



**Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

**Fosfoproteômica em Podócito Humano Imortalizado da Doença de  
Fabry desenvolvido utilizando a Tecnologia CRISPR/Cas9**

**ESTER MIRANDA PEREIRA**

**Teresina-PI**

**2017**

**ESTER MIRANDA PEREIRA**

**Fosfoproteômica em Podócito Humano Imortalizado da Doença de Fabry desenvolvido utilizando a Tecnologia CRISPR/Cas9**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Piauí - Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Semiramis Jamil Hadad do Monte**

**Teresina-PI**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

P436f Pereira, Ester Miranda.

Fosfoproteômica em podócito humano imortalizado da  
Doença de Fabry desenvolvido utilizando a tecnologia  
CRISPR/Cas9 / Ester Miranda Pereira. – 2017.  
68 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de  
Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.  
“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Semiramis Jamil Hadad do  
Monte”.

1. Nefropatia de Fabry. 2. Podócitos. 3. CRISPR/Cas9.  
4. Biotecnologia. I. Título.

CDD 616.61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: ESTER MIRANDA PEREIRA

TÍTULO DO PROJETO: "Fosfoproteômica em Podócito Humano Imortalizado da Doença de Fabry desenvolvido utilizando a Tecnologia CRISPR/Cas9"

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Semiramis Jamil Hadad do Monte

**BANCA EXAMINADORA:**

	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Semiramis Jamil Hadad do Monte - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Benedito Borges da Silva - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva – UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Profa. Dra. Liline Maria Soares Martins - UESPI (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u>Liline Martins</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 14 de novembro de 2017.

HORÁRIO: 09:00h

LOCAL: Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco  
(NUPCelt/CCA/UFPI)

Em 2009, eu era apenas uma menina repleta de sonhos e apaixonada pelo conhecimento, sobretudo o científico. E como um raio de sol, a professora Semiramis Monte surgiu em minha vida. Um sol tão forte e brilhante que alimentou meus sonhos e estes ganharam vida. É completamente desconhecido por mim, o porque de uma mulher tão brilhante ter investido seu tempo e conhecimento na transformação e no crescimento de uma simples menina como eu. Mas, todos os dias eu tenho me esforçado para merecer tanto amor e bondade. Todas as pesquisas, ideias e conquistas em minha vida só poderiam ser dedicados a ELA.

Querida Professora Semiramis Monte, sou profundo agradecimento e tudo o que posso pedir ao Universo é que um dia eu tenha a oportunidade de ser para alguém o que a senhora é para mim. A senhora é a luz que me ilumina e a árvore que me sustenta. Um dia, a minha semente germinará, eu me tornarei uma árvore descendente da senhora e, poderei levar em meus galhos a seiva que nutrirá outros alunos, continuando, assim, o seu legado!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de amor inesgotável.

Aos meus anjos guardiões e espíritos amigos.

Em especial à Dr<sup>a</sup>. Semiramis Jammil Hadad do Monte, por ser a idealizadora desta pesquisa e ter me ofertado a oportunidade de executá-la, sempre me apoiando, acreditando em minha capacidade e me mostrando a luz quando já não conseguia raciocinar.

Ao Bernardo Pinto Freitas Filho, meu amigo e companheiro, sempre me apoiando e compreendendo os momentos nos quais precisei ausentar-me para a conclusão do Doutorado.

Aos meus pais, Aristides Reis Pereira e Magnólia Miranda Pereira, sempre me incentivando, cuidando, amando, torcendo ... E, acima de tudo, me ensinando que a caridade é o único e verdadeiro caminho para se obter paz nesse mundo.

Às minhas irmãs Lorena Miranda Pereira e Ângela Miranda Pereira, que tornam meus dias mais alegres.

Ao amigo e professor Adalberto Socorro da Silva, sinônimo de humildade e gentileza, que com sua incrível inteligência, paciência e compreensão me ensinou bem mais do que ciência, ensinou-me o significado de cooperação!

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular do Piauí e do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Pittsburgh, por simplesmente abrirem as portas destas instituições, facilitando o acesso a todas as informações necessárias.

*"O homem só possui em plena propriedade aquilo que lhe é dado levar deste mundo. Do que encontra ao chegar e deixa ao partir goza ele enquanto aqui permanece. Forçado, porém, que é a abandonar tudo isso, não tem das suas riquezas a posse real, mas, simplesmente, o usufruto. Que é então o que ele possui? Nada do que é de uso do corpo; tudo o que é de uso da alma: a inteligência, os conhecimentos, as qualidades morais. Isso o que ele traz e leva consigo, o que ninguém lhe pode arrebatá-lo, o que lhe será de muito mais utilidade no outro mundo do que neste. Depende dele ser mais rico ao partir do que ao chegar, visto como, do que tiver adquirido em bem, resultará a sua posição futura."*

**O Evangelho Segundo o Espiritismo**

## RESUMO

**Introdução:** A Doença de Fabry (DF) é uma doença rara de acúmulo lisossômico com padrão de herança ligado ao cromossomo X. A DF é ocasionada por mutações no gene *GLA* que codifica a enzima alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -GAL A), cuja principal função é metabolizar glicoesfingolipídeos. A Terapia de Reposição Enzimática (TRE) melhorou a qualidade de vida dos pacientes com DF, mas não impede a progressão da Nefropatia de Fabry (NF). A Doença Renal Crônica (DRC) é uma das principais causas de morbidade, redução da qualidade de vida e morte prematura em pacientes portadores da DF. O globotriaosilceramida (Gb3), o principal substrato de  $\alpha$ -GAL A, se acumula progressivamente dentro das células em uma variedade de tecidos. Os mecanismos pelos quais o aumento dos níveis de Gb3 e seus metabólitos secundários resultam em disfunção celular e orgânica na DF ainda permanecem desconhecidos. O estabelecimento de modelos celulares tem sido uma ferramenta útil para testar hipóteses de patogênese, para identificar biomarcadores de prognóstico clínico e de progressão da doença e para o desenvolvimento de medicamentos em fase inicial para várias doenças humanas. **Objetivos:** Identificação de vias de sinalização alteradas em podócito humano imortalizado com o genótipo e fenótipo da DF. **Metodologia:** Nós utilizamos a tecnologia de edição gênica *Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats associated endonuclease 9* (CRISPR/Cas9) para desenvolver um modelo de podócito humano imortalizado da DF. Em seguida, realizamos um estudo exploratório das vias de sinalização alteradas no modelo de podócito da DF em relação ao podócito controle utilizando como abordagem o fosfosarray. **Resultados:** Nosso modelo de podócito humano da DF apresentou elevados níveis de Gb3 e atividade de  $\alpha$ -GAL A reduzida. O estudo exploratório identificou um total de 59 proteínas e fosfoproteínas diferencialmente expressas. O estudo de ontologia gênica mostrou que essas proteínas estão envolvidas nos processos de crescimento, diferenciação e regulação do ciclo celular através das vias de sinalização PI3K, AKT, ErbB e MAPK. **Conclusão:** Este estudo fornece pela primeira vez uma análise abrangente das vias de sinalização na deficiência de  $\alpha$ -GAL A em podócitos humano imortalizados da DF e potencialmente abre novos caminhos para descoberta de biomarcadores e desenvolvimento de fármacos para a NF.

**Palavras chave:** CRISPR/Cas9 ; Nefropatia de Fabry, podócitos

## ABSTRACT

Fabry disease (FD) is a rare X-linked lysosomal storage disorder. Recent newborn screening data estimate that over 1,300 patients are born with FD each year. Over 70% of FD patients present with kidney dysfunction, of which about half progresses to end stage renal disease. While enzyme replacement therapy (ERT) has improved quality of life of FD patients, the kidney shows only suboptimal response to therapy, and disease progression can occur despite long term ERT. Globotriaosylceramide (Gb3), the main substrate of  $\alpha$ -gal A, progressively accumulates in a variety of tissues, and at the cellular level, it localizes to lipid raft domains. The mechanisms by which increased levels of Gb3 result in cellular and organ dysfunction in F are still unknown. Establishment of cell models have been useful as a tool for testing hypotheses of disease pathogenesis, for identifying biomarkers of clinical prognosis and disease progression, and for high-throughput early stage drug development for several human diseases. Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)-associated endonuclease (Cas)9 from *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) represent a novel tool for single or multiple genes modification in replicating cells, capable of inducing frame-shift insertion/deletion mutations and subsequent gene disruption. We applied CRISPR/Cas9 genome editing technology to develop human kidney cell models of FD in immortalized podocytes Using a surrogate reporter plasmid and selection through flow cytometry assisted sorting and hygromycin resistance, we enriched cell populations that were potentially modified through transfection of CRISPR plasmids designed to target different regions of the GLA gene. Enriched cell populations showed editing of target region through T7E1 assay as well as phenotype of FD shown by accumulation of the Gb3 and decreased enzyme activity of  $\alpha$ -gal A. Single clonal cell populations were characterized for genome editing of GLA by sequencing of PCR amplified regions. In order to explore different pathways that could have distinct patterns of activation under condition of  $\alpha$ -gal A deficiency in podocyte, we performed a phosphorylation profiling of immortalized human podocytes which were genome edited for FD and compared to control cells. Using a high-throughput antibody array, we measured the differential fold change for each total protein as well as their phosphorylation status per site in FD and control podocytes. Our results point at canonical pathways such as PI3K/AKT and ERK/MAPK as being differentially activated in FD podocytes. This study provides for the first time a comprehensive analysis of signaling pathways in  $\alpha$ -gal A deficiency and potentially opens new avenues for biomarker discovery and drug development for Fabry nephropathy.

**Key words:** CRISPR/Cas9; Fabry nephropathy; podocyte.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

$\alpha$ -GAL A	alpha-galactosidase A
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CRISPR/Cas9	<i>Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats associated endonuclease 9</i>
DF	Doença de Fabry
DRC	Doença Renal Crônica
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric oxide synthase</i>
EP	<i>effacement</i> podocitário
FD	Fenda diafragmática
FOS	<i>Fabry Outcome Survey</i>
Gb3	globotriaocilceramida
GLS	Glicoesfingolipídeos
HVE	hipertrofia do ventrículo esquerdo
IECA	inibidores da enzima conversora da angiotensina
Lyso-Gb3	Globotriaosilesfingosina
NF	Nefropatia de Fabry
Pod	Podocina
PODLX	Podocalixina
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
MBG	Membrana Basal Glomerular
TGF	taxa de filtração glomerular
SRA	sistema renina angiotensina
S-1-P	esfingosina-1-fosfato

## SUMÁRIO

<b>1.0 – INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2.0 – REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
<b>2.1 – Doença de Fabry</b>	13
2.1.1 – Conceito	13
2.1.2 - Aspectos Genéticos	14
2.1.3 – Epidemiologia	15
2.1.4 – Manifestações Clínicas	17
2.1.5 – Diagnóstico	19
2.1.6 – Tratamento	20
2.1.7 – Nefropatia de Fabry	22
<b>2.2 – Glicosíngolipídeos</b>	26
<b>2.3 – Podócitos</b>	29
2.3.1 – Introdução	29
2.3.2 – Embriogênese Podocitária	32
2.3.3 – Estrutura	33
2.3.4 – Injúria ao Podócito	37
2.3.5 – Regulação Molecular e Função do Podócito	39
2.3.6 – Modelos celulares para estudo de podocitopatias	43
<b>2.4 – Proteômica</b>	46
<b>2.5 – Bioinformática</b>	48
<b>3.0 – CAPÍTULOS</b>	50
3.1 – Capítulo I - Podocitúria na Doença de Fabry	50
3.2 – Capítulo II -	51
<i>Characterization and phosphoproteomic analysis of a human immortalized podocyte model of Fabry disease generated using CRISPR/Cas9 technology</i>	
<b>4.0 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	52
<b>5.0 – REFERÊNCIAS</b>	53

## 1.0 INTRODUÇÃO

A Doença de Fabry (FD)(OMIM #301500) é uma desordem lisossômica rara com padrão de herança ligado ao cromossomo X (OPITZ et al., 1965). O gene afetado GLA codifica a enzima lisossômica alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -GAL A) (EC 3.2.1.22) cuja principal função é metabolizar glicoesfingolipídeos (DESNICK et al., 1979). A diminuição ou ausência da atividade de  $\alpha$ -GAL A ocasiona o acúmulo progressivo de glicoesfingolipídeos com resíduos terminais neutros, principalmente globotriaosilceramida (Gb3), no interior das células de variados órgãos, o que altera a fisiopatologia celular e lesiona o tecido (KINT, 1970).

A Nefropatia de Fabry (NF) é uma das consequências clínicas mais graves ocasionadas pelo acúmulo de Gb3, resultando em glomeruloesclerose, atrofia tubular, fibrose intersticial e inflamação. Pacientes com NF tipicamente apresentam microalbuminúria em uma idade precoce que evolui para proteinúria evidente e declínio progressivo da taxa de filtração glomerular (TFG), evoluindo para doença renal crônica (DRC) (BEKRI et al., 2005; DEEGAN et al., 2006; ORTIZ; OLIVEIRA; WALDEK; et al., 2008). A Terapia de reposição enzimática (TRE) degrada os depósitos de Gb3 nos tufo glomerulares, mas não interrompe o desenvolvimento da doença renal. Assim, a TRE deve ser associada à terapias complementares destinadas a modificar a patogênese subjacente à lesão tecidual. A inibição do sistema renina-angiotensina (SRA) reduz a proteinúria na NF e pode retardar a perda da função renal. Contudo, os sintomas da DF, tais como hipotensão e bradicardia, limitam a tolerabilidade dos inibidores do SRA. Logo, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas baseadas em uma melhor compreensão dos eventos patogênicos é necessário para otimizar o tratamento NF.

Resultados histopatológicos renais mostram um padrão de depósitos de Gb3 em todos os tipos de células renais, principalmente em podócitos e em células epiteliais do túbulo distal. Lesão e redução da densidade de podócitos também foram documentados em pacientes com NF e estão entre os preditores de sua progressão (BECHERUCCI; ROMAGNANI, 2015; PEREIRA, ESTER MIRANDA et al., 2016). Podócitos são células epiteliais viscerais totalmente diferenciadas e

funcionalmente especializadas na filtração glomerular, a incapacidade dos podócitos maduros de se dividirem para garantir a manutenção do número de podócitos é o principal fator que desencadeia a perda progressiva da função renal. O tratamento precoce da lesão podocitária é essencial para limitar a doença glomerular e a progressão da doença renal (ALROY;SABNIS ;KOPP, 2002;ÖQVIST et al., 2009). Nesse contexto, o estabelecimento de um modelo celular de podócito humano com o genótipo e fenótipo da DF configura-se uma ferramenta útil para o estudo dos processos biológicos que se encontram alterados na NF, além de auxiliar na identificação de biomarcadores de progressão e prognóstico clínico.

Cientes da necessidade de uma intervenção precoce e específica para evitar a progressão da NF e de que tal fato só é possível após uma melhor compreensão de como o acúmulo de Gb3 altera a fisiopatologia dos podócitos, nós objetivamos com o presente trabalho:

- i) Quantificar a excreção de podócitos em urina de portadores da DF e controles saudáveis..
- ii) Desenvolver um modelo de podócito humano imortalizado com o fenótipo e genótipo da DF utilizando como ferramenta de edição gênica o sistema CRISPR/Cas9.
- ii) Identificar vias de sinalizações alteradas em podócitos humanos imortalizados da DF utilizando como abordagem o fosfoarray.
- iii) Transferir o modelo celular de podócito humano imortalizado da DF e a tecnologia CRISPR/Cas9 para o Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí (LIB-UFPI).

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doença de Fabry

#### 2.1.1 Conceito

A doença de Anderson-Fabry (OMIM\*301500), também chamada de Doença de Fabry (DF) ou angioqueratoma corporal difuso foi inicialmente descrita em 1868 pelos dermatologistas William Anderson na Inglaterra e Johannes Fabry na Alemanha (ANDERSON, 1898;FABRY, 1898). Entretanto, apenas seis décadas após, com a descoberta da organela lisossômica, a etiologia da DF foi elucidada (BRADY et al., 1967).

A DF é uma doença de depósito lisossômico, causada por mutações no gene *GLA* (OPITZ et al., 1965). Tais mutações afetam o produto gênico, a enzima lisossômica  $\alpha$ -GAL A, que participa do metabolismo dos glicoesfingolípídeos (BRADY et al., 1967). A redução ou ausência da atividade de  $\alpha$ -GAL A leva ao acúmulo progressivo de glicoesfingolípídeos (sobretudo sob a forma de globotriaosilceramida - Gb3) no plasma e nos lisossomos das células endoteliais de variados órgãos, principalmente pele, rins, coração, olhos e cérebro, com o resultante aparecimento da doença (LARRALDE et al., 2004).

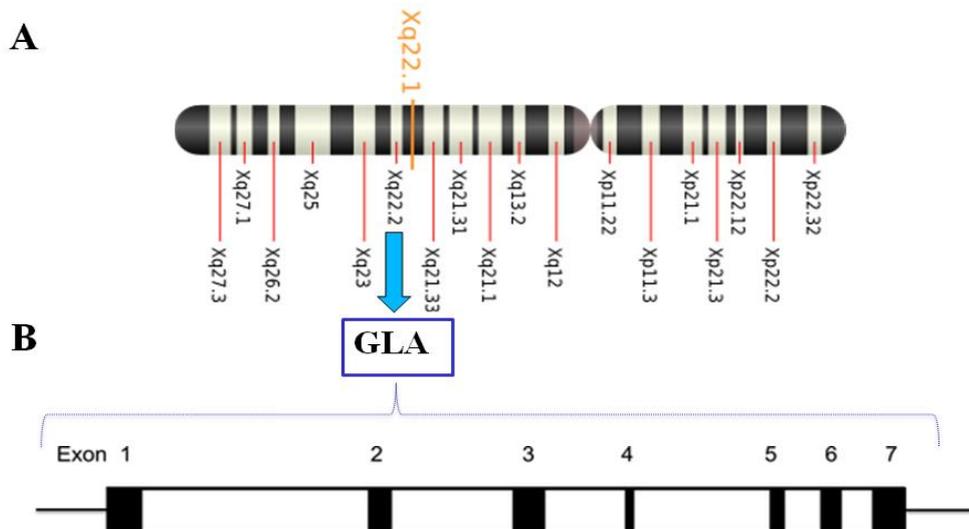
O acúmulo de Gb3 em células e tecidos desencadeia processos inflamatórios, isquemia, hipertrofia e o desenvolvimento de fibrose, promovendo assim, danos celulares e disfunção progressiva dos órgãos que, se não tratada, pode ocasionar à falência dos órgãos e morte prematura (BRANTON;SCHIFFMANN ;KOPP, 2002;ANDERSON et al., 2014). No entanto, o depósito progressivo de Gb3 pode não ser o único substrato responsável pelas manifestações da DF, uma vez que sinais e sintomas podem ocorrer na ausência de um acúmulo severo desse substrato. Globotriaosilfosfingosina (lyso-Gb3), um glicolípídeo bioativo, também se encontra elevado na DF e em cultura de podócitos humanos, lyso-Gb3 induz o aumento da expressão de colágeno tipo IV e fibronectina de forma TGF- $\beta$  dependente, um padrão típico de fibrose (WU et al., 2005). Além disso, a inflamação é um achado comum em biopsias renais de portadores da DF e há também

evidência de inflamação sistêmica persistindo mesmo após o início da TRE. Essa inflamação sistêmica persistente tem sido associada, inclusive, ao acidente vascular cerebral (AVC), um achado recorrente em portadores da DF (FELDT-RASMUSSEN, 2011).

### 2.1.2 Aspectos Genéticos

A herança da DF é ligada ao cromossomo X (OPITZ et al., 1965). O gene afetado chama-se *GLA* e está localizado no braço longo do cromossomo X na região 22 na banda 1 (Xq22.1) (BISHOP;KORNREICH ;DESNICK, 1988) (Figura 01-A). Esse gene tem cerca de 12kb de comprimento e contém sete éxons que variam entre 92 e 291 pares de bases (KRAWCZAK et al., 2000) (Figura 01-B). O defeito genético que produz a doença é extremamente heterogêneo, e de acordo com o Banco de Dados de Mutações Genéticas Humanas do Instituto de Genética Médica de Cardiff ([HTTP://WWW.HGMD.CF.AC.UK/AC/INDEX.PHP](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)) existem atualmente 649 mutações descritas. Os Exons 5, 6 e 3 compreendem a maioria das mutações pontuais, respectivamente. Mutações missense podem ser classificados em 3 grupos de acordo com o efeito que têm sobre a função da proteína (GARMAN;GARBOCZI, 2004): i) mutações que alteram o sítio ativo da enzima; ii) mutações que interferem na dobragem e estabilidade correta da proteína; iii) mutações que afetam negativamente a função da enzima.

**Figura 1- Localização e estrutura do gene *GLA*** A) Localização do gene *GLA* no cromossomo X. B) Representação esquemática dos éxons do gene *GLA*

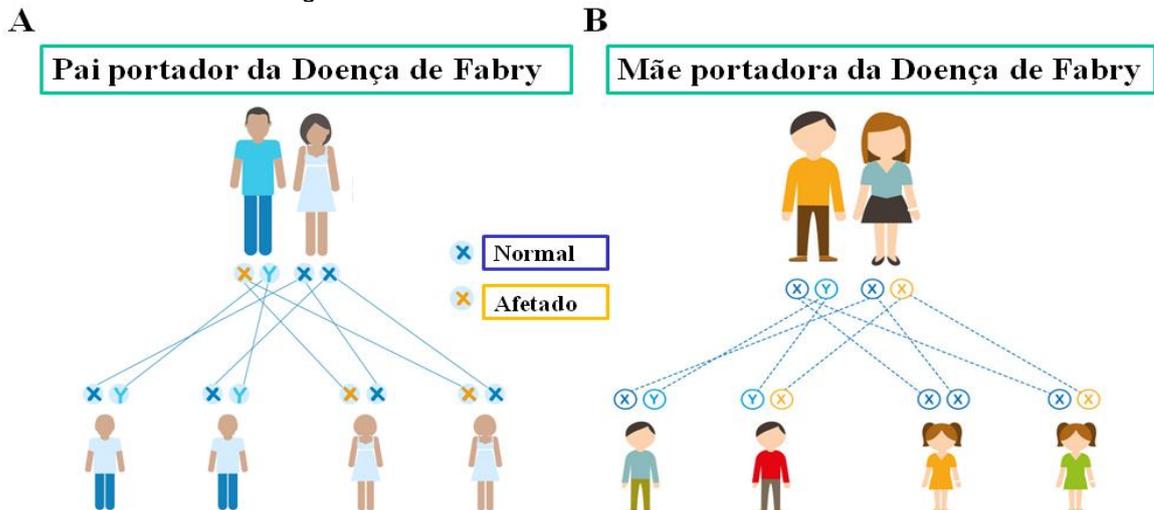


Fonte: Adaptado de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GLA>.

Aproximadamente 85% das famílias possui “mutações privadas”, ou seja, mutações específicas para essa determinada família, o que dificulta a padronização de um teste molecular para diagnosticar o distúrbio. A causa deste grande número de mutações diferentes no gene *GLA* não é conhecida.

Por se tratar de um padrão de herança ligado ao cromossomo X, homens portadores da DF sempre transmitirão o gene afetado para as filhas, mas nunca para os filhos. Mulheres heterogizotas possuem 50% de probabilidade de transmitir o gene afetado para os filhos, independente do sexo (Figura 02).

**Figura 02- Padrão de Herança Ligado ao Cromossomo X.** A) O pai é portador do gene mutado da Doença de Fabry e todas filhas herdarão o gene mutado; B) Mãe é portadora do gene mutado da Doença de Fabry e todos os filhos, independente do sexo, possuem 50% de probabilidade de herdar o gene mutado.



Fonte: Adaptado de <http://www.igeim.org.br/tiposheranca.html>

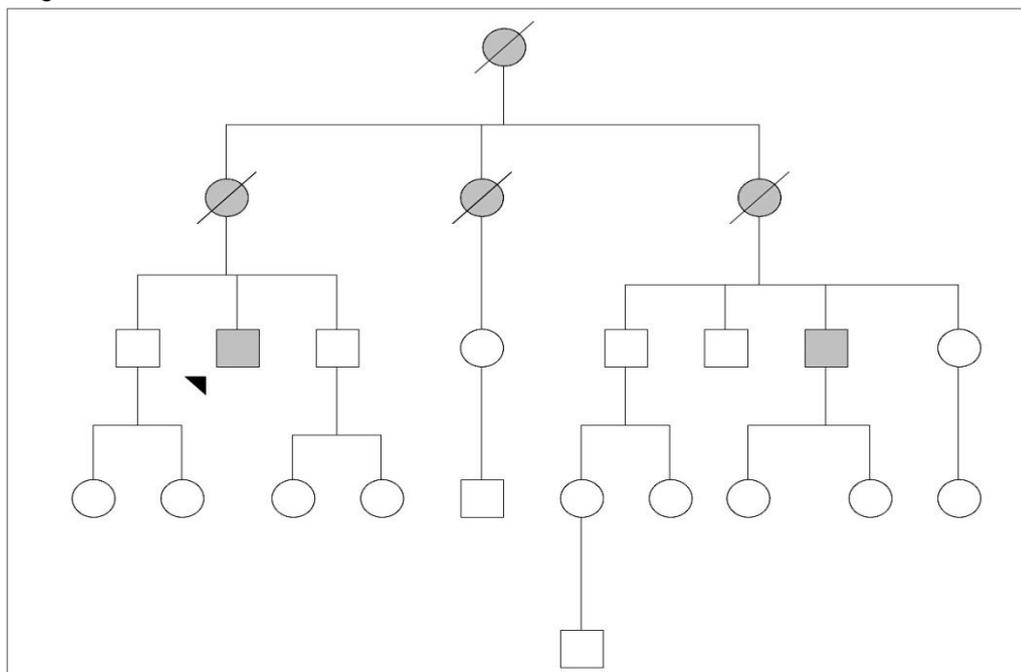
### 2.1.3 Epidemiologia

A DF tem ampla distribuição étnica e estima-se sua incidência em um caso a cada 40.000 homens ou um a cada 117.000 nascidos vivos (MEIKLE et al., 1999), representando, assim, a segunda alteração mais frequente por acúmulo lisossômico em humanos. Entretanto, as pesquisas recentes de triagem neonatal sugerem que a incidência pode ser muito maior, até 1:3100 (SPADA et al., 2006). É possível que essa incidência esteja subestimada devido à existência das variantes intermediárias da doença, aos casos diagnosticados “post mortem” (LARRALDE et al., 2007), à falta de sinais e sintomas específicos da doença e à escassez de informações técnico-científicas, já que se trata de uma doença rara.

A doença renal é uma característica clínica chave para o diagnóstico da DF e acredita-se que a incidência da DF em pacientes com DRC estágio 5 é subestimado (LINTHORST et al., 2003). Linthorst *et al* (2003) estimaram a prevalência da DF em pacientes submetidos à diálise em 0,22%. Conseqüentemente, um *screening* para a DF em grandes clínicas de diálise renal tem sido sugerido. Na França, 106 pacientes de hemodiálise foram selecionados para fazer o diagnóstico laboratorial para a DF. Um paciente foi diagnosticado positivo e mais sete de seus familiares possuíam a mesma mutação (BEKRI et al., 2005). Um estudo no Japão reportou que 1,2% dos homens que realizavam diálise renal eram portadores da DF (NAKAO et al., 2003).

No estado do Piauí, Monte e colaboradores realizaram uma triagem em indivíduos submetidos à hemodiálise sem etiologia conhecida e identificaram dois pacientes (DE DEUS VALE et al., 2008). Apenas um dos pacientes autorizou a pesquisa do gene afetado em familiares. Atualmente, o pedigree que teve como caso índice o paciente estudado (V269M), é composto por mais de 600 indivíduos (Figura 03) (PEREIRA et al., 2014).

**Figura 03 - Genealogia de cinco gerações de portadores da Doença de Fabry (DF) diagnosticados no estado do Piauí, Brasil.** A seta indica o caso índice da família. Círculos = mulheres; Quadrados = homens;; Símbolos com uma linha diagonal = falecido.



Fonte própria.

### 2.1.4 Manifestações Clínicas

Embora o acúmulo de glicolípideos inicie no período pré-natal, os sintomas típicos da DF geralmente surgem apenas na primeira infância nos homens (VEDDER et al., 2006). Os sintomas incluem episódios de dor nas extremidades (acroparestesia), sintomas gastrointestinais, hipohidrose e sensibilidade associada ao calor (SCHIFFMANN et al., 2005).

#### a) *Achados Dermatológicos:*

O achado mais característico da DF é a presença de angioqueratomas (AK) cutâneos disseminados. Os AK são lesões vasculares que abrangem um ou mais vasos sanguíneos dilatados na derme superior, diretamente abaixo da epiderme, em geral acompanhados de reação epidérmica caracterizada por acantose e/ou hiperqueratose (SCHILLER;ITIN, 1996). Clinicamente, apresentam-se como inúmeras pápulas de cor variável do vermelho ao preto, com superfície discretamente queratósica e tamanho variável de um até 10mm de diâmetro. Tendem a dispor-se em grupos e habitualmente tem distribuição simétrica e preferencial pela área de pele que vai do umbigo as coxas (disposição conhecida como em “roupa de banho”)

Os AK surgem na adolescência nos hemizigotos, porém não está estabelecido claramente o momento do surgimento em mulheres, embora costume ocorrer em idades mais avançadas (WHYBRA et al., 2001).

#### b) *Achados Neurológicos:*

O sintoma cardinal da DF é a parestesia crônica, que ocorre principalmente nos hemizigotos, acomete mãos e pés, começa na infância e persiste até a vida adulta. Trata-se de uma dor ardente acompanhada de formigamento, que pode ser intermitente ou contínua, e que pode irradiar para áreas vizinhas (LARRALDE et al., 2004). As acroparestesias compõem a principal causa de morbidade da doença durante as duas primeiras décadas de vida e, em alguns casos, levam a depressão e até mesmo à tentativas de suicídio (KOLODNY;PASTORES, 2002).A dor tem sido associada à neuropatia de pequenas fibras e acredita-se ser ocasionada por uma perfusão reduzida dos nervos periféricos ou devido ao acúmulo de glicosfingolípídios

em células neurais e perineurais (GEMIGNANI et al., 1984). Os episódios de dor podem ser contínuos ou esporádicos, mas normalmente estão associados a mudanças bruscas de temperatura, febre, estresse e exercícios físicos (MACDERMOT;HOLMES ;MINERS, 2001). Na idade adulta a ocorrência de AVC acontece na idade média de 34 anos em hemizigotos e de 40 em heterozigotas, e se deve fundamentalmente a oclusão da microvasculatura ou a embolia (LARRALDE et al., 2007).

c) *Achados Oftalmológicos:*

O achado ocular mais comum da DF é a córnea verticilata (opacidades amareladas caracterizadas por uma ou mais linhas irradiando de um ponto próximo ao centro da córnea), estando presente em quase todos os hemizigotos e entre 70 a 90% nas heterozigotas. Essa alteração não afeta a visão. Como esse achado ocular é muito frequente, a oftalmoscopia de lâmpada de fenda é uma importante ferramenta no auxílio do diagnóstico das mulheres com DF quando não se tem acesso aos estudos moleculares (NGUYEN et al., 2005).

d) *Achados renais:*

A presença de poliúria pode ser uma manifestação precoce do acometimento renal, mas é comumente ignorada. A maioria dos portadores da DF desenvolve proteinúria na adolescência tardia e é nesse momento que o dano renal é reconhecido (LARRALDE et al., 2007). Ele é progressivo, evolui habitualmente para DRC com redução da TFG atingindo estágio 5 da DRC, que se apresenta entre a terceira e a quinta década de vida, sendo tratada com diálise crônica ou transplante renal (BRANTON;SCHIFFMANN ;KOPP, 2002). Após o transplante, a atividade da enzima do enxerto consegue metabolizar o Gb3 evitando o acometimento do rim transplantado. Anteriormente, quando a diálise e o transplante renal não eram realizados, a DRC era a principal causa de morte na DF e a expectativa de vida era de 41 anos aproximadamente (ZARATE;HOPKIN, 2008).

e) *Achados Cardíacos:*

O comprometimento cardíaco é constante na DF. Produz-se pelo depósito de Gb3 e lyso-Gb3 no miocárdio, nas válvulas e no sistema de condução, o que explica a diversidade de sintomas, cuja expressão depende do sexo e da idade

(KAMPMANN et al., 2002). As manifestações mais comuns são: hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE), insuficiência mitral, arritmias e doença coronariana arterial (KAMPMANN et al., 2002). A coexistência de HVE e alterações valvulares associa-se à doença mais grave e constitui um fator de prognóstico da gravidade da doença em geral.

Heltianu et al (2002) verificaram uma correlação entre a DF e anormalidades no gene *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). Esse gene determina a síntese de óxido nítrico, molécula essencial para as funções fisiológicas do sistema vascular, o qual é exclusivamente produzido pelas células endoteliais. Mutações no gene eNOS podem aumentar a predisposição ou intensificar doenças cardiovasculares, como, por exemplo, na DF. Esse achado constitui um mecanismo adicional que explica por que um mesmo alelo para DF causa fenótipos diferentes entre os indivíduos portadores (HELTIANU et al., 2002).

f) *Achados Gastrointestinais:*

As manifestações gastrointestinais incluem náuseas, vômitos, dor abdominal, saciedade precoce, diarreia e constipação (HOFFMANN et al., 2007). Foi proposto que a demora no esvaziamento gástrico em conjunto com o acúmulo de lipídios nas células ganglionares do sistema nervoso autônomo, são os fatores responsáveis pela saciedade precoce, enquanto a diarreia tem sido associada ao crescimento bacteriano excessivo (O'BRIEN et al., 1982). A diminuição da sudorese ou hipohidrose é outra característica comum da DF, provocando intolerância ao calor e á atividades física, o que reduz bastante a qualidade de vida dos pacientes.

### **2.1.5 Diagnóstico**

*FabryOutcomeSurvey* (FOS, patrocinado pela Shire) e *Fabry Registry* (patrocinado pela Genzyme) são bancos de dados estabelecidos para coletar dados longitudinais sobre a DF (WILCOX et al., 2008). Estes bancos de dados mostraram um longo atraso entre o início dos sintomas iniciais e o diagnóstico. Por exemplo, dentro do Registro de Fabry, as idades medianas para o início dos sintomas e o diagnóstico foram 9 e 23 anos no gênero masculino, e 13 e 32 anos no feminino, respectivamente (MEHTA et al., 2004). Muitos pacientes pediátricos (menores de 18 anos) com DF relatam sintomas iniciais. No Registro de Fabry (idade mediana, 12

anos, n = 352), 77% dos homens e 51% das mulheres tinham sintomas ou sinais de DF, incluindo alguns pacientes que já haviam desenvolvido DRC estágio 2 ou 3 (DRC, n = 3) (RAMASWAMI et al., 2006). A avaliação das alterações morfológicas na DF por microscopia óptica e microscopia eletrônica em 9 pacientes pediátricos sintomáticos (7 homens, 2 mulheres, 7-18 anos) revelou alterações glomerulares e vasculares apesar da função renal normal (MEHTA et al., 2009).

Entre os fatores que contribuem para o diagnóstico tardio estão: i) o envolvimento de vários órgãos, desencadeando sintomas comuns à outras doenças; ii) à ausência de sinais patognomônicos; iii) à heterogeneidade fenotípica e iv) à ausência de conhecimento técnico e científico sobre a DF. O diagnóstico da DF exige confirmação laboratorial, através da dosagem da atividade enzimática de  $\alpha$ -GAL A em plasma (POEPPL;MURRAY ;MEDIN, 2005), soro, leucócitos, lágrimas, biopsias de tecido ou cultura em fibroblastos ou linfoblastos (DESNICK;WASSERSTEIN, 2001). Mulheres heterozigotas podem ser identificadas por apresentarem valores intermediários da atividade enzimática da  $\alpha$ -GAL A, porém essa atividade pode variar desde zero até a normalidade em função da lionização do cromossomo X. A investigação bioquímica não é suficiente para estabelecer o diagnóstico final da DF nessas mulheres, sendo necessária a análise molecular para a confirmação, por meio de análise de mutação no gene *GLA* (LINTHORST et al., 2003).

Quando se suspeita da DF, a pesquisa da história familiar é essencial, já que a maioria dos casos ocorre de forma hereditária. Porém, a ausência de dados familiares positivos não invalida o diagnóstico, uma vez que novas mutações são frequentemente documentadas.

### **2.1.6 Tratamento**

A principal terapia específica para a DF é a Terapia de Reposição Enzimática (TRE). A TRE para DF foi aprovada na Europa em 2001, nos Estados Unidos em 2003 e, em 2005, no Brasil. Atualmente existem duas  $\alpha$ -GAL humanas disponíveis no comércio: a algasidase alfa (Replagal®, Transkaryotic Therapies Inc.,Cambridge, Massachusetts), produzida por cultura de fibroblastos humanos

acrescidos de promotores ativos para a transcrição do gene da  $\alpha$ -GAL, aprovada na Europa; e a algalidase beta (Fabrazyme®, GenzymeCorp., Cambridge, Massachusetts), obtida por terapia recombinante de ovários de hamsters, aprovada na Europa e nos EUA (DESNICK et al., 1979).

Ambas as proteínas são estrutural e funcionalmente semelhantes, têm atividade específica comparável e são administradas por via intravenosa a cada 15 dias. A TRE é um tratamento a ser utilizado por toda a vida, uma vez que a quantidade da enzima no plasma é rapidamente depletada, necessitando, assim, de infusões constantes (DESNICK et al., 2003). A tolerância à TRE é geralmente boa, com exceção de reações leves ou moderadas associadas à infusão, que são produto da formação de anticorpos IgG não neutralizantes.

O uso da TRE a longo prazo melhora significativamente o estado clínico dos pacientes, principalmente pela redução da dor neuropática e diminuição da cardiomiopatia. A universalização do uso da TRE no tratamento da DF modificou a história natural da doença, incluindo a morbidade renal. Se na era pré-TRE, a NF era o fator de maior morbimortalidade, hoje essa posição é ocupada pela doença vascular. Apesar disso, a TRE apenas retarda o desenvolvimento da NF (SCHAEFER; TYLKI-SZYMAŃSKA; HILZ, 2009).

Em adultos, a TRE objetiva retardar a progressão da NF aos estágios finais, que necessitam de terapia de substituição da função renal, seja por diálise ou transplante renal (RIES et al., 2003; RIES et al., 2005; WRAITH et al., 2008; BORGWARDT et al., 2013; ANDERSON et al., 2014). Três revisões sistemáticas realizadas separadamente (CONNOCK et al., 2006; ALEGRA et al., 2012; EL DIB; NASCIMENTO; PASTORES, 2013) para estudar a eficácia da TRE na DF concluíram que o uso da TRE estabiliza a função renal em adultos, porém não reduz a proteinúria (WEST et al., 2009). Por isso, após a confirmação do diagnóstico da DF, o início da TRE com foco na NF é preconizado para todo paciente com proteinúria  $\geq 300\text{mg}/24\text{ h}$  e/ou redução da TFG.

Em crianças, o principal objetivo da TRE é impedir o desenvolvimento de complicações tardias. Entretanto, isso é uma lacuna no conhecimento, uma vez que ainda não existe um consenso se crianças sem comprometimento laboratorial de função renal, identificada pela presença de microalbuminúria e/ou redução da TFG,

devem iniciar a TRE. Apesar da ausência de comprometimento laboratorial, observa-se nas biópsias a presença de depósitos de Gb3 em podócitos com ou sem modificação da citoarquitetura dos prolongamentos podocitários, conhecidos como *effacement* podocitário (EP) (TØNDEL et al., 2010). O início precoce da TRE modifica esse achado histológico de EP, comprovando que o processo de EP é dinâmico e passível de reversibilidade se for afastado o fator etiológico da DRC.

Ramaswami e cols. (RAMASWAMI et al., 2011) estudaram a segurança do uso da TRE em crianças menores de 7 anos durante 4 anos. Os resultados mostraram que o uso de TRE nessa faixa etária é segura, preserva a TFG e evita o aparecimento de microalbuminúria. Entretanto, é necessária a observação de longo prazo para determinar se o início precoce da TRE irá de fato prevenir disfunção de órgãos nesses pacientes.

Outro tratamento específico disponível é a chaperona farmacológica migalastat (Amicus Therapy, EUA) , indicada para os doentes que possuem variantes instáveis da  $\alpha$ -GAL A mutante, que, por defeitos de qualidade é retida no retículo endoplasmático (RE), mas conservam atividade enzimática residual. A migalastat se liga e estabiliza a  $\alpha$ -GAL A recém sintetizada, restabelecendo o tráfico normal da enzima para os lisossomos, onde a dissociação de migalastat do sítio ativo de  $\alpha$ -GAL, possibilita a enzima metabolizar os substratos acumulados (GERMAIN et al., 2016).

Apesar dos avanços no tratamento específico para a DF e da TRE estabilizar e retardar a progressão da doença renal em portadores da DF, parte desses pacientes não conseguirão evitar a esclerose glomerular avançada e necessitarão de diálise e/ou transplante renal (ORTIZ; OLIVEIRA; WANNER; et al., 2008). Nesse contexto, torna-se crucial uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que levam ao desenvolvimento da NF para o desenvolvimento de biomarcadores precoces e futuros alvos terapêuticos.

### **2.1.7 Nefropatia de Fabry (NF)**

A NF é classificada como uma podocitopatia metabólica. O comprometimento renal ocorre no estágio embrionário e progride com surgimento de proteinúria e redução da TFG tanto em homens como em mulheres. A esmagadora

maioria das doenças renais que progridem para DRC começa no glomérulo, como uma consequência de uma capacidade muito limitada dos glomérulos de se regenerarem. Esta deficiência notável deriva principalmente de um tipo celular específico, o podócito (WOLF;CHEN ;ZIYADEH, 2005). Nascermos com um certo número de podócitos, aproximadamente 800 / glomérulo nos 2 milhões de néfrons dos dois rins com perda progressiva ao longo da vida. Até agora, não foram encontradas evidências de que os podócitos perdidos são substituídos por novos podócitos através de processos mitóticos (SHANKLAND, 2006). A única forma de compensar os podócitos perdidos para preservar a função glomerular consiste na hipertrofia das células residuais(KRIZ, 2012). Este mecanismo, no entanto, aumenta sua vulnerabilidade a qualquer desafio.

Constantemente perdemos podócitos; No entanto, na ausência de doença renal grave, mantemos um número suficiente para durar até uma idade avançada. As doenças glomerulares aceleram dramaticamente a perda de podócitos. Se num determinado glomérulo o número de podócitos cair abaixo de um certo nível (cerca de 60% do normal), o glomérulo junto com o néfron inteiro será perdido (HARA et al., 1998).

Por se tratar de um glomerulopatia, a NF configura-se uma das manifestações mais graves da DF, acredita-se que a NF seja consequência do acúmulo de Gb3 no endotélio glomerular, em células mesangiais e intersticiais, podócitos e na vasculatura renal.

Homens com o fenótipo clássico da DF desenvolvem proteinúria evidente e comprometimento renal progressivo entre a 2ª e 3ª décadas de vida (WILCOX et al., 2008). Mulheres portadoras da DF também possuem um risco significativo de comprometimento de órgãos importantes, como os rins. De fato, em um estudo com 638 mulheres portadoras da DF, a mensuração da TFG revelou que 62,5% das mulheres apresentaram TFG<90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> e 19% TFG<60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (WILCOX et al., 2008). Aproximadamente 30-35% das mulheres com DF têm proteinúria (DEEGAN et al., 2006;ORTIZ;OLIVEIRA;WALDEK; et al., 2008), 13% desenvolvem DRC estágio 3 (WEIDEMANN et al., 2012) e 1-4% desenvolvem doença renal terminal (WARNOCK et al., 2010).

Na DF, o decréscimo da função renal ao longo do tempo está relacionado com o grau de proteinúria e, nos pacientes não tratados, é mais rápido quando a  $TFG < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  (SCHIFFMANN et al., 2009). O sexo masculino e a hipertensão também são fatores de risco significativos para o desenvolvimento de DRC (SCHIFFMANN et al., 2009). Como nas demais nefropatias, a sobrecarga proteica pode causar um aumento nos níveis de mediadores inflamatórios, e acumulação intersticial desses mediadores pode levar a cicatriz renal. A redução da massa de nefron aumenta assim o risco de danos renais adicionais por (i) hiperfiltração, (ii) proteinúria e (iii) ativação da angiotensina II.

Em 1981, Brenner et al. hipotetizaram que a deterioração progressiva da função renal foi resultado de alterações hemodinâmicas glomerulares compensatórias ocorrendo em resposta à perda de néfrons. Em um modelo animal experimental com redução da massa renal, os néfrons restantes sofreram hipertrofia, o que foi associado com redução da resistência arteriolar e aumento do fluxo sanguíneo glomerular. A resistência arteriolar aferente diminuiu mais do que a resistência arteriolar eferente com progressão da doença renal. Como consequência, ocorre hipertensão glomerular (BRENNER et al., 1981).

A hipertensão glomerular foi demonstrada em estudos experimentais como um mediador do dano renal progressivo após uma variedade de lesões iniciais. Nestes modelos de DRC, a hiperfiltração glomerular ocorreu a nível de nefron e está associada a TFG total normal ou reduzida. Em algumas condições humanas, no entanto, particularmente *diabetes mellitus*, um aumento absoluto de TFG é frequentemente observado, representando hiperfiltração a nível renal. Os mecanismos de hiperfiltração glomerular a nível de nefron e renal podem ser diferentes. A TFG é determinado pelo fluxo plasmático renal, pelo gradiente de pressão hidráulica através da membrana renal e pelo coeficiente de ultrafiltração. Todos esses parâmetros podem ser alterados em pacientes com hiperfiltração glomerular. Alterações hemodinâmicas renais que resultam em hiperfiltração glomerular são susceptíveis de ter um papel crucial na iniciação e progressão da DRC (BRENNER;LAWLER ;MACKENZIE, 1996).

Como a hiperfiltração glomerular leva à cicatrizes segmentares e agravamento da função renal não está totalmente claro, mas estudos experimentais

revelaram que as adaptações funcionais para uma redução na massa renal incluem vasodilatação intra-renal, levando a elevação da pressão capilar glomerular e aumento do fluxo plasmático por néfron. A hiperfiltração por néfron remanescente serve inicialmente para manter a TFG, que é acompanhada por um aumento paralelo no volume glomerular que envolve a expansão dos componentes da matriz e um aumento no número de células endoteliais e mesangiais (NEURINGER;BRENNER, 1993). Podócitos adultos, no entanto, não podem proliferar, deixando lacunas na fenda diafragmática. Este processo não imunológico pode levar à lesão contínua dos podócitos e da microvasculatura glomerular, o que contribui para a proteinúria, fibrose e progressiva deterioração da função renal.

A lesão renal associada à hiperfiltração glomerular também é influenciada pela ativação do SRA, o que leva à respostas hemodinâmicas renais e sistêmicas compensatórias, aumento da rigidez arterial e disfunção endotelial. A intervenção mais efetiva, portanto, pode ser dirigida à hipertensão glomerular e ao SRA. O aumento da pressão glomerular pode ser atenuado pelo bloqueio do efeito vasoconstritor da angiotensina II sobre a arteríola eferente glomerular. Tal efeito benéfico seria independente das propriedades anti-hipertensivas dos inibidores do SRA. Dados animais sugerem que a terapia crônica com inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) ou bloqueadores dos receptores da angiotensina (ARAs) promove a regressão da glomerulosclerose, mesmo em fases posteriores da doença. Embora a angiotensina II tenha um importante papel como mediadora das mudanças hemodinâmicas no rim, vários outros efeitos não-hemodinâmicos atribuídos a esta substância podem também atuar na progressão da DRC (TERASAKI et al., 1994). Pode-se citar sua interferência na produção de espécies de oxigênio reativo; na regulação de citocinas; nas células de adesão; nos fatores de crescimento pró-fibróticos, os quais estimulam a proliferação das células mesangiais; na indução da expressão do TGF- $\beta$ ; no aumento da síntese de matriz extracelular; estímulo à produção do inibidor-1 de plasminogênio pelas células musculares lisas e células endoteliais; e ativação e infiltração de macrófagos. A angiotensina II também aumenta a produção de aldosterona pela adrenal, que contribui para a injúria renal e aumento da passagem transcápsular de proteínas plasmáticas pelo glomérulo (BRENNER, 2002).

Entretanto, os fatores supracitados (hiperfiltração, hipertensão glomerular e SRA), são mecanismos secundários que levam ao desenvolvimento da lesão renal. Ichikawa e colaboradores mostraram que o podócito lesado é o fator primário da progressão da doença renal crônica. Um podócito lesado lesa os podócitos vizinhos, numa cascata que culminará na perda excessiva de podócitos e, conseqüentemente, em hiperfiltração glomerular (ICHIKAWA et al., 2005). Logo, a compreensão da lesão inicial do podócito é essencial para que não ocorra a lesão renal irreversível.

No contexto da NF, a lesão inicial parece estar relacionada ao acúmulo de Gb3 e seus mediadores em podócitos desde o início do desenvolvimento renal, o que leva ao desprendimento dessas células e sua conseqüente eliminação na urina. De fato, Camila Tondell e colaboradores analisando biopsias renais de crianças portadoras da DF sem comprometimento laboratorial renal, observaram depósitos de Gb3 em podócitos com ou sem *effacement* (TØNDEL et al., 2008). O início precoce da TRE modificou esse achado histológico, comprovando que afastando o fator etiológico inicial, o *effacement* é dinâmico e passível de reversibilidade.

Assim, o conhecimento preciso do porquê e como o aumento da concentração dos glicoesfingolipídeos lesa o podócito é de grande importância na busca de estratégias para impedir e/ou retardar a progressão da NF para a DRC.

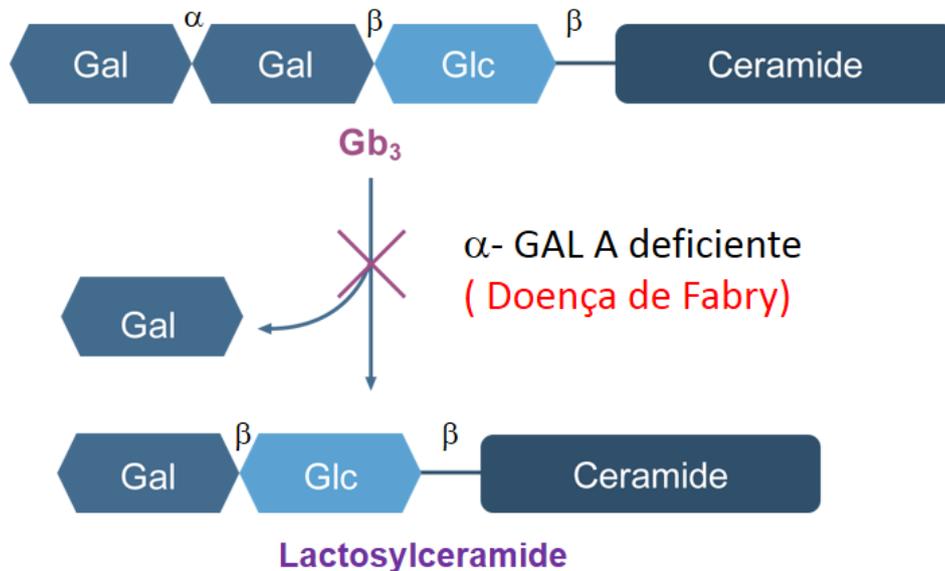
## **2.2 Glicoesfingolipídeos - GLSs**

A compreensão de como o acúmulo ou deficiência de um substrato afeta o organismo, como no caso da DF, exige alguns pré-requisitos básicos: (i) a elucidação da via metabólica alterada, (ii) a compreensão da natureza química e das interações celulares realizadas pelos metabólitos, (iii) de sua distribuição ao longo do organismo e (iv) e das funções exercidas pelo substrato em diferentes tipos celulares.

Brady e colaboradores demonstraram pela primeira vez em 1967, utilizando Gb3 radiomarcado como substrato, que a DF era ocasionada por uma deficiência enzimática da  $\alpha$ -GAL A que catalisa a remoção de grupos de  $\alpha$ -galactose terminais

desse substrato, como consequência ocorre o acúmulo de glicoesfingolípídeos neutros. (BRADY et al., 1967). (Figura 04)

**Figura 04. Via metabólica da degradação de Gb3.**  $\alpha$ -GAL A catalisa Gb3 em um resíduo de galactose e lactosilceramida. Legenda:  $\alpha$ -GAL A = alpha galactosidase A; Cer= ceramida; gb3= globotriaocilceramida; Glc= glicose



Fonte: Adaptado de <https://www.fabryawareness.com/>

Os glicoesfingolípídeos (GSLs) foram descobertos e nomeado por Ernst Klenk após seu isolamento do tecido cerebral em 1942 (STULTS;SWEeley ;MACHER, 1989). GSLs são constituintes membranares onipresentes, que são incorporados na membrana plasmática da célula. O termo GSLs aplica-se à compostos que contêm pelo menos um monossacárido e um esfingóide. Eles foram subdivididos em GSLs neutros e GSLs ácidos. Os GSLs neutros são os que possuem concentrações alteradas na DF.

As alterações específicas na composição e metabolismo dos GSLs ocorrem durante a proliferação celular, fases do ciclo celular, desenvolvimento do cérebro, diferenciação e neoplasia em vários tipos de células, indicando que a composição de GSLs responde à alterações na morfologia e função das células (HAKOMORI, 1981;HAKOMORI;KANNAGI, 1983;HAKOMORI;IGARASHI, 1995). A composição de GSLs também é única para cada tipo de célula ou tecido, e esta especificidade pode desempenhar um papel funcional na adesão e/ou transdução de sinal intracelular característica de tipos de células específicos. Um exemplo característico dessa especificidade é a forma do Gb3 ligado á membrana, conhecida como CD77. O CD77 é um receptor que está presente na maioria das células humanas no estágio

embrionário e adulto, entretanto, participa da seleção negativa de células B no centro germinativo, células B que expressão esse receptor são induzidas a entrar em apoptose (MANGENEY et al., 1991;MANGENEY et al., 1993). Além disso, a expressão de CD77 varia entre indivíduos de acordo com sua constituição genética, um exemplo é a presença do antígeno p<sup>K</sup> (CD77) em eritrócitos (NAIKI;MARCUS, 1974).

Alterações nas concentrações de GSLs ocorre em quase todos os tipos de câncer em humanos e animais e muitos antígenos associados à tumores são agora conhecidos como GSLs (HAKOMORI, 1981;HAKOMORI;KANNAGI, 1983;FALGUIÈRES et al., 2008;LIANG et al., 2013). O aumento da expressão de CD77, por exemplo, tem sido relatado em vários tumores sólidos, tais como ovário e câncer de mama ou meningioma maligno (KIGUCHI et al., 2006;FALGUIÈRES et al., 2008;LIANG et al., 2013). Recentemente, o aumento da expressão de CD77 está sendo correlacionado com o desenvolvimento de metástase em câncer de cólon (KOVNASNJUK et al., 2005). O CD77 também atua como um receptor para a maioria das Shiga-like toxinas, incluindo a verotoxina-1, uma enterotoxina de *E.coli* entero-hemorrágica, que pode induzir insuficiência renal aguda (KIYOKAWA et al., 1998). Curiosamente, verificou-se que ratos deficientes em Gb3 eram insensíveis á doses letais de verotoxina-1(OKUDA et al., 2006). A alteração da expressão de CD77 pode servir como ponto de entrada, levando à mecanismos de doença convergentes associados à distúrbios adquiridos e hereditários que terminam em doença renal, nesse caso, a DF pode ser vista como um exemplo de como as investigações sobre doenças raras, os chamados "experimentos" da natureza podem ajudar a elucidar caminhos fisiopatológicos que podem ter amplas implicações. Nesse contexto, o acúmulo desse glicoesfingolípídeos nos podócitos pode interferir no desenvolvimento, na adesão, motilidade e na manutenção da estrutura podocitária.

Inicialmente, o Gb3 é sintetizado no complexo de Golgi a partir de lactosilceramida, em seguida atinge o folheto externo da membrana plasmática através de transporte mediado por vesículas (LANNERT et al., 1994). Como outros glicoesfingolípídeos, o Gb3 reside preferencialmente em domínios de membrana especializados denominados "jangadas" lipídicas ou "microdomínios" (IKONEN, 2001). Os microdomínios constituem conjuntos dinâmicos bem compactados da

membrana plasmática que são ricos em esfingolipídios e/ou colesterol. Apesar de serem mais abundantes na membrana plasmática, podem ser encontradas intracelularmente nos compartimentos exocítico e endocítico (GALBIATI;RAZANI ;LISANTI, 2001). São entidades móveis e dinâmicas que se movem lateralmente ao longo da membrana plasmática e circulam continuamente entre a membrana plasmática e os compartimentos internos (NICHOLS et al., 2001), desempenhando papéis importantes no tráfico de membranas pós-Golgi, sinalização intra e intercelular e adesão celular (SIMONS;TOOMRE, 2000).

Perturbações na composição ou dinâmica dos microdomínios contribuem para a patogênese de várias doenças humanas, incluindo aterosclerose e doença de Alzheimer (CORDY;HOOPER ;TURNER, 2006;SCHENGRUND, 2010). Além disso, as mudanças na composição do microdomínio foram descritas para alguns distúrbios de armazenamento lisossômico, como Niemann-Pick tipo C, doença de Gaucher tipo I, doença de Sandhoff, doença de Sanfilippo, linfoscitose de ceróide neuronal, e doença de Krabbe (SIMONS;GRUENBERG, 2000). Estudos recentes demonstraram que a distribuição celular em estado estacionário de lactosilceramida difere em fibroblastos de pacientes com DF quando comparados aos fibroblastos controle, sugerindo alterações no tráfico mediado por microdomínios lipídicos na DF (LABILLOY et al., 2014). Um estudo dos microdomínios lipídicos em MDCK silenciadas para o gene *GLA*, demonstrou alterações tanto na composição quanto no tráfico mediados pelos microdomínios lipídicos (LABILLOY et al., 2014). No entanto, os efeitos da acumulação de Gb3 na dinâmica do microdomínio e quaisquer consequências para a patogênese da DF permanecem desconhecidos.

Até o momento, os metabólitos mais estudados na DF são gb3, lyso-Gb3 e esfingosina-1-fosfato (S1P). Esses substratos participam de diversas vias de sinalizações de crescimento celular, apoptose e motilidade. Logo, alterações em suas concentrações no interior e na membrana celular podem interferir em vias de sinalizações que induzem o desenvolvimento da NF desde a embriogênese.

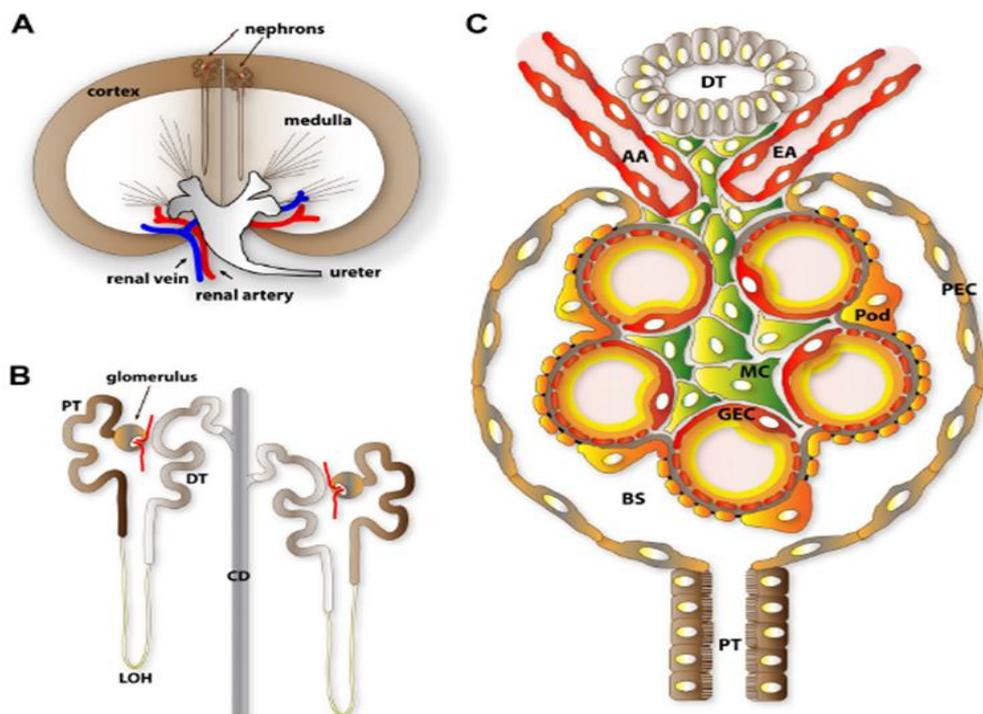
## **2.3 Podócitos**

### **2.3.1 - Introdução**

O rim humano contém aproximadamente um milhão de unidades individuais de filtração denominadas glomérulos. Os glomérulos são compostos de capilares especializados rodeados por uma membrana basal e células epiteliais glomerulares, também conhecidas como podócitos. Estes tufo capilares são estruturalmente apoiado por células musculares lisas modificadas chamadas de células mesangiais (Figura 05).

Embora todos os componentes glomerulares sejam importantes para o desenvolvimento e a função glomerular, o podócito tem sido alvo de inúmeras investigações. Ao longo da última década, a identificação de doenças humanas com mutações em genes específicos dos podócitos, observações de modelos animais e estudo de cultura de células levaram a um intenso interesse científico no papel dos podócitos nas doenças glomerulares (WIGGINS et al., 2005;SHI et al., 2008). Embora a investigação dos mecanismos da doença glomerular durante este período não tenha sido focado nessa célula, há evidências crescentes sobre a importância da interdependência entre todos os componentes do glomérulo.

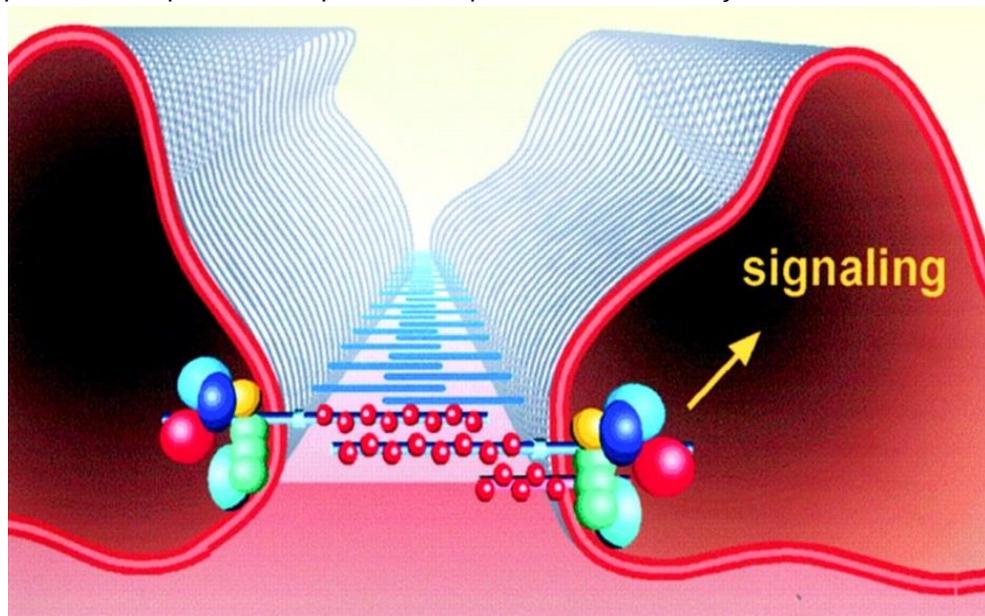
**Figura 05 - Visão anatômica geral da filtração renal.** A) Representação esquemática da distribuição de nefron no rim. Os glomérulos, unidades de filtração dos nefrons, estão localizados na região do cortex renal.B) Estrutura segmentar dos nefrons. C) Organização celular do glomerulo. Legenda: GEC= célula endotelial glomerular; AA = arteríola aferente; EA = arteríola eferente; Pod = podócito; MC = células mesangiais; PEC = célula epitelial parietal; PT = túbulo proximal; DT = túbulo distal; LOH = alça de Henle; CD= ducto coletor; BS = espaço de Bowman.



Fonte: Adaptado de MUNDEL, P. et al, (2002).

O estudo da biologia dos podócitos pode ser amplamente dividido em (i) mecanismos e fisiologia que definem o desenvolvimento dos podócitos, (ii) manutenção da saúde dos podócitos maduros e (iii) resposta dos podócitos à lesão. Os podócitos são células epiteliais viscerais altamente especializadas e terminais, ou seja, não se proliferam em situações de normalidade. O desenvolvimento dos podócitos envolve a metamorfose de uma célula epitelial cuboidal fixada na MBG em uma célula com um enorme corpo celular do qual emergem processos (ou pedicelos) primários, secundários e terciários, semelhantes aos tentáculos de um polvo, que se interdigitam formando junções intercelulares únicas com espaços regulares, chamadas de fenda diafragmática (Figura 06). A manutenção dos podócitos na maturidade requer mudanças estruturais, induzidas por sinalização celular, para manter a integridade da fenda diafragmática e a saúde do glomérulo.

**Figura 06- A fenda diafragmática dos podócitos é uma junção celular especializada com propriedades de sinalização.** Conecta processos de pedicelos interdigitantes que servem como parte essencial da barreira de filtração glomerular. As proteínas que compõem a fenda diafragmática (nephrin e neph1) recrutam proteínas adaptadoras citoplasmáticas para iniciar a transdução do sinal.



Fonte: Adaptado de KRIZ, W. (2012)

Na maioria das doenças glomerulares, o podócito sofre uma mudança morfológica dramática envolvendo o encurtamento de seus processos secundários e terciários, mecanismo denominado *effacement* podocitário (EP). Enquanto a aparência morfológica dos podócitos encontrados em muitas doenças glomerulares

pode ser indistinguível, é provável que os mecanismos moleculares subjacentes que levam á essas alterações morfológicas sejam distintos. A compreensão dos mecanismos moleculares que são responsáveis pelo EP nos ajudarão desenvolvimento de terapias específicas para doenças individuais. Nesse contexto, torna-se essencial a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na NF para o desenvolvimento de uma terapia que não apenas retarde, mas evite o desenvolvimento da lesão renal na DF.

### 2.3.2 Embriogênese podocitária

Durante o desenvolvimento renal, os precursores epiteliais dão origem aos podócitos maduros, que são semelhantes as células mesenquimais. O desenvolvimento glomerular prossegue em quatro estágios: (i) o estágio da formação da vesícula renal, (ii) o estágio do corpo em forma de S, (iii) o estágio da alça capilar e (iv) o estágio de maturação do glomérulo (SAXÉN;SARIOLA, 1987;SOROKIN;EKBLUM, 1992). A transição do estágio do corpo em forma de S para o estágio de alça capilar é crítica para a diferenciação dos podócitos (MUNDEL;KRIZ, 1995). As células precursoras dos podócitos são células poligonais simples com alta capacidade de multiplicação. Durante a fase inicial do desenvolvimento glomerular, os podócitos imaturos estão ligados por junções apicais (REEVES;CAULFIELD ;FARQUHAR, 1978). Estruturalmente, essas junções se assemelham a junções apertadas, que expressam a proteína *zone occludens* (ZO-1)e proteínas desmosomais (SCHNABEL;ANDERSON ;FARQUHAR, 1990). A expressão de podocalixina (PODX) e da proteína de junção celular ZO-1 começa nesta fase (SCHNABEL et al., 1989).

À medida em que os podócitos entram no estágio subsequente da alça capilar, eles começam a estabelecer sua arquitetura característica de uma célula complexa, incluindo a formação dos pedicelos e da fenda diafragmática. Nesta fase, desaparecem as proteínas desmosomais, a proteína ZO-1 migra do polo apical para o basal onde a fenda diafragmática se desenvolve. Em conjunto com o aparecimento das proteínas associadas à fenda diafragmática, são expressas nefrina, podocina e CD2AP (KREIDBERG, 2003). Esta conversão fenotípica, que inicia-se na fase S, está associada à perda de atividade mitótica e acompanhada pela expressão de

várias outras proteínas específicas, incluindo a sinaptopodina e PODLX com o reaparecimento de vimentina, um marcador fenotípico de células mesenquimais.

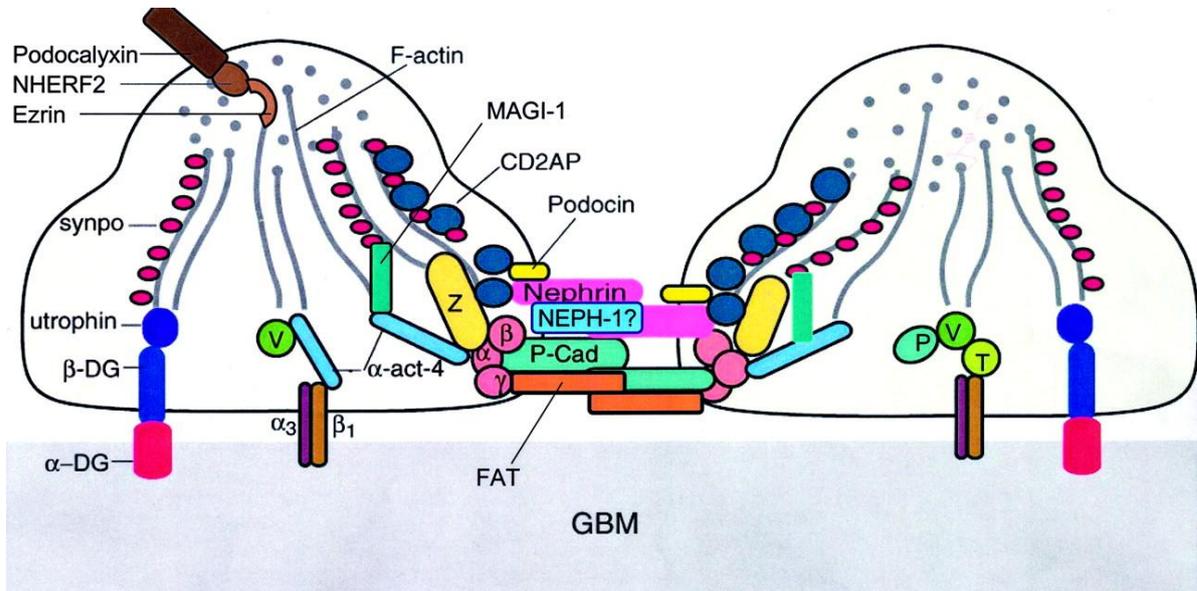
O desenvolvimento dos podócitos é relevante para os mecanismos de lesão podocitária no adulto. Os podócitos maduros são incapazes de se dividir *in vivo*. A evidência para esta hipótese vem dos estudos que mostram que o número de núcleos dos podócitos não aumenta nem durante o crescimento renal após o nascimento e nem na hipertrofia renal (PABST;STERZEL, 1983;FRIES et al., 1989). A transição dos podócitos do estágio de corpo em forma de S para o estágio de alça capilar e sua ramificação em arquitetura de célula especializada envolvem um processo de diferenciação celular complexo semelhante a um neurônio. Curiosamente, em resposta a certos estímulos [por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos (FGF)-2], podócitos podem reentrar no ciclo celular e submeter-se à divisão nuclear, mas não conseguem completar a divisão celular (KRIZ et al., 1994). A única exceção a esse fenômeno é observada na nefropatia por HIV, na qual os podócitos sofrem uma proliferação semelhante à tumoral, mas sem capacidade reparadora (BARISONI et al., 1999).

A incapacidade dos podócitos maduros para se submeterem à divisão celular e para reabastecer sua população torna o glomérulo vulnerável à sinais tóxicos, levando a perda significativa de podócitos, o que é uma marca no desenvolvimento da DRC (KRIZ;GRETZ ;LEMLEY, 1998).

### **2.3.3 Estrutura**

Estruturalmente, podemos dividir os podócitos em três domínios (i) apical, (ii) Basal e citoesqueleto e (iii) lateral (Figura 07).

**Figura 07 - Anatomia molecular dos podócitos.** O domínio apical é composto por sialoproteínas de carga negativa, sendo a podocalixina a principal delas. No domínio lateral, os pedicelos dos podócitos vizinhos se interdigitam formando a fenda diafragmática, essa ligação é formada por interações entre proteínas como a nefrina, podocina, proteína análoga ánefrina (NEPH-1) e P-caderina (P-cad). No domínio basal, o podócito está aderido à membrana basal glomerular (MBG) por meio de integrinas como a  $\alpha_3$  e  $\beta_1$ . O citoesqueleto de actina possui função chave na perfeita adesão do podócito nos domínios basal e lateral. Quaisquer interferência em um dos três domínios pode acarretar no *effacement* podocitário.



Fonte: Adaptado de MUNDEL, P. et al (2002).

### (i) Domínio Apical

A membrana apical do podócito é carregada negativamente devida à presença de diversas sialoproteínas de superfície aniônica, como a podocalixina, podoplanina e podoendina. Essa carga negativa limita a passagem de albumina carregada negativamente, e mantém a separação física dos podócitos adjacentes (SCHNABEL et al., 1989). A podocalixina é a maior das sialoproteínas transmembrana (165-kDa) e pertence à família das sialomucinas. Ela aparece no podócito pouco antes da formação dos pedicelos e da fenda, e é sempre encontrada na superfície apical. Sua importância é crítica para a formação e preservação da arquitetura celular dos podócitos, possivelmente impedindo a adesão das células parietais da cápsula de Bowman junto a estes (ECONOMOU et al., 2004). Devido a sua localização externa, é utilizada como marcador fenotípico dos podócitos em diversas glomerulopatias.

## (ii) Domínio Basal

A adesão dos podócitos à MBG é essencial para o funcionamento do glomérulo. A MBG é produzida e mantida pelos podócitos e células endoteliais glomerulares e anormalidades da MBG podem alterar a função de ambos. Os podócitos aderem à MBG através de proteínas de adesão, especialmente as integrinas. Há dados abundantes que apontam para a importância da sinalização relacionada à integrina na determinação do comportamento dos podócitos. As integrinas são receptores transmembranares heterodiméricos compostos de uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ . Nos podócitos, a  $\alpha3$  e  $\beta1$ -integrina são as mais abundantes (RODEWALD; KARNOVSKY, 1974). Camundongos com deleção gênica de  $\alpha3$  ou  $\beta1$ -integrina desenvolvem síndrome nefrótica e defeitos no desenvolvimento dos pedicelos (KANASAKI et al., 2008). A proteína kinase ligada à integrina (ILK) associa-se com o domínio citoplasmático da  $\beta$ -integrina e contribui para a transdução de sinal mediada por integrina (KIM et al., 2009). Os camundongos com deleção gênica de ILK em podócitos exibem EP, anormalidades da MBG, proteinúria e glomeruloesclerose progressiva (HAN et al., 2006). Essas proteínas ligam-se a diversos componentes da membrana, como colágeno IV, fibronectina, laminina e endactina, e também a proteínas do corpo podocitário, como alfa actinina-4 e sinaptopodina do citoesqueleto, permitindo que as alterações da membrana basal repercutam na forma e no movimento do podócito (Figura 07).

A produção de componentes da MBG por podócitos e a sua maturação são marcadas pela substituição da laminina-1 pela laminina-11 (que consiste em cadeias  $\alpha5 / \beta2 / \gamma1$ ) bem como pela substituição de  $\alpha1$ ,  $\alpha2$  por cadeias de  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  e  $\alpha5$ , presentes na MBG madura (MINER; SANES, 1996; MINER, 1999). Trabalhos recentes de experimentos de enxerto sugerem que fatores emergentes de células endoteliais medeiam a troca para a produção de laminina-11 [e possivelmente também para colágeno  $\alpha3$ , 4 e 5] em podócitos (JOHN; ABRAHAMSON, 2001). Como mostrado em vários modelos de ratos mutantes a falha destas alterações está associada a lesões estruturais graves (podócitos, MBG) e funcionais (fugas de proteínas).

Quando o podócito é lesado, seja pelo acúmulo de Gb3 na NF, ou em outras glomerulonefrites, esse podócito lesado se destaca da MBG e é liberado na urina. A

ocorrência prolongada desse processo resulta no aumento do diâmetro dos poros de filtração, que clinicamente é observado como proteinúria, marca registrada das glomerulopatias. Nesse contexto, a perda de podócitos na urina já vem sendo investigada como uma potencial ferramenta para avaliação da função renal antecedente à proteinúria (PETERMANN;FLOEGE, 2007). Além da perda da integridade da fenda diafragmática, o deslocamento dos podócitos da MBG afeta outras funções exercidas por essa célula, como a síntese e manutenção da MBG, produção e secreção dos fatores de crescimento, neutralização da pressão gerada no capilar glomerular, e regulação dinâmica de sua arquitetura.

A integridade estrutural dos pedicelos é crucial para estabelecer a estabilidade entre as junções célula-célula e célula-matriz dos podócitos. Este desafio único resultou no desenvolvimento de uma organização especializada do citoesqueleto dos podócitos em pedicelos. A função primária do citoesqueleto é garantir que o podócito se mantenha unido ao podócito vizinho, formando a fenda diafragmática, e permaneça ligado à MBG (MCCALL et al., 2014). Uma vez que a parede capilar glomerular sofre distensões cíclicas com cada batimento cardíaco, é também necessária uma combinação de resistência mecânica e flexibilidade. O citoesqueleto dos principais pedicelos tem que manter contato com a maquinaria metabólica do corpo celular do podócito para permitir o transporte vesicular ao longo do processo. Uma função adicional do citoesqueleto poderia ser uma contração das forças distensíveis da parede capilar.

A alfa-actina-4 é um filamento de actina, que está envolvida em certas formas de glomeruloesclerose segmentar focal (GESF) (WIGGINS, 2007). O gene da alfa-actina-4 foi identificado por Kaplan et al na mutação da forma autossômica dominante da GESF (KAPLAN et al., 2000). Esta proteína é um componente do citoesqueleto, sem dúvida desempenha um papel fundamental na integridade dos pedicelos, contribuindo para a formação e manutenção da integridade do citoesqueleto. Também é uma proteína importante para adesão do podócito à MBG.

### **(iii) Domínio Lateral - Barreira diafragmática**

Os pedicelos estão interligados entre si por um diafragma em fenda, e esta fenda é a principal barreira de filtração. Dessa forma, qualquer injúria que altere esta

arquitetura e leve à retração dos podócitos em relação à MBG, desencadeará perda de proteínas, uma característica chave das glomeruloscleroses (MORENO et al., 2008). A fenda diafragmática mede aproximadamente 25-60nm de comprimento e sua estrutura molecular inclui um número crescente de proteínas que estão organizadas em microdomínios funcionais dentro de um componente lipídico e se conectam com o citoesqueleto através de interações com outras proteínas sinalizadoras do podócito.

Como uma barreira seletiva ao tamanho, a fenda diafragmática é composta de proteínas de junção aderentes, tais como nefrina, P-caderina, NEPH1 e F-actina. Está conectada ao citoesqueleto de actina por proteínas adaptadoras, tais como a proteína associada a CD2, ZO-1,  $\beta$ -catenina e podocina (ITOH et al., 1997). A  $\beta$ -catenina está presente nos podócitos em duas formas: uma está localizada na membrana plasmática como uma caderina / catenina adesiva que estabiliza as junções aderentes mantendo a integridade epitelial e a outra no núcleo como um regulador chave da expressão gênica através da ligação à fatores de transcrição (HEIKKILÄ et al., 2010).

A ruptura da estrutura ou função da fenda diafragmática é um evento comum em muitas doenças renais que surgem no nível de podócitos (JALANKO et al., 2001). Acredita-se que a fenda diafragmática funciona como um sensor e regulador da forma e comprimento dos pedicelos (MORENO et al., 2008). Por exemplo, o movimento de cada pedicelo precisa ser coordenado com precisão com o dos pedicelos dos podócitos vizinhos para assegurar a integridade da BFG. Tal coordenação é provavelmente obtida através do acoplamento funcional de pedicelos opostos, que gera cascatas de sinalização em ambas as extremidades da fenda diafragmática. Esta rede multiproteína provavelmente funciona como uma plataforma de sinalização complexa e não simplesmente como uma peneira física.

#### **2.3.4 Injúria ao Podócito**

A lesão podocitária é o denominador comum em muitas formas de doença glomerular humana e experimental, como doença de mudança mínima, GESF, glomerulopatia membranosa, nefropatia diabética, nefrite lúpica e NF (KRIZ et al.,

1998;BOUTE et al., 2000;REISER et al., 2002;SUSZTAK et al., 2006;SANCHEZ-NIÑO et al., 2010). O melhor padrão caracterizado de lesão envolve uma reorganização do citoesqueleto de actina que leva ao EP e à ruptura da fenda diafragmática. A interrupção de qualquer um dos três domínios dos podócitos, com a transformação concomitante do citoesqueleto de actina e perda do padrão de interdigitação normal, leva à perda de podócito e proteinúria.

Há uma crescente compreensão da sequencia de eventos que desencadeia o EP e proteinúria, seguido ao longo do tempo por outras alterações fenotípicas, como hipertrofia do podócito e, finalmente, destacamento e perda . Os padrões iniciais de lesão incluem (i) alterações na estrutura ou função da fenda diafragmática, (ii) interferência com o MBG ou a interação podócito - MBG, (iii) disfunção do citoesqueleto de actina (iv)ativação de vias de imunidade inatas tais como a via de sinalização B7-1 , e (v) distúrbios na regulação transcricional da função do podócito(MUNDEL;SHANKLAND, 2002;REISER et al., 2004;WELSH;SALEEM, 2012;BYRON et al., 2014).

A lesão inicial no podócito é um processo reversível se o citoesqueleto de actina puder ser reparado, permitindo aos pedicelos se ramificarem novamente e retornarem ao padrão de interdigitação. A lesão podocitária crônica pode levar à perda da função glomerular e, finalmente, a perda total da função renal, através de três mecanismos principais: (a) vias desreguladas, (b) via inflamatória e (c) via degenerativa. No primeiro caso, na desregulação, a desdiferenciação dos podócitos leva à proliferação de podócitos no espaço de Bowman e ao colapso do tufo glomerular e perda capilar. Assim, a chamada glomerulopatia colapsante ocorre, por exemplo, na nefropatia associada ao HIV. Os mecanismos inflamatórios podem levar à fixação dos podócitos à membrana basal parietal, seguidopeloestabelecimento de aderências dos tufos à cápsula de Bowman(KRIZ, 2012). A proliferação adicional de podócitos e células parietais resulta numa crescente formação celular. Quando a lesão cura por fibrose, ocorre a glomerulosclerose segmentar. Finalmente, na forma degenerativa, que é mais comumente observada, a persistência da lesão podocitária pode causar atenuação do corpo celular, hipertrofia podocitária, desprendimento da MBG e morte podocitária, seguida pela formação de sinéquias pela ligação de células epiteliais parietais a MBG "nua"(ICHIKAWA et al., 2005). Este ligação resulta em filtração mal direcionada para o interstício. Através de uma série de alterações

subsequentes a perda de podócitos leva, em última análise, à glomerulosclerose e à insuficiência renal.

Logo, a identificação precoce da lesão ao podócito é crucial para se iniciar uma terapia específica que permita a reparação da lesão. Na NF o acúmulo de glicosfingolipídeos. Os estudos moleculares da disfunção podocitária tem mostrado que a injúria se inicia com alterações de vias de sinalizações responsáveis pela manutenção da função do podócito. Com base nisso, o estudo e a compreensão das vias alteradas em podócitos no contexto da NF torna-se essencial, uma vez já está estabelecido que glicosfingolipídeos desempenham um papel central em vias de adesão, migração e sinalização celular.

### **2.3.5 Regulação Molecular da Função dos Podócitos**

A década passada trouxe novos conhecimentos significativos sobre proteínas de membrana que iniciam vias de sinalização importantes para a estrutura e função dos podócitos(KREIDBERG, 2003). Essas moléculas atuam como sensores do complexo ambiente extracelular do podócito, recebendo sinais do espaço urinário (Bowman), do espaço vascular (capilar) e do MBG. Estes sinais são subsequentemente transduzidos para o ambiente intracelular, modulando o citoesqueleto de actina, transcrição de genes e vias de metabolismo celular . O resultado final da desregulação dessas proteínas é a podocitopenia, que pode ocorrer devido ao destacamento, apoptose, falta ou inabilidade de podócitos para proliferar.

#### **a) Apoptose**

O número celular reflete o equilíbrio entre um aumento no número de células devido à proliferação e uma diminuição no número de células devido à apoptose (morte celular programada). Embora estudos anteriores não tenham documentado um aumento significativo de apoptose em podócitos, estudos recentes têm mostrado que podócitos sofrem apoptose na doença glomerular (PETERMANN;FLOEGE, 2007). Uma explicação para a dificuldade anterior na detecção da apoptose de podócitos é que os podócitos apoptóticos são provavelmente eliminados na urina, tornando-se tecnicamente células de difícil detenção em biopsias que era a amostra

biológica mais utilizada nesses estudos. Kim e colaboradores induziram síndrome nefrótica em camundongos pela administração de aminonucleosídeo de puromicina (PAN) e demonstraram claramente a apoptose dos podócitos após lesão (KIM et al., 2001).

Estudos recentes analisaram ainda os mecanismos subjacentes à apoptose do podócito. Jia e colaboradores demonstraram que a angiotensina II induz a apoptose em podócitos de rato. Este efeito foi dependente da dose e do tempo (JIA et al., 2008). A apoptose induzida por angiotensina II foi reduzida bloqueando os receptores subtipo I ou II e foi completamente impedida quando ambos os receptores foram inibidos. A apoptose induzida por AngII foi parcialmente dependente de TGF- $\beta$ . Alterações nas vias de sinalização Smad, após a indução da apoptose em podócito por TGF- $\beta$ , foi recentemente descrita. Já a indução de apoptose de podócitos de rato em cultura pela administração de PAN é mediada através de espécies reativas de oxigênio (122). Tomados em conjunto, estes estudos mostram que a apoptose aumenta nos podócitos sob certas circunstâncias e contribui para a perda do número de células. Estudos futuros estão agora focados na compreensão das vias que medeiam esse processo.

## **b) Destacamento**

Um segundo mecanismo subjacente à uma diminuição no número de podócitos é o desprendimento de células da MBG. De fato, os estudos de Hara e colaboradores mostraram que as células obtidas na urina de pacientes com várias doenças glomerulares coraram positivas para podocalixina, um marcador podocitário (HARA et al., 2005). Resultados semelhantes foram mostrados no modelo PAN de lesão de podócitos em ratos (WIGGINS et al., 2005). Estudos posteriores demonstraram que os podócitos excretados na urina são viáveis e que alterações nas integrinas pode ser o indutor desse processo (CHEN et al., 2000).

As integrinas são receptores heterodiméricos de adesão celular cuja função é central para a inflamação, imunidade, progressão tumoral, desenvolvimento e manutenção da arquitetura normal dos tecidos em órgãos maduros. A adesão celular e a disseminação, bem como a remodelação da matriz extracelular (MEC) envolvem sinalização bidirecional e ligação física entre a MEC, as integrinas e o

citoesqueleto. O citoesqueleto de actina dos pedicelos podocitários está ligado à MBG pela integrina  $\alpha\beta 1$ , integrina  $\alpha\beta 3$  e  $\alpha/\beta$ -dystroglycans (ADLER, 1992). Podócitos também expressam a integrina p4, e mutações no gene que codifica a integrina p4 estão associadas com FSGS congênita e doença de pele (KEMENY et al., 1995) . A inativação genética da integrina  $\alpha 3$  ou  $\beta 1$  provoca EP e insuficiência renal em camundongos recém-nascidos, ressaltando assim o papel crítico da integrina  $\alpha\beta 1$  no desenvolvimento e manutenção do filtro glomerular (CHEN et al., 2006).

A quinase ligada à integrina (ILK) da proteína B1 é outro mediador do dano podocitário progressivo. A deleção específica do gene ILK em podócitos de camundongos provoca FSGS progressiva e insuficiência renal (HATTORI et al., 2008). A ativação de ILK em podócitos induz a sinalização de Wnt, o que, por sua vez, leva à redução da expressão de CD2AP e P-caderina, destacamento de podócitos e proliferação. Além disso, a super expressão de ILK provoca o rearranjo do citoesqueleto de actina no podócito, presumivelmente através da fosforilação mediada por ILK da  $\alpha$ -actinina. ILK serve como um adaptador que bioquimicamente e funcionalmente conecta a MBG com a fenda diafragmática, interagindo com nefrina,  $\alpha$ -actinina, PINCH e  $\alpha$ -parvin, desempenhando um papel crucial na adesão do podócito, morfologia e sobrevivência (FAUL et al., 2007).

O papel de B7-1 como regulador bidireccional da ativação e tolerância de células T está bem estabelecido e envolve a ligação de B7-1 aos seus receptores CD28, CTLA ou PD-L1. Entretanto, B7-1 é também um mediador induzível de lesão podocitária e proteinúria . Identificado inicialmente devido à sua super expressão em ratos knockout para integrina  $\alpha 3$ , também está super expresso em podócitos na nefrite lúpica humana e experimental e em ratos knockout para nefrina. O significado clínico destes resultados foi aumentado pela observação de que a expressão de B7-1 em podócitos correlaciona-se com a gravidade da nefrite lúpica humana.

### **c) Ausência de Proliferação**

Verificou-se também que uma diminuição do número de podócitos é consequente à falta de proliferação adequada após lesão neste tipo de célula . Como resultado, após a perda celular (por desprendimento e / ou apoptose), a

incapacidade de proliferação impede a restauração do número normal de podócitos. Isto contrasta com as células mesangiais e endoteliais glomerulares, que proliferam prontamente em resposta à diversas formas de lesão. Há um grande corpo de literatura mostrando que a proliferação de podócitos se correlaciona estreitamente com seu estado de diferenciação, o que pode fornecer pistas importantes nos mecanismos subjacentes à falta de proliferação (REISER et al., 2002). Durante a glomerulogênese, os podócitos presumíveis e imaturos proliferam e estão ativamente envolvidos no ciclo celular. No entanto, durante a fase S crítica do desenvolvimento renal, os podócitos saem do ciclo celular para assumir um fenótipo terminalmente diferenciado e quiescente, o que é necessário para a sua função altamente especializada.

A proliferação é governada no ciclo celular por proteínas reguladoras do ciclo celular. Para proliferar, as ciclinas devem ligar-se e ativar quinases dependentes de ciclina (CDK). Em contraste, CDK são inativados por inibidores de CDK, incluindo p21, p27 e p57. Deste modo, o equilíbrio dos complexos de ciclina-CDK e dos inibidores de CDK determina se as células proliferam ou não. Tanto em camundongos como em humanos, as imunocolorações para p27 e p57 estão ausentes em podócitos imaturos proliferantes (MUNDEL;SHANKLAND, 2002).

Durante o estágio em forma de S do desenvolvimento glomerular, contudo, a diferenciação de podócitos coincide com um aumento acentuado na expressão dos inibidores de CDK p27 e p57 (MUNDEL;SHANKLAND, 2002). Esta expressão diferencial de inibidores de CDK persiste em podócitos normais.

Os modelos biológicos são de extrema importância para a elucidação da fisiopatologia da doença, identificação de marcadores moleculares precoce, para descoberta e teste de medicamentos. O crescente avanço em genômica e bioinformática possibilitou estudos mais abrangentes da função gênica comparativa (HOUEBINE, 2007). Os camundongos são o organismo modelo mais comumente usado na pesquisa biomédica e compartilham 85% de similaridade em suas regiões codificadoras de genes com humanos (BATZOGLOU et al., 2000). Estes animais podem ser facilmente mantidos sob ambiente controlado e padronizado, minimizando os fatores de confusão. Eles também compartilham vários aspectos de sua anatomia, fisiologia e metabolismo com os seres humanos, mas com uma vida

útil acelerada, permitindo a tradução rentável para entender a biologia humana. No entanto, alguns modelos de rato não conseguem reproduzir o espectro completo da doença, tornando-os inadequados para o estudo de certas condições, tais como a DF (OHSHIMA et al., 1997). Além disso, as crescentes organizações contra o uso de animais em experimentos laboratoriais exigem novas condutas éticas que solicitam a mudança da pesquisa em modelos animais para modelos celulares, tendo em vista o crescente avanço nessa área.

### **2.3.6 Modelos celulares para estudo de podocitopatias**

Uma melhor compreensão da biologia do podócito veio de dois pontos principais: primeiro, a genética molecular de transtornos de um único gene que levam à formas raras de síndrome nefrótica congênita (BOUTE et al., 2000); E segundo, o estudo focalizado deste tipo celular especializado *in vivo* e *in vitro*.

Os glomérulos são utilizados para aquisição de uma cultura primária de podócitos. Normalmente, o isolamento dos podócitos glomerulares é realizado por peneiração diferencial. Alguns dos primeiros trabalhos sobre podócitos de ratos e humanos utilizaram podócitos de cultura primária, mas o problema foi que estas células não desenvolveram as características de células diferenciadas e continuaram a proliferar, enquanto que podócitos diferenciados são células quiescentes que não proliferam (NI;SALEEM ;MATHIESON, 2012). Quando marcadores específicos de podócitos diferenciados (como nefrina e podocina) se tornaram conhecidos no início de 1990, ficou claro que um modelo de podócito adequado para estudo *in vitro* precisava obrigatoriamente apresentar esses marcadores.

Uma técnica para aumentar o número de células disponíveis e desenvolver populações clonais de células que, teoricamente, deveriam ser homogêneas e estáveis é transformar as células utilizando um oncogene. O gene de transformação normalmente utilizado é o SV40, um gene derivado de macaco que promove a proliferação não regulada das células nas quais é transfectado. Sraer e colegas em Paris produziram uma linhagem celular de podócitos humanos transformados com

SV40, entretanto, verificou-se que esta linhagem celular não desenvolveu o fenótipo de podócitos diferenciados.

Em 2002, Sallen e colaboradores desenvolveram uma linhagem de podócito humano imortalizado após a obtenção do cultivo primário. Para tanto, eles utilizaram o vírus SV40 sensível á temperatura, o que lhes possibilitaram um controle da expressão do vírus SV40 *in vitro* (SALEEM et al., 2002). Na temperatura de 33°C o vírus é expresso e as células se proliferam vigorosamente, quando essas mesmas células são colocadas a 37°C, temperatura semelhante ás condições fisiológicas corporal normal, o transgene viral é silenciado, as células param de proliferar, entram no processo de diferenciação e começam a expressar os marcadores específicos de podócitos diferenciados. Essa linhagem celular, conhecida como "Saleemocytes", foi partilhada com outros pesquisadores e tem sido amplamente estudada por numerosos grupos em todo o mundo, inclusive o nosso grupo.

Após o estabelecimento de um modelo celular adequado para o estudo da biologia do podócito, técnicas de biologia molecular começaram a ser utilizadas para a obtenção de um podócito com o fenótipo da doença glomerular que se deseja estudar.

O primeiro modelo celular de podócito humano imortalizado utilizado para estudar a NF foi desenvolvido utilizando a técnica de silenciamento gênico por meio dos RNAs de interferência (iRNA). Os iRNAs é um sistema bastante conservado evolutivamente que fornece proteção contra vírus e transposons de RNA de dupla fita (dsRNA) como parte de uma resposta imune primitiva, descrita pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998). Estes dsRNAs são clivados em pequenos RNAs de interferência (siRNA) e incorporados num complexo de multiproteína denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo RISC-siRNA ativado reconhece então mRNA complementar, desencadeando a clivagem específica da sequência, a desestabilização ou a repressão translacional do mRNA alvo e assim o silenciamento de genes . Pequenas moléculas siRNA sintéticas podem ser projetadas para direcionar mRNA de um gene de escolha e entregues nas células para o carregamento RISC, permitindo o silenciamento gênico direcionado. Embora a diminuição efetiva na abundância da proteína alvo possa ser alcançada em muitos casos, este sistema só permite um

silenciamento transitório, uma vez que a maioria dos siRNA sintéticos é degradada em 48 h .

O sistema CRISPR / Cas9 tem sido amplamente utilizado para a edição do genoma desde a descoberta de seus componentes básicos. Em 1987, descobriu-se que o genoma bacteriano contém 29 repetições nucleotídicas intercaladas por cinco sequências não repetitivas de 32 nucleótidos (Ishino et al., 1987). Durante os 10 anos seguintes, elementos repetitivos adicionais foram relatados em diferentes espécies bacterianas e archea. Em 2000, Mojica *et al.* classificaram estas sequências repetidas intercaladas como uma única família de elementos de repetição agrupados presentes em mais de 40% das bactérias e 90% das arqueas (Mojica et al., 2000). Em 2002, Jansen *et al.* criaram o termo CRISPR (do inglês **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) para descrever os loci microbianos genômicos consistindo de repetições intercaladas (Jansen et al., 2002). Cada uma dessas repetições encontra-se adjacente a um “protoespaçador” (“espaçador de DNA”), que corresponde a uma região não-codificante inserida no DNA bacteriano após o contato com genomas invasores provenientes de bacteriófagos ou plasmídeos. A importância destas repetições foi apreciada mais tarde quando os investigadores descobriram que as sequências do genoma dos bacteriófagos são semelhantes às sequências espaçadoras nos loci CRISPR (Bolotin et al., 2005). Em seguida, descobriu-se que os loci CRISPR são transcritos e os vírus são incapazes de infectar células bacterianas que transportam as sequências CRISPR correspondentes aos genomas virais (Tang et al., 2002). Estes resultados levaram à especulação de que o sistema CRISPR serve como uma memória imune e mecanismo de defesa contra infecção de bacteriófago. Outra parte de extrema importância desse mecanismo são as endonucleases denominadas Cas (*CRISPR-associated proteins*). As proteínas Cas são capazes de clivar o DNA em locais específicos direcionados pelas sequências CRISPR.

A transcrição do locus CRISPR resulta em pequenos fragmentos de RNA com capacidade de desempenhar o reconhecimento de um DNA exógeno específico e atuar como um guia de modo a orientar a nuclease Cas, que irá promover a clivagem e consequente eliminação do DNA invasor caso este entre novamente em contato com a bactéria, atuando como importante mecanismo de defesa contra DNAs invasores.

Basicamente o sistema imunológico CRISPR funciona em 3 etapas:

1) Adaptação - DNA de um vírus invasor é processado em segmentos curtos que são inseridos na sequência CRISPR como novos espaçadores.

2) Produção de RNA - repetições CRISPR e espaçadores no DNA bacteriano passam por transcrição, o RNA resultante é uma molécula de cadeia simples. Esta cadeia de RNA é cortada em pequenos pedaços chamados CRISPR RNAs (crRNAs).

Etapa 3) Segmentação - crRNAs guiam a maquinaria molecular bacteriana juntamente para destruir o material viral. Uma vez que as sequências de RNA de CRISPR são copiadas das sequências de DNAs virais adquiridas durante a adaptação, elas são correspondências exatas com o genoma viral e assim servem como guias extremamente preciosos.

Apesar da compreensão do funcionamento do sistema, foi apenas em 2012 que o sistema CRISPR-Cas9 começou a ser introduzido como uma técnica revolucionária para edição de genoma (STERNBERG; DOUDNA, 2015). Para tanto, os pesquisadores substituem as regiões CRISPR de sequências virais por sequências genômicas específicas do gene de interesse. Assim, é possível induzir deleções para inativar o gene de interesse, possibilitando o desenvolvimento de modelos celulares com genótipo e fenótipo da doença de interesse a ser estudada.

## **2.4 Proteômica**

Após o desenvolvimento de modelos celulares editados geneticamente, o passo seguinte é a compreensão de como determinadas mutações alteram a dinâmica celular desencadeando a patogênese da doença. Nesse contexto, o estudo de alterações no perfil de proteínas e fosfoproteínas torna-se essencial, uma vez que as proteínas são os dispositivos moleculares, em escala nanométrica, na qual a função biológica é exercida. Elas são os blocos de construção de todas as células em nossos corpos e em todas as criaturas vivas de todos os reinos. Embora a informação necessária para a vida continue codificada pela molécula de DNA, o processo dinâmico de manutenção, replicação, defesa e reprodução da vida é realizado por proteínas.

No passado, o estudo do perfil de proteínas foi feito por análise de RNA, conhecido como transcriptoma, entretanto, o perfil de RNA não se correlacionou com o conteúdo de proteínas. Sabe-se agora que o mRNA nem sempre é traduzido em proteína e a quantidade de proteína produzida para uma determinada quantidade de mRNA depende do gene que é transcrito a partir do estado fisiológico atual da célula.

O dogma central da biologia molecular, que afirma que "o DNA é transcrito em RNA e o RNA é traduzido em proteína", trouxe muito mais complexidade do que se pensava originalmente. Enquanto o genoma humano é composto por aproximadamente 21.000 genes, o transcriptoma humano contém mais de 80.000 transcritos de codificação de proteínas, que se calcula que se traduzem em 250.000 a 1 milhão de proteínas (AHMAD;LAMOND, 2014). Os RNAs não codificantes, incluindo os microRNAs e os pequenos RNAs nucleares, também desempenham papéis importantes na modificação e regulação da transcrição, adicionando mais complexidade aos sistemas biológicos. Além disso, após a tradução, as proteínas podem ser modificadas de forma reversível ou irreversível, afetando a diversidade e extensão de sua função. A meia-vida das proteínas também varia de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos que podem contribuir para o aumento ou diminuição da taxa de degradação das proteínas (DE KLERK;T HOEN, 2015). Assim, não é de surpreender que a expressão de mRNA nem sempre se correlacione com os níveis de proteína, assim como nem sempre a abundância de proteínas está correlacionada com a função deles .

As modificações de proteínas que modulam a função protéica após a tradução podem ocorrer através da clivagem proteolítica ou alterações nas cadeias laterais de aminoácidos. Tais modificações incluem vários processos enzimáticos e não enzimáticos, tais como: adição de grupos, acetilação, acilação, alquilação, glicosilação, oxidação, hidroxilação, carboxilação, glicação, metilação, desidratação ou transaminação, ubiquitinação ou fosforilação (HORNBECK et al., 2012).

A fosforilação de proteínas é a principal modificação pós-tradução por meio da qual as moléculas de sinalização modulam os processos intracelulares. Este processo ocorre pela ação de mais de 2000 quinases, que adicionam um grupo fosfato às cadeias laterais de resíduos de serina, treonina ou tirosina, e é revertida

por um menor número de fosfatases (MANDELL, 2003). A regulação dependente da fosforilação da função protéica pode resultar em mudanças na ativação protéica, regulação transcricional, localização subcelular, interações protéicas e lipídicas, além de degradação. Nos estados de doença, as mudanças no estado de fosforilação ou abundância de fosfoproteínas-chave resultam em ativação ou supressão aberrante de sinalização. No estudo do perfil de proteínas e fosfoproteínas em modelos celulares, como os podócitos, os microarrays de anticorpos são valiosas ferramentas para a análise funcional e semi-quantitativa de proteínas conhecidas e fisiologicamente relevantes. Eles também permitem a análise de modificações pós-tradução particulares, como a fosforilação. Esses arrays baseados em imunensaio permitem a detecção de multiplexos e a quantificação estimada de centenas de proteínas nativas e / ou pós-translacionalmente modificadas em amostras biológicas complexas (DE KLERK; DEN DUNNEN ;T HOEN, 2014).

## **2.5 Bioinformática**

Durante a década de 1960, houve uma evolução simultânea de inventários de proteínas e taxonomias digitais. Na década de 1980, estes tinham amadurecido e foram institucionalizados com uma proliferação de dados biológicos. Esses conjuntos de dados foram, no entanto, mantidos em repositórios proprietários cuidadosamente guardados com pouca ou nenhuma comunicação entre eles (BISBY, 2000)). A década de 1990 foi marcada por uma mudança na ênfase do acúmulo de vastos volumes de dados para reduzir a sobreposição entre bancos de dados e fazer uso de dados existentes em vários locais de repositório (BOGUSKI;MCINTOSH, 2003). Esse processo de aumentar a comunicação entre bancos de dados é conhecido como interoperabilidade - cujo foco é permitir o compartilhamento e comparação de dados.

À medida que o corpo cumulativo de conhecimento biológico aumenta, gerar uma conta abrangente e consistente da biologia depende da capacidade dos cientistas de recorrer e sintetizar vastos conjuntos de dados em recursos digitais distribuídos. Uma vez que os dados biológicos, em particular as bases de dados de "omics" e de modelos de dados, em escala molecular, não representam

adequadamente a fisiologia que descrevem (BOGUSKI;MCINTOSH, 2003)Há, portanto, a necessidade de compilar as características celulares desses organismos em representações discerníveis desses próprios organismos.

O surgimento da ciência-genômica, proteômica e metabolômica para a identificação e previsão de componentes, assinaturas e processos de produtos genéticos (SAEYS;ROUZÉ ;VAN DE PEER, 2007)- contribuiu com a informação de nível molecular sobre a qual processos biológicos podem ser deduzidos. Certamente, a complexidade da biologia reside no nível dos produtos gênicos - proteínas. Em um ambiente computacional, a biodiversidade é a informação hereditária encapsulada em produtos genéticos e identificada através do coletivo de mapeamentos de vários genomas do organismo modelo. Embora a maturação de "omics" tenha sido facilitada em grande parte pela capacidade de tornar interoperáveis fontes de dados divergentes de forma transparente, apresentou um novo conjunto de desafios de engenharia. Estes incluem a necessidade de integrar fontes de dados diversas e remotas, bem como extrair conhecimento da informação pós-integração digital (THOMAS;GANJI, 2006)

A mudança de paradigma que a revolução "omics" criou dentro da biologia é melhor exemplificada pela predição de genes (também conhecida como descoberta de genes) e tarefas de predição funcional. As novas tecnologias, como os microarrays, geram volumes de dados enormes e em constante mudança (BOWKER, 2000). O rápido crescimento do mapeamento do genoma requer a capacidade de automatizar a chamada de genes ou a identificação dos genes individuais de um genoma. A descoberta de genes envolve algoritmos para a identificação de regiões biologicamente funcionais - ou éxons - de sequências que codificam explicitamente proteínas. Nesse contexto, as ferramentas de bioinformáticas tornam-se essenciais para a compreensão de como alterações na expressão de determinadas proteínas interferem em processos biológicos fundamentais na célula.

### 3.0 CAPÍTULOS

#### 3.1 Podocitúria na Doença de Fabry (PEREIRA, E.M;MONTE, S.J.H; et al., 2016)

#### RESUMO

**Introdução:** A doença de Fabry (DF) é uma desordem lisossômica ligada ao cromossomo X ocasionada por mutações no gene que codifica a enzima lisossômica  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GAL). A redução ou ausência da atividade dessa enzima leva ao acúmulo progressivo de Gb3. A doença renal é uma importante consequência clínica da acumulação de Gb3. Podócito é o tipo celular mais afetado na doença renal, que mostra apenas uma resposta parcial à Terapia de Reposição Enzimática. Além disso, a disfunção podocitária é a principal contribuinte para a perda progressiva da função renal e pode ser encontrada alterada mesmo antes do início da microalbuminúria. Assim, a podocitúria na DF pode ser uma ferramenta importante para prever a doença renal. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi quantificar a excreção urinária de podócitos em pacientes com DF (V269M, n = 14) e controles saudáveis (n = 40), e relacioná-las com as variáveis sexo, idade, tempo de terapia e a razão albumina: creatinina (AUC). **Métodos:** Podócitos urinários foram identificados utilizando imunofluorescência para podocalixina e DAPI. O número de células podocalixina positivo foi contado e o número médio foi utilizado (faixa normal 0-0.6 podócitos/mL). **Resultados:** O número médio de podócitos na urina de pacientes com DF foi significativamente maior do que os controles saudáveis ( $p < 0.0001$ ). Observou-se uma correlação positiva entre podocitúria e AUC ( $p = 0.004$ ;  $r^2 = 0.6417$ ). **Conclusão:** A podocitúria pode ser uma ferramenta adicional para avaliar a progressão da doença renal em pacientes que se espera que tenha um fenótipo mais agressivo.

**Palavras-chave:** doença de fabry; podócitos; técnica indireta de fluorescência para anticorpo.

**3.2. Characterization and phosphoproteomic analysis of a human immortalized podocyte model of Fabry disease generated using CRISPR/Cas9 technology.**(PEREIRA, E.M;LABILLOY, ANATÁLIA; et al., 2016)

**ABSTRACT**

Fabry nephropathy is a major cause of morbidity and premature death in patients with Fabry disease (FD), a rare X-linked lysosomal storage disorder. Gb3, the main substrate of  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A), progressively accumulates within cells in a variety of tissues. Establishment of cell models has been useful as a tool for testing hypotheses of disease pathogenesis. We applied CRISPR/Cas9 genome editing technology to the GLA gene to develop human kidney cell models of FD in human immortalized podocytes, which are the main affected renal cell type. Our podocytes lack detectable  $\alpha$ -Gal A activity and have increased levels of Gb3. To explore different pathways that could have distinct patterns of activation under conditions of  $\alpha$ -gal A deficiency, we used a high-throughput antibody array to perform phosphorylation profiling of CRISPR/Cas9-edited and control podocytes. Changes in both total protein levels and in phosphorylation status per site were observed. Analysis of our candidate proteins suggests that multiple signaling pathways are impaired in FD.

**Copyright © 2016 the American Physiological Society.**

**Keywords:** CRISPR/Cas9; Fabry nephropathy; podocyte

#### 4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Indivíduos portadores da DF excretam mais podócitos/mL na urina do que indivíduos saudáveis.
- ✓ O sistema CRISPR/Cas9 é uma ferramenta de edição gênica eficaz no desenvolvimento de podócito humano imortalizado com fenótipo e genótipo da DF.
- ✓ Um total de 59 fosfoproteínas estão diferencialmente expressas nos podócitos humanos imortalizados com o genótipo e fenótipo da DF em relação aos podócitos controles.
- ✓ Os processos celulares relacionados ao crescimento, diferenciação e regulação do ciclo celular estão desregulados nos podócitos imortalizados da DF em relação aos podócitos controles.
- ✓ As vias de sinalização MAPK, ErbB, Ras, Pi3k-Akt-mTOR e VEGF estão superexpressas nos podócitos humanos imortalizados da DF.

## 5.0 REFERÊNCIAS

ADLER, S. Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. **The American journal of pathology**, v. 141, n. 3, p. 571, 1992.

AHMAD, Y.; LAMOND, A. I. A perspective on proteomics in cell biology. **Trends Cell Biol**, v. 24, n. 4, p. 257-64, Apr 2014. ISSN 1879-3088 (Electronic)

0962-8924 (Linking).

ALEGRA, T. et al. Enzyme replacement therapy for Fabry disease: a systematic review and meta-analysis. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 947-954, 2012. ISSN 1415-4757.

ALROY, J.; SABNIS, S.; KOPP, J. B. Renal pathology in Fabry disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. suppl 2, p. S134-S138, 2002. ISSN 1046-6673.

ANDERSON, L. et al. Long-term effectiveness of enzyme replacement therapy in Fabry disease: results from the NCS-LSD cohort study. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 37, n. 6, p. 969-978, 2014. ISSN 0141-8955.

ANDERSON, W. A case of "angiokeratoma". . **Br J Dermatol.**, v. 10, p. 113-17, Apr 1898.

BARISONI, L. et al. The Dysregulated Podocyte Phenotype A Novel Concept in the Pathogenesis of Collapsing Idiopathic Focal Segmental Glomerulosclerosis and HIV-Associated Nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 1, p. 51-61, 1999. ISSN 1046-6673.

BATZOGLOU, S. et al. Human and mouse gene structure: comparative analysis and application to exon prediction. **Genome Res**, v. 10, n. 7, p. 950-8, Jul 2000. ISSN 1088-9051

BECHERUCCI, F.; ROMAGNANI, P. When foots come first: early signs of podocyte injury in Fabry nephropathy without proteinuria. **Nephron**, v. 129, n. 1, p. 3-5, 2015. ISSN 1660-8151.

BEKRI, S. et al. Fabry disease in patients with end-stage renal failure: the potential benefits of screening. **Nephron Clin Pract**, v. 101, n. 1, p. c33-8, 2005.

BISBY, F. A. The quiet revolution: biodiversity informatics and the internet. **Science**, v. 289, n. 5488, p. 2309-2312, 2000. ISSN 0036-8075.

BISHOP, D. F.; KORNREICH, R.; DESNICK, R. J. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 11, p. 3903-7, Jun 1988. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking).

BOGUSKI, M. S.; MCINTOSH, M. W. Biomedical informatics for proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 233-237, 2003. ISSN 0028-0836.

BORGWARDT, L. et al. Fabry disease in children: agalsidase beta enzyme replacement therapy. **Clinical genetics**, v. 83, n. 5, p. 432-438, 2013. ISSN 1399-0004.

BOUTE, N. et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. **Nature genetics**, v. 24, n. 4, p. 349-354, 2000.

BOWKER, G. C. Mapping biodiversity. **International Journal of Geographical Information Science**, v. 14, n. 8, p. 739-754, 2000. ISSN 1365-8816.

BRADY, R. O. et al. The metabolism of ceramide trihexosides. I. Purification and properties of an enzyme that cleaves the terminal galactose molecule of galactosylgalactosylglucosylceramide. **J Biol Chem**, v. 242, n. 5, p. 1021-6, Mar 10 1967. ISSN 0021-9258 (Print).

BRANTON, M.; SCHIFFMANN, R.; KOPP, J. B. Natural history and treatment of renal involvement in Fabry disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 13 Suppl 2, p. S139-43, Jun 2002.

BRENNER, B. et al. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 241, n. 1, p. F85-F93, 1981. ISSN 1931-857X.

BRENNER, B. M. Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 12, p. 1753, 2002.

BRENNER, B. M.; LAWLER, E. V.; MACKENZIE, H. S. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. **Kidney international**, v. 49, n. 6, p. 1774-1777, 1996. ISSN 0085-2538.

BYRON, A. et al. Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. ASN. 2013070795, 2014. ISSN 1046-6673.

CHEN, C.-A. et al. Reduced podocyte expression of  $\alpha3\beta1$  integrins and podocyte depletion in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis and chronic PAN-treated rats. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 147, n. 2, p. 74-82, 2006. ISSN 0022-2143.

CHEN, H.-C. et al. Altering expression of  $\alpha3\beta1$  integrin on podocytes of human and rats with diabetes. **Life sciences**, v. 67, n. 19, p. 2345-2353, 2000. ISSN 0024-3205.

CONNOCK, M. et al. A systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of enzyme replacement therapies for Fabry's disease and mucopolysaccharidosis type 1. 2006.

CORDY, J. M.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. **Molecular membrane biology**, v. 23, n. 1, p. 111-122, 2006. ISSN 0968-7688.

DE DEUS VALE, N. F. et al. Diagnóstico de Doença de Fabry em Indivíduos Submetidos à Hemodiálise no Estado do Piauí: O Papel do Exame de Triagem e Estudo de Casos. **J Bras Nefrol**, v. 30, n. 4, p. 259-63, 2008.

DE KLERK, E.; DEN DUNNEN, J. T.; T HOEN, P. A. RNA sequencing: from tag-based profiling to resolving complete transcript structure. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 18, p. 3537-51, Sep 2014. ISSN 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking).

DE KLERK, E.; T HOEN, P. A. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. **Trends Genet**, v. 31, n. 3, p. 128-39, Mar 2015. ISSN 0168-9525 (Print)0168-9525 (Linking).

DEEGAN, P. et al. Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 4, p. 347-352, 2006. ISSN 1468-6244.

DESNICK, R. J. et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. **Ann Intern Med**, v. 138, n. 4, p. 338-46, Feb 18 2003.

DESNICK, R. J. et al. Enzyme therapy in Fabry disease: differential in vivo plasma clearance and metabolic effectiveness of plasma and splenic alpha-galactosidase A isozymes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 10, p. 5326-30, Oct 1979.

DESNICK, R. J.; WASSERSTEIN, M. P. Fabry disease: clinical features and recent advances in enzyme replacement therapy. **Adv Nephrol Necker Hosp**, v. 31, p. 317-39, 2001. ISSN 0084-5957 (Print) 0084-5957 (Linking).

ECONOMOU, C. G. et al. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. **Journal of cell science**, v. 117, n. 15, p. 3281-3294, 2004. ISSN 0021-9533.

EL DIB, R. P.; NASCIMENTO, P.; PASTORES, G. M. Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease. **The Cochrane Library**, 2013. ISSN 1465-1858.

FABRY, J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents. **Arch Dermatol Syph**, v. 43, p. 187-200, Apr 1898.

FALGUIÈRES, T. et al. Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 8, p. 2498-2508, 2008. ISSN 1535-7163.

FAUL, C. et al. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 9, p. 428-437, 2007. ISSN 0962-8924.

FELDT-RASMUSSEN, U. Fabry disease and early stroke. **Stroke research and treatment**, v. 2011, 2011.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998. ISSN 0028-0836.

FRIES, J. et al. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 60, n. 2, p. 205-218, 1989. ISSN 0023-6837.

GALBIATI, F.; RAZANI, B.; LISANTI, M. P. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. **Cell**, v. 106, n. 4, p. 403-411, 2001. ISSN 0092-8674.

GARMAN, S. C.; GARBOCZI, D. N. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human  $\alpha$ -galactosidase. **Journal of molecular biology**, v. 337, n. 2, p. 319-335, 2004. ISSN 0022-2836.

GEMIGNANI, F. et al. Pathological study of the sural nerve in Fabry's disease. **European neurology**, v. 23, n. 3, p. 173-181, 1984. ISSN 0014-3022.

GERMAIN, D. P. 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. ISSN 0028-4793.

HAKOMORI, S.-I. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. **Annual review of biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 733-764, 1981. ISSN 0066-4154.

HAKOMORI, S.-I.; IGARASHI, Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. **The journal of biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1091-1103, 1995. ISSN 0021-924X.

HAKOMORI, S.-I.; KANNAGI, R. Glycosphingolipids as Tumor-Associated and Differentiation Markers<sup>56</sup>. 1983. ISSN 0027-8874.

HAN, S. Y. 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. ISSN 0302-766X.

HARA, M. et al. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 2, p. 408-416, 2005. ISSN 1046-6673.

HARA, M. et al. Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. **American journal of nephrology**, v. 18, n. 1, p. 35-41, 1998. ISSN 0250-8095.

HATTORI, M. et al. Increase of Integrin-Linked Kinase Activity in Cultured Podocytes upon Stimulation with Plasma from Patients with Recurrent FSGS. **American Journal of Transplantation**, v. 8, n. 7, p. 1550-1556, 2008. ISSN 1600-6143.

HEIKKILÄ, E. et al.  $\beta$ -Catenin mediates adriamycin-induced albuminuria and podocyte injury in adult mouse kidneys. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 8, p. 2437-2446, 2010. ISSN 1460-2385.

HELTIANU, C. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Fabry's disease. **Clin Genet**, v. 61, n. 6, p. 423-9, Jun 2002.

HOFFMANN, B. et al. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. **Clinical Gastroenterology and hepatology**, v. 5, n. 12, p. 1447-1453, 2007. ISSN 1542-3565.

HORNBECK, P. V. et al. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D261-70, Jan 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)0305-1048 (Linking).

HOUDEBINE, L. M. Transgenic animal models in biomedical research. **Methods Mol Biol**, v. 360, p. 163-202, 2007. ISSN 1064-3745 (Print)  
1064-3745 (Linking).

[HTTP://WWW.HGMD.CF.AC.UK/AC/INDEX.PHP](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php). Disponível em: <  
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>>. Acesso em: 20 de maio

ICHIKAWA, I. et al. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 14, n. 3, p. 205-210, 2005. ISSN 1062-4821.

IKONEN, E. Roles of lipid rafts in membrane transport. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 4, p. 470-477, 2001. ISSN 0955-0674.

ITOH, M. et al. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to  $\alpha$  catenin and actin filaments. **The Journal of cell biology**, v. 138, n. 1, p. 181-192, 1997. ISSN 0021-9525.

JALANKO, H. et al. Genetic kidney diseases disclose the pathogenesis of proteinuria. **Annals of medicine**, v. 33, n. 8, p. 526-533, 2001. ISSN 0785-3890.

JIA, J. et al. Angiotensin II infusion induces nephrin expression changes and podocyte apoptosis. **American journal of nephrology**, v. 28, n. 3, p. 500-507, 2008. ISSN 0250-8095.

JOHN, P. L. S.; ABRAHAMSON, D. R. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and-11 chains. **Kidney international**, v. 60, n. 3, p. 1037-1046, 2001. ISSN 0085-2538.

KAMPMANN, C. et al. Cardiac involvement in Anderson-Fabry disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 13 Suppl 2, p. S147-9, Jun 2002.

KANASAKI, K. et al. Integrin  $\beta$ 1-mediated matrix assembly and signaling are critical for the normal development and function of the kidney glomerulus. **Developmental biology**, v. 313, n. 2, p. 584-593, 2008. ISSN 0012-1606.

KAPLAN, J. M. et al. Mutations in ACTN4, encoding  $\alpha$ -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. **Nature genetics**, v. 24, n. 3, p. 251-256, 2000.

KEMENY, E. et al. Podocytes lose their adhesive phenotype in focal segmental glomerulosclerosis. **Clinical nephrology**, v. 43, n. 2, p. 71-83, 1995. ISSN 0301-0430.

KIGUCHI, K. et al. Characteristic expression of globotriaosyl ceramide in human ovarian carcinoma-derived cells with anticancer drug resistance. **Cancer science**, v. 97, n. 12, p. 1321-1326, 2006. ISSN 1349-7006.

KIM, Y. et al. Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-dependent  $\beta$ -catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. **J Cell Biol**, v. 184, n. 2, p. 309-322, 2009. ISSN 0021-9525.

KIM, Y. H. et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. **Kidney international**, v. 60, n. 3, p. 957-968, 2001. ISSN 0085-2538.

KINT, J. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency. **Science**, v. 167, n. 3922, p. 1268-1269, 1970. ISSN 0036-8075.

KIYOKAWA, N. et al. Induction of apoptosis in normal human renal tubular epithelial cells by Escherichia coli Shiga toxins 1 and 2. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 1, p. 178-184, 1998. ISSN 0022-1899.

KOLODNY, E. H.; PASTORES, G. M. Anderson-Fabry disease: extrarenal, neurologic manifestations. **J Am Soc Nephrol**, v. 13 Suppl 2, p. S150-3, Jun 2002.

KOVBASNJUK, O. et al. The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 52, p. 19087-19092, 2005. ISSN 0027-8424.

KRAWCZAK, M. et al. Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. **Hum Mutat**, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2000.

KREIDBERG, J. A. Podocyte differentiation and glomerulogenesis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 3, p. 806-814, 2003. ISSN 1046-6673.

KRIZ, W. Glomerular diseases: podocyte hypertrophy mismatch and glomerular disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 8, n. 11, p. 618-619, 2012. ISSN 1759-5061.

KRIZ, W. et al. The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. **Kidney international. Supplement**, v. 45, p. S64, 1994. ISSN 0098-6577.

KRIZ, W.; GRETZ, N.; LEMLEY, K. V. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? **Kidney international**, v. 54, n. 3, p. 687-697, 1998. ISSN 0085-2538.

KRIZ, W. et al. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association**, v. 13, n. 11, p. 2781-2798, 1998. ISSN 1460-2385.

LABILLOY, A. et al. Altered dynamics of a lipid raft associated protein in a kidney model of Fabry disease. **Molecular genetics and metabolism**, v. 111, n. 2, p. 184-192, 2014. ISSN 1096-7192.

LANNERT, H. et al. Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. **FEBS letters**, v. 342, n. 1, p. 91-96, 1994. ISSN 0014-5793.

LARRALDE, M. et al. Childhood flexural comedones: a new entity. **Arch Dermatol**, v. 143, n. 7, p. 909-11, Jul 2007.

LARRALDE, M. et al. Fabry disease: a study of 6 hemizygous men and 5 heterozygous women with emphasis on dermatologic manifestations. **Arch Dermatol**, v. 140, n. 12, p. 1440-6, Dec 2004.

LIANG, Y.-J. et al. Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 4968-4973, 2013. ISSN 0027-8424.

LINTHORST, G. E. et al. alpha-Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 8, p. 1581-4, Aug 2003.

MACDERMOT, K.; HOLMES, A.; MINERS, A. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. **Journal of medical genetics**, v. 38, n. 11, p. 769-775, 2001. ISSN 0022-2593.

MANDELL, J. W. Phosphorylation state-specific antibodies: applications in investigative and diagnostic pathology. **Am J Pathol**, v. 163, n. 5, p. 1687-98, Nov 2003. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440 (Linking).

MANGENEY, M. et al. Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. **Cancer Research**, v. 53, n. 21, p. 5314-5319, 1993. ISSN 0008-5472.

MANGENEY, M. et al. CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. **European journal of immunology**, v. 21, n. 5, p. 1131-1140, 1991. ISSN 1521-4141.

MCCALL, A. S. et al. Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1380-1392, 2014. ISSN 0092-8674.

MEHTA, A. et al. Natural course of Fabry disease: changing pattern of causes of death in FOS–Fabry Outcome Survey. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 8, p. 548-552, 2009. ISSN 0022-2593.

MEHTA, A. et al. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. **European journal of clinical investigation**, v. 34, n. 3, p. 236-242, 2004. ISSN 1365-2362.

MEIKLE, P. J. et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. **Jama**, v. 281, n. 3, p. 249-54, Jan 20 1999.

MINER, J. H. Renal basement membrane components. **Kidney international**, v. 56, n. 6, p. 2016-2024, 1999. ISSN 0085-2538.

MINER, J. H.; SANES, J. R. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3 (IV): implications for Alport syndrome. **The Journal of cell biology**, v. 135, n. 5, p. 1403-1413, 1996. ISSN 0021-9525.

MORENO, J. A. et al. A slit in podocyte death. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 16, p. 1645-1654, 2008. ISSN 0929-8673.

MUNDEL, P.; KRIZ, W. Structure and function of podocytes: an update. **Anatomy and embryology**, v. 192, n. 5, p. 385-397, 1995. ISSN 0340-2061.

MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 3005-3015, 2002. ISSN 1046-6673.

NAIKI, M.; MARCUS, D. M. Human erythrocyte P and Pk blood group antigens: identification as glycosphingolipids. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 60, n. 3, p. 1105-1111, 1974. ISSN 0006-291X.

NAKAO, S. et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. **Kidney Int**, v. 64, n. 3, p. 801-7, Sep 2003.

NEURINGER, J. R.; BRENNER, B. M. Hemodynamic theory of progressive renal disease: a 10-year update in brief review. **American journal of kidney diseases**, v. 22, n. 1, p. 98-104, 1993. ISSN 0272-6386.

NGUYEN, T. T. et al. Ophthalmological manifestations of Fabry disease: a survey of patients at the Royal Melbourne Fabry Disease Treatment Centre. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 33, n. 2, p. 164-8, Apr 2005.

NI, L.; SALEEM, M.; MATHIESON, P. W. Podocyte culture: tricks of the trade. **Nephrology**, v. 17, n. 6, p. 525-531, 2012. ISSN 1440-1797.

NICHOLS, B. J. et al. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. **The Journal of cell biology**, v. 153, n. 3, p. 529-542, 2001. ISSN 0021-9525.

O'BRIEN, B. et al. Pathophysiologic and ultrastructural basis for intestinal symptoms in Fabry's disease. **Gastroenterology**, v. 82, n. 5, p. 957-962, 1982. ISSN 0016-5085.

OHSHIMA, T. et al. alpha-Galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 6, p. 2540-4, Mar 18 1997. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking).

OKUDA, T. et al. Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 15, p. 10230-10235, 2006. ISSN 0021-9258.

OPITZ, J. M. et al. The Genetics of Angiokeratoma Corporis Diffusum (Fabry's Disease) and Its Linkage Relations with the Xg Locus. **Am J Hum Genet**, v. 17, n. 4, p. 325-42, Jul 1965.

ÖQVIST, B. et al. **Nephropathy in Fabry disease: the importance of early diagnosis and testing in high-risk populations**: Oxford University Press 2009.

ORTIZ, A. et al. Nephropathy in males and females with Fabry disease: cross-sectional description of patients before treatment with enzyme replacement therapy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 5, p. 1600-1607, 2008. ISSN 0931-0509.

ORTIZ, A. et al. Recommendations and guidelines for the diagnosis and treatment of Fabry nephropathy in adults. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 4, n. 6, p. 327, 2008. ISSN 1759-5061.

PABST, R.; STERZEL, R. B. Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. **Kidney international**, v. 24, n. 5, p. 626-631, 1983. ISSN 0085-2538.

PEREIRA, E. M. et al. Lysosome-associated protein 1 (LAMP-1) and lysosome-associated protein 2 (LAMP-2) in a larger family carrier of Fabry disease. **Gene**, v. 536, n. 1, p. 118-122, 2014. ISSN 0378-1119.

PEREIRA, E. M. et al. Characterization and phosphoproteomic analysis of a human immortalized podocyte model of Fabry disease generated using CRISPR/Cas9 technology. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 311, n. 5, p. F1015-F1024, 2016. ISSN 1931-857X.

PEREIRA, E. M. et al. Podocitúria na doença de Fabry. **J. bras. nefrol**, v. 38, n. 1, p. 49-53, 2016. ISSN 0101-2800.

PEREIRA, E. M. et al. Podocyturia in Fabry disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 1, p. 49-53, 2016. ISSN 0101-2800.

PETERMANN, A.; FLOEGE, J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. **Nephron Clinical Practice**, v. 106, n. 2, p. c61-c66, 2007. ISSN 1660-2110.

POEPPL, A. G.; MURRAY, G. J.; MEDIN, J. A. Enhanced filter paper enzyme assay for high-throughput population screening for Fabry disease. **Anal Biochem**, v. 337, n. 1, p. 161-3, Feb 1 2005.

RAMASWAMI, U. et al. Safety of agalsidase alfa in patients with Fabry disease under 7 years. **Acta Paediatrica**, v. 100, n. 4, p. 605-611, 2011. ISSN 1651-2227.

RAMASWAMI, U. et al. Clinical manifestations of Fabry disease in children: data from the Fabry Outcome Survey. **Acta Paediatrica**, v. 95, n. 1, p. 86-92, 2006. ISSN 1651-2227.

REEVES, W.; CAULFIELD, J.; FARQUHAR, M. Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 39, n. 2, p. 90-100, 1978. ISSN 0023-6837.

REISER, J. et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 10, p. 1390, 2004.

REISER, J. et al. Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 6, p. 951-955, 2002. ISSN 1460-2385.

RIES, M. et al. Pediatric fabry disease. **Pediatrics**, v. 115, n. 3, p. e344-e355, 2005. ISSN 0031-4005.

RIES, M. et al. The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. **European journal of pediatrics**, v. 162, n. 11, p. 767-772, 2003. ISSN 0340-6199.

RODEWALD, R.; KARNOVSKY, M. J. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. **The Journal of cell biology**, v. 60, n. 2, p. 423-433, 1974. ISSN 0021-9525.

SAEYS, Y.; ROUZÉ, P.; VAN DE PEER, Y. In search of the small ones: improved prediction of short exons in vertebrates, plants, fungi and protists. **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 414-420, 2007. ISSN 1460-2059.

SALEEM, M. A. et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 3, p. 630-638, 2002. ISSN 1046-6673.

SANCHEZ-NIÑO, M. D. et al. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 6, p. 1797-1802, 2010. ISSN 1460-2385.

SAXÉN, L.; SARIOLA, H. Early organogenesis of the kidney. **Pediatric nephrology**, v. 1, n. 3, p. 385-392, 1987. ISSN 0931-041X.

SCHAEFER, R. M.; TYLKI-SZYMAŃSKA, A.; HILZ, M. J. Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease. **Drugs**, v. 69, n. 16, p. 2179-2205, 2009. ISSN 0012-6667.

SCHENGRUND, C.-L. Lipid rafts: keys to neurodegeneration. **Brain research bulletin**, v. 82, n. 1, p. 7-17, 2010. ISSN 0361-9230.

SCHIFFMANN, R. et al. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 2, p. 345-354, 2005. ISSN 1460-2385.

SCHIFFMANN, R. et al. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 7, p. 2102-2111, 2009. ISSN 0931-0509.

SCHILLER, P. I.; ITIN, P. H. Angiokeratomas: an update. **Dermatology**, v. 193, n. 4, p. 275-82, 1996.

SCHNABEL, E.; ANDERSON, J. M.; FARQUHAR, M. G. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. **The Journal of cell biology**, v. 111, n. 3, p. 1255-1263, 1990. ISSN 0021-9525.

SCHNABEL, E. et al. Biogenesis of podocalyxin--the major glomerular sialoglycoprotein--in the newborn rat kidney. **European journal of cell biology**, v. 48, n. 2, p. 313-326, 1989. ISSN 0171-9335.

SHANKLAND, S. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. **Kidney international**, v. 69, n. 12, p. 2131-2147, 2006. ISSN 0085-2538.

SHI, S. et al. Podocyte-selective deletion of dicer induces proteinuria and glomerulosclerosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 11, p. 2159-2169, 2008. ISSN 1046-6673.

SIMONS, K.; GRUENBERG, J. Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. **Trends in cell biology**, v. 10, n. 11, p. 459-462, 2000. ISSN 0962-8924.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 1, n. 1, p. 31-39, 2000. ISSN 1471-0072.

SOROKIN, L.; EKBLUM, P. Development of tubular and glomerular cells of the kidney. **Kidney international**, v. 41, n. 3, p. 657-664, 1992. ISSN 0085-2538.

SPADA, M. et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. **Am J Hum Genet**, v. 79, n. 1, p. 31-40, Jul 2006.

STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. **Molecular cell**, v. 58, n. 4, p. 568-574, 2015. ISSN 1097-2765.

STULTS, C. L.; SWEELEY, C. C.; MACHER, B. A. [14] Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. **Methods in enzymology**, v. 179, p. 167-214, 1989. ISSN 0076-6879.

SUSZTAK, K. et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 55, n. 1, p. 225-233, 2006. ISSN 0012-1797.

TERASAKI, P. I. et al. The hyperfiltration hypothesis in human renal transplantation. **Transplantation**, v. 57, n. 10, p. 1450-1454, 1994. ISSN 0041-1337.

THOMAS, C. E.; GANJI, G. Integration of genomic and metabonomic data in systems biology-are we there yet? **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 9, n. 1, p. 92, 2006. ISSN 1367-6733.

TØNDEL, C. et al. Renal biopsy findings in children and adolescents with Fabry disease and minimal albuminuria. **American journal of kidney diseases**, v. 51, n. 5, p. 767-776, 2008. ISSN 0272-6386.

TØNDEL, C. et al. Monitoring renal function in children with Fabry disease: comparisons of measured and creatinine-based estimated glomerular filtration rate. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 5, p. 1507-1513, 2010. ISSN 0931-0509.

VEDDER, A. et al. Manifestations of Fabry disease in placental tissue. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 29, n. 1, p. 106-111, 2006. ISSN 0141-8955.

WARNOCK, D. et al. 143. End stage renal disease in patients with Fabry disease: Natural history data from the Fabry registry. **Molecular genetics and metabolism**, v. 99, n. 2, p. S38, 2010. ISSN 1096-7192.

WEIDEMANN, F. et al. Interdisciplinary approach towards female patients with Fabry disease. **European journal of clinical investigation**, v. 42, n. 4, p. 455-462, 2012. ISSN 1365-2362.

WELSH, G. I.; SALEEM, M. A. The podocyte cytoskeleton—key to a functioning glomerulus in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 8, n. 1, p. 14-21, 2012. ISSN 1759-5061.

WEST, M. et al. Agalsidase alfa and kidney dysfunction in Fabry disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 5, p. 1132-1139, 2009. ISSN 1046-6673.

WHYBRA, C. et al. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. **J Inherit Metab Dis**, v. 24, n. 7, p. 715-24, Dec 2001.

WIGGINS, J. E. et al. Podocyte hypertrophy, “adaptation,” and “decompensation” associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 10, p. 2953-2966, 2005. ISSN 1046-6673.

WIGGINS, R.-C. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. **Kidney international**, v. 71, n. 12, p. 1205-1214, 2007. ISSN 0085-2538.

WILCOX, W. R. 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. ISSN 1096-7192.

WOLF, G.; CHEN, S.; ZIYADEH, F. N. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1626-1634, 2005. ISSN 0012-1797.

WRAITH, J. E. et al. Safety and efficacy of enzyme replacement therapy with agalsidase beta: an international, open-label study in pediatric patients with Fabry disease. **The Journal of pediatrics**, v. 152, n. 4, p. 563-570. e1, 2008. ISSN 0022-3476.

WU, D. T. et al. TGF- $\beta$  concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 11, p. 3211-3221, 2005. ISSN 1046-6673.

ZARATE, Y. A.; HOPKIN, R. J. Fabry's disease. **Lancet**, v. 372, n. 9647, p. 1427-35, Oct 18 2008.