

Nadia Aylín Gomez

**ESTUDO DA HOMEOSTASE LISOSSÔMICA E CARACTERIZAÇÃO
DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE FABRY EM
CULTURA CELULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2017

Nadia Aylín Gomez

**ESTUDO DA HOMEOSTASE LISOSSÔMICA E CARACTERIZAÇÃO
DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE FABRY EM
CULTURA CELULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Vânia D'Almeida

São Paulo

2017

Gomez, Nadia Aylín

Estudo da homeostase lisossômica e caracterização de fibroblastos de pacientes com doença de Fabry em cultura celular / Nadia Aylín Gomez – São Paulo, 2016.

xiii, 42f.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Lysosomal homeostasis study and characterization of Fabry disease patient's fibroblasts in cell culture

1. Fabry disease / 2. Lysosomal storage disorder / 3. Lysosomal homeostasis / 4. Lysosomal calcium / 5. mTORC1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA

LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

Chefe de Departamento de Psicobiologia: Prof. Dr. José Carlos F. Galduróz

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação: Profa. Dra. Débora C. Hipólide

Nadia Aylín Gomez

**ESTUDO DA HOMEOSTASE LISSSÔMICA E CARACTERIZAÇÃO
DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE FABRY EM
CULTURA CELULAR**

Presidente da Banca: Profa. Dra. Vânia D’Almeida

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Baldo

Prof. Dr. Fábio Dupart Nascimento

Prof. Dr. Jair Chagas

Suplente: Dr. Carlos Eduardo Neves Girardi

Este estudo foi desenvolvido no Departamento de Psicobiologia da
Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina
(UNIFESP/EPM)

AUXÍLIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Instituto de Genética e Erros Inatos do Metabolismo (IGEIM)

DEDICATÓRIA

*A **DEUS** por TUDO*

*A meus pais Mercedes Petroff e Gustavo Gomez
pelo amor, paciência e apoio.*

*A TODOS os que fizeram parte da minha vida,
e que de alguma forma contribuíram
para que esse estudo fosse concluído.*

AGRADECIMENTOS

A minhas irmãs **Iona e Maia**, a meu sobrinho **Imanol**, a minha avó **Damiana** e a toda minha família pelo apoio e pensamentos positivos mesmo na distância.

Agradeço a **Profa. Dra. Vania D'Almeida** que me recebeu de braços abertos, e teve vontades de enfrentar o desafio de desenvolver um mestrado comigo.

Gostaria de agradecer ao **Prof. Edgar Paredes-Gamero** e ao **Prof. Dr. Marcos Sergio de Toledo** pelas discussões científicas, ajuda experimental e toda a importante colaboração neste projeto. Agradeço também **Profa. Dra. Helena B. Nader**, por permitir a utilização da infraestrutura de seu laboratório.

Gostaria de agradecer a **todos os professores** do curso de Pós-graduação do Departamento de Psicobiologia, pelas importantes contribuições para minha formação acadêmica.

Agradeço aos técnicos do Laboratório, **Diva, Adriana, Laura, Sueli** por permitirem a realização dos experimentos, além das conversas diárias.

As grandes amigas do LEIM: **Ana Beatriz, Ana Carolina, Ana Luiza, Ananda, Andrea, Bruno, Beatriz, Cinthia, Helton, Joyce, Julia, Kenia, Karen, Leandro, Lisandro, Luana, Marion, Matheus, Nicole, Renan, Sylvia, Thaís, Vanessa C, Vanessa P**, sem o apoio diário deles meu progresso não teria sido igual.

Aos amigos e alunos do Departamento de Bioquímica que participaram ativamente neste projeto, **Marina, Christiano, Roberto, Marcos Vinicius, Heron e Wagner**. Obrigada pelo tempo, dedicação e o conhecimento científico ensinado.

Gostaria de agradecer ao pessoal da AFIP e do Departamento de Psicobiologia: **Ana, Andréia, Bruno, Dora, Dunga, Hélio, Ivan, Jaqueline, Mara, Manoel, Mané, Nelson, Ulisses, Valeria, Vinicius**, que fizeram a minha rotina muito mais agradável.

Aos alunos do Departamento de Psicobiologia, **Aline, André M, André S, Cesar, Cris, Flavia, Giovana, Leo, Lyvia, Marcela, Marcos, Marcus Vinicius, Paulo, Pia, Rafael, Roger, Rosalvo, Sandra, Simone, Sophia, Stefani, Thaís, Thays, Valeria, Vivian, Viviane**. Obrigada pelas experiências compartilhadas e encontros no corredor, copa ou bar.

Agradeço a meus amigos de São Paulo que se encarregaram de tirar um sorriso de mim todos os dias, **Jhon, Marcela, Rafael, Jana, Jamile, Julino, Mariana, Larissa, Letícia, Marisa, Noelia, Jessica, Diego, Larissa, Alexei, Fernanda, Diogo, Daniela, Anna, Estevão, Luana, Jessica, Leandro, Daniel, Luísa, Cris, Rodrigo, Giulia, André, Fernando, Patrícia, Bruno, Helen, Dorival, Marcio, Marjo, Pierre**. Vocês têm um papel central por eu ter chegado até aqui, obrigada pelo compartilhado, pela ajuda, conversas, desabafos, confiança, amor e carinho. Obrigada por acreditar em mim.

À **família equilíbrio Jiu-Jitsu** por me ensinar a me superar cada dia. Obrigada principalmente ao meu mestre **Kinio**.

Agradeço a **Isabel** pelas conversas e conselhos no momento certo.

Finalmente gostaria de agradecer **a todas as pessoas** que direta ou indiretamente formaram parte deste caminho trilhado. Obrigada pelas palavras e momentos compartilhados.

SUMÁRIO

Banca Examinadora	iv
Auxílio Financeiro	v
Dedicatória	vi
Agradecimentos	vii
Sumário	ix
Lista de abreviaturas e símbolos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Erros Inatos do Metabolismo	1
1.2. Doenças de Depósito Lisossômico	1
1.3. Doença de Fabry	2
1.4. Os lisossomos	5
1.5. Regulação da homeostase lisossômica	6
1.6. Homeostase lisossômica nas DDL	7
2. OBJETIVO	9
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MÉTODOS	10
3.1. Desenho experimental	10
3.2. Cultura celular	11
3.3. Caracterização dos fibroblastos	11
3.3.1. Atividade enzimática	11
3.3.1.1. α -Galactosidase A	12
3.3.1.2. β -Glicosidase	12
3.3.1.3. α -Glicosidase ácida	12
3.3.1.4. α -L-Iduronidase	12
3.3.2. Extração e purificação de Gb3	13
3.4. Homeostase lisossômica	14
3.4.1. Quantificação de Ca^{2+}	14
3.4.2. Quantificação de mTOR	14
3.4.3. Localização de TFEB e mTOR	15
3.5. pH citoplasmático	16

3.6. Análise Estatística	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Caracterização dos fibroblastos	17
4.1.1. Atividade enzimática	17
4.1.2. Gb3	19
4.2. Homeostase lisossômica.....	20
4.2.1. Níveis de Ca^{2+}	20
4.2.2. Níveis de p-mTOR	24
4.2.3. Localização de TFEB e p-mTOR	25
4.3. pH citoplasmático	27
5. DISCUSSÃO.....	28
5.1. Caracterização dos fibroblastos	28
5.2. Homeostase dos lisossomos.....	30
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL - Microlitro

mL - Mililitro

L - Litro

nm - Nanômetro

μm - Micrômetro

mm - Milímetro

μM - Micromolar

mM - Milimolar

M - Molar

μg - Micrograma

mg - Miligrama

g - Grama

rpm - Rotações por minuto

α-Gal A - alfa-Galactosidase A

β-Gli - beta-Glicosidase

α-Gli ácida - alfa-Glicosidase ácida

Idua - alfa-L-Iduronidase

DDL - Doenças de depósito lisossômico

Gb3 - globotriaosilceramida

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

TFEB - *Transcription fator EB*. Fator de Transcrição EB

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. Meio Eagle, Modificação Dulbecco

SFB - Soro Fetal Bovino

PBS - *Phosphate-Buffer Saline*. Salina Tamponada com Fosfato

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

BSS-CMF - *Balanced Saline Solution Calcium and Magnesium Free*. Solução Salina Equilibrada Livre de Cálcio e Magnésio

HBSS - *Hank's balanced salt solution*. Solução Salina Equilibrada de Hank

CO₂ - Dióxido de Carbono

Ca²⁺ - Cálcio

ATB - Antibiótico

Gln - L-glutamina

°C - graus Celsius

UI - Unidades Internacionais

BSA - *Bovine Serum Albumin*. Albumina Sérica Bovina

EUA - Estados Unidos da América

4MU - 4-metilumbiliferona

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

GLM - *General Linear Model*. Modelo Linear Generalizado

RESUMO

A doença de Fabry é uma das poucas doenças de depósito lisossômico que possui herança recessiva ligada ao cromossomo X. Uma mutação no gene *GLA*, gera uma deficiência da enzima alfa-Galactosidase A (α -Gal A), que junto com o acúmulo crescente de globotriaosilceramida (Gb3) resultam nos sinais e sintomas. Esta é uma doença crônica e as células do endotélio vascular são as mais comprometidas, levando a um comprometimento multiorgânico com algumas ocorrências neurológicas que podem causar uma morte prematura.

Os lisossomos são as principais organelas citosólicas afetadas na doença de Fabry. O funcionamento normal destas organelas é necessário para vários processos vitais. Eles estão envolvidos na autofagia, endocitose, exocitose e fagocitose entre outras funções. A regulação da homeostase lisossômica é muito importante e, recentemente, se demonstrou que a sinalização lisossomo-núcleo participa desta regulação. Ainda não é totalmente conhecido o impacto da deficiência enzimática nos lisossomos de pacientes com doença de Fabry. Por esse motivo, o objetivo de nosso estudo foi avaliar as concentrações de Ca^{2+} , mTOR e TFEB, os principais protagonistas da maquinaria que regula a autofagia e a biogênese lisossômica, em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry.

Neste trabalho caracterizamos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry, observando a deficiência de α -Gal A e o acúmulo de Gb3. Além disso foi constatada uma disfunção lisossômica nas atividades enzimáticas de β -Glicosidase, α -Glicosidase ácida, α -L-Iduronidase. Os parâmetros bioquímicos, que participam da regulação da homeostase lisossômica e o pH citoplasmático foram avaliados, mas não mostraram diferenças significativas, o que sugere que as células mantêm a regulação lisossômica em equilíbrio e também a homeostase celular. Por outro lado, foi verificado que o Ca^{2+} citoplasmático ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$) e o Ca^{2+} do retículo endoplasmático ($\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$), em culturas celulares de pacientes homens e mulheres, estão modificados. Isto sugere alterações em mecanismos dependentes deste íon.

Concluindo, os fibroblastos de pacientes com doença de Fabry apresentam uma alteração das enzimas lisossômicas avaliadas, assim como do $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ e do $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ o que, por sua vez, não afetou a regulação dos parâmetros da homeostase lisossômica, como pode ser verificado mediante a análise de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$, p-mTOR e TFEB, ou ainda, pelo equilíbrio celular avaliado por meio do pH_{cit} .

ABSTRACT

Fabry disease is one of the lysosomal storage diseases which has a X-linked recessive inheritance. A mutation in *GLA* gene, causes α -galactosidase A (α -Gal A) deficiency, that with the crescent accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) results in signs and symptoms. This is a chronic disease, and the vascular endothelial cells are the most compromised, leading to a multiorgan disease, with some neurologic manifestations that can cause premature death.

Lysosomes are the principal cytosolic organelles affected in Fabry disease, and their normal function is necessary to several vital processes. They act in autophagy, endocytosis, exocytosis and phagocytosis among other functions. The regulation of lysosomal homeostasis is very important and recently it was demonstrated that the lysosomal-nucleus signaling participated of this process. The complete impact of the enzymatic deficiency in lysosomes with Fabry disease is still unknown. For this reason, the aim of our study is to evaluate Ca^{2+} , mTOR and TFEB, the principal players of the machinery that regulates the autophagy and lysosomal biogenesis, in fibroblasts of Fabry disease patients.

In this work, we characterized fibroblasts of Fabry disease patients, observing the deficiency of α -Gal A and the accumulation of Gb3. Also, it was verified an impaired lysosomal function in the enzymatic activity of β -Glucosidase, acid α -Glucosidase and α -L-Iduronidase. The biochemical parameters, that participated of the lysosomal homeostasis regulation and the cytoplasmic pH, were evaluated, but did not show significant differences, which suggests that the cells maintain the lysosomal regulation in equilibrium and cellular homeostasis, too. It was verified that the Ca^{2+} cytoplasmatic ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$) e o Ca^{2+} endoplasmic reticulum ($\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$), in male and female patients cell cultures were modified, which, in turn, indicates alterations in mechanisms dependent on this ion.

In conclusion, fibroblast of Fabry disease patients shows an alteration in the lysosomal enzymes evaluated, as well as, in the concentration of $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ and $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ which seems do not to affect the lysosomal homeostasis regulation, or even the cellular equilibrium.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são definidos como uma alteração bioquímica de origem hereditária decorrente de um defeito na estrutura ou função de uma proteína específica, levando a uma alteração na via metabólica (Garrod, 1908). Até o momento, mais de 900 EIM já foram descritos decorrentes de um único defeito enzimático (Childs, Valle e Jimenez-Sanchez, 2001).

Os EIM são classificados de acordo com sua fisiopatologia em: A) os que afetam a síntese ou catabolismo de moléculas complexas, entre os quais encontram-se os defeitos lisossômicos, peroxissômicos e as enfermidades de transporte e processamento intracelular, que se caracterizam por apresentar uma clínica progressiva e permanente e, não dependem da dieta nem apresentam intercorrências. B) defeitos na produção de energia, como as glicogenoses, acidemias lácticas congênitas, defeitos na oxidação de ácidos graxos e na cadeia respiratória mitocondrial, que podem apresentar comprometimento de muitos órgãos e desencadear crises com hipotonia, miopatia, dano cardíaco e hepático, geralmente em decorrência de fatores desencadeantes como infecções, jejum, cirurgias ou outros tipos de estresse e, C) defeitos resultantes de acúmulo de substâncias tóxicas; que se caracterizam por apresentar um quadro agudo e progressivo causado por acúmulo de compostos tóxicos endógenos (Saudubray *et al.*, 2006).

1.2. Doenças de Depósito Lisossômico

As doenças de depósito lisossômico (DDL) compõem um grupo heterogêneo de mais de 50 doenças metabólicas causadas pela deficiência de enzimas ou de outras proteínas relevantes para o funcionamento normal do sistema endossomo/lisossomo. A disfunção lisossômica pode levar a um acúmulo de substratos, e o acúmulo progressivo pode, direta ou indiretamente, causar a perturbação da homeostase do lisossomo e, conseqüentemente, o comprometimento da função celular (Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010).

Todas as DDL apresentam herança autossômica recessiva, com exceção de apenas 3, mucopolissacaridose tipo II (MPS II), Doença de Fabry e Doença de Danon, que são ligadas ao cromossomo X. As DDL são doenças multissistêmicas, crônicas e progressivas, com uma incidência conjunta estimada entre 1:1500 a 1:7000 nascidos vivos, mas que isoladamente são consideradas raras (Meikle, 1999; Staretz-Chacham *et al.*, 2009). Dentre elas, as mais prevalentes em europeus são as Doenças de Gaucher, Fabry, e MPS I (Meikle e Hopwood, 2003).

Uma ampla heterogeneidade fenotípica é observada entre as DDL em relação à idade de início dos sintomas, gravidade da doença, órgãos envolvidos e efeitos no sistema nervoso central. A correlação genótipo-fenótipo nas DDL nem sempre permite um prognóstico sobre a evolução natural da doença. Fatores ambientais, além das diversas mutações dos genes, causam uma clínica vasta e variável (Beck, 2001). Devido às manifestações heterogêneas, que também não são específicas, e à raridade das DDL, o diagnóstico pode ser complexo e demorado, e muitas vezes a doença não é identificada (Wilcox, 2004).

O acúmulo de substratos representa a causa primária das DDL, mas a ampla diversidade de manifestações clínicas observadas sugere que várias vias bioquímicas e/ou celulares secundárias estejam envolvidas na fisiopatologia destas doenças (Futerman e van Meer, 2004). Além disso, o fato de várias DDL apresentarem acúmulo de metabólitos que não estão diretamente relacionados à enzima deficiente como, por exemplo, acúmulo de gangliosídeos em pacientes com mucopolissacaridoses, corrobora a hipótese do envolvimento de vias secundárias (Walkley e Vanier, 2009).

1.3. Doença de Fabry

A Doença de Fabry (DF, OMIM 301500), é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, causada pela deficiência da atividade da enzima alfa-Galactosidase A (α -Gal A) (Brady *et al.*, 1967), cujo gene (*GLA*) está localizado no *locus* Xq22.1 (Desnick, Ioannou e Eng, 2001). O defeito enzimático gera um acúmulo progressivo de globotriaosilceramida (Gb3) e glicosfingolipídeos relacionados, especialmente em endotélio vascular, pele, rins, coração e cérebro (Sweeley e Klionsky, 1963). A

incidência da doença de Fabry vem sendo estimada em 1:40.000 a 1:117.000 nascimentos em todo mundo (Mehta *et al.*, 2004). No entanto, por se tratar de uma doença de difícil diagnóstico, a incidência exata permanece desconhecida.

O mecanismo exato que relaciona as alterações bioquímicas e celulares com a doença ainda não está totalmente estabelecido, mas existe uma associação entre o acúmulo lisossômico de Gb3 e estresse oxidativo, desbalanço energético metabólico, disfunção de canais e comprometimento da degradação lisossômica (Lakomá *et al.*, 2016). Acredita-se que o acúmulo de glicosfingolipídeos no endotélio vascular e nas células de músculo liso levam ao comprometimento da irrigação sanguínea e, por consequência, a isquemia é responsável pela disfunção dos órgãos (Das e Naim, 2009).

A doença se caracteriza por uma disfunção multiorgânica grave, a atividade enzimática nula ou muito baixa que os homens afetados apresentam, leva ao fenótipo clássico que se manifesta com angioqueratomas, acroparestesias, hipoidrose, proteinúria e opacidade de córnea desde a infância. À medida que os pacientes chegam à idade adulta, o acúmulo de Gb3 se intensifica, e afeta principalmente o endotélio vascular levando à falência renal, cardíaca ou a acidentes cerebrovasculares, que podem resultar em uma morte prematura (Fabry, 2002).

As manifestações neurológicas dos pacientes com doença de Fabry, são variadas e, muitas vezes, comuns a outras doenças. Na maioria dos casos, as dolorosas neuropatias são as primeiras a se manifestarem, atingindo principalmente pés e mãos. Além dos acidentes cerebrovasculares e os acidentes isquêmicos transientes, outros sintomas são: vertigem, tontura, náusea, dores de cabeça, ataxia, hemiparesia, perda de memória e até de consciência (Toyooka, 2013). Comportamento psiquiátrico e demência também foram atribuídos às vasculopatias cerebrais na doença de Fabry (Okeda e Nisihara, 2008)

De forma interessante, mesmo a doença sendo ligada ao cromossomo X, muitas mulheres heterozigotas apresentam diversos sintomas podendo apresentar também o fenótipo clássico esperado apenas para indivíduos hemizigotos (do sexo masculino). As manifestações clínicas esperadas nas mulheres são mais amenas do que as dos homens, mas em geral são variáveis, podendo apresentar-se desde formas assintomáticas até fatais (Whybra *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Hughes, 2008). Trabalhos da literatura relatam que as alterações viscerais

são muito frequentes no grupo feminino, algumas vezes mais frequentes do que nos homens com a doença (Wilcox *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que muitos sintomas característicos da doença de Fabry, como dor nas extremidades, são até mais frequentes nas mulheres heterozigotas do que nos homens (Bouwman *et al.*, 2012).

Entretanto, no caso de mulheres portadoras de mutações que resultam em doenças ligadas ao X, a existência de duas populações distintas de células, com relação ao cromossomo X ativo, pode ser uma explicação para que não ocorra manifestação clínica da doença. Isso se deve à possibilidade de haver cooperação metabólica entre as células, isto é, a transferência de moléculas de uma célula para outra. As células com o gene mutante podem receber uma certa quantidade do produto gênico deficiente das células com o gene funcional (Migeon, 2006).

Ainda não estão bem esclarecidos quais são os reais mecanismos que levam as mulheres heterozigotas para mutações no gene *GLA* a manifestarem sinais da doença tão frequentemente. Os sintomas característicos da doença de Fabry se apresentam nas mulheres com um espectro variado de gravidade. Como possível explicação, foi estudada a inativação do cromossomo X, esperando que tenha alguma correlação com os níveis de atividade enzimática ou com a idade. Os autores concluíram que este mecanismo não executa a função esperada na doença de Fabry dado que as mulheres sofrem os mesmos sinais e sintomas que os homens (Elstein *et al.*, 2012). Outro estudo, relacionou o dano causado pelo acúmulo de Gb3 nos podócitos do glomérulo com o mosaicismismo em mulheres com doença de Fabry. Foi demonstrado que o número de podócitos afetados aumenta com a idade das pacientes, sugerindo uma perda desproporcional destes podócitos afetados ao longo do tempo, comprometendo o funcionamento renal (Mauer *et al.*, 2014).

Interessante observar que um estudo recente, utilizando culturas de células, mostrou que na α -Gal A imatura (52 kDa) existem ligantes muito fortes da manose-6-fosfato, que se unem eficientemente aos receptores. No entanto, a α -Gal A madura (sem os ligantes) pode deixar a célula, e como não tem os ligantes da manose-6-fosfato, não pode ser internalizada e a correção cruzada é ineficiente. Neste sistema utilizado no estudo, a α -Gal A foi incapaz de corrigir a deficiência nas células de pacientes com Fabry (Fuller *et al.*, 2015).

Também, foi observado que a inativação aleatória do cromossomo X se intensifica com a idade na doença de Fabry. As pacientes novas normalmente estão moderadamente afetadas, e as idosas mostram sintomas mais graves entre eles deterioração da função renal e progressão da hipertrofia ventricular esquerda. O que corrobora a hipótese de uma correção cruzada ineficiente entre as células heterozigotas afetadas e não afetadas (Echevarria *et al.*, 2016).

Um estudo brasileiro fez o diagnóstico molecular e comparou com os níveis de atividades enzimáticas em gota de sangue seca em papel de filtro, leucócitos e plasma com a finalidade de determinar os valores de corte para as pacientes com doença de Fabry. A conclusão foi que mensurar a α -Gal A em plasma e leucócitos em conjunto é necessário para obter valores de corte que permitam o diagnóstico eficiente entre homens e mulheres com doença de Fabry (Pasqualim *et al.*, 2014)

1.4. Os lisossomos

Os lisossomos foram descritos pela primeira vez por Christian De Duve e são organelas envolvidas por membranas que estão presentes em células eucariotas e contêm hidrolases ácidas. Estas organelas citosólicas são responsáveis pela degradação de macromoléculas, e para isso, possuem entre 50-60 hidrolases ácidas e mais de 200 proteínas integrais ou associadas à sua membrana (de Duve *et al.*, 1955; Journet *et al.*, 2002; Bagshaw, Mahuran e Callahan, 2005). Dentre estas proteínas já foram identificadas diversas enzimas, v-ATPases (Vacuolar-type H⁺-ATPases), transportadores, canais, proteínas sinalizadoras, estruturais e associadas ao tráfego intracelular (Schroeder *et al.*, 2007).

Os lisossomos mantêm a homeostase celular e são mediadores de uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo apresentação de antígenos, autofagia, endocitose, exocitose, fagocitose, transdução de sinais e neurotransmissão (Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010). Todos estes processos necessitam de uma resposta adaptativa e dinâmica dos lisossomos aos sinais provenientes do meio ambiente. Além disso, as condições fisiológicas como a idade e a dieta, bem como condições patológicas incluindo DDL, doenças neurodegenerativas, lesões e infecções podem resultar em uma resposta adaptativa

dos lisossomos (Luzio, Bright e Pryor, 2007; Ballabio e Gieselmann, 2009; Saftig e Klumperman, 2009). As principais funções dos lisossomos são o *clearance* celular, a homeostase de lipídeos, o metabolismo energético, o reparo da membrana plasmática, a restauração óssea e a defesa contra agentes patogênicos (Saftig, 2005; Luzio, Pryor e Bright, 2007). Por esse motivo, a disfunção de qualquer componente lisossômico é capaz de causar alterações importantes, podendo levar ao acúmulo de substratos não degradados dentro da célula (Walkley e Vanier, 2009). Além de que, o acúmulo do material primário pode causar uma cadeia de disfunções secundárias que no final compromete as funções e a homeostase da célula (Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010).

1.5. Regulação da homeostase lisossômica

Um dos protagonistas da regulação da biogênese e função lisossômica é o fator de transcrição EB (TFEB). Este fator de transcrição pertence à família do zíper de leucina *helix-loop-helix* básico (bHLH). Os alvos regulados pelo TFEB são um grupo de genes que coordenam a expressão e regulação lisossômica (CLEAR) (Sardiello *et al.*, 2009). Entre eles estão aqueles que codificam as hidrolases lisossômicas envolvidas na degradação de substratos, as proteínas da membrana lisossômica que modulam a interação dos lisossomos com outras estruturas celulares e os componentes vacuolares do complexo ATPase que mantêm o microambiente do lúmen em pH 4,6-5,0 (Mellman, Fuchs e Helenius, 1986; Palmieri *et al.*, 2011). A atividade do TFEB é regulada pela fosforilação, que o mantém inativo no citoplasma, enquanto o TFEB ativo desfosforilado é translocado para o núcleo para atingir seus genes alvo (Settembre e Ballabio, 2011).

O regulador de crescimento complexo 1 *mammalian target of rapamycin* (mTORC1), é um complexo proteico que se encontra na membrana lisossômica, sendo membro da maquinaria *lysosomal nutrient-sensing* (LYNUS). A interação entre os aminoácidos do lúmen lisossômico e as v-ATPases regulam as Rag guanosina trifosfatases (GTPases), que ativam o mTORC1 translocando-o para a membrana lisossômica (Sancak *et al.*, 2010; Zoncu *et al.*, 2011). A p-mTOR quinase fosforila o TFEB, que normalmente se encontra no citoplasma, o qual se une à

família de proteínas YWHA (14-3-3). Desta forma, a translocação do TFEB ao núcleo é impedida (Martina *et al.*, 2012; Roczniak-Ferguson *et al.*, 2012; Settembre *et al.*, 2012).

O Ca^{2+} é um íon imprescindível para diversos mecanismos, que atua na sinalização celular. Ele pode propagar a informação com ajuda de intermediários (primeiros e segundos mensageiros) ou sem ajuda alguma, sendo ele mesmo primeiro ou segundo mensageiro. Os sinais de Ca^{2+} regulam atividades importantes da célula, desde a expressão dos genes, contração do músculo esquelético e cardíaco, até diversas vias metabólicas. O Ca^{2+} lisossômico ($\text{Ca}^{2+}_{\text{liss}}$) vem sendo considerado um importante sinalizador e regulador intracelular (Morgan *et al.*, 2011; Brini *et al.*, 2013). Este íon faz parte de uma nova via de comunicação entre o lisossomo e o núcleo. Durante situações de estresse como jejum e exercício físico, o $\text{Ca}^{2+}_{\text{liss}}$ é liberado no citoplasma onde ativa a calcineurina, que é uma fosfatase encarregada de desfosforilar o TFEB quando este se encontra fosforilado no citoplasma. Esta desfosforilação favorece a translocação do TFEB para o núcleo, onde exerce a sua ação sobre os genes CLEAR. Assim, diversas alterações celulares que afetam a autofagia e a biogênese lisossômica começam a ser estimuladas (Palmieri *et al.*, 2011; Medina e Ballabio, 2015).

O jejum resulta na ativação de mTOR, o regulador de autofagia, que desencadeia a formação de autofagossomos de membrana dupla (Mizushima, 2007; Kraft e Martens, 2012). Múltiplos lisossomos se fundem com um autofagossomo para formar um autolisossomo no qual o conteúdo celular englobado é degradado. Os produtos degradados, como por exemplo aminoácidos e açúcares, são liberados no citosol dos autolisossomos mediante transportadores (Klionsky e Emr, 2000). A liberação de nutrientes do autolisossomo ativa o mTOR, desencadeando o final da autofagia e a formação de lisossomos nascentes da membrana autofágica, um processo denominado reforma lisossômica autofágica (ALR), que é crítico para manter a homeostase do lisossomo (Rong *et al.*, 2012).

1.6. Homeostase lisossômica nas DDL

Apesar da importância da homeostase lisossômica, os mecanismos moleculares responsáveis pela sua regulação, nas DDL, ainda não estão

esclarecidos. As características fisiopatológicas diversas, causadas pelo acúmulo de substratos dentre outros fatores, leva ao comprometimento de diferentes vias de sinalização em vários tipos celulares. Alguns grupos vêm estudando as possíveis vias de regulação nas DDL, mas ainda pouco se conhece dos reguladores na doença de Fabry.

Alterações na homeostase do Ca^{2+} intracelular já foram descritas em algumas DDL, mucopolisacaridose tipo 1 (MPS 1), GM1-gangliosidose tipo 1 e doença de Gaucher (Pelled *et al.*, 2005; Sano *et al.*, 2009; Viana *et al.*, 2016). Na MPS 1 foi descrito um desbalanço nos níveis de Ca^{2+} , com aumento do Ca^{2+} no retículo endoplasmático ($\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$) e do Ca^{2+} mitocondrial, que podem causar uma maior suscetibilidade ao estímulo apoptótico (Viana *et al.*, 2016). Na GM1-gangliosidose foi observado que o $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ é expelido e, posteriormente, absorvido pela mitocôndria que medeia a apoptose celular (Sano *et al.*, 2009). Na doença de Gaucher foi observado um da liberação do Ca^{2+} estocado no retículo endoplasmático, que também foi correlacionado com o acúmulo de glicosilceramida (Pelled *et al.*, 2005).

As mudanças nas concentrações de Ca^{2+} lisossômico ($\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$) foram estudadas nas DDL, entre elas em Niemann-Pick tipo C1, mucopolipidose tipo IV (ML IV), síndrome de Chediak–Higashi e MPS 1. Na doença de Niemann-Pick tipo C1 a proteína NPC1 está mutada e o processo de entrada de Ca^{2+} no lisossomo é deficiente, por isso, a concentração do $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ está diminuída. De forma contrária, na ML IV a liberação de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ está comprometida, devido ao canal de Ca^{2+} TRPML1 estar mutado. Por conseguinte, foi encontrada uma alta concentração de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ no lúmen lisossômico (Lloyd-Evans, Morgan, *et al.*, 2008). Na síndrome de Chediak–Higashi a proteína LYST, que atua na fusão e fissão vesicular, está alterada. Dessa forma, foi observado um aumento na captação do $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ (Styrt, Pollack e Klempner, 1988). Na MPS 1 o catabolismo dos glicosaminoglicanos é ineficiente, e nosso grupo encontrou níveis aumentados de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ nos esplenócitos de camundongos modelo da doença (Pereira *et al.*, 2010).

O lisossomo tem o papel de centro de sinalização, dado que o $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ liberado permite a translocação do TFEB. Esse último é quem vai regular os genes da biogênese e da autofagia. Na doença de Fabry, assim como em todas as DDL, o lisossomo é a organela de maior comprometimento. Por esse motivo, estudar este mecanismo pode ampliar o conhecimento ajudando na compreensão da fisiopatologia da doença de Fabry.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a via de regulação da homeostase lisossômica, mediada pelo mTOR e TFEB em cultura de fibroblastos de pacientes com Doença de Fabry e de indivíduos controle sem a doença.

2.2. Objetivos específicos

Utilizando culturas de fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controles sem a doença, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1) Avaliar a atividade enzimática da α -Galactosidase A;
- 2) Verificar o funcionamento lisossômico mediante a avaliação da atividade enzimática de outras hidrolases lisossômicas;
- 3) Avaliar a presença de globotriaosilceramida;
- 4) Avaliar a concentração do íon Ca^{2+} intracelular;
- 5) Quantificar a expressão proteica da p-mTOR;
- 6) Avaliar a localização de p-mTOR e de TFEB;
- 7) Avaliar o pH citoplasmático.

3. MÉTODOS

3.1. Desenho experimental

Foram adquiridos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle sem a doença, de ambos os sexos. Estas células foram adquiridas no Instituto *Coriell for Medical Research* dos EUA (ID No. GM02775, GM02772, GM03377, GM01650). Os experimentos de caracterização dos fibroblastos foram realizados em indivíduos do gênero masculino e os experimentos de homeostase lisossômica foram feitos nos gêneros feminino e masculino. Para testar os fibroblastos de pacientes com doença de Fabry, foi decidido avaliar a resposta do Ca^{2+} e da p-mTOR a um estímulo. Para isso desafiámos as células com um choque de soro. Esse teste consiste em incubar as culturas celulares com 50% de Soro Fetal Bovino (SFB) durante 4 horas antes do experimento. Na tabela 1 estão detalhados os grupos avaliados.

Tabela 1. Detalhamento dos grupos correspondentes às culturas de fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle sem a doença, de ambos os gêneros.

Grupo	Abreviação
Controle Homem	CH
Fabry Homem	FH
Controle Homem Desafiado	CHD
Fabry Homem Desafiado	FHD
Controle Mulher	CM
Fabry Mulher	FM
Controle Mulher Desafiado	CMD
Fabry Mulher Desafiado	FMD

3.2. Cultura celular

Os fibroblastos foram cultivados em Meio Eagle, Modificação Dulbecco (DMEM) – com glicose e enriquecido com 15% de SFB, 1% de penicilina, estreptomicina (antibióticos – ATB) e 1% L-glutamina (gln). As células foram mantidas na estufa de cultura com 5% CO₂ a 37°C, e o meio de cultura foi trocado a cada 4 ou 5 dias. Para soltar as células, foi utilizada uma solução salina tamponada com fosfato – ácido etilenodiaminotetracético (PBS-EDTA) ou Solução Salina Equilibrada Livre de Cálcio e Magnésio (BSS-CMF) como tampão de lavagem, Tripsina/EDTA 0,125 M como enzima proteolítica que desagrega as células da garrafa de cultivo e meio com SFB que neutraliza a ação da tripsina pela α -1-antitripsina. Todos os experimentos foram realizados em células com confluência entre 70 e 80%.

3.3. Caracterização dos fibroblastos

3.3.1. Atividade enzimática

Para caracterizar a atividade enzimática lisossômica nos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry, avaliamos por fluorimetria a atividade enzimática lisossômica de 4 hidrolases: α -Galactosidase A (α -Gal A), β -Glicosidase (β -Gli), α -Glicosidase ácida (α -Gli ácida), α -L-Iduronidase (Idua). 10⁵ células confluentes foram lavadas com PBS-EDTA, tripsinizadas e o *pellet* foi ressuspenso em 200 μ L de PBS-EDTA. As amostras foram sonicadas com o Vibra Cell X130PB (Sonics) 5 vezes por 10 segundos para lisar as células. A quantidade de proteína presente em cada amostra foi quantificada pelo método de Lowry (Lowry et al, 1951). Foi verificado se as amostras obtiveram valores de absorbância correspondentes aos valores de absorbância estabelecidos pela curva de calibração, e foram utilizados entre 20 e 60 μ g de proteínas em cada ensaio.

3.3.1.1. α -Galactosidase A (Kolodny e Mumford, 1976)

Para a determinação da atividade da α -Gal A se preparou uma solução de trabalho com 10 μ L do tampão citrato fosfato 1M, que regula o pH da reação, 50 μ L do substrato fluorimétrico 4MU- α -D-galactopiranosídeo, 10 μ L de N-acetil- D-galactosamina 1 M, que é o inibidor específico da α -galactosidase B e 30 μ L do homogenato celular. As amostras foram agitadas e incubadas em banho úmido sob agitação constante de 100 rpm a 37°C por 10, 20 e 30 minutos. Após o meio de reação atingir a temperatura ambiente, aproximadamente 5 minutos, foram adicionados 2,0 mL da solução STOP tampão glicina-KOH 0,25M, pH 10,3.

3.3.1.2. β -Glicosidase (Raghavan, Topol e Kolodny, 1980)

Para a determinação da atividade da β -Gli foi utilizada uma solução de trabalho com 20 μ L de tauro deoxicolato 2% diluído no tampão citrato fosfato 1 M, 50 μ L de substrato fluorimétrico 4MU- β -D-glicopiranosídeo e 30 μ L da amostra de homogenato celular. Os tubos foram agitados e incubados em banho úmido sob agitação constante de 100 rpm a 37°C por 1 hora, 1 hora e 30 minutos, e 2 horas. Após o meio de reação atingir a temperatura ambiente, aproximadamente 5 minutos, foram adicionados 2,0 mL da solução STOP tampão glicina-KOH 0,25M, pH 10,3.

3.3.1.3. α -Glicosidase ácida (Okumiya *et al.*, 2006)

Para determinar a atividade da α -Gli ácida se preparou uma solução de 60 μ L de substrato fluorimétrico 4MU- α -D-glicopiranosídeo com e sem acarbose, que é um inibidor não específico da α -Glicosidase, diluída no tampão citrato fosfato 1 M e 10 μ L da amostra de homogenato celular. As placas de 96 poços foram agitadas por 20 seg, incubadas com rotação de 200 rpm a 37°C por 1 hora, 1 hora e 30 minutos e 2 horas. Ao término da incubação foram adicionados 200 μ L da solução STOP, solução de carbonato de sódio 0,5 mol/L e 0,25g/L Triton X-100 em todos os poços.

3.3.1.4. α -L-Iduronidase (Rome, Weissmann e Neufeld, 1979)

A determinação da atividade da enzima Idua foi realizada usando 25 μ L do substrato fluorimétrico 4MU- α -L-idopiranosídeo e 25 μ L do homogenato celular. A

reação foi agitada e, posteriormente, incubada sob agitação constante de 100 rpm a 37°C por 30, 45 e 60 minutos em um banho úmido. Após o meio de reação atingir a temperatura ambiente, aproximadamente 5 minutos, foram adicionados 2,0 mL da solução STOP tampão glicina-KOH 0,25M, pH 10,3.

A leitura de todas as reações foi realizada no fluorímetro SpectraMax (Molecular Devices) com excitação de 360 nm e emissão de 450 nm. A liberação da molécula 4-metilumbiliferona (4MU), que em pH alcalino emite uma fluorescência proporcional à quantidade de moléculas que foram hidrolisadas e, portanto, à atividade enzimática de cada enzima, foi quantificada. Foi realizada uma curva de calibração com a 4-MU e os valores foram corrigidos com o branco e a quantidade de proteína mensuradas. Os cálculos das atividades foram feitos com o programa *SoftMax Pro 5.4 Microplate Data Acquisition & Analysis Software*.

3.3.2. Extração e purificação de Gb3 (Toledo *et al.*, 1995)

Para caracterizar a presença de Gb3 nos fibroblastos com doença de Fabry, usamos a técnica de cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC). 10⁶ células foram lavadas com CMF-BSS, tripsinizadas e congeladas até seu processamento. As amostras foram descongeladas e os glicolipídeos extraídos pela adição de 1 mL da mistura de solventes isopropanol/hexano/água (55:20:25, v/v/v), e com 2 mL de clorofórmio/metanol (2:1, v/v). As soluções foram agitadas com barras magnéticas e mantidas em banho de ultrassom, após uma hora os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado, os processos foram realizados duas vezes cada e os sobrenadantes unidos. Os extratos foram secos e ressuspensos no solvente clorofórmio/metanol (2:1, v/v). A cromatografia em placa de HPTLC foi desenvolvida no sistema de solventes clorofórmio/metanol/CaCl₂ 0,02% (60:40:9; v/v/v). A revelação do HPTLC contendo os glicolipídeos totais foi realizada após borrifar a placa com orcinol/H₂SO₄, e revelada em estufa a 120°C por 5 minutos. As regiões contendo os glicolipídeos aparecem como manchas púrpuras.

3.4. Homeostase lisossômica

3.4.1. Quantificação de Ca^{2+}

Para medir o Ca^{2+} por fluorescência, 10^4 células foram incubadas na estufa de cultura por 1 hora com o marcador Fluo-4 AM NW dye mix (2,5 mM) em placas pretas de fundo transparente de 96 poços (50 μL por poço). A quantificação foi feita no aparelho FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices) utilizando uma excitação de 488 nm e emissão de 524 nm. Para abertura dos canais intracelulares de Ca^{2+} diferentes reagentes foram adicionados: Rianodina e Tapsigargina, que atuam no retículo endoplasmático modulando os receptores de rianodina e inibindo a Ca^{2+} ATPase, respectivamente, aos 30 segundos; Bafilomicina A1 que age no lisossomo inibindo a H^+ ATPase, aos 700 segundos; e Ionomicina que é um ionóforo do Ca^{2+} da membrana celular, aos 1000 segundos. Para observar os movimentos nos níveis do Ca^{2+} citosólico ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$), Ca^{2+} do retículo endoplasmático ($\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$) e Ca^{2+} lisossômico ($\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$) a leitura foi feita a cada 4 segundos por um total de 1200 segundos.

A análise dos dados foi realizada utilizando o *SoftMax Pro 5.4 Microplate Data Acquisition & Analysis Software*. A intensidade de fluorescência foi mensurada em Unidade de Fluorescência Relativa (RFU) e normalizada, o delta do aumento de Ca^{2+} em relação ao basal com cada droga foi calculado.

3.4.2. Quantificação de mTOR

A expressão proteica de mTORC1, foi avaliada com base nos níveis de p-mTOR por citometria de fluxo. 10^4 células foram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas e fixadas com 2% de paraformaldeído à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com Glicina 0,01 M, para bloquear os radicais formados na fixação, e permeabilizadas com Triton X-100 0,001% por 30 minutos. As células foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário para p-mTOR de coelho (diluição 1:50) com 1% de BSA em PBS. O anticorpo secundário Alexa Fluor 488 IgG de cabra anti-coelho (diluição 1:300) foi adicionado e incubado por 40

minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas e ressuspensas em 200 µl de PBS-BSA e analisadas no citômetro de fluxo BD Accury C6 (BD Biosciences).

3.4.3. Localização de TFEB e mTOR

Para avaliar a localização das proteínas TFEB e mTOR, foram utilizados anticorpos para p-mTOR e TFEB desfosforilada, além disso os núcleos foram marcados com DAPI. Os fibroblastos foram cultivados em placas de 24 poços (1×10^4 células por poço) sobre lamínula de vidro de 13 mm, após 48 horas, as células foram lavadas com Salina Tamponada com Fosfato - Albumina Sérica Bovina (PBS-BSA), fixadas com 2% de paraformaldeído à temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida lavadas com Glicina 0,1 M e permeabilizadas com Triton X-100 0,001% por 15 minutos. As células foram incubadas 4 horas a temperatura ambiente com o anticorpo primário para p-mTOR de coelho (diluição 1:50) em PBS-BSA. Foi adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 594 IgG anti-coelho (diluição 1:500) por 40 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário de cabra para TFEB (diluição 1:50) em PBS-BSA e adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 IgG anti-cabra (diluição 1:500) por 40 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-BSA-azida, as lamínulas foram montadas individualmente em lâmina de vidro empregando-se intensificador de fluorescência Fluoromount G/DAPI para visualizar os núcleos e estocadas a 4°C até seu processamento.

As lâminas foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser LSM 710 META (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), com objetiva 63x (Plan-Neofluar, abertura numérica de 1.4) sob óleo de imersão. p-mTOR-Alexa Fluor 594 foram excitados com laser HeNe ($\lambda_{Ex} = 594$ nm, $\lambda_{Em} = 600-735$ nm) e TFEB-Alexa Fluor 488 foram excitados com laser de argônio ($\lambda_{Ex} = 488$ nm, $\lambda_{Em} = 500-550$ nm). As imagens foram preparadas utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS5 e Adobe Illustrator CS5.

3.5. pH citoplasmático

Para medir o pH citoplasmático (pH_{cit}) por fluorescência, 10^4 células foram incubadas na estufa de cultura por 1 hora com o marcador BCECF-AM (0,3 mM) em placas pretas de fundo transparente de 96 poços (50 μL por poço). Em seguida as células foram lavadas com PBS deixando 50 μL por poço até a quantificação. Esta foi feita no aparelho FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices) utilizando duas excitações 490 nm e 440 nm e uma emissão de 535 nm. A análise dos dados foi realizada utilizando o *SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis Software*. Foi mensurada a fluorescência em dois comprimentos de onda, e a razão 490/440 foi utilizada para comparar os diferentes grupos celulares.

3.6. Análise Estatística

Os dados obtidos de pH, p-mTOR e Ca^{2+} foram analisados com o teste não paramétrico Mann Whitney, uma vez que o tamanho da amostra foi $N < 30$. No caso das atividades enzimáticas como são medidas repetidas, a esfericidade foi analisada com o teste de Mauchly e a comparação estatística entre os grupos foi realizada com o teste estatístico GLM (General Linear Model).

Os dados estão representados por média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos fibroblastos

4.1.1. Atividade enzimática

A avaliação da atividade das hidrolases lisossômicas é uma ferramenta útil para observar a função do lisossomo. A medida destas atividades foi feita nos fibroblastos provenientes de pacientes com doença de Fabry e indivíduos controle do sexo masculino (FH e CH) em 3 tempos diferentes, para avaliar se havia variação ao longo do tempo. Em cada gráfico correspondente, apresentados nas figuras 1 a 4, pode-se observar uma diferença significativa entre os dois tipos celulares.

A deficiência enzimática característica da doença foi comprovada, uma vez que se observou uma atividade nula da enzima α -Gal A nos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry (Fig.1).

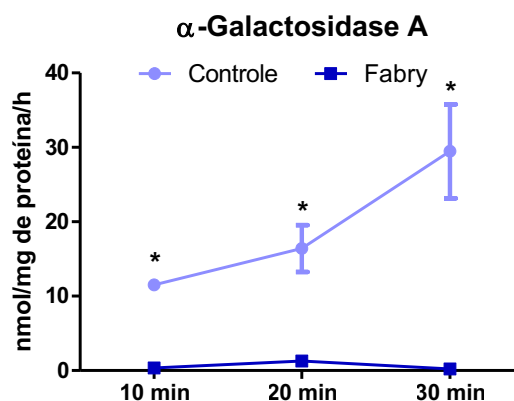


Figura 1. Atividade enzimática de α -Gal A. α -Gal A em fibroblastos de indivíduos controle e de indivíduos com doença de Fabry. (média $\pm$ desvio padrão; N=2, * teste GLM entre os grupos, $p < 0,05$)

De forma interessante, os FH têm atividade da enzima β -Gli maior comparados com os indivíduos controle (Fig. 2).

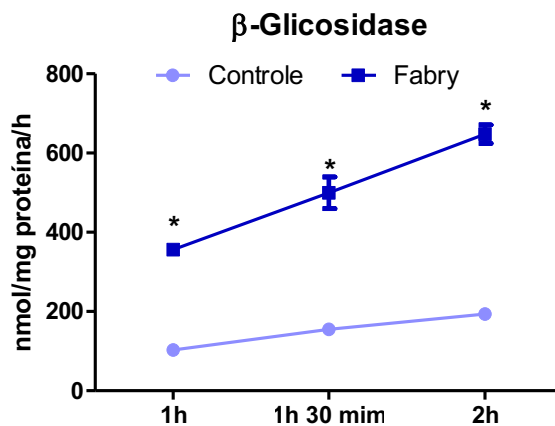


Figura 2. Atividade enzimática de β -Gli. β -Gli em fibroblastos de indivíduos controle e de indivíduos com doença de Fabry. (média $\pm$ desvio padrão; N=2, * teste GLM entre os grupos, $p < 0,05$)

Por outro lado, os fibroblastos dos pacientes com doença de Fabry têm menor atividade das enzimas α -Gli ácida (Fig. 3) e Idua (Fig. 4) em comparação aos indivíduos controle.

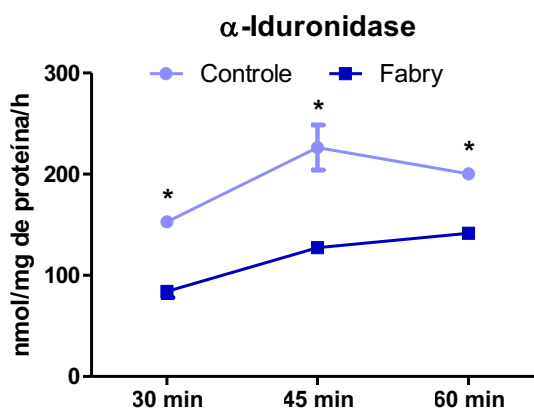


Figura 3. Atividade enzimática de Idua. Idua em fibroblastos de indivíduos controle e de indivíduos com doença de Fabry. (média $\pm$ desvio padrão; N=2, * teste GLM entre os grupos, $p < 0,05$)

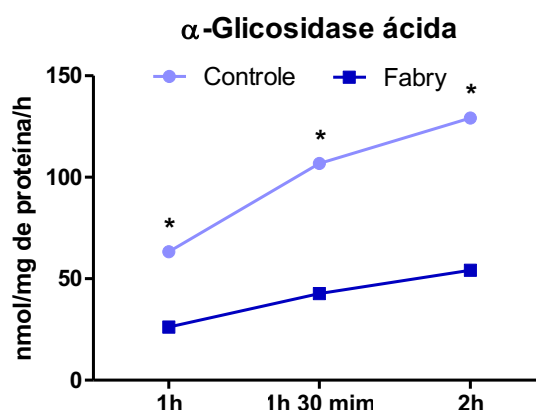


Figura 4. Atividade enzimática de α-Gli ácida. α-Gli ácida em fibroblastos de indivíduos controle e de indivíduos com doença de Fabry. (média ± desvio padrão; N=3, * teste GLM entre os grupos, $p < 0,05$)

4.1.2. Gb3

A avaliação do Gb3 é mais um parâmetro que permite caracterizar a doença de Fabry, ele é um dos glicoesfingolipídeos que se acumula nos lisossomos das células dos pacientes. Por meio da técnica de HPTLC, utilizada neste caso, é possível avaliar a presença ou ausência de mono-hexosil-ceramida (CMH), di-hexosil-ceramida (CDH), tri-hexosil-ceramida (CTH) e globosídeo (Gb). No nosso experimento observamos a presença de tri-hexosil-ceramida apenas nos fibroblastos dos pacientes com doença de Fabry. Na Fig. 5 observamos três colunas, da esquerda para a direita, temos o GL, que é a mistura que contém o padrão de glicolípídeos; o CH que é o homogenato de fibroblastos de homens sem a doença de Fabry; e o FH que é o homogenato de fibroblastos de pacientes homens com a doença de Fabry. Podemos observar claramente a presença de Gb3 apenas na coluna de FH.

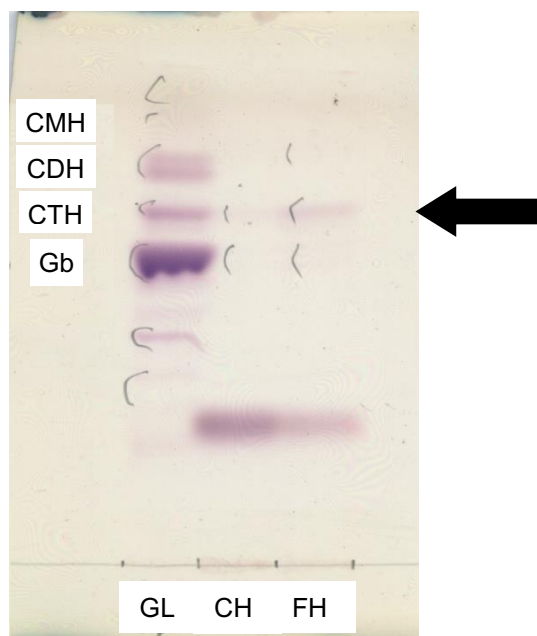


Figura 5. Figura demonstrativa de HPTLC de glicolípídeos extraídos da cultura de fibroblastos. GL= padrão de glicolípídeos, CH= controle homem, FH= Fabry homem, CMH = mono-hexosil-ceramida, CDH = di-hexosil-ceramida, CTH = tri-hexosil-ceramida e Gb = globosídeo.

4.2. Homeostase lisossômica

4.2.1. Níveis de Ca^{2+}

Para avaliar se a sinalização, entre os lisossomos e o núcleo, dos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry está comprometida, quantificamos os níveis de Ca^{2+} nestas células e comparamos com os fibroblastos controles. Foi utilizado o ensaio fluorimétrico no qual os fibroblastos confluentes foram marcados com o fluoróforo Fluo-4-AM que detecta as variações intracelulares de Ca^{2+} citoplasmático.

Primeiro, a rianodina e tapsigargina foram utilizadas para mobilizar o Ca^{2+} estocado no retículo endoplasmático para o citoplasma, onde foi mensurado. Em seguida foi colocada a bafilomicina A1, que atinge os canais v-ATPase e libera o Ca^{2+} localizado nos lisossomos. Finalmente, adicionou-se a ionomicina, que é um ionóforo de Ca^{2+} , que permite a passagem deste íon através da membrana

Foi observada uma diferença significativa no conteúdo de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ entre os grupos de células CH e FH ($U=400$; $p=0,0053$) (Fig. 12), o que não foi observado nas células dos indivíduos do sexo feminino CM e FM ($U=560$; $p=0,324$).

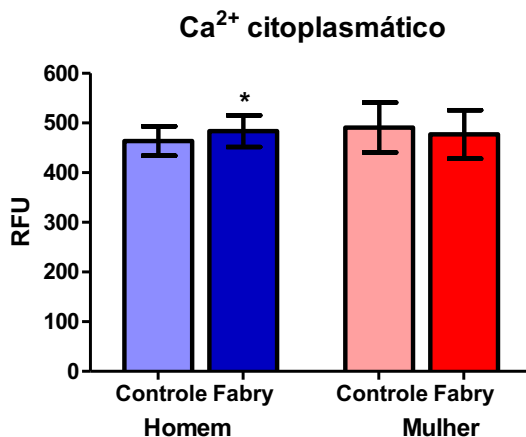


Figura 12. RFU do Ca^{2+} citoplasmático. $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle. (média ± desvio padrão, *teste de Mann Whitney, em triplicata, $p<0,05$)

Por outro lado, o $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ foi estatisticamente diferente apenas entre as células CM e FM ($U=1,00$; $p=0,0190$) (Fig. 13).

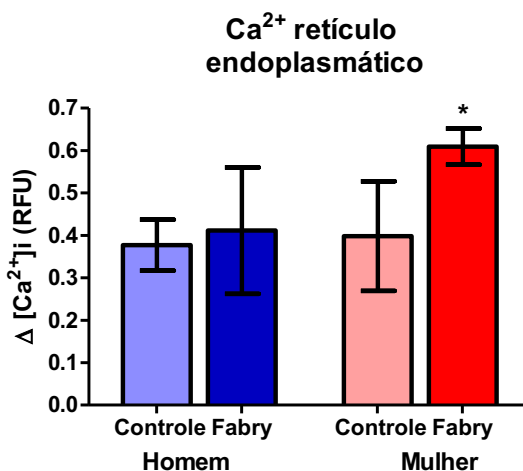


Figura 13. Variação da concentração de Ca^{2+} no retículo endoplasmático. $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle. Os dados foram normalizados e a diferença entre o antes e o depois da adição de rianodina e taspigargina foi calculada. (média ± desvio padrão, *teste de Mann Whitney, em triplicata, $p<0,05$)

Quando avaliamos o $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$, verificamos que seus níveis não apresentam diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos avaliados: CH e FH ($U=10,00$; $p=0,2403$); CM e FM ($U=10,00$; $p=0,7619$) (Fig.14).

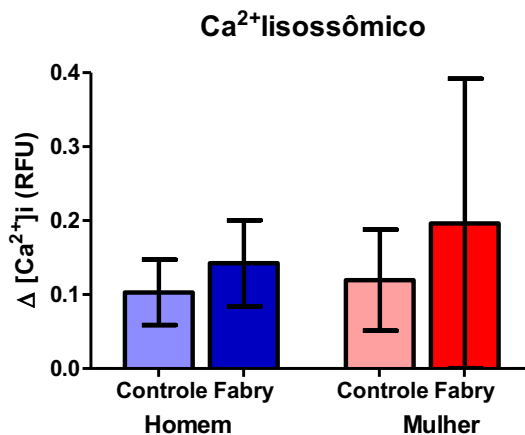


Figura 14. Variação da concentração no Ca^{2+} do lisossomo. $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle. Os dados foram normalizados e a diferença entre o antes e o depois da adição da bafilomicina A1 foi calculada. (média $\pm$ desvio padrão, em triplicata)

Nos grupos de células CHD e FHD, que foram desafiados com soro, não verificamos uma diferença significativa no conteúdo de Ca^{2+} citoplasmático ($U=646$; $p=0,9865$) (Fig. 15), que também não foi observada ao comparar as células CMD e FMD ($U=540$; $p=0,2266$).

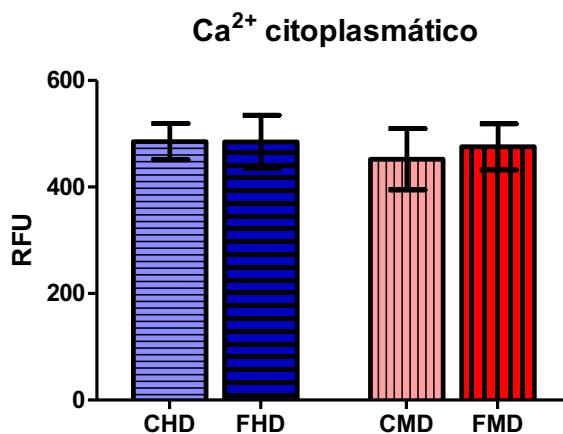


Figura 15. RFU do Ca^{2+} citoplasmático. $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle que foram desafiados com 50% de SFB. (média $\pm$ desvio padrão, em triplicata)

Da mesma forma, o Ca^{2+} proveniente do retículo endoplasmático não é estatisticamente diferente entre os grupos (Fig. 16), considerando ambos gêneros.

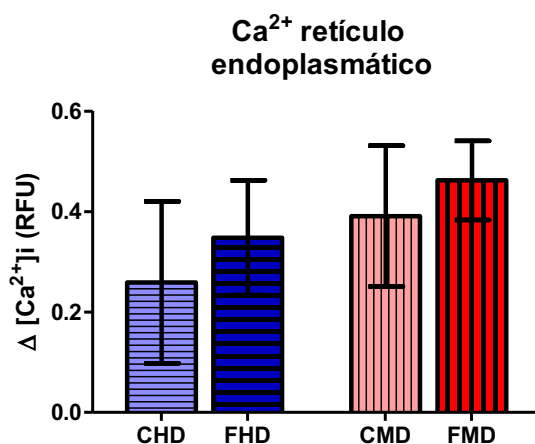


Figura 16. Variação da concentração no Ca^{2+} do retículo endoplasmático. $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle que foram desafiados com 50% de SFB. Os dados foram normalizados e a diferença entre o antes e o depois da adição da rianodina e tapsigargina foi calculada. (média $\pm$ desvio padrão, em triplicata)

Quando avaliamos o Ca^{2+} lisossômico, verificamos que os níveis não diferem de forma estatisticamente significativa entre todos os grupos comparados: CHD e FHD ($U=8,00$; $p=0,4206$); CMD e FMD ($U=7,00$; $p=0,3095$) (Fig.17).

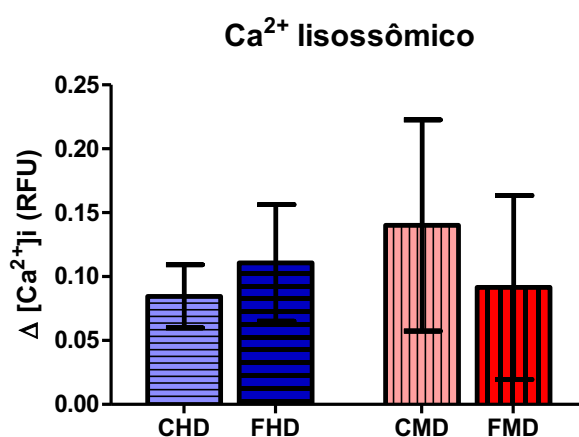


Figura 17. Variação da concentração no Ca^{2+} do lisossomo. $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e de indivíduos controle que foram desafiados com 50% de SFB. Os dados foram normalizados e a diferença entre o antes e o depois da adição da bafilomicina A1 foi calculada. (média $\pm$ desvio padrão, em triplicata).

4.2.2. Níveis de p-mTOR

Para verificar se as condições do lúmen lisossômico em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry são diferentes dos fibroblastos de indivíduos controle quantificamos a p-mTOR, proteína ativa do complexo mTORC1. A proteína foi mensurada por citometria de fluxo e é apresentada a média geométrica normalizada. Podemos observar que os níveis de p-mTOR não diferiram de forma significativa entre os diferentes grupos: CH e FH ($U=22,00$; $p=0,1996$); CM e FM ($U=18,00$; $p=0,3277$) (Fig. 18).

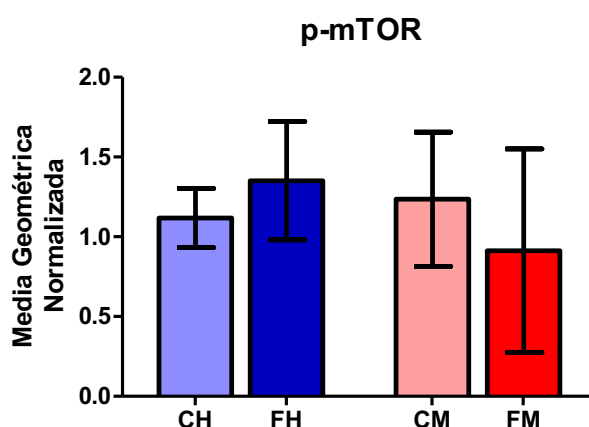


Figura 18. Média geométrica normalizada da p-mTOR. Quantificação da p-mTOR por citometria em fibroblastos de indivíduos controle e de indivíduos com doença de Fabry. Os dados foram normalizados e foi calculada a média geométrica (média $\pm$ desvio padrão)

Quando realizamos o desafio com choque de soro se verificou que os níveis não diferem de forma estatisticamente significante entre todos os grupos comparados (Fig.19).

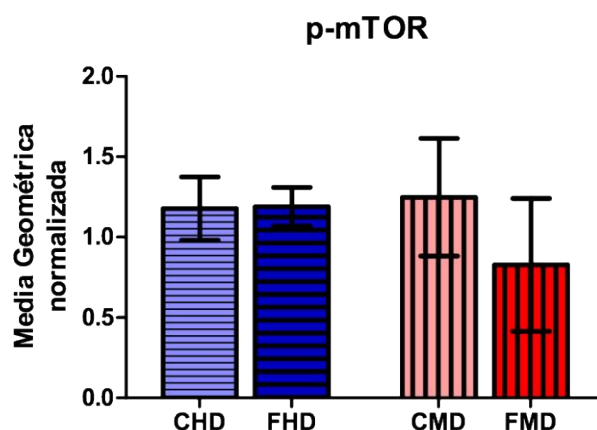


Figura 19. Média geométrica normalizada da p-mTOR. Quantificação da p-mTOR em fibroblastos de indivíduos controle e de indivíduos com doença de Fabry que foram desafiados com 50% de SFB. Os dados foram normalizados e foi calculada a média geométrica (média $\pm$ desvio padrão, * teste de Mann Whitney, em triplicata, $p < 0,05$)

4.2.3. Localização de TFEB e p-mTOR

Para avaliar a localização de TFEB e p-mTOR nas células de pacientes com doença de Fabry e controle sem a doença, a avaliação destas proteínas foi realizada por microscopia confocal.

Nas imagens pode-se observar que tanto o TFEB como o p-mTOR se encontram exclusivamente no citoplasma, havendo muitas vezes colocalização. Também podemos observar que não existe uma diferença significativa entre os diferentes grupos comparando células de pacientes do sexo masculino e feminino com seus respectivos controles.

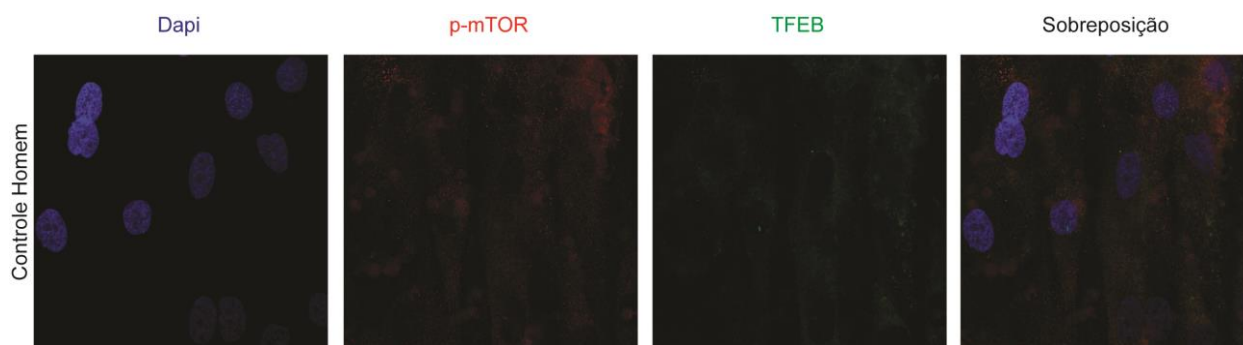


Figura 20: Localização citoplasmática de p-mTOR e TFEB em fibroblastos masculinos de indivíduos sem doença de Fabry. A Microscopia confocal indicando a localização subcelular da proteína p-mTOR (vermelho), TFEB (verde) e DAPI (azul).

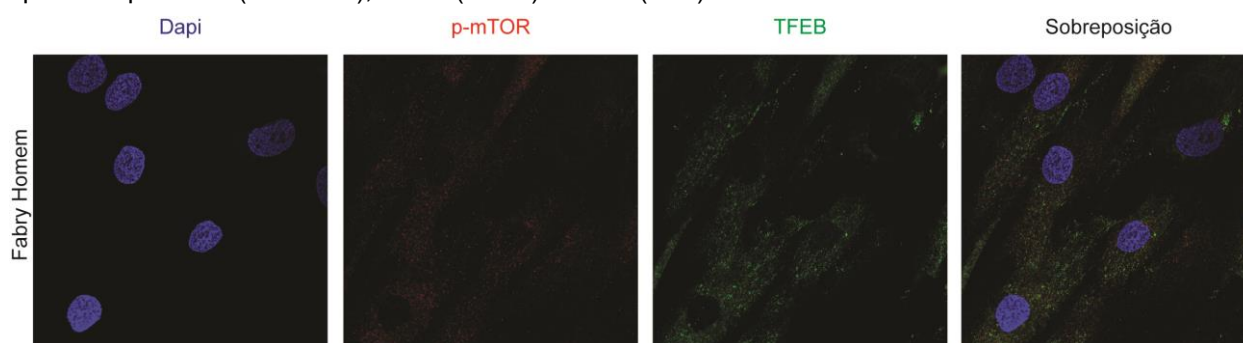


Figura 21: Localização citoplasmática de p-mTOR e TFEB em fibroblastos masculinos de pacientes com doença de Fabry. A Microscopia confocal indicando a localização subcelular da proteína p-mTOR (vermelho), TFEB (verde) e DAPI (azul).

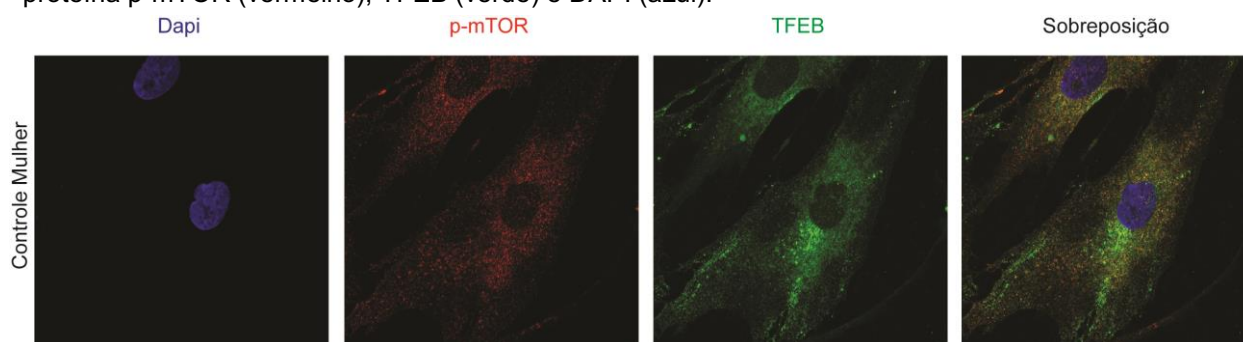


Figura 22: Localização citoplasmática de p-mTOR e TFEB em fibroblastos femininos de indivíduos sem doença de Fabry. A Microscopia confocal indicando a localização subcelular da proteína p-mTOR (vermelho), TFEB (verde) e DAPI (azul).

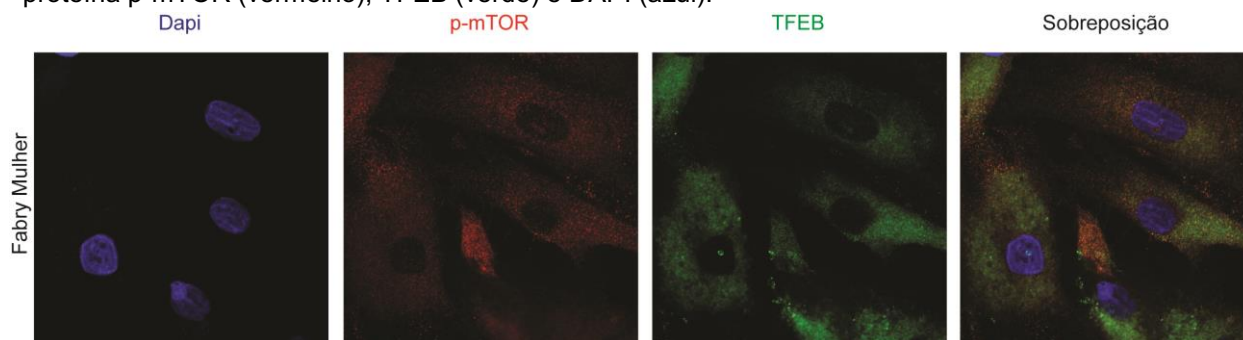


Figura 23: Localização citoplasmática de p-mTOR e TFEB em fibroblastos de pacientes mulheres com doença de Fabry. A Microscopia confocal indicando a localização subcelular da proteína p-mTOR (vermelho), TFEB (verde) e DAPI (azul).

4.3. pH citoplasmático

Com o objetivo de avaliar se a homeostase celular dos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry está comprometida, nós utilizamos o parâmetro bioquímico pH citoplasmático (pH_{cit}) e comparamos com o pH_{cit} dos fibroblastos de indivíduos controle. Com o marcador de fluorescência utilizado, BCECF-AM, conseguimos verificar se existe ou não uma diferença no pH dos diferentes tipos celulares. Para a quantificação do valor absoluto seria necessária uma curva de calibração nestas células e, por esse motivo, apresentamos a razão Ex 490/440. Os valores de pH_{cit} observados nos grupos não diferiram de forma significativa entre pacientes com doença de Fabry e indivíduos controle sem a doença (Fig. 24).

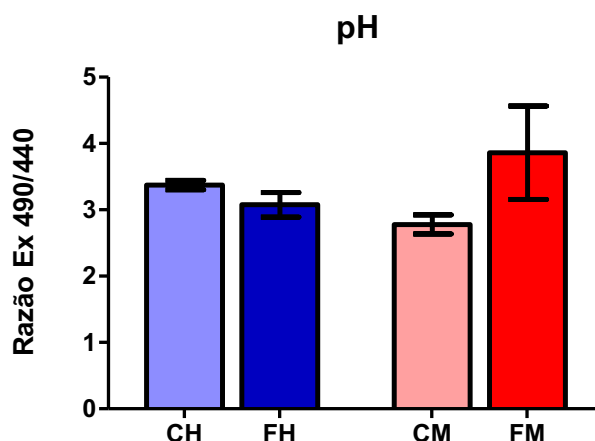


Figura 24. pH citoplasmático. Fibroblastos de indivíduos controle e de indivíduos com doença de Fabry. Dados apresentados em razão Ex 490/440 (média $\pm$ desvio padrão, em triplicata)

5. DISCUSSÃO

Vários grupos já estudaram o lisossomo e suas alterações nas DDL (Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010; Platt, Boland e van der Spoel, 2012; Kuech, Brogden e Naim, 2016), mas até hoje muitos aspectos que envolvem esta classe de doenças ainda são desconhecidos. Por isso, o objetivo principal de nosso estudo foi contribuir com o entendimento da homeostase lisossômica em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e, com isso, compreender melhor a fisiopatologia da doença.

5.1. Caracterização dos fibroblastos

Com o objetivo de caracterizar as culturas celulares de pacientes com doença de Fabry, utilizamos dois parâmetros bioquímicos. Avaliamos a atividade enzimática de α -Gal A e o acúmulo de Gb3. Como as células foram compradas no Instituto *Coriell for Medical Research* dos EUA sabe-se que os pacientes têm uma mutação C>T no nucleotídeo 658 no éxon 5 do gene *GLA* (c.658C>T), e que tal mudança leva a um códon de parada [Arg220Ter (R220X)]. Esta mutação foi objetivo de outro estudo, no qual se observou que os sintomas típicos da doença de Fabry são iguais em ambos os gêneros (Maki *et al.*, 2004). Com o experimento de atividade enzimática foi demonstrado que a cultura de fibroblastos do paciente com doença de Fabry não tem atividade da α -Gal A (Fig. 2).

Esta disfunção enzimática levou a um acúmulo de Gb3, visto que a enzima α -Gal A é a encarregada de hidrolisar a fração terminal alfa-galactosil dos glicolípidos na via catabólica dos lisossomos (Aerts *et al.*, 2008). Este acúmulo de Gb3 pode levar a uma perda funcional e mudanças na estrutura celular, acionando uma cascata de eventos intracelulares, os quais causam o comprometimento do metabolismo energético (Das e Naim, 2009), levam a danos em pequenos vasos (Park, Shu e Shayman, 2009), disfunção dos canais das células endoteliais (Choi *et al.*, 2014), estresse oxidativo (Shen *et al.*, 2008) e deficiência da maturação dos autofagossomos (Chévrier *et al.*, 2010). Mediante a técnica qualitativa HPTLC, verificamos a presença do depósito de Gb3 nos fibroblastos de pacientes com

doença de Fabry e a ausência do acúmulo do glicosfingolípido nos fibroblastos de indivíduos controle (Fig. 5).

Apesar de diversas evidências nesta área, até o momento ainda não foram totalmente esclarecidas quais são as consequências secundárias da deficiência enzimática ou do acúmulo de Gb3 nos lisossomos que, por sua vez, estão funcionando de uma maneira diferente e, por isto, podem estar sujeitos a repercussões na sua atividade biológica como um todo ou nas funções de outras enzimas lisossômicas. Foi assim que sugerimos que as atividades de outras enzimas poderiam estar alteradas e decidimos avaliar outras hidrolases que catabolizam outros tipos de macromoléculas dentro do lisossomo.

A β -Glicosidase é uma enzima associada à membrana, que degrada o substrato glicocerebrosídeo, em ceramida e glicose, e a deficiência enzimática provoca a doença de Gaucher (Beutler e Grabowski, 2001). A α -Glicosidase ácida catalisa a clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 da molécula de glicogênio, e sua insuficiência gera um acúmulo intralisossomal de glicogênio em vários tecidos que causa a doença de Pompe (Hirschhorn e Reuser, 2001). A α -L-Ilduronidase é a enzima lisossômica necessária para quebrar as longas cadeias dos glicosaminoglicanos, a ausência enzimática gera a Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) (Neufeld e Muenzer, 2001).

No nosso estudo foi observado uma diferença significativa entre os dois grupos analisados (Controle Homem e Fabry Homem) nas três enzimas avaliadas β -Gli, α -Gli ácida e Idua. Encontramos uma maior atividade enzimática de β -Gli nos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry, e por outro lado, estas células apresentam uma atividade menor de α -Gli ácida e Idua quando comparamos células de pacientes Fabry com os fibroblastos de indivíduos controle. Estes achados podem apontar para uma disfunção lisossômica, que pode ser causada tanto pela deficiência de α -Gal A como pelo acúmulo de Gb3 ou ainda, por uma via secundária relacionada.

No entanto, nossos dados não estão em concordância com a literatura, Fuller *et al.*, (2015) mensurou algumas proteínas lisossômicas entre elas β -Gli, α -Gli ácida e Idua, e observaram valores de atividade enzimática dos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry similares aos fibroblastos de indivíduos controles. Além disso, os autores observaram uma grande variação de valores com um número amostral de 5 indivíduos o que demonstra a grande variabilidade biológica que existe nas

enzimas lisossômicas entre os diferentes indivíduos, caso eles tenham ou não uma DDL. Esta informação traz uma importante consideração sobre a relevância biológica da variação da atividade de outras enzimas lisossômicas em pacientes que possuem uma deficiência primária. Em nosso estudo encontramos um paciente em que foi identificada uma alteração nas hidrolases β -Gli, α -Gli ácida e Idua. No entanto, não foi possível correlacionar as diferentes atividades enzimáticas com as características apresentadas por este paciente, uma vez que o estudo foi realizado com células em cultura adquiridas comercialmente. Acreditamos que seja importante verificar outros indivíduos e também outras enzimas, principalmente as que atuam na mesma via catabólica da α -Gal A para poder entender melhor o papel das enzimas não deficientes na manutenção da função lisossômica de pacientes com uma DDL.

5.2. Homeostase dos lisossomos

Para avaliar a homeostase lisossômica dos fibroblastos do paciente com doença de Fabry escolhemos quantificar Ca^{2+} intracelular, verificarmos a localização da p-mTOR e do TFEB e, mensurar o pH citoplasmático.

Do ponto de vista biológico o Ca^{2+} é o íon intracelular muito versátil encarregado de intermediar a sinalização dentro das células, ele atua como um modulador de variação temporal em diferentes processos celulares (Berridge, Bootman e Roderick, 2003). Recentemente Medina et al. (2015) estudou como o Ca^{2+} que se encontra estocado no lisossomo também tem a propriedade de modular a sinalização lisossomo-núcleo, pela ativação da calcineurina que desforforila o TFEB. Como a doença de Fabry é uma DDL, em que o lisossomo está comprometido, nós decidimos investigar se as concentrações de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ nas células em cultura de pacientes são diferentes dos indivíduos controle. Com a mesma técnica de fluorescência fomos capazes de mensurar o $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$, o $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ e o $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$, entretanto cada um destes parâmetros pode ter um significado diferente na fisiopatologia da doença.

Na nossa avaliação do $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$, observamos não haver diferenças entre as concentrações nos grupos CH e FH. De forma semelhante, não encontramos diferenças entre os grupos CM e FM (Fig. 14), indicando que em células de

pacientes com doença de Fabry em cultura, no momento de estudo, não foi necessário um maior acúmulo de Ca^{2+} , para estimular a biogênese lisossômica ou seja, as concentrações do $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ não estavam comprometidas. No entanto, é importante ressaltar que este parâmetro bioquímico pode não estar prejudicado neste tipo celular, fibroblastos de pele, mas sim em outros tipos celulares mais afetados pela doença como, por exemplo, as células de endotélio vascular. Não temos as ferramentas suficientes para demonstrar porque o $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ não se encontra diferente no nosso experimento, não obstante seria interessante estudá-lo em outros tipos celulares da doença de Fabry, visto que já foi constatado que este íon se encontra modificado em outras DDL. Na doença Niemann-Pick tipo C1 o processo de entrada de Ca^{2+} ao lisossomo é desequilibrado resultando numa diminuição de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ (Lloyd-Evans, Morgan, *et al.*, 2008). Na ML tipo IV, a liberação de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ está comprometida, o que explica a alta concentração de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ no lúmen (Lloyd-Evans, Peterneva, *et al.*, 2008). E também o nosso grupo encontrou um incremento dos níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ em esplenócitos de camundongos modelo da doença MPS I (Pereira *et al.*, 2010).

Quando verificamos o $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ dos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e comparamos com os indivíduos controle de gênero masculino não observamos diferença significativa, mas curiosamente quando avaliamos este parâmetro nos fibroblastos provenientes do gênero feminino foi encontrada uma diferença entre os grupos FM e CM (Fig. 13). De maneira oposta quando analisamos o $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ dos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e comparamos com os indivíduos controle observamos uma diferença significativa entre os grupos CH e FH, que não foi verificada nos fibroblastos provenientes do gênero feminino (Fig. 12).

O $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$, desempenha uma função vital na regulação de muitos eventos celulares e a alteração da homeostase do Ca^{2+} leva ao estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo e morte celular. Nas DDL as alterações podem ser diferentes, dependendo do modo e lugar em que o substrato acumulado interage com os canais de Ca^{2+} (Vitner, Platt e Futerman, 2010). O $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ é um parâmetro importante na avaliação da homeostase lisossômica, já que foi recentemente descrito de que modo, em condições normais, ele exerce a função de reabastecer os estoques de $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$ mediante os receptores IP3 e independente do pH lisossômico (Garrity *et al.*, 2016). Em virtude da reconhecida importância da regulação do $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$

nas vias de sinalização intracelular (Medina *et al.*, 2015), a interação entre o retículo endoplasmático e o lisossomo servem como foco de novos estudos de regulação da homeostase celular, e além disso, podem ajudar na explicação da alteração da homeostase do $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ nas DDL (Coen *et al.*, 2012).

Já foi observado, pelo nosso grupo, um aumento do $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ associado com apoptose celular em modelo animal de MPS 1 (Viana *et al.*, 2016). Este fenômeno, aumento do $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ associado à apoptose, também foi demonstrado na GM1, em que o gangliosídeo interage com um dos canais que libera o Ca^{2+} (Sano *et al.*, 2009). Além disso, na doença de Gaucher se observou aumento do $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ correlacionado com o acúmulo de glicosilceramida, já que este modula diretamente ao receptor de rianodina do retículo endoplasmático (Pelled *et al.*, 2005). Devido aos estudos nas diferentes DDL abordando a regulação dos estoques da $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$, deduzimos que poderia existir uma diferença significativa nos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry comparados a células de controle sem a doença. Tanto no $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ quanto no $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ avaliados em nosso trabalho, observamos diferenças entre os gêneros, isto pode ser devido ao fato de que a doença de Fabry está ligada ao cromossomo X, e podem existir mecanismos de regulação diferentes nos fibroblastos de homens e mulheres. Como este trabalho é o primeiro a estudar a homeostase lisossômica em fibroblastos de pacientes com doença de Fabry ou em uma DDL ligada ao cromossomo X, verificamos o comprometimento do equilíbrio do Ca^{2+} intracelular, não obstante sugerimos a importância de ampliar estas análises em um número maior de pacientes.

O mTORC1 é o complexo proteico que controla o crescimento e que colabora na regulação do lúmen lisossômico. Fatores de crescimento, níveis de aminoácidos e estresse regulam este complexo (Zoncu *et al.*, 2011). Em sua forma ativa fosforilada, p-mTOR promove a sínteses de proteínas, lipídeos e metabolismo celular, além de regular o lúmen do lisossomo (Laplane e Sabatini, 2012). A forma p-mTOR tem um efeito direto na inibição de autofagia e biogênese lisossômica, por regular o TFEB que atua positivamente no núcleo, na atividade dos genes CLEAR (Sardiello *et al.*, 2009; Settembre *et al.*, 2012). Em condições nutricionais habituais a p-mTOR fosforila o TFEB permanecendo no citoplasma. Mas quando as condições nutricionais são deficientes o TFEB transloca no núcleo para unir-se aos genes CLEAR (Settembre *et al.*, 2012, 2013). Neste estudo, avaliamos a p-mTOR verificando um padrão semelhante entre os fibroblastos de pacientes com doença de

Fabry e os fibroblastos dos indivíduos controle de ambos os gêneros em cultura (Fig. 18). Uma quantidade similar da proteína fosforilada pode indicar que os níveis nutricionais do lúmen lisossômico nestas culturas celulares são equivalentes. Não temos um estímulo que gere a ativação da mTOR, nem na célula, nem no lisossomo o qual denota que, provavelmente, o metabolismo energético está ativo e em equilíbrio nos quatro tipos celulares.

Em nossos experimentos de quantificação de Ca^{2+} e p-mTOR também incluímos o desafio com choque de SFB nos fibroblastos de pacientes com doença de Fabry. O objetivo deste estímulo foi desafiar a maquinaria que está funcionando adequadamente, apesar da doença. Em virtude de que a doença de Fabry é uma doença degenerativa e crônica, as células dos pacientes podem sofrer adaptações capazes de gerar um “sistema de regulação” pelo qual conseguem suportar a falta da enzima da α -Gal A. A hipótese de existência desse “sistema de regulação” ainda não foi comprovada e, por esse motivo, não sabemos se o choque com soro fetal seria capaz de desequilibrá-la. Neste trabalho escolhemos incrementar a quantidade de nutrientes que a célula tem no meio em 50% durante 4 horas como uma tentativa de interferir neste sistema. Tanto na quantificação de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$, $\text{Ca}^{2+}_{\text{ret}}$ e $\text{Ca}^{2+}_{\text{lis}}$, quanto na quantificação da p-mTOR não achamos diferenças significativas entre os diferentes grupos de ambos gêneros após o estímulo (Fig. 15-17 e 19) o que sugere que o “sistema de regulação” não é atingido pelo aumento de nutrientes ou que este sistema consegue lidar bem com o incremento nutricional, tanto nas células controles como na doença de Fabry.

Na avaliação da localização da p-mTOR e do TFEB (Fig. 20-23), foi verificado se a p-mTOR estava perto de TFEB nas células controle e se o TFEB se encontrava no núcleo das células de pacientes com doença de Fabry em cultura. Observamos que não existem diferenças entre os quatro grupos, CH, FH, CM e FM. A p-mTOR se encontra no citoplasma junto com o TFEB, como podemos ver nas fotografias, estas proteínas co-localizam, ou seja, se encontram próximas, o que indica que a p-mTOR está ativada e fosforilando o TFEB, concordando com os resultados obtidos com a quantificação da p-mTOR, apesar de que não fosse o esperado.

O pH_{cit} foi o parâmetro bioquímico escolhido para avaliar a saúde celular, em razão de que pequenas variações podem impactar em processos vitais (Chambard e Pouyssegur, 1986; Musgrove, Seaman e Hedley, 1987). Um exemplo disso é que a acidificação do pH_{cit} foi associada com o desbalanço metabólico que, por sua vez

gera uma resposta adaptativa do mTORC1 (Baldi *et al.*, 2011). Em nossos resultados não foram observadas diferenças significativas entre os fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e os fibroblastos de indivíduos controle de ambos os gêneros (Fig. 24). O que sugere que na cultura destes fibroblastos a homeostase celular está conservada, o que corrobora com um estudo anterior no qual os valores de pH_{cit} não são diferentes entre os fibroblastos de pacientes com doença de Fabry e fibroblastos de indivíduos sem a doença (Ivleva *et al.*, 1991).

Analizados de maneira conjunta, verificamos que vai ser muito importante (1) avaliar os parâmetros em um número maior de pacientes (2) estudar outros tipos celulares e (3) estudar outras mutações da doença de Fabry. Nossos resultados sugerem alterações bioquímicas significativas nas vias de catabolismo metabólico do glicocerebrosídeo, do glicogênio e dos glicosaminoglicanos, que são secundárias à deficiência enzimática da doença de Fabry. Considerando os mecanismos de homeostase lisossômica o nosso trabalho é pioneiro nesta doença, e nele não observamos variações na quantidade de p-mTOR, nem na sua localização, que se situou junto com o TFEB, como também não encontramos variações no Ca²⁺_{lis}, mas sim no Ca²⁺_{cit} e no Ca²⁺_{ret}. Isto sugere possíveis mecanismos de adaptação das células com a doença de Fabry, semelhantes às células de indivíduos controle. Os mecanismos patogênicos estudados colaboram com a compreensão da fisiopatologia da doença de Fabry e abrem portas na procura de novos sistemas de regulação.

6. CONCLUSÕES

A caracterização dos fibroblastos de paciente com doença de Fabry mostrou que eles não têm atividade da α -Gal A compatível com os distúrbios na via catabólica dos glicoesfingolípídeos acumulando-se Gb3, que também foi evidenciado nestas células. Além disso, nosso trabalho demonstrou que existe uma disfunção lisossômica em que se veem afetadas pelo menos outras três hidrolases β -Gli, α -Gli ácida e Idua.

A homeostase lisossômica avaliada pela concentração de Ca^{2+} não se mostrou alterada em culturas de fibroblastos de paciente com doença de Fabry, mas foi encontrada uma mudança nas concentrações de Ca^{2+} do citoplasma e no Ca^{2+} estocado no retículo endoplasmático, o que é sinal de alterações neste íon que podem levar a desequilíbrios celulares.

O desafio proposto neste estudo não foi suficiente para desequilibrar os fibroblastos com doença de Fabry em cultura, o que indica que frente a um aumento de nutrientes estas células conservam a estabilidade.

A maquinaria de regulação lisossômica avaliada pela concentração de p-mTOR e sua localização junto com TFEB nos fibroblastos de paciente com doença de Fabry está conservada, indicando que a sinalização lisossomo-núcleo nestas células se encontra em equilíbrio. O pH citoplasmático é outro parâmetro bioquímico que nos levou a concluir que os fibroblastos de paciente com doença de Fabry em cultura não tem um comprometimento importante na homeostase celular.

7. REFERÊNCIAS

- Aerts, J. M., Groener, J. E., Kuiper, S., Donker-Koopman, W. E., Strijland, A., Ottenhoff, R., van Roomen, C., Mirzaian, M., Wijburg, F. A., Linthorst, G. E., Vedder, A. C., Rombach, S. M., Cox-Brinkman, J., Somerharju, P., Boot, R. G., Hollak, C. E., Brady, R. O. e Poorthuis, B. J. (2008) "Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), p. 2812–7.
- Bagshaw, R. D., Mahuran, D. J. e Callahan, J. W. (2005) "A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle.", *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(2), p. 133–43.
- Balgi, A. D., Diering, G. H., Donohue, E., Lam, K. K. Y., Fonseca, B. D., Zimmerman, C., Numata, M. e Roberge, M. (2011) "Regulation of mTORC1 signaling by pH.", *PloS one*. Organizado por M. Polymenis, 6(6), p. e21549.
- Ballabio, A. e Gieselmann, V. (2009) "Lysosomal disorders: From storage to cellular damage", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1793(4), p. 684–696.
- Beck, M. (2001) "Variable clinical presentation in lysosomal storage disorders.", *Journal of inherited metabolic disease*, 24 Suppl 2(2suppl), p. 47-51–6.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. e Roderick, H. L. (2003) "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.", *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), p. 517–29.
- Beutler, E. e Grabowski, G. (2001) "Gaucher disease", in Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., e Valle, D. (orgs.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, p. 3635–3668.
- Bouwman, M. G., Rombach, S. M., Schenk, E., Sweeb, A., Wijburg, F. A., Hollak, C. E. M. e Linthorst, G. E. (2012) "Prevalence of symptoms in female Fabry disease patients: a case-control survey.", *Journal of inherited metabolic disease*, 35(5), p. 891–8.
- Brady, R. O., Gal, A. E., Bradley, R. M., Martensson, E., Warshaw, A. L. e Laster, L. (1967) "Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency.", *N Engl J Med*, 276(21), p. 1163–7.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D. e Carafoli, E. (2013) "Intracellular calcium homeostasis and signaling.", *Metal ions in life sciences*, 12, p. 119–68.
- Chambard, J. C. e Pouyssegur, J. (1986) "Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G0----G1 transition of fibroblasts.", *Experimental cell research*, 164(2), p. 282–94.
- Chévrier, M., Brakch, N., Céline, L., Genty, D., Ramdani, Y., Moll, S., Djavaheri-Mergny, M., Brasse-Lagnel, C., Annie Laquerrière, A. L., Barbey, F. e Bekri, S. (2010) "Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease.", *Autophagy*, 6(5), p. 589–99.
- Childs, B., Valle, D. e Jimenez-Sanchez, G. (2001) "The inborn error and biochemical individuality", in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, V. D. (org.) *The Metabolic and*

Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill.

Choi, S., Kim, J. A., Na, H. Y., Cho, S. E., Park, S., Jung, S. C. e Suh, S. H. (2014) "Globotriaosylceramide induces lysosomal degradation of endothelial K Ca_v3.1 in fabry disease", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(1), p. 81–89.

Coen, K., Flannagan, R. S., Baron, S., Carraro-Lacroix, L. R., Wang, D., Vermeire, W., Michiels, C., Munck, S., Baert, V., Sugita, S., Wuytack, F., Hiesinger, P. R., Grinstein, S. e Annaert, W. (2012) "Lysosomal calcium homeostasis defects, not proton pump defects, cause endo-lysosomal dysfunction in PSEN-deficient cells", *Journal of Cell Biology*, 198(1), p. 23–35.

Das, A. M. e Naim, H. Y. (2009) "Biochemical basis of Fabry disease with emphasis on mitochondrial function and protein trafficking.", *Advances in clinical chemistry*, 49(1), p. 57–71.

Deegan, P. B., Böhner, F., Barba, M., Hughes, D. A. e Beck, M. (2006) *Fabry disease in females: clinical characteristics and effects of enzyme replacement therapy, Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*.

Desnick, R., Ioannou, Y. e Eng, M. (2001) "Alpha galactosidase a deficiency: fabry disease", in Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., e Valle, D. (orgs.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, p. 3733–3774.

de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. e Appelmans, F. (1955) "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue", *Biochemical Journal*, 60(4), p. 604–617.

Echevarria, L., Benistan, K., Toussaint, A., Dubourg, O., Hagege, A. A., Eladari, D., Jabbour, F., Beldjord, C., De Mazancourt, P. e Germain, D. P. (2016) "X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease", *Clinical Genetics*, 89(1), p. 44–54.

Elstein, D., Schachamov, E., Beer, R. e Altarescu, G. (2012) "X-inactivation in Fabry disease", *Gene*. Elsevier B.V., 505(2), p. 266–268.

Fabry, H. (2002) "Angiokeratoma corporis diffusum--Fabry disease: historical review from the original description to the introduction of enzyme replacement therapy.", *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement*, 91(439), p. 3–5.

Fuller, M., Mellett, N., Hein, L. K., Brooks, D. A. e Meikle, P. J. (2015) "Absence of α -galactosidase cross-correction in Fabry heterozygote cultured skin fibroblasts.", *Molecular genetics and metabolism*, 114(2), p. 268–73.

Futerman, A. H. e van Meer, G. (2004) "The cell biology of lysosomal storage disorders.", *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(7), p. 554–65.

Garrity, A. G., Wang, W., Collier, C. M., Levey, S. A., Gao, Q. e Xu, H. (2016) "The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes", *eLife*, 5(MAY2016).

Garrod, A. E. (1908) "The Croonian Lectures ON INBORN ERRORS OF METABOLISM", in *The Lancet*, p. 1–7.

Hirschhorn, R. e Reuser, A. (2001) "Glycogen storage disease type II: Acid alpha-

glucosidase (acid maltase) deficiency”, in Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., e Valle, D. (orgs.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, p. 3389–3420.

Hughes, D. A. (2008) “Early therapeutic intervention in females with Fabry disease?”, *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 97(457), p. 41–7.

Ivleva, T. S., Ogloblina, T. A., Litinskaia, L. L., Khrust, I. R. e Vidershaĭn, G. I. (1991) “[Intravital determination of pH gradient between the cytoplasm and lysosomes in human fibroblasts in the normal state and in hereditary storage diseases].”, *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 111(5), p. 495–8.

Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Roux, F. e Garin, J. (2002) “Proteomic analysis of human lysosomes: Application to monocytic and breast cancer cells”, *Proteomics*, 2(8), p. 1026–1040.

Klionsky, D. J. e Emr, S. D. (2000) “Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.”, *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), p. 1717–21.

Kraft, C. e Martens, S. (2012) “Mechanisms and regulation of autophagosome formation.”, *Current opinion in cell biology*, 24(4), p. 496–501.

Kuech, E.-M., Brogden, G. e Naim, H. Y. (2016) “Alterations in membrane trafficking and pathophysiological implications in lysosomal storage disorders”, *Biochimie*. Elsevier B.V.

Lakomá, J., Donadio, V., Liguori, R. e Caprini, M. (2016) “Characterization of Human Dermal Fibroblasts in Fabry Disease”, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc., 231(1), p. 192–203.

Laplanche, M. e Sabatini, D. M. (2012) “MTOR signaling in growth control and disease”, *Cell*. Elsevier, 149(2), p. 274–293.

Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., Schuchman, E. H., Galione, A. e Platt, F. M. (2008) “Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium”, *Nature Medicine*, 14(11), p. 1247–1255.

Lloyd-Evans, E., Peterneva, A., Lewis, G. e Churchill, F. P. (2008) “Abnormal lysosomal calcium homeostasis in mucopolipidosis type IV”, *Mol. Genet. Metab*, 93, p. S29–S30.

Luzio, J. P., Bright, N. A. e Pryor, P. R. (2007) “The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway”, *Biochemical Society Transactions*, 35(5).

Luzio, J. P., Pryor, P. R. e Bright, N. A. (2007) “Lysosomes: fusion and function.”, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(8), p. 622–32.

Maki, N., Komatsuda, A., Wakui, H., Oyama, Y., Kodama, T., Ohtani, H., Kigawa, A., Imai, H., Motegi, M., Yamaguchi, A. e Sawada, K. (2004) “A nonsense mutation (R220X) in the α -galactosidase A gene causes typical Fabry disease in both genders”, *Clinical Nephrology*, 61(3), p. 185–190.

Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M. e Puertollano, R. (2012) “MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB.”,

Autophagy, 8(6), p. 903–14.

Mauer, M., Glynn, E., Svarstad, E., Tøndel, C., Gubler, M. C., West, M., Sokolovskiy, A., Whitley, C. e Najafian, B. (2014) “Mosaicism of podocyte involvement is related to podocyte injury in females with Fabry disease”, *PLoS ONE*, 9(11).

Medina, D. L. e Ballabio, A. (2015) “Lysosomal calcium regulates autophagy”, *Autophagy*, 11(6), p. 970–971.

Medina, D. L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., Settembre, C., Wang, W., Gao, Q., Xu, H., Sandri, M., Rizzuto, R., De Matteis, M. A. e Ballabio, A. (2015) “Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB”, *Nature Cell Biology*, 17(3), p. 288–299.

Mehta, A., Ricci, R., Widmer, U., Dehout, F., Garcia De Lorenzo, A., Kampmann, C., Linhart, A., Sunder-Plassmann, G., Ries, M. e Beck, M. (2004) “Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey”, *European Journal of Clinical Investigation*, 34(3), p. 236–242.

Meikle, P. J. (1999) “Prevalence of Lysosomal Storage Disorders”, *JAMA*, 281(3), p. 249.

Meikle, P. J. e Hopwood, J. J. (2003) “Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis”, *European Journal of Pediatrics*, 162, p. S34–S37.

Mellman, I., Fuchs, R. e Helenius, A. (1986) “Acidification of the endocytic and exocytic pathways”, *Annual review of biochemistry*, 55, p. 663–700.

Migeon, B. R. (2006) “The role of X inactivation and cellular mosaicism in women’s health and sex-specific diseases.”, *JAMA*, 295(12), p. 1428–33.

Mizushima, N. (2007) “Autophagy: process and function.”, *Genes & development*, 21(22), p. 2861–73.

Morgan, A. J., Platt, F. M., Lloyd-evans, E. e Galione, A. (2011) “Molecular mechanisms of endolysosomal Ca²⁺ signalling in health and disease”, *Biochem. J.*, 439, p. 349–374.

Musgrove, E., Seaman, M. e Hedley, D. (1987) “Relationship between cytoplasmic pH and proliferation during exponential growth and cellular quiescence.”, *Experimental cell research*, 172(1), p. 65–75.

Neufeld, E. e Muenzer, J. (2001) “The Mucopolysaccharidoses”, in Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., e Valle, D. (orgs.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, p. 3669–3694.

Okeda, R. e Nisihara, M. (2008) “An autopsy case of Fabry disease with neuropathological investigation of the pathogenesis of associated dementia”, *Neuropathology*, 28(5), p. 532–540.

Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M. e Ballabio, A. (2011) “Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways”, *Human Molecular Genetics*, 20(19), p. 3852–3866.

Park, J. L., Shu, L. e Shayman, J. a (2009) “Differential involvement of COX1 and

COX2 in the vasculopathy associated with the -galactosidase A-knockout mouse", *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 296(4), p. H1133–H1140.

Parkinson-Lawrence, E. J., Shandala, T., Prodoehl, M., Plew, R., Borlace, G. N. e Brooks, D. a (2010) "Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology.", *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(2), p. 102–115.

Pasqualim, G., Simon, L., Sperb-Ludwig, F., Burin, M. G., Michelin-Tirelli, K., Giugliani, R. e Matte, U. (2014) "Fabry disease: a new approach for the screening of females in high-risk groups.", *Clinical biochemistry*, 47(7–8), p. 657–62.

Pelled, D., Trajkovic-Bodennec, S., Lloyd-Evans, E., Sidransky, E., Schiffmann, R. e Futerman, A. H. (2005) "Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease", *Neurobiology of Disease*.

Pereira, V. G., Gazarini, M. L., Rodrigues, L. C., Da Silva, F. H., Han, S. W., Martins, A. M., Tersariol, I. L. S. e D'Almeida, V. (2010) "Evidence of lysosomal membrane permeabilization in mucopolysaccharidosis type I: Rupture of calcium and proton homeostasis", *Journal of Cellular Physiology*, 223(2), p. 335–342.

Platt, F. M., Boland, B. e van der Spoel, A. C. (2012) "The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction.", *The Journal of cell biology*, 199(5), p. 723–34.

Roczniak-Ferguson, A., Petit, C. S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T. C. e Ferguson, S. M. (2012) "The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis.", *Science signaling*, 5(228), p. ra42.

Rong, Y., Liu, M., Ma, L., Du, W., Zhang, H., Tian, Y., Cao, Z., Li, Y., Ren, H., Zhang, C., Li, L., Chen, S., Xi, J. e Yu, L. (2012) "Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation".

Saftig, P. (2005) *Lysosomes*. Boston, MA: Springer US. doi: 10.1007/0-387-28957-7.

Saftig, P. e Klumperman, J. (2009) "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function.", *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 10(9), p. 623–635.

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S. e Sabatini, D. M. (2010) "Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids", *Cell*, 141(2), p. 290–303.

Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiah, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M. e d'Azzo, A. (2009) "GM1-Ganglioside Accumulation at the Mitochondria-Associated ER Membranes Links ER Stress to Ca²⁺-Dependent Mitochondrial Apoptosis", *Molecular Cell*.

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E. e Ballabio, A. (2009) "A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function", *Science*, 325(5939), p. 473–7.

Saudubray, J.-M., Desguerre, I., Sedel, F. e Charpentier, C. (2006) "A Clinical Approach to Inherited Metabolic Diseases", in Fernandes, J., Saudubray, J.-M., Berghe, G. van den, e Walter, J. H. (orgs.) *Inborn Metabolic Diseases*. Berlin,

Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 3–48.

Schroeder, L. K., Kremer, S., Kramer, M. J., Currie, E., Kwan, E., Watts, J. L., Lawrenson, A. L. e Hermann, G. J. (2007) “Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC Transporter PGP-2 in the Biogenesis of a Lysosome-related Fat Storage Organelle”, *Molecular Biology of the Cell*, 18(3), p. 995–1008.

Settembre, C. e Ballabio, A. (2011) “TFEB regulates autophagy”, *Autophagy*, 7(November), p. 1379–1381.

Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P. K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Klisch, T. J., Wollenberg, A. C., Di Bernardo, D., Chan, L., Irazoqui, J. E. e Ballabio, A. (2013) “TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop”, *Nature Cell Biology*, 15.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S. S., Erdin, S. S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M. e Ballabio, A. (2012) “A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB.”, *The EMBO journal*. Nature Publishing Group, 31(5), p. 1095–108.

Shen, J.-S., Meng, X.-L., Moore, D. F., Quirk, J. M., Shayman, J. A., Schiffmann, R. e Kaneshi, C. R. (2008) “Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells.”, *Molecular genetics and metabolism*. Elsevier Inc., 95(3), p. 163–8.

Staretz-Chacham, O., Lang, T. C., LaMarca, M. E., Krasnewich, D. e Sidransky, E. (2009) “Lysosomal storage disorders in the newborn.”, *Pediatrics*, 123(4), p. 1191–207.

Styrt, B., Pollack, C. R. e Klempner, M. S. (1988) “An abnormal calcium uptake pump in Chediak-Higashi neutrophil lysosomes.”, *Journal of leukocyte biology*, 44(2), p. 130–5.

Sweeley, C. C. e Klionsky, B. (1963) “FABRY’S DISEASE: CLASSIFICATION AS A SPHINGOLIPIDOSIS AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL GLYCOLIPID.”, *The Journal of biological chemistry*, 238(172713), p. 3148–50.

Toyooka, K. (2013) “Fabry disease”, in *Handbook of clinical neurology*. 1º ed. Elsevier B.V., p. 629–642.

Viana, G. M., Buri, M. V., Paredes-Gamero, E. J., Martins, A. M. e D’Almeida, V. (2016) “Impaired Hematopoiesis and Disrupted Monocyte/Macrophage Homeostasis in Mucopolysaccharidosis Type I Mice”, *Journal of Cellular Physiology*, 231(3), p. 698–707.

Vitner, E. B., Platt, F. M. e Futerman, A. H. (2010) “Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases”, *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), p. 20423–20427.

Walkley, S. U. e Vanier, M. T. (2009) “Secondary lipid accumulation in lysosomal disease”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(4), p. 726–736.

Wang, R. Y., Lelis, A., Mirocha, J. e Wilcox, W. R. (2007) “Heterozygous Fabry

women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life.”, *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 9(1), p. 34–45.

Whybra, C., Kampmann, C., Willers, I., Davies, J., Winchester, B., Kriegsman, J., Brühl, K., Gal, A., Bunge, S. e Beck, M. (2001) “Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes.”, *Journal of inherited metabolic disease*, 24(7), p. 715–24.

Wilcox, W. R. (2004) “Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care”, *The Journal of Pediatrics*, 144(5), p. S3–S14.

Wilcox, W. R., Oliveira, J. P., Hopkin, R. J., Ortiz, A., Banikazemi, M., Feldt-Rasmussen, U., Sims, K., Waldek, S., Pastores, G. M., Lee, P., Eng, C. M., Marodi, L., Stanford, K. E., Breunig, F., Wanner, C., Warnock, D. G., Lemay, R. M., Germain, D. P. e Fabry Registry (2008) “Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry.”, *Molecular genetics and metabolism*, 93(2), p. 112–28.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Yasemin, S. e Sabatini, D. M. (2011) “mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out mechanism that requires the Vacuolar H⁺-ATPase”, *Science*, 334(6056), p. 678–683.