E e F evidenciam células mantidas em cultivo por 14 dias somente em presença de meio e soro fetal bovino para diferenciação celular. Posteriormente, foram expostas a difosfato de cloroquina (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por período de 72 horas. As imagens A e D estão com aumento de 200x, as imagens B, C, E e F de 600x.

FONTE: O autor, 2019.

Na Figura 8, pode-se observar nas imagens 8A, 8B e 8C as células controle e as imagens 8D, 8E e 8F, células que receberam o tratamento com difosfato de cloroquina, como já descrito anteriormente. Pode-se também observar nas imagens

8A, 8B e 8C de forma evidente que as células controle apresentam uma intensa marcação e organização dos microfilamentos de actina. Os núcleos destas células apresentam-se central no corpo celular de forma esférica. Estas células apresentam evidente organização das fibras de *stress* por toda a extensão do corpo celular. São células alongadas e fusiformes. Observa-se que com esse padrão de organização do microfilamentos de actina em fibras de *stress* as células apresentam-se aderidas, espalhadas por sobre o substrato, apresentam extensão lateral do corpo celular e íntima interação com o substrato. As células estão justapostas ou subconfluentes. De forma interessante e evidente, fica nítida a alteração do grau de espalhamento lateral do corpo celular das células após exposição a difosfato de cloroquina (imagens 8D, 8E e 8F). Observam-se que os núcleos destas células se mantem central mas mudam morfologia, passam a ser núcleos alongados, que acompanham a morfologia celular de forma visível, vê-se células bem mais alongadas, fusiformes, apresentam uma intensa marcação do microfilamento de actina predominantemente depositado no córtex submembranar, chama atenção a não mais intensa organização dos microfilamentos em fibras de *stress* por todo o corpo celular. Há presença dos microfilamentos de actina somente de forma reduzida em filamentos longos pela extensão do corpo celular. Neste caso, as células perderam a capacidade de organização destas fibras de *stress* para a expansão lateral do corpo das mesmas, são células que estão perdendo o grau de espalhamento e adesão lateral ao substrato.

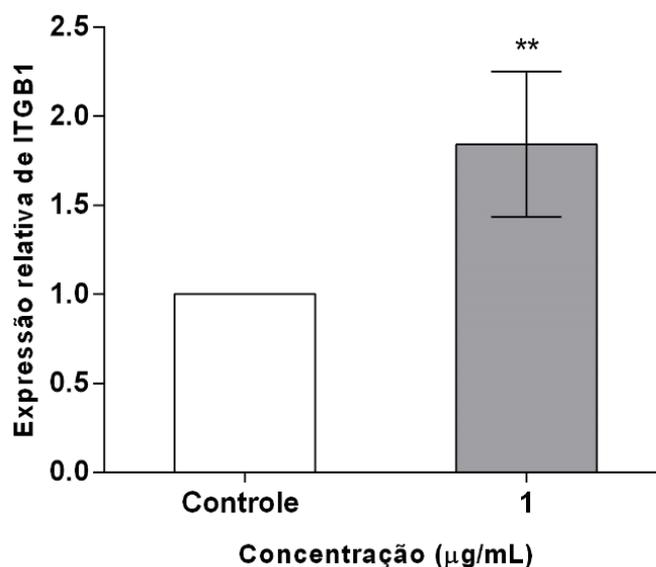
O tratamento das células com difosfato de cloroquina de forma evidente induziu perda da adesão, menor grau de espalhamento com diminuição da organização das fibras de *stress*, induzindo células mais alongadas, fusiformes, com menor expansão do corpo celular.

## 6.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INTEGRINA $\alpha 3\beta 1$ POR RT-QPCR

A expressão gênica das cadeias de integrina  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  foi avaliada por RT-qPCR nos podócitos tratados ou não com difosfato de cloroquina  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  a  $37^\circ\text{C}$  por 72 h. Os genes avaliados foram ITG $\beta 1$  e ITG $\alpha 3$  representando cada uma das cadeias,

respectivamente. Dessa forma, foi possível se observar um aumento significativo da expressão das cadeias  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  ( $P < 0,01$ ), como mostram as Figuras 9 e 10.

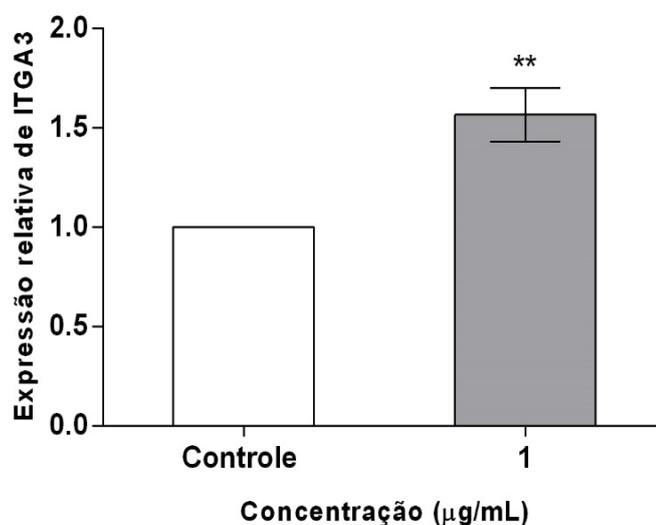
**Figura 9** - Expressão relativa do gene ITGB1 determinada por RT-qPCR



NOTA: Expressão relativa de ITGB1 por podócitos não tratados (controle) ou tratados com difosfato de cloroquina 1 µg/mL por 72 h a 37°C. A expressão relativa do RNAm foi determinada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando o HGPRT como gene normalizador. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (\*\* $P < 0,01$ ). Os valores se referem a média  $\pm$  EPM de cinco experimentos independentes (N=5).

FONTE: O autor, 2019.

**Figura 10** - Expressão relativa do gene ITGA3 determinada por RT-qPCR



NOTA: Expressão relativa de ITGA3 por podócitos não tratados (controle) ou tratados com difosfato de cloroquina 1 µg/mL por 72 h a 37°C. A expressão relativa do RNAm foi determinada pelo método

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando o HGPRT como gene normalizador. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (\*\* $P < 0,01$ ). Os valores se referem a média  $\pm$  EPM de cinco experimentos independentes (N=5).

FONTE: O autor, 2019.

## 7 DISCUSSÃO

Esse trabalho se desenvolveu dentro da problemática da DF, doença genética que prejudica a expressão ou o funcionamento da enzima  $\alpha$ -GLA. O prejuízo na atividade dessa enzima gera acúmulo de glicosfingolípídeos nos lisossomos. Essa deposição lipídica ocorre de modo progressivo e atinge diferentes tipos celulares, afetando diferentes tecidos no organismo (BOGGIO et al., 2009; NAKAO et al., 2003; NAGAMATSU et al., 2017; SHU et al., 2014). Sabe-se que o acometimento renal é uma das principais causas de morte e incapacidade nessa doença, e o processo de disfunção podocitária é um dos protagonistas no desenvolvimento da nefropatia de Fabry (NAGAMATSU et al., 2017; ORTIZ, SANCHEZ-NIÑO, 2016; GREKA, MUNDEL, 2013). Porém, os mecanismos fisiopatológicos que fazem com que os podócitos percam seu papel na barreira de filtração glomerular ainda não são claros. Neste estudo, foi desenvolvido um modelo celular para estudo da DF por meio do bloqueio farmacológico da  $\alpha$ -GLA em podócitos murinos. Assim, foi possível avaliar como o acúmulo lipídico prejudica a morfologia celular através da avaliação do citoesqueleto e como a expressão gênica da integrina  $\alpha 3\beta 1$  foi alterada frente ao processo de acúmulo lisossomal.

A cloroquina induz o acúmulo lisossomal de glicosfingolípídeos em pacientes que fazem o uso crônico desse medicamento (ALBAY et al., 2005) e por isso foi utilizada como uma ferramenta para mimetizar a DF *in vitro*. A metodologia proposta por Inagaki et al. (1993) foi utilizada como base para a indução de acúmulo lipídico nos podócitos, sendo um experimento realizado de forma inédita nesse tipo celular. Como pode ser observado na Figura 4, no ensaio de viabilidade celular por MTT, houve uma diminuição significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 2  $\mu\text{g/mL}$ , fazendo com que a concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  fosse a escolhida para a continuidade dos experimentos. Como forma de avaliar se a concentração escolhida seria capaz de induzir ao acúmulo lisossomal, foi realizado o ensaio de VN adaptado do protocolo de Repetto et al. (2008) em que as células também foram coradas com CV para que o viés da viabilidade celular fosse descartado e fosse obtido apenas o valor da quantidade de lisossomos, esse ensaio demonstrou que houve um aumento significativo ( $P < 0,0001$ ) na quantidade/volume dessas organelas, como pode ser

observado no Figura 5. Esse resultado vai de encontro com o esperado segundo o protocolo de Inagaki et al. (1993), apesar de a concentração utilizada nos podócitos ter sido 3x menor que a utilizada para as células endoteliais (INAGAKI et al., 1993; REPETTO et al., 2008). Além disso, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, com uma sonda que marca de forma específicas os lisossomos e, como pode ser observado na Figura 6, em que há um grande aumento na marcação em vermelho (lisossomos), elucidando de forma qualitativa os resultados obtidos. Esse resultado vai de encontro com o observado *in vivo*, em que há grande deposição lipídica nas células renais nos pacientes portadores da DF (SUGARMAN et al., 2018). Dessa forma, este trabalho propôs um modelo celular para o estudo da DF em podócitos por meio da indução farmacológica de acúmulo lisossomal.

Para avaliar mudanças na estrutura podocitária frente ao acúmulo lisossomal, foram realizados os ensaios de MEV e imunofluorescência com marcação para actina-F e núcleo. Na Figura 7, pela análise ultraestrutural ficou evidente a perda de adesão celular, menor grau de espraiamento e da expansão lateral do corpo celular destas células após a indução do acúmulo lisossomal. Esse resultado converge com o observado na Figura 8, em que também é demonstrado menor grau de espraiamento dessas células, devido a desorganização do citoesqueleto de actina, com diminuição da organização das fibras de *stress*, células mais alongadas, fusiformes, com menor expansão do corpo celular. A morfologia da célula podocitária, incluído seus prolongamentos celulares, é toda sustentada com base no citoesqueleto de actina-F e ela é essencial para que os podócitos desempenhem seu papel na BFG. Estudos mostram que mutações em proteínas que conectam o citoesqueleto de actina-F com proteínas de adesão focais podem causar prejuízo ao podócito, levando ao apagamento de seus pedicelos, proteinúria e, conseqüentemente, gerando uma desordem glomerular (GREKA, MUNDEL, 2013; MUNDEL, KRIZ, 1995; PERICO et al., 2016). Dada a importância da conformação dessa célula, as alterações no citoesqueleto de actina-F, podem ser um dos mecanismos do acometimento renal dos pacientes portadores da DF.

O principal receptor que liga o citoesqueleto de actina-F com a matriz da MBG, ou seja, a principal molécula responsável pela adesão focal podocitária é a integrina  $\alpha 3\beta 1$  (SACHS; SONNENBERG, 2013; ZAMBRUNO et al., 1992). Nesse trabalho foi avaliada a expressão gênica das duas cadeias proteicas que contituem esse receptor.

Como pode ser observado nas Figuras 9 e 10, houve um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) na expressão gênica tanto da cadeia  $\beta 1$  como da  $\alpha 3$ . São escassos e praticamente inexistentes, estudos relacionando a expressão dessa integrina com a DF, e desta forma para que pudéssemos compreender nossos achados, foi feita uma extrapolação dos trabalhos já realizados para nefropatia diabética (ND). Sabe-se que o acometimento renal na DF é muito semelhante com o que ocorre na ND (Ortiz, SANCHEZ-NIÑO, 2016), em que tais pacientes também apresentam descolamento dos podócitos da MBG, apagamento dos pedicelos na biópsia renal, podocitúria, microalbuminúria e proteinúria (Toyoda et al., 2007; Weil et al., 2012). Corroborando nossos achados, alguns autores demonstraram um aumento da expressão gênica da integrina  $\beta 1$  em podócitos frente a altas concentrações de glicose e angiotensina II (HAN et al., 2006). Ainda, Sawada et al. (2016) demonstraram *in vitro* um aumento na expressão gênica da integrina  $\alpha 3\beta 1$  em podócitos tratados com TGF-1 (reproduzindo o microambiente do glomérulo na ND), neste mesmo estudo foram avaliadas biópsias renais de pacientes em estágios iniciais ( $n = 6$ ) e avançados ( $n = 8$ ) da ND e, por hibridização *in situ*, em que foi observado que existe um aumento na expressão dessa integrina nos estágios iniciais e uma baixa expressão em estágios tardios da doença (SAWADA et al., 2016). Em relação a proteína, também na ND, Chen et al. (2008) demonstraram *in vitro* que há uma diminuição na expressão proteica dessas integrinas assim como uma diminuição na capacidade da adesão dos podócitos (CHEN et al., 2008). Esses dados indicam que pode haver um mecanismo pós transcricional que justifique as diferenças na expressão gênica e proteica da integrina  $\alpha 3\beta 1$ . Porém, ainda não existem dados disponíveis sobre esse comportamento na DF e, como forma de complementar nossos resultados, na tentativa de entender de forma mais clara os mecanismos que levam a perda da função podocitária na DF, ainda devem ser realizados experimentos para quantificar e identificar a localização celular dessa proteína.

O acometimento renal na DF é uma das principais causas de morte e incapacidade nessa doença e mudanças na arquitetura dos podócitos afetam de forma direta a seletividade da BFG, assim como mudanças na sua morfologia (observada em biópsias renais) podem até ser consideradas como marcadores precoces da nefropatia de Fabry (VAN DEN BERG et al., 2004; TØNDEL et al., 2015; GERMAIN, 2010). Fica claro o protagonismo dos podócitos no acometimento da

função dos rins na DF e, apesar de já existirem tratamentos específicos para essa doença, como é o caso da TRE e chaperonas farmacológicas, a diminuição das inclusões lisossomais não ocorre de forma efetiva nessa célula devido a sua baixa capacidade de replicação (NEUMANN et al., 2013; ROZENFELD, 2009; GERMAIN et al., 2016; GUCE, 2011; SHII, 2012; NAJAFIAN et al., 2011; ORTIZ; SANCHEZ-NIÑO, 2016; TØNDEL et al., 2013).

Por ser uma doença rara, a DF carece de literatura específica, o que prejudica desde o diagnóstico até o tratamento desses pacientes por não haver um amplo conhecimento sobre a doença. A contribuição deste trabalho é trazer resultados focados no acometimento renal na DF. Reconhecemos que nosso estudo apresenta a limitação de não terem sido realizados ensaios avaliando a expressão proteica da integrina  $\alpha3\beta1$ . Sendo esse o próximo passo para complementar os resultados já obtidos e continuar o processo de investigação sobre a nefropatia de Fabry.

Em resumo, esse trabalho propôs um modelo podocitário para o estudo da DF. Além de demonstrar uma superexpressão da principal integrina de adesão focal podocitária frente ao acúmulo lisossomal, mecanismo muito similar ao que ocorre na ND, corroborando com dados *in vivo* que demonstram um desenvolvimento similar dessas duas doenças. Dessa forma, os resultados obtidos abrem perspectivas para novos alvos terapêuticos, visando a melhora na qualidade de vida desses pacientes.

## 8 CONCLUSÕES

- Por meio do ensaio de viabilidade celular foi possível estabelecer a concentração de 1 µg/mL de cloroquina para a realização dos experimentos;
- A indução do acúmulo lisossomal foi confirmada pelos ensaios de VN e imunofluorescência. Demonstrando que a cloroquina foi capaz de induzir ao acúmulo lisossomal, mimetizando, por mecanismos farmacológicos, a DF *in vitro*;
- O acúmulo lisossomal gerou mudanças morfológicas ultraestruturais na célula e no citoesqueleto de actina. Resultado que converge com as mudanças na arquitetura celular observadas nas biópsias renais de pacientes portadores da DF;
- Quando induzido o acúmulo lisossomal, aumentou-se a expressão gênica da integrina  $\alpha3\beta1$ . Resultado similar ao que ocorre na ND, corroborando com estudos *in vivo* que demonstram um curso similar dessas duas nefropatias.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliação *in vitro*, frente a indução de acúmulo lisossomal, da expressão proteica da integrina  $\alpha3\beta1$  por *western blot*, assim como a localização celular dessa proteína por meio de imunofluorescência. Possibilitando assim, investigar se existem possíveis mecanismos pós-transcricionais interferindo no processo de perda de adesão podocitária.

## REFERÊNCIAS

ABENSUR, H.; REIS, M. A. DOS A. DOS. Renal involvement in Fabry disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 2, p. 245–254, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20160034>>. .

AERTS, J. M.; GROENER, J. E.; KUIPER, S.; et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 2812–7, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268542&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

ALBAY, D.; ADLER, S. G.; PHILIPPOSE, J.; et al. Chloroquine-induced lipidosis mimicking Fabry disease. **Modern Pathology**, v. 18, n. 5, p. 733–738, 2005.

BOGGIO, P.; LUNA, P. C.; ABAD, M. E.; LARRALDE, M. Doença de Fabry. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 4, p. 367–376, 2009.

BROUNS, R.; SHEORAJPANDAY, R.; BRAXEL, E.; et al. Middelheim Fabry Study (MiFaS): A retrospective Belgian study on the prevalence of Fabry disease in young patients with cryptogenic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 109, n. 6, p. 479–484, 2007.

BROUNS, R.; THIJIS, V.; EYSKENS, F.; et al. Belgian fabry study: Prevalence of fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. **Stroke**, v. 41, n. 5, p. 863–868, 2010.

CAIRNS, T.; MÜNTZE, J.; GERNERT, J.; et al. Hot topics in Fabry disease. **Postgraduate Medical Journal**, p. postgradmedj-2018-136056, 2018. Disponível em: <<http://pmj.bmj.com/lookup/doi/10.1136/postgradmedj-2018-136056>>. .

CHEN, J.; GUI, D.; CHEN, Y.; et al. Astragaloside IV improves high glucose-induced podocyte adhesion dysfunction via  $\alpha 3\beta 1$  integrin upregulation and integrin-linked kinase inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 796–804, 2008.

CHIMENTI, C.; PIERONI, M.; MORGANTE, E.; et al. Prevalence of Fabry disease in female patients with late-onset hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 110, n. 9, p. 1047–1053, 2004.

COSTA, R. M.; MARTUL, E. V.; REBOREDO, J. M.; CIGARRÁN, S. Curvilinear bodies in hydroxychloroquine-induced renal phospholipidosis resembling Fabry disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 6, n. 5, p. 533–536, 2013.

DEGIRMENCI, C.; YILMAZ, S. G.; ONAY, H.; et al. A novel mutation and in vivo

confocal microscopic findings in Fabry disease. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 31, n. 1, p. 45–47, 2017. King Saud University. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337063>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5352937>><<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319453416300959>>. .

DIB, R. EL; GOMAA, H.; ORTIZ, A.; et al. Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease : A complementary overview of a Cochrane publication through a linear regression and a pooled analysis of proportions from cohort studies. , p. 1–22, 2017.

DUCHARME, J.; FARINOTTI, R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. Focus on recent advancements. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 31, n. 4, p. 257–274, 1996.

FALL, B.; SCOTT, C. R.; MAUER, M.; et al. Urinary podocyte loss is increased in patients with fabry disease and correlates with clinical severity of fabry nephropathy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–14, 2016.

FELLGIEBEL, A.; GARTENSCHLÄGER, M.; WILDBERGER, K.; et al. Enzyme replacement therapy stabilized white matter lesion progression in fabry disease. **Cerebrovascular Diseases**, v. 38, n. 6, p. 448–456, 2014.

FERRAZ, F.; FERNANDEZ, J. H. Integrinas na adesão , migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. **Revista Científica da FMC**, v. 9, n. 2, p. 25–34, 2014.

FRANCESCO, P. N. DE; MUCCI, J. M.; CECI, R.; FOSSATI, C. A.; ROZENFELD, P. A. Fabry disease peripheral blood immune cells release in inflammatory cytokines : Role of globotriaosylceramide. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 109, n. 1, p. 93–99, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.02.003>>. .

FUJINO, T.; HASEBE, N. Alteration of histone H3K4 methylation in glomerular podocytes associated with proteinuria in patients with membranous nephropathy. **BMC nephrology**, v. 17, n. 1, p. 179, 2016. BMC Nephrology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27855638>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5114780>>. .

GERMAIN, D. P. Fabry disease. **Arch Dermatol.**, v. 140, p. 1440–1446, 2004.

GERMAIN, D. P. Fabry disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1–49, 2010.

GERMAIN, D. P.; HUGHES, D. A.; NICHOLLS, K.; et al. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 6, p. 545–555, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1510198>>. .

GONZALEZ-NORIEGA, A.; GRUBB, J. H.; TALKAD, V.; SLY, W. S. Chloroquine Inhibits Lysosomal Enzyme Pinocytosis and Enhances Lysosomal Enzyme Secretion By Impairing Receptor Recycling. , v. 85, n. June, 1980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2111452/pdf/jc853839.pdf>>. .

GREKA, A.; MUNDEL, P. Cell Biology and Pathology of Podocytes. **Annu Rev Physiol.**, v. 74, p. 299–323, 2013.

GUBLER, M.-C.; LENOIR, G.; GRÜNFELD, J.-P.; et al. Early renal changes in hemizygous and heterozygous patients with Fabry's disease. **Kidney International**, v. 13, n. 3, p. 223–235, 1978. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S008525381531869X>>. .

GUCE, A. I. The molecular basis of pharmacological chaperoning in human  $\alpha$ -galactosidase. **Chem Biol**, v. 12, n. 9, p. 1199–1216, 2011.

GUIMARÃES, F. S. F.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, S. M.; et al. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC Cancer**, v. 9, p. 293, 2009.

H., M. M. Fabry's disease - A comprehensive review on pathogenesis, diagnosis and treatment. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 64, n. 2, p. 189–194, 2014. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L372233537%0Ahttp://jpma.org.pk/PdfDownload/5948.pdf>>. .

HAN, S. Y.; KANG, Y. S.; JEE, Y. H.; et al. High glucose and angiotensin II increase  $\beta$ 1 integrin and integrin-linked kinase synthesis in cultured mouse podocytes. **Cell and Tissue Research**, v. 323, n. 2, p. 321–332, 2006.

HOPKIN, R. J.; JEFFERIES, J. L.; LANEY, D. A.; et al. The management and treatment of children with Fabry disease: A United States-based perspective. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 117, n. 2, p. 104–113, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.10.007>>. .

HUGHES, D. A.; NICHOLLS, K.; SHANKAR, S. P.; et al. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. **Journal of Medical Genetics**, v. 54, n. 4, p. 288–296, 2017.

HUMPHRIES, J. D. Integrin ligands at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 19, p. 3901–3903, 2006.

INAGAKI, M.; KATSUMOTO, T.; NANBA, E.; et al. Lysosomal glycosphingolipid storage in chloroquine-induced  $\alpha$ -galactosidase-deficient human endothelial cells with transformation by simian virus 40: in vitro model of Fabry disease\*. **Acta Neuropathol**, v. 85, p. 272–279, 1993.

KREIDBERG, J. A.; DONOVAN, M. J.; GOLDSTEIN, S. L.; et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. **Development**, v. 122, n. 11, p. 3537–3547, 1996.

LINTHORST, G. E.; HOLLAK, C. E. M.; MÜLLER-HÖCKER, J. Chloroquine-Induced Phospholipidosis of the Kidney Mimicking Fabry's Disease (multiple letters). **Human Pathology**, v. 34, n. 12, p. 1358–1359, 2003.

VON DER LIPPE, C.; FRICH, J. C.; HARRIS, A.; SOLBRÄNKE, K. N. Experiences of Being Heterozygous for Fabry Disease: a Qualitative Study. **Journal of Genetic Counseling**, v. 25, n. 5, p. 1085–1092, 2016.

MAARTENS, A. P.; BROWN, N. H. **Anchors and Signals: The diverse roles of integrins in development**. 1<sup>o</sup> ed. Elsevier Inc., 2015.

MACDERMOT, K. D.; HOLMES, A.; MINERS, A. H. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. **Journal of medical genetics**, v. 38, n. 11, p. 750–760, 2001.

MALADES, N. Atteinte rénale de la maladie de Fabry : résultats de l'enzymothérapie. **Medecine/Sciences**, v. 21, p. 23–25, 2005.

MAUER, M.; GLYNN, E.; SVARSTAD, E.; et al. Mosaicism of podocyte involvement is related to podocyte injury in females with Fabry disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

MEHTA, A; GINSBERG, L. Natural history of the cerebrovascular complications of Fabry disease. **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 447, p. 24- 7; discussion 9-10, 2005.

MEIKLE, P. J.; HOPWOOD, J. J.; CLAGUE, A. E.; CAREY, W. F. Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. **JAMA**, v. 281, n. 3, p. 249–254, 1999.

MORENO-LAYSECA, P.; ICHA, J.; HAMIDI, H.; IVASKA, J. Integrin trafficking in cells and tissues. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 122–132, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0223-z>>. .

MUNDEL, P.; KRIZ, W. Structure and function of podocytes: an update. **Anatomy and Embryology**, v. 192, n. 5, p. 385–397, 1995.

NAGAMATSU, K.; SEKIJIMA, Y.; NAKAMURA, K.; et al. Prevalence of Fabry disease and GLA c.196G>C variant in Japanese stroke patients. **Journal of Human Genetics**, , n. November 2016, p. 1–6, 2017. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/jhg.2017.31>>. .

NAGATA, M. Podocyte injury and its consequences. **Kidney International**, v. 89, n. 6, p. 1221–1230, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.01.012>>. .

NAJAFIAN, B.; SVARSTAD, E.; BOSTAD, L.; et al. Progressive podocyte injury and globotriaosylceramide (GL-3) accumulation in young patients with Fabry disease. **Kidney international**, v. 79, n. 6, p. 663–70, 2011.

NAKAO, S.; KODAMA, C.; TAKENAKA, T.; et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype. **Kidney international**, v. 64, n. 3, p. 801–7, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12911529>>. .

NEUMANN, P.; ANTONGIOVANNI, N.; FAINBOIM, A.; et al. Guía para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la enfermedad de Fabry. **Medicina**, v. 73, p. 482–94, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152410>>. .

ORTIZ, A. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Fabry. **Med Clin (Barc)**, 2016.

ORTIZ, A.; CIANCIARUSO, B.; CIZMARIK, M.; et al. End-stage renal disease in patients with Fabry disease: Natural history data from the Fabry Registry. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 3, p. 769–775, 2010.

PERICO, L.; CONTI, S.; BENIGNI, A.; REMUZZI, G. Podocyte–actin dynamics in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 11, p. 692–710, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneph.2016.127>>. .

PISANI, A.; VISCIANO, B.; IMBRIACO, M.; et al. The kidney in Fabry’s disease. **Clinical Genetics**, v. 86, n. 4, p. 301–309, 2014.

RAINSFORD, K. D.; PARKE, A. L.; CLIFFORD-RASHOTTE, M.; KEAN, W. F. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 231–269, 2015. Springer Basel.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

ROZENFELD, P. A. Fabry disease: Treatment and diagnosis. **IUBMB Life**, v. 61, n. 11, p. 1043–1050, 2009.

ROZENFELD, P. A.; TARABUSO, A.; EBNER, R.; RAMALLO, G.; FOSSATI, C. A. A successful approach for the detection of Fabry patients in Argentina. **Clinical Genetics**, v. 69, n. 4, p. 344–348, 2006.

SACHS, N.; SONNENBERG, A. Cell–matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 9, n. 4, p. 200–210, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneph.2012.291>>.

SAWADA, K.; TOYODA, M.; KANEYAMA, N.; et al. Upregulation of  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin in Podocytes in Early-Stage Diabetic Nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, n. Mc, p. 1–7, 2016. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/9265074/>>. .

SCHIFFMANN, R.; RIES, M.; BLANKENSHIP, D.; et al. Changes in plasma and urine globotriaosylceramide levels do not predict Fabry disease progression over 1 year of agalsidase alfa. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 15, n. 12, p. 983–9, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/gim/journal/v15/n12/full/gim201356a.html#affil-auth>>. .

SCHIWEK, D.; ENDLICH, N.; HOLZMAN, L.; et al. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. **Kidney International**, v. 66, n. 1, p. 91–101, 2004.

SEYDELMANN, N.; WANNER, C.; STORK, S.; ERTL, G.; WEIDEMANN, F. Fabry disease and the heart. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 29, n. 2, p. 195–204, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25987173>%5Cnhttp://www.bprcem.com/article/S1521-690X(14)00125-0/pdf>. .

SHEN, J.-S.; MENG, X.-L.; MOORE, D. F.; et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 95, n. 3, p. 163–168, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719208001765>>. .

SHII, B. S. I. Review Pharmacological chaperone therapy for Fabry disease. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 88, p. 18–30, 2012.

SHU, L.; VIVEKANANDAN-GIRI, A.; PENNATHUR, S.; et al. Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of Fabry disease. **Kidney international**, v. 86, n. 1, p. 58–66, 2014. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ki.2013.520>>. .

SPADA, M.; PAGLIARDINI, S.; YASUDA, M.; et al. High Incidence of Later-Onset Fabry Disease Revealed by Newborn Screening. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. July, p. 31–40, 2006. Disponível em: <[www.ajhg.org](http://www.ajhg.org)>. .

SUGARMAN, M.; CHOUDHURY, J.; JOVANOVIC, A. An atypical p.N215S variant of Fabry disease with end-stage renal failure. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 15, n. November 2017, p. 43–45, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.01.006>>. .

SUN, A. Lysosomal storage disease. **Journal of the Nepal Medical Association**, v.

48, n. 175, p. 242–245, 2011.

TØNDEL, C.; BOSTAD, L.; LARSEN, K. K.; et al. Agalsidase benefits renal histology in young patients with Fabry disease. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 24, n. 1, p. 137–48, 2013.

TØNDEL, C.; KANAI, T.; LARSEN, K. K.; et al. Foot process effacement is an early marker of nephropathy in young classic fabry patients without albuminuria. **Nephron**, v. 129, n. 1, p. 16–21, 2015.

TOYODA, M.; NAJAFIAN, B.; KIM, Y.; CARAMORI, M. L.; MAUER, M. Endothelial Fenestration in Human Type 1 Diabetic. **Diabetes**, v. 56, n. August, p. 2155–2160, 2007.

TRIMARCHI, H.; CANZONIERI, R.; SCHIEL, A.; et al. Podocyturia is significantly elevated in untreated vs treated Fabry adult patients. **Journal of Nephrology**, v. 29, n. 6, p. 791–797, 2016.

TURKMEN, K.; SAHIN, G.; KOCYIGIT, I.; et al. The Prevalence of Fabry Disease in Patients with Chronic Kidney Disease in Turkey : The TURKFAB Study. **Kidney Blood Pressure Res**, v. 41, p. 1016–1024, 2016.

VAN DEN BERG, J. G.; VAN DEN BERGH WEERMAN, M. A.; ASSMANN, K. J. M.; WEENING, J. J.; FLORQUIN, S. Podocyte foot process effacement is not correlated with the level of proteinuria in human glomerulopathies. **Kidney International**, v. 66, n. 5, p. 1901–1906, 2004.

VEDDER, A. C.; STRIJLAND, A.; VD BERGH WEERMAN, M. A.; et al. Manifestations of Fabry disease in placental tissue. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 29, n. 1, p. 106–111, 2006.

WALDEK, S.; FERIOZZI, S. Fabry nephropathy: a review - how can we optimize the management of Fabry nephropathy? **BMC Nephrology**, v. 15, n. 1, p. 72, 2014.

WANG, R. Y.; LELIS, A.; MIROCHA, J.; WILCOX, W. R. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. **Genetics in Medicine**, v. 9, n. 1, p. 34–45, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1097/GIM.0b013e31802d8321>>. .

WANNER, C. Fabry disease model: A rational approach to the management of fabry disease. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. SUPPL. A, p. 2–5, 2007.

WEIL, E. J.; LEMLEY, K. V.; MASON, C. C.; et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 82, n. 9, p. 1010–1017, 2012. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ki.2012.234>>. .

WILCOX, W. R.; OLIVEIRA, J. P.; HOPKIN, R. J.; et al. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: Lessons from the Fabry Registry. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 93, n. 2, p. 112–128, 2008.

YALIN, S. F.; EREN, N.; SINANGIL, A.; et al. Fabry Disease Prevalence in Renal Replacement Therapy in Turkey. **Nephron**, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/496620>>. .

YOGASUNDARAM, H.; HUNG, W.; PATERSON, I. D.; SERGI, C.; OUDIT, G. Y. Chloroquine-induced cardiomyopathy: a reversible cause of heart failure. **ESC Heart Failure**, v. 5, n. 3, p. 372–375, 2018.

ZAMBRUNO, G.; FURCI, L.; LUSVARGHI, E.; et al. Very Late Activation-3 Integrin Is the Dominant  $\beta$ 1-Integrin on the Glomerular Capillary Wall: An Immunofluorescence Study in Nephrotic Syndrome. **Nephron**, v. 62, n. 4, p. 382–388, 1992.