

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Investigação de parâmetros de estresse oxidativo e inflamação  
em pacientes com doença de Fabry submetidos à  
Terapia de Reposição Enzimática:  
correlações com globotriaosilceramida**

**Giovana Brondani Biancini**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Regla Vargas**

Porto Alegre, 2012.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Investigação de parâmetros de estresse oxidativo e inflamação  
em pacientes com doença de Fabry submetidos à  
Terapia de Reposição Enzimática:  
correlações com globotriaosilceramida**

**Giovana Brondani Biancini**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Regla Vargas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, 2012.

### CIP - Catalogação na Publicação

Biancini, Giovana Brondani

Investigação de parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em pacientes com doença de Fabry submetidos à terapia de reposição enzimática: correlações com globotriaosilceramida / Giovana Brondani Biancini. -- 2012.

55 f.

Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. doença de Fabry. 2. estresse oxidativo. 3. globotriaosilceramida. 4. defesas antioxidantes. 5. inflamação. I. Vargas, Carmen Regla, orient. II. Título.

Aos meus pais, Marcos (*in memoriam*) e Irma,  
que me ensinaram, dentre tantas outras coisas,  
que tudo o que deve ser feito merece ser bem feito.

## **Agradecimentos**

À Prof<sup>a</sup> Carmen, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e pela orientação e confiança nesses quase cinco anos de trabalho.

Aos pacientes, por aceitarem participar deste estudo.

Ao CNPq, CAPES e FIPE/HCPA pelo suporte financeiro.

À equipe do Hospital Dia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por gentilmente colaborar com as coletas das amostras e ao Juarez e às acadêmicas de enfermagem Mariana e Maria Luiza, pela disposição em realizarem as coletas.

À Dra. Cristina Netto e Dr. Roberto Giugliani, pela disponibilidade e compreensão.

À equipe do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo e às secretárias Cléia e Zeniara do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelas inúmeras ajudas.

Aos colegas do Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com os quais muito aprendi e aprendo sempre, bem como àqueles que por lá passaram. Com todos vocês pude experimentar a agradável mistura de trabalho e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por todos os ensinamentos.

Aos meus verdadeiros amigos de infância, escola, faculdade e pós-graduação, que estão sempre ao meu lado e fazem a vida ficar muito mais bonita.

Aos que me acolheram em Porto Alegre.

Ao Paulo, pela parceria, conselhos, companhia e, sobretudo, amor.

Aos Brondani e Biancini, pela solidez e por representarem dignamente o significado da palavra “família”.

Aos meus amados Marcos, Irma, Daniel e Vitor pelo amor incondicional e por serem o meu porto seguro.

## RESUMO

A doença de Fabry (DF) é um erro inato do catabolismo de glicosíngolipídeos de herança ligada ao cromossomo X decorrente de uma atividade deficiente da enzima lisossômica  $\alpha$ -galactosidase A. Os pacientes apresentam como principais achados angioqueratomas na pele e acroparestesias e geralmente vão a óbito na idade adulta por falência renal e acidente vascular cerebral. Como consequência da deficiência enzimática, os substratos (principalmente a globotriaosilceramida – Gb3) acumulam-se em fluidos corporais e lisossomas de diversos tipos celulares do organismo. Desde 2001, a terapia disponível para a DF é a Terapia de Reposição Enzimática (TRE). Antes disso, o tratamento era apenas para os sintomas. Algumas hipóteses para a fisiopatologia da DF estão intimamente ligadas à produção de espécies reativas e inflamação, porém até este momento não haviam estudos *in vivo* sobre esse tema. Então, o objetivo deste estudo foi investigar parâmetros de estresse oxidativo, citocinas próinflamatórias e Gb3 em pacientes com DF em tratamento com TRE e, finalmente, estabelecer uma possível relação entre eles. Analisamos amostras de sangue e urina de pacientes com DF sob TRE (n=14) e controles saudáveis pareados por idade (n=14). Os pacientes apresentaram níveis diminuídos de defesas antioxidantes, medidas através de glutathione (GSH), atividade da glutathione peroxidase (GPx) e aumento da razão superóxido dismutase/catase (SOD/CAT) em eritrócitos. Em relação ao dano a biomoléculas (lipídeos e proteínas), verificamos nos pacientes aumento de malondialdeído (MDA) e grupamentos carbonilas proteicos no plasma e de di-tirosina (di-Tyr) na urina. As citocinas próinflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  também mostraram-se aumentadas no plasma dos pacientes. O Gb3 na urina apresentou correlação significativa direta com os níveis plasmáticos de IL-6, grupamentos carbonilas e MDA. IL-6 mostrou-se direta e significativamente correlacionada com di-Tyr e inversamente correlacionada com a atividade da GPx. Esses dados sugerem que os estados próinflamatório e pró-oxidante ocorrem, estão correlacionados e parecem ser induzidos pelo Gb3 em pacientes com DF em tratamento com TRE.

## ABSTRACT

Fabry disease (FD) is an X-linked inborn error of glycosphingolipid catabolism due to deficient activity of  $\alpha$ -galactosidase A. Patients present as main findings angiokeratomas in skin and acroparesthesias and usually die in adult age of renal failure and stroke. As a consequence of the enzyme deficiency, the substrates (mainly globotriaosylceramide - Gb3) accumulate in body fluids and lysosomes of many cell types of organism. Since 2001, the available therapy for FD is the Enzyme Replacement Therapy (ERT). Before that, treatment was just for the symptoms. Some pathophysiology hypotheses are intimately linked to reactive species production and inflammation, but until this moment there were no *in vivo* studies about it. Hence, the aim of this study was to investigate oxidative stress parameters, pro-inflammatory cytokines and Gb3 in patients with FD under treatment with ERT and, finally, to establish a possible relation between them. We analyzed blood and urine samples of Fabry patients under ERT (n=14) and healthy age-matched controls (n=14). Patients presented decreased levels of antioxidant defenses, assessed by glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) activity and increased superoxide dismutase/catalase (SOD/CAT) ratio in erythrocytes. Concerning to the damage to biomolecules (lipids and proteins), we verified in patients increase of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl groups in plasma and of di-tyrosine (di-Tyr) in urine. The pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  were also increased in plasma from patients. Urinary Gb3 presented significant direct correlation with the plasma levels of IL-6, carbonyl groups and MDA. IL-6 was directly and significantly correlated with di-Tyr and inversely correlated with GPx activity. This data suggest that a pro-inflammatory and pro-oxidant state occur, are correlated and seem to be induced by Gb3 in Fabry patients under ERT treatment.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

DF	Doença de Fabry
di-Tyr	Di-tirosina
DLD	Doença Lisossômica de Depósito
Gb3	Globotriaosilceramida
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IL-6	Interleucina 6
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
MDA	Malondialdeído
NO·	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH·	Radical hidroxila
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TRE	Terapia de Resposição Enzimática

**SUMÁRIO**

	Pág.
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	1
1. Estresse Oxidativo	1
2. Erros Inatos do Metabolismo (EIM)	3
3. Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs)	4
4. Deficiência da $\alpha$ -galactosidase A: doença de Fabry (DF)	5
4.1. Terapia de Reposição Enzimática (TRE)	7
4.2. Fisiopatologia da DF	9
<b>II. OBJETIVOS</b>	12
<b>III. RESULTADOS</b>	13
<b>Capítulo 1.</b> <i>Global triaasilceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy</i>	
<b>Resultados Suplementares</b>	21
<b>IV. DISCUSSÃO</b>	22
<b>V. CONCLUSÕES</b>	30
<b>VI. PERSPECTIVAS</b>	31
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	33
<b>ANEXO 1.</b> Lista de figuras	43
<b>ANEXO 2.</b> Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética	44
<b>ANEXO 3.</b> Termo de Consentimento para Pacientes	45
<b>ANEXO 4.</b> Termo de Consentimento para Controles	46

## I. Introdução

### 1. Estresse oxidativo

Conceitualmente, estresse oxidativo é definido como o resultado de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes teciduais e as espécies reativas presentes, em favor destas, gerando dano às mais variadas biomoléculas e reações em cadeia que prejudicam o funcionamento celular normal. Esse desbalanço pode ocorrer tanto por uma diminuição nas defesas antioxidantes (p. ex. por exposição a xenobióticos que são metabolizados por conjugação com glutathione – GSH - ou por alimentação pobre em antioxidantes e minerais) como por um aumento na produção de espécies reativas (p. ex. em doenças inflamatórias crônicas, nas quais os sistemas de produção de espécies reativas estão cronicamente ativados), ou por ambos (Halliwell e Whiteman, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2006).

Espécies reativas são moléculas com a característica comum de originarem reações em cadeia pela sua reatividade com as moléculas vizinhas. Tais espécies podem ser radicalares (denominadas radicais livres, p.ex. radical hidroxila –  $\text{OH}^\cdot$ ) e não-radicalares (p.ex. peróxido de hidrogênio –  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A maioria das biomoléculas são de natureza não-radicalar, mas quando atacadas por um radical livre, podem dar início a reações em cadeia pela formação de um novo radical. As espécies reativas possuem papel fisiológico importante (p.ex. óxido nítrico –  $\text{NO}^\cdot$  - na vasodilatação e  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sinalizador), porém, quando seu excesso é potencialmente danoso a biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (Halliwell, 2006; Stone e Yang, 2006).

A definição clássica para o termo “antioxidante” é a de “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, significativamente diminui ou previne a sua oxidação desse substrato” (Halliwell e Gutteridge, 2006). As defesas antioxidantes que atuam em sistemas biológicos são classificadas como enzimáticas (p. ex. glutathione peroxidase – GPx, catalase – CAT- e superóxido dismutase - SOD) e não enzimáticas, essas últimas subclassificadas em de origem endógena (por exemplo GSH e ácido úrico) ou exógena (proveniente da dieta, como algumas vitaminas e micronutrientes). Tais defesas atuam controlando os níveis de espécies reativas, de forma a mantê-los suficientemente baixos a ponto de exercerem sua atividade biológica (p. ex. efeito sinalizador do óxido nítrico - NO) sem causar muito dano aos tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2006; Halliwell, 2006).

O controle dos níveis de espécies reativas pelas defesas antioxidantes se dá através da diminuição da formação de espécies reativas ou pela sua remoção (ou seqüestro, propriedade conhecida como de *scavenger*). O metabolismo energético celular gera ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) à medida que os elétrons da cadeia transportadora de elétrons são passados diretamente ao oxigênio ( $O_2$ ). Nesse contexto, é fundamental a atividade da enzima antioxidante SOD, que catalisa a dismutação desse radical  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ . . Sendo o  $H_2O_2$  também potencialmente danoso a biomoléculas e de fácil difusão através de membranas, são de grande importância as enzimas antioxidantes com propriedade de peroxidases (CAT e GPx) para manter baixos seus níveis (Halliwell e Gutteridge, 2006; Halliwell, 2006).

Estudos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo em diversas patologias, tais como neoplasias (Toyokuni, 1995; Mantovani *et al.*, 2002; López-Lázaro, 2010), doenças neurodegenerativas (Halliwell, 2006) e erros inatos do metabolismo (Fontella *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2004; Barschak *et al.*, 2008; Mc Guire, Parikh e Diaz, 2009; Sitta *et al.*, 2009; Ribas *et al.*, 2010; ).

## **2. Erros Inatos do Metabolismo (EIM)**

EIM são doenças monogênicas herdadas causadas por mutações que levam à tradução de uma proteína, geralmente uma enzima, com atividade deficiente ou nula. Essa deficiência gera um bloqueio metabólico com acúmulo dos substratos da enzima deficiente e de repercussão variável no indivíduo, sendo geralmente grave ou letal. A herança pode ser de três padrões: autossômica recessiva (maioria dos casos), autossômica dominante ou ligada ao X (Beaudet *et al.*, 2001).

Os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, com base na sua fisiopatologia: distúrbios na síntese ou degradação de moléculas complexas (p.ex. doenças lisossômicas de depósito e peroxissomais); erros inatos do metabolismo intermediário (p. ex. EIM de aminoácidos e ácidos orgânicos) e doenças com deficiência de energia (p. ex. defeitos de gliconeogênese, de oxidação de ácidos graxos e doenças da cadeia respiratória mitocondrial) (Saudubray e Charpentier, 2001).

### 3. Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs)

As DLDs são cerca de 50 doenças resultantes da atividade deficiente de hidrolases de macromoléculas solúveis no lúmen do lisossoma ou de proteínas integrais da membrana lisossomal com função de transporte. Todas as DLDs conhecidas já foram caracterizadas pelo acúmulo intralisossomal de substrato (p.ex. a doença de Fabry, doença de Pompe e mucopolissacaridoses - MPS), o primeiro evento a ocorrer, porém a grande variabilidade de sintomas observados sugere que outras rotas bioquímicas e celulares sejam ativadas. Possivelmente, essas rotas variem assim como os metabólitos acumulados variam entre as diferentes DLDs (Futerman e van Meer, 2004).

Uma recente publicação de Vitner e colaboradores acerca das cascatas fisiopatológicas ativadas nas DLDs apontou o estresse oxidativo como possível fator envolvido na fisiopatologia da doença de Fabry, além da autofagia, alteração do tráfego de lipídeos, estresse no retículo endoplasmático, resposta autoimune, alteração da homeostase do cálcio e inflamação (Vitner *et al.*, 2010). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou o envolvimento do estresse oxidativo na mucopolissacaridose tipo II (MPS II). Nos pacientes MPS II, a terapia de reposição enzimática parece ter efeito protetor contra o dano oxidativo a lipídeos e proteínas (Fillipon *et al.*, 2011).

Estudos têm demonstrado que os lisossomos são bastante vulneráveis ao estresse oxidativo e apresentam, ao mesmo tempo, condições favoráveis a um estado próoxidante e até mesmo à reação de Fenton (geração de radicais hidroxila, altamente danosos a biomoléculas, pela presença de íons  $Fe^{2+}$  e peróxido de hidrogênio). Como consequência, a ruptura lisossomal gera um extravasamento do conteúdo da organela (grande concentração de ferro de

enzimas hidrolíticas) no citoplasma e pode levar a necrose e apoptose (Terman *et al.*, 2006; Terman e Brunk, 2006; Brunk, Neuzil e Eaton, 2001).

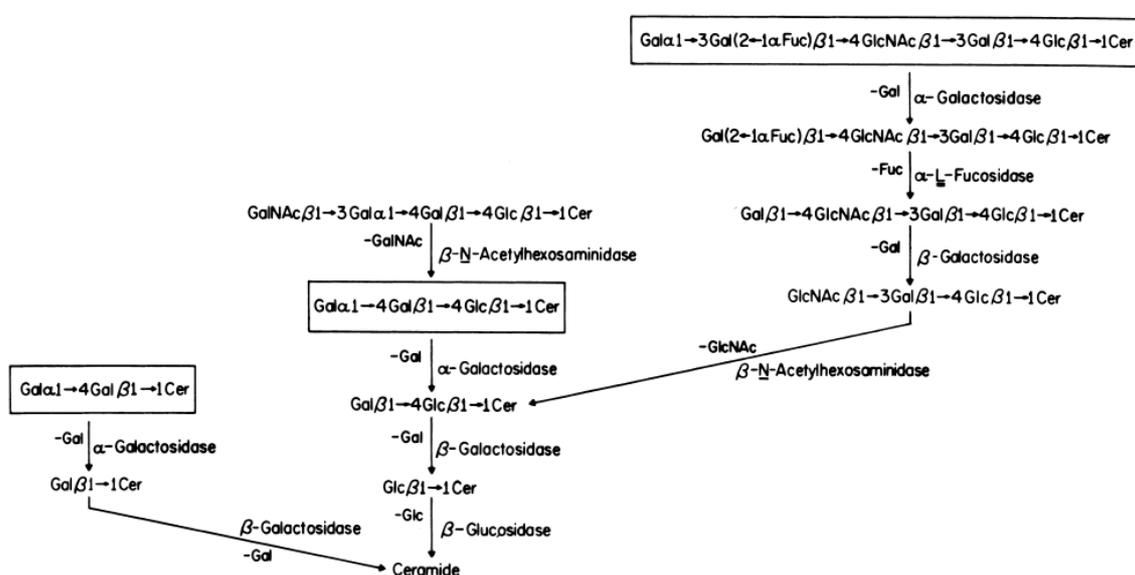
As DLDs podem, assim como os EIM, ser classificadas de diversas maneiras, sendo que a mais útil parece ser a que agrupa de acordo com a enzima deficiente em vez de agrupar pela natureza do substrato acumulado (Futerman e van Meer, 2004).

#### **4. Deficiência da $\alpha$ -galactosidase A: doença de Fabry (DF)**

A doença de Fabry (DF) é um erro inato do metabolismo (EIM) de herança ligada ao X que ocorre devido a mutações no gene GLA que codifica a enzima  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -gal A, EC 3.2.1.22). Trata-se de uma enzima lisossomal, portanto a DF é classificada como uma Doença Lisossômica de Depósito (DLD). Em pacientes com a forma clássica da DF, a  $\alpha$ -gal A apresenta atividade muito baixa e até mesmo indetectável. Como consequência, os substratos da enzima (glicosíngolipídeos, principalmente a globotriaosilceramida – Gb3; Figura 1) acumulam-se nos mais variados líquidos biológicos e tecidos (Desnick, Iannou e Eng, 2001). Mais de 350 mutações no gene GLA já foram descritas, sendo que a maioria dos pacientes possui mutações de ponto causando substituições de um único aminoácido, terminação prematura da transcrição ou defeitos no processamento do transcrito primário (Clarke, 2007; Okumiya *et al.*, 1995).

Pacientes com DF apresentam como achados e sintomas clássicos acroparestesias, opacidade da córnea, perda da audição, diarreia, intolerância a temperaturas extremas e angioqueratomas. Tratando-se de uma doença de evolução crônica e sem episódios de agudização, a maioria dos pacientes

sãodiagnosticados na idade adulta quando já apresentam insuficiência renal crônica e necessitam ser submetidos a hemodiálise. Complicações vasculares como acidente vascular cerebral precoce também são comuns em pacientes com DF. As heterozigotas apresentam quadro clínico heterogêneo explicado pelo mecanismo de inativação do cromossomo X, podendo ser desde assintomáticas até desenvolver falência renal (Desnick, Iannou e Eng, 2001).



**Figura 1.** Via metabólica do catabolismo de glicoesfingolípídeos, destacando-se os metabólitos acumulados na DF: galactosilceramida, globotriaosilceramida (Gb3) e glicoesfingolípídeos do grupo sanguíneo B (Adaptado de Scriver *et al.*, 2001).

Em nível de Brasil, não há dados epidemiológicos acerca da frequência ou incidência a DF. A incidência da forma clássica da DF foi estimada em 1/40.000 a 1/117.000 homens (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Meikle *et al.*, 1999). Entretanto, um estudo mais recente de triagem neonatal na população italiana revelou uma incidência de 1 para cada 3.100 homens sendo que observaram uma proporção de 1 fenótipo clássico para 11 de início tardio (Spada *et al.*, 2006). Por se tratar de uma doença com sintomas inespecíficos e

que envolvem múltiplos órgãos, estima-se que a DF seja subdiagnosticada (Rozenfeld, 2009).

O diagnóstico da DF é realizado através da medida da atividade enzimática da  $\alpha$ -gal A em plasma, fibroblastos, sangue impregnado em papel filtro ou leucócitos (sendo este considerado padrão-ouro). Para heterozigotas, as quais podem apresentar atividade enzimática em níveis considerados normais, a análise molecular do gene GLA se faz necessária (Desnick, Iannou e Eng, 2001; Gal, Hughes e Winchester, 2011).

#### **4.1. Terapia de Reposição Enzimática (TRE)**

O tratamento para a DF consistia, até o ano de 2001, apenas em medidas paliativas. A partir daquele ano, tornou-se disponível a TRE, que consiste na infusão venosa de  $\alpha$ -gal A recombinante a cada 15 dias. Existem duas formas comercialmente disponíveis, a agalsidase alfa (Fabrazyme<sup>®</sup>, Genzyme Corporation) e agasidase beta (Replagal<sup>®</sup>, Shire Human Genetic Therapies). Ambas são administradas em quantidade corrigida pela massa corporal do paciente e as doses recomendadas são de, respectivamente, 0,2 e 1,0 mg/Kg. Estudos demonstram que, mesmo a origem da enzima e a dose administrada sendo diferentes, ambas as formulações possuem eficácia similar (Eng *et al.*, 2001).

Entretanto, em 2010 foi publicada uma revisão pela *Cochrane corporation* avaliando os testes clínicos publicados acerca dos nove anos de TRE. Os autores concluíram que mais estudos devem ser realizados para se afirmar acerca das consequências a longo prazo da TRE sobre a morbidade da DF. Ainda, a utilização de terapia complementar também deve ser avaliada e

novas terapias como a de redução do substrato e chaperonas farmacológicas são citadas como promissoras (El Dib e Pastores, 2011). Os autores consideraram, dentro dos critérios de inclusão por eles estabelecidos, dois estudos clínicos com agalsidase alfa (Hughes *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2002) e três com agalsidase beta (Banikazemi *et al.*, 2007; Bierer *et al.*, 2006; Thurberg *et al.*, 2004). Pacientes com DF apresentaram diminuição significativa de Gb3 no plasma e tecidos após o tratamento com agalsidase alfa ou beta. Porém, os estudos carecem de correlações clínicas acerca de pontos importantes como episódios de dor comumente apresentados pelos pacientes (acroparestesias e as chamadas “crises de Fabry”), função renal e morbimortalidade. Além disso, o tempo máximo de TRE avaliado foi 36 meses, sendo que não há dados na literatura sobre os efeitos a longo prazo dessa terapia.

Os fatores que podem estar associados à falha terapêutica da TRE ainda não são totalmente conhecidos, porém são citados o dano tecidual irreversível nos órgãos acometidos (Murray *et al.*, 2006) e a produção de anticorpos neutralizadores contra a enzima recombinante. A produção de anticorpos é mais prevalente nos pacientes que recebem a infusão de agalsidase beta 1.0 mg/Kg, possivelmente devido à origem da linhagem celular na qual é produzida a enzima recombinante – agalsidase beta é produzida em células de ovário de ratos e a agalsidase alfa em cultura de fibroblastos humanos (Beck 2002; Pastores e Thadhani, 2001). Além disso, a dose maior (1.0 mg/Kg, contra 0.2 mg/Kg da agalsidase alfa) provavelmente seja mais imunogênica (Vedder *et al.*, 2008). Vedder e colaboradores também encontraram resultados contraditórios com o da literatura prévia, uma vez que os títulos de anticorpos não tiveram diminuição significativa com o uso crônico da TRE (Vedder *et al.*, 2008). Tais

estudos haviam encontrado diminuição nos títulos de anticorpos (Eng *et al.*, 2001; Vilcox *et al.*, 2004).

#### **4.2. Fisiopatologia da DF**

Embora a causa primária da DF seja bem conhecida, os mecanismos pelos quais o acúmulo intralisossomal de substratos nas DLDs leva à disfunção celular ainda estão sendo investigados (Terman *et al.*, 2006; Brunk *et al.*, 2001.) e a fisiopatologia da DF se encontra ainda pouco elucidada.

Estudos apontam como maior causa de morbidade as alterações microvasculares, que influenciam diretamente na função renal e nas manifestações cerebrovasculares e angioqueratomas (Desnick, Iannou e Eng, 2001). Estima-se que a disfunção endotelial encontrada nesses pacientes seja relacionada a uma super-regulação do sistema renina-angiotensina, com aumento de citocinas e moléculas de adesão bem como pelo efeito pró-inflamatório da angiotensina II em leucócitos e células endoteliais e da musculatura lisa vascular (Rombach *et al.*, 2010; De Graba *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2007).

Outras evidências também apontam a inflamação como componente-chave no entendimento da DF. Um estudo de Rozenfeld e colaboradores encontrou distúrbios da função leucocitária e números anormais de células do sistema imune (aumento de linfócitos, e diminuição de monócitos e células dendríticas) em pacientes com DF. Ainda, tais pesquisadores encontraram um aumento de Gb3 em linfócitos totais e do tipo B nos pacientes (Rozenfeld *et al.* 2009). O Gb3 presente na membrana plasmática é denominado CD 77 (Thomaidis, 2009) e parece ter um papel na necrose e apoptose (Mangenev,

1993). Na apoptose mediada por receptor de linfócito B, o CD 77/Gb3 participa regulando a atividade de uma proteína tirosina cinase citoplasmática (Mori *et al.*, 2000).

Especula-se que o acúmulo de Gb3 esteja relacionado intimamente com as alterações vasculares também por meio do desencadeamento de processo inflamatório intravascular. Um estudo *in vitro* de Shen e colaboradores demonstrou que o Gb3 induz um aumento da expressão de moléculas de adesão e produção de espécies reativas em cultura de células endoteliais de pacientes com DF. Os autores observaram que além do Gb3, o plasma de pacientes com DF tratados com TRE também foi capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) naquelas células (Shen *et al.*, 2008). Ainda, já é descrito o envolvimento de espécies reativas em um grande número de doenças inflamatórias crônicas e doenças vasculares como AVC isquêmico, sendo este último uma frequente complicação da DF (Halliwell, 1994; Polidori *et al.*, 1998).

Além do estudo de Shen e colaboradores, há outras evidências na literatura científica de que o estresse oxidativo possa estar envolvido na fisiopatologia da DF. Um estudo de Moore e colaboradores demonstrou que a infusão venosa de ascorbato, um potente antioxidante, diminuiu a hiperperfusão cerebral encontrada em pacientes com DF tratados com TRE. Ainda, encontraram um aumento na atividade da mieloperoxidase sérica nos pacientes condizente com processo inflamatório (Moore *et al.*, 2004). A mieloperoxidase é associada à injúria vascular e aumento do risco de aterosclerose (Zhang *et al.*, 2001). Sua elevação no soro indica um aumento

significativo no *priming* de leucócitos, sendo este último associado a inflamação e produção de ERO (Swain, Rohn e Quinn, 2002).

Tendo como base o conhecimento do efeito vasodilatador do óxido nítrico (NO $\cdot$ ), alguns estudos investigaram o metabolismo deste em pacientes com DF. Foi encontrado um excesso de ânion superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ) e produtos derivados do NO $\cdot$ , sugerindo que a vasodilatação endotelial fosse mediada também por outros sinalizadores que não o NO $\cdot$  (Moore *et al.*, 2001; Altarescu *et al.*, 2001). O excesso de O $_2^{\cdot-}$  pode reagir com NO $\cdot$  formando peroxinitrito (ONOO $^-$ ), sendo que ambos podem agir como vasodilatadores. Esses achados sugerem que as espécies reativas podem tanto agir como vasodilatadores crônicos, como aumentar a vulnerabilidade vascular à aterosclerose (Wei, Kontos e Beckman, 1996; Moore *et al.*, 2004).

Para determinar o quanto a deficiência em  $\alpha$ -gal, ou seja, a DF, afetaria a progressão da aterosclerose, pesquisadores estudaram ratos com deficiência concomitante de  $\alpha$ -gal A e apolipoproteína E (apo E). A deficiência de  $\alpha$ -gal A acelerou o processo de aterosclerose e causou aumento de nitrotirosina na placa aterosclerótica (Bodary *et al.*, 2005). Um excesso de nitrotirosina nos vasos já havia sido relatado em biópsias de pele de pacientes com DF, sendo revertido pela TRE (Moore *et al.*, 2001). Esse aumento de nitrotirosina somado aos outros resultados de Moore, Altarescu e colaboradores sugerem que há uma alteração crônica das vias do óxido nítrico em pacientes com DF.

## **II. Objetivos**

### **1. Objetivo geral**

Considerando as evidências do envolvimento do estresse oxidativo, inflamação e acúmulo do Gb3 na fisiopatologia da DF e a falta de uma investigação que inter-relacione esses três elementos e avalie o estresse oxidativo mais profundamente, o objetivo geral deste trabalho foi investigar, em pacientes tratados com TRE, tais elementos e correlacioná-los, afim de encontrar uma possível relação entre eles.

### **2. Objetivos específicos**

a) Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (através da medida da atividade das enzimas CAT, SOD e GPx) e não-enzimáticas (através da quantificação de GSH) em eritrócitos;

b) Avaliar o dano oxidativo a lipídeos (através da quantificação de malondialdeído - MDA - em plasma) e proteínas (através da quantificação de grupamentos carbonilas e sulfidrilas em plasma e de di-Tyr na urina);

c) Quantificar Gb3 na urina;

d) Quantificar interleucinas próinflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) no plasma;

e) Correlacionar o Gb3, as interleucinas próinflamatórias e os parâmetros de estresse oxidativo.

### III. RESULTADOS

#### Capítulo I

Os resultados estão apresentados na forma de artigo científico publicado na revista *Biochimica et Biophysica Acta – Metabolic Basis of Disease*.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

# Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbadis](http://www.elsevier.com/locate/bbadis)

## Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy

Giovana B. Biancini <sup>a,b,\*</sup>, Camila S. Vanzin <sup>a,b</sup>, Daiane B. Rodrigues <sup>b</sup>, Marion Deon <sup>b</sup>, Graziela S. Ribas <sup>b,c</sup>, Alethéa G. Barschak <sup>d</sup>, Vanusa Manfredini <sup>e</sup>, Cristina B.O. Netto <sup>b</sup>, Laura B. Jardim <sup>b,f</sup>, Roberto Giugliani <sup>a,b</sup>, Carmen R. Vargas <sup>a,b,c,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

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

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 September 2011

Received in revised form 25 October 2011

Accepted 1 November 2011

Available online 6 November 2011

#### Keywords:

Fabry disease  
Oxidative stress  
Globotriaosylceramide  
Inflammation  
Antioxidant defense  
Reactive species

### ABSTRACT

Fabry disease is an X-linked inborn error of glycosphingolipid catabolism due to deficient activity of  $\alpha$ -galactosidase A that leads to accumulation of the enzyme substrates, mainly globotriaosylceramide (Gb3), in body fluids and lysosomes of many cell types. Some pathophysiology hypotheses are intimately linked to reactive species production and inflammation, but until this moment there is no *in vivo* study about it. Hence, the aim of this study was to investigate oxidative stress parameters, pro-inflammatory cytokines and Gb3 levels in Fabry patients under treatment with enzyme replacement therapy (ERT) and finally to establish a possible relation between them. We analyzed urine and blood samples of patients under ERT ( $n = 14$ ) and healthy age-matched controls ( $n = 14$ ). Patients presented decreased levels of antioxidant defenses, assessed by reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) activity and increased superoxide dismutase/catalase (SOD/CAT) ratio in erythrocytes. Concerning to the damage to biomolecules (lipids and proteins), we found that plasma levels of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl groups and di-tyrosine (di-Tyr) in urine were increased in patients. The pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  were also increased in patients. Urinary Gb3 levels were positively correlated with the plasma levels of IL-6, carbonyl groups and MDA. IL-6 levels were directly correlated with di-Tyr and inversely correlated with GPx activity. This data suggest that pro-inflammatory and pro-oxidant states occur, are correlated and seem to be induced by Gb3 in Fabry patients.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** Cr, creatinine; CAT, catalase; Di-Tyr, di-tyrosine; FD, Fabry disease; FU, fluorescence units; Gb3, globotriaosylceramide; GLA,  $\alpha$ -galactosidase A; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HPLC, high-performance liquid chromatography; IL, interleukin; LC-MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; TNF, tumor necrosis factor.

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

E-mail addresses: [giovana.bb@gmail.com](mailto:giovana.bb@gmail.com) (G.B. Biancini),

[cami\\_vanzin@hotmail.com](mailto:cami_vanzin@hotmail.com) (C.S. Vanzin), [daianegrbr@hotmail.com](mailto:daianegrbr@hotmail.com) (D.B. Rodrigues), [marion\\_deon@yahoo.com.br](mailto:marion_deon@yahoo.com.br) (M. Deon), [grazielaribas@yahoo.com.br](mailto:grazielaribas@yahoo.com.br) (G.S. Ribas), [aletheagatto@gmail.com](mailto:aletheagatto@gmail.com) (A.G. Barschak), [vanusa\\_manfredini@yahoo.com.br](mailto:vanusa_manfredini@yahoo.com.br) (V. Manfredini), [cbnetto@hcpa.ufrgs.br](mailto:cbnetto@hcpa.ufrgs.br) (C.B.O. Netto), [ljardim@hcpa.ufrgs.br](mailto:ljardim@hcpa.ufrgs.br) (L.B. Jardim), [rgiugliani@hcpa.ufrgs.br](mailto:rgiugliani@hcpa.ufrgs.br) (R. Giugliani), [crvargas@hcpa.ufrgs.br](mailto:crvargas@hcpa.ufrgs.br) (C.R. Vargas).

### 1. Introduction

Fabry disease (FD) is an X-linked inborn error of glycosphingolipid catabolism due to deficient activity of  $\alpha$ -galactosidase A (EC 3.2.1.22). This defect leads to a progressive accumulation of substrates, mainly globotriaosylceramide (Gb3), in body fluids and lysosomes of vascular endothelium and most other tissues. Clinical manifestations include pain and paresthesias in the extremities, angiokeratomas in skin and mucous membranes, hypohidrosis and corneal opacity [1]. Since 2001, enzyme replacement therapy (ERT) is available for FD. The treatment consists in intravenous infusion of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A, every two weeks. Agalsidase beta and agalsidase alfa are the two recombinant forms of  $\alpha$ -galactosidase A in use for FD [2].

Although it is known that Fabry patients usually die in adult life from renal, cardiac and/or cerebral complications of the vascular disease [1], the pathophysiology of the disease is largely unknown. There is some evidence in the literature demonstrating that oxidative stress

may be involved in FD pathophysiology. Moore et al. [3] found that ascorbate, a potent antioxidant, decreases hyperperfusion in Fabry patients under ERT treatment. In this context, Bodary et al. [4] demonstrated, in apolipoprotein-E (apo-E) deficient mice, that  $\alpha$ -galactosidase A deficiency accelerates atherosclerosis and causes increased nitrotyrosine in the plaque. Moore et al. [5] also found excess dermal vascular nitrotyrosine in biopsies from Fabry patients. It is already known that reactive species are involved in a great number of chronic-inflammatory and vascular diseases [6,7]. Also, some studies have shown that lysosomes are quite vulnerable to oxidative stress and the lysosomal compartment is, at the same time, a place with many favorable conditions to pro-oxidant state and even Fenton reaction [8–10].

An *in vitro* study from Shen et al. [11] demonstrates that Gb3 increases reactive oxygen species (ROS) generation and adhesion molecules expression in cultured Fabry endothelial cells. Also, the authors found that plasma from patients treated with ERT increased ROS generation in cultured endothelial cells when compared to plasma from controls.

Considering that oxidative stress is probably involved in Fabry disease but there are a few studies relating it directly, the aim of this study was to evaluate and correlate oxidative damage to biomolecules, antioxidant defenses, pro-inflammatory cytokines and Gb3 levels in patients with Fabry disease under treatment with ERT.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

The study was performed in 14 adult patients (11 male hemizygotes and three female heterozygotes) with the classic form of FD (median age 39.0 years; range 19–63) and 14 healthy controls matched by age and sex (median age 28.5 years; range 22–58). All patients were receiving ERT treatment (agalsidase alfa — Replagal® 0.2 mg/kg or agalsidase beta — Fabrazyme® 1.0 mg/kg) every two weeks by intravenous infusion, for about 24.5 months (median; range 2–77). At the moment of diagnosis, most of the patients presented the classic symptoms: angiokeratomas, hypohidrosis and pain in extremities. Diagnosis of male patients was done by detection of deficient  $\alpha$ -galactosidase A activity in plasma and confirmed in leukocytes. For the heterozygotes, diagnosis was confirmed by molecular analysis of GLA gene. Table 1 shows age, gender, mutation, estimated glomerular filtration rate by Modification of Diet in Renal Disease

**Table 1**  
Gender, age, mutation, estimated glomerular filtration rate and chronic kidney disease stage from FD patients.

	Gender <sup>a</sup>	Age (years)	Mutation <sup>b</sup>	eGFR-MDRD <sup>c</sup> (mL/min/1.73)	CKD stage <sup>d</sup>
1	M	40	I133N	79	2
2	M	19	570del16	154	1
3	M	39	L36F	133	1
4	M	34	G328R	15	5
5	M	21	30delG	150	1
6	M	54	30delG	61	2
7	M	39	30delG	25	4
8	M	51	30delG	7	5
9	M	32	30delG	105	1
10	M	23	30delG	177	1
11	M	35	30delG	111	1
12	F	63	30delG	57	3
13	F	53	30delG	72	2
14	F	44	570del16	77	2

<sup>a</sup> M = male and F = female.

<sup>b</sup> GLA mutation.

<sup>c</sup> Glomerular filtration rate (GFR) estimated by MDRD equation.

<sup>d</sup> Chronic kidney disease (CKD) stage according to the National Kidney Foundation.

equation (eGFR-MDRD) and chronic kidney disease (CKD) stage data from the patients.

Informed consent was obtained from the participants. The study was approved by The Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil.

### 2.2. Samples collection and preparation

Occasional urine and heparinized blood samples were obtained from patients immediately before the session of ERT. Samples were obtained from controls concomitantly. Urine samples were collected in sterile flask and mixed before being deposited on 10–10 cm virgin filter papers (Whatman 903), until saturation. The filter papers were dried at room temperature (for at least 4–6 h) and stored at 4 °C until Gb3 determination. The rest of urine collected was 1 mL aliquoted and frozen at –80 °C until analysis.

Whole blood was centrifuged at 1000 ×g for 10 min and plasma was removed by aspiration, aliquoted and frozen at –80 °C until biochemical determinations. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride) and lysates were prepared by addition of 1 mL of distilled water to 100  $\mu$ L of washed erythrocytes and frozen at –80 °C until determination of GSH and antioxidant enzymes' activities. For these determinations, supernatant (after centrifugation at 13,500 ×g for 10 min) was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein.

### 2.3. Biochemical determinations

#### 2.3.1. Malondialdehyde (MDA) plasmatic levels

MDA, an end product of lipoperoxidation, was measured by HPLC following the method described by Esterbauer and Cheeseman [12] with slight modifications. Six hundred microliters of 28% trichloroacetic acid and 1.4 mL of distilled water were added to a 100  $\mu$ L aliquot of plasma. After centrifugation, supernatant was removed and MDA was separated by HPLC using an amino-phase column with 30 mM acetonitrile, Tris buffer pH 7.4 (1:9, v/v). The effluent was monitored at 267 nm, the wavelength of maximum absorption of the enolate anion form of free MDA. The calibration was done with a standard solution of MDA. Results were expressed as log of mM of MDA.

#### 2.3.2. Urine di-tyrosine (di-Tyr) levels

In order to determine in urine the levels of protein oxidation, the intensity of fluorescence of di-Tyr was measured according to the method described by Kirschbaum [13] using a SpectraMax M2e (Molecular Devices, USA) microplate reader at wavelengths of 315 and 410 nm (excitation and emission, respectively). Results were expressed as log of fluorescence units per mg urine creatinine (log FU/mg Cr).

#### 2.3.3. Carbonyl groups determination in plasma

The formation of carbonyl groups, a parameter of oxidative damage to proteins, was measured based on the reaction of these groups with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described by Levine et al. [14]. The absorption of the product of reaction was measured in a spectrophotometer at 370 nm. Results were expressed as nmol carbonyl/mg protein.

#### 2.3.4. Total plasmatic level of sulfhydryl (SH) groups

The plasmatic concentration of SH groups was determined as described by Aksenov and Markesbery [15]. The method is based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by SH groups into a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. The SH content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol TNB/mg protein.

### 2.3.5. Reduced glutathione (GSH) content in erythrocytes

In order to measure the levels of GSH, the main intracellular antioxidant, lysates of erythrocytes were processed as described by Browne and Armstrong [16] and the fluorescence measured ( $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emission}} = 420 \text{ nm}$ ) was compared to a calibration curve prepared with GSH solutions. Results were expressed as nmol/mg protein.

### 2.3.6. Erythrocyte glutathione peroxidase (GPx) activity

Erythrocyte GPx activity was measured by using a commercially available kit (RANSEL®; Randox Lab). GPx catalyses the oxidation of glutathione (GSH) to GSSG (oxidized glutathione). In the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH, the oxidized GSSG is converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP. The decrease in absorbance after 1 and 2 min at 340 nm was measured and results were expressed in U/mg protein.

### 2.3.7. Erythrocyte SOD/CAT ratio

Erythrocyte CAT activity was evaluated by observing the rate of decrease in hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) absorbance in a spectrophotometer at 240 nm according to the method described by Aebi [17]. SOD activity was measured using the RANSOD® kit (Randox Lab, Antrim, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical, which is produced by the incubation with the xanthine–xanthine oxidase reaction system. The absorbance of the product is measured spectrophotometrically at 505 nm. One unit of SOD corresponds to a 50% inhibition of red formazan formation. The specific activity of SOD and CAT were expressed as U/mg protein. Since both enzymes work in sequence to reduce the superoxide anion to water, the ratio SOD/CAT was applied in order to verify the existence of an impairment that could lead to a pro-oxidant status. Results were expressed as log of SOD/CAT ratio.

### 2.3.8. Pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ )

Plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  levels were measured by the MILLIPLEX™ MAP Human Cytokine/Chemokine Kit (Millipore Corp., Billerica, Massachusetts, USA). Results were expressed in pg/mL.

### 2.3.9. Urinary Gb3 concentration

A 5-cm diameter filter paper disc was punched from each sample and processed as described by C. Auray-Blais [18] with some modifications.  $\text{C}_{17:0}$ -Gb3 was used as internal standard (IS) and added to the samples before injection into the LC-MS/MS (liquid chromatography–tandem mass spectrometry) system. For LC, it was used an Alliance 2695 system with stepwise gradient elution with mobile phases A (ammonium acetate 2 mM + 0.1% formic acid in water) and B (ammonium acetate 2 mM + 0.1% formic acid in methanol). A Discovery® C8, 5  $\mu\text{m}$  column (577508-U) was used for separation, at 45 °C and the total analysis run time was 4.5 min. MS/MS was carried out using a Quattro micro tandem quadrupole instrument (Waters Micromass, Manchester, UK) with electrospray ionization operated in positive ion mode. The multiple reaction monitoring mode was used for the measurement of IS and total Gb3 isoforms. Gb3 levels were expressed as  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and after divided by creatinine (Cr) levels (mg/mL), finally resulting in  $\mu\text{g}$  Gb3/mg Cr. Results were expressed as log of  $\mu\text{g}$  Gb3/mg Cr.

### 2.3.10. Urinary creatinine (Cr)

Cr was determined by picric acid method — Creatinine K kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil). Urinary creatinine reacts with picric acid under alkaline conditions producing an orange color whose absorbance was determined in a spectrophotometer at 492 nm. Results were expressed as mg Cr/mL.

### 2.3.11. Protein determination

Plasma and erythrocyte protein concentrations were determined, respectively, by Biuret method — using the commercial kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil) — and by the method of Lowry [19].

### 2.4. Statistical analysis

All results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Normal distribution was tested by the Shapiro–Wilk test. Logarithmic (log) transformation was done in data not normally distributed in order to transform them in parametric. Unpaired Student's *t* test was used for all comparisons between the two groups, using the first sample collected of each patient. Correlations between Gb3 levels and the other parameters were performed by Pearson's correlation test.

Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Analyses were performed by using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA — SPSS version 19.0) software, and graphics were constructed in GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA — version 5.0) software.

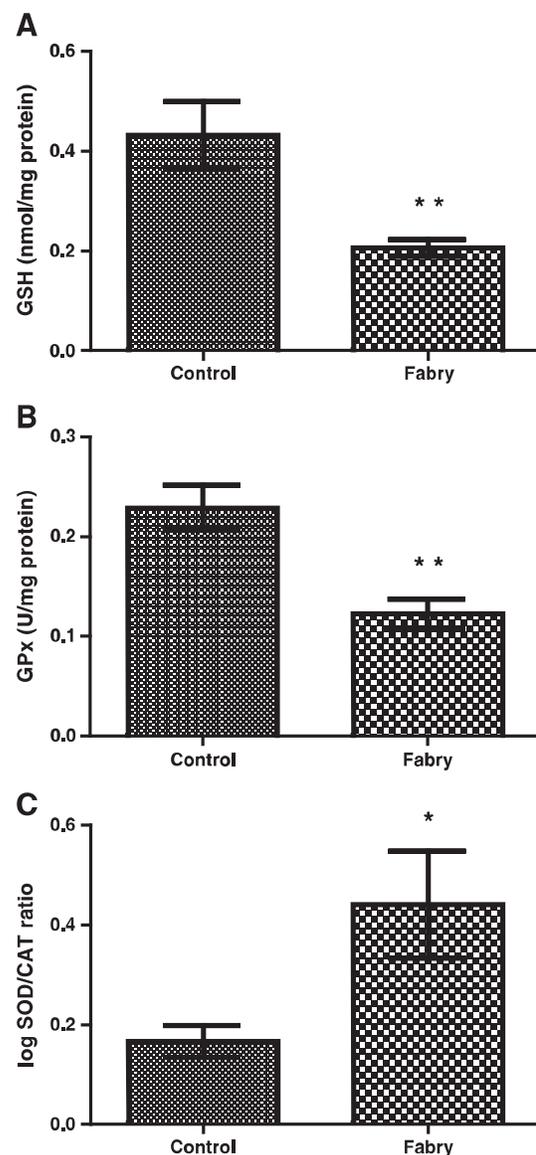


Fig. 1. Antioxidant defenses [GSH (A), GPx (B) and SOD/CAT ratio (C)] in Fabry patients under ERT ( $n = 11$ ) and controls ( $n = 12$ – $14$ ). Data represent mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Student's *t* test for unpaired samples) compared to the control group.

### 3. Results

#### 3.1. Antioxidant defenses

The concentration of erythrocyte GSH, the main non-enzymatic antioxidant in cells, was significantly reduced in patients when compared to the control group (Fig. 1A) [ $t(12.376) = 3.240$ ,  $p < 0.01$ ]. Erythrocyte GPx activity (Fig. 1B) was also reduced in patients [ $t(23) = 3.717$ ,  $p < 0.01$ ] and directly correlated with GSH content ( $r = 0.290$ ,  $p < 0.05$ ). Moreover, SOD/CAT ratio was increased in patients [ $t(12.191) = 1.800$ ,  $p < 0.05$ ], indicating a pro-oxidant status (Fig. 1C) since the product of the reaction catalyzed by SOD, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), cannot be reduced to water in the same velocity by CAT and then becomes available to oxidize biomolecules.

#### 3.2. Oxidative damage to biomolecules

To determine the oxidative damage to lipids and proteins we measured MDA and carbonyl groups in plasma and di-Tyr levels in urine. Results showed that Fabry patients under treatment with ERT have increased levels of oxidative damage to lipids (MDA plasma levels, Fig. 2A) [ $t(11.403) = 5.069$ ,  $p < 0.01$ ] and proteins (di-Tyr in urine, Fig. 2B; carbonyl groups plasma levels, Fig. 2C) [ $t(13.987) = 2.160$ ,  $p < 0.05$ ;  $t(25) = 3.986$ ,  $p < 0.01$ , respectively] when compared to controls. No statistical difference was found in plasma sulfhydryl groups (Fig. 2D) [ $t(22) = 0.155$ ,  $p > 0.05$ ] between patients and controls.

#### 3.3. Pro-inflammatory cytokines

Pro-inflammatory cytokines assayed in this study, TNF- $\alpha$  (Fig. 3A) and IL-6 (Fig. 3B) were increased in Fabry patients when compared to controls [ $t(21) = 3.600$ ,  $p < 0.01$ ;  $t(16) = 3.000$ ,  $p < 0.01$ , respectively].

#### 3.4. Gb3 levels

To determine Gb3 levels we measured urinary Gb3 concentration. Results showed that Fabry patients receiving ERT presented significant higher levels of urinary Gb3 when compared to controls [ $t(19) = 8.138$ ,  $p < 0.01$ ] (Fig. 4).

#### 3.5. Correlations between oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and Gb3 levels

Gb3 levels were positively correlated with the plasma levels of IL-6, MDA and carbonyl (Fig. 5A, B and C;  $r = 0.971$ ,  $p < 0.01$ ;  $r = 0.622$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = 0.745$ ,  $p < 0.05$ , respectively). No significant correlations were found between Gb3 levels and the other parameters. IL-6 levels were directly correlated with urinary levels of di-Tyr (Fig. 6A;  $r = 0.642$ ,  $p < 0.05$ ) and inversely correlated with erythrocyte GPx activity (Fig. 6B;  $r = -0.653$ ,  $p < 0.05$ ).

### 4. Discussion

Lysosome storage disorders (LSDs) are well known monogenic disorders caused by mutations that lead to an impairment of the activity of lysosome enzymes and consequently, a progressive accumulation of substrates. Although the primary cause of LSDs is established, the mechanisms of how the intra-lysosomal accumulation leads to cell and tissue dysfunction remain not completely clear (including in Fabry disease) [8,10,20,21].

Vitner et al. published in 2010 a minireview focusing on the pathogenic cascades activated in LSDs [22]. These cascades include autophagy, altered lipid trafficking, endoplasmic reticulum (ER) stress, autoimmune response, altered calcium homeostasis, inflammation and oxidative stress. Lysosomes are quite vulnerable to oxidative stress as a natural consequence of the physiological conditions underlying the organelle [8–10]. Probably, the accumulation of substrates

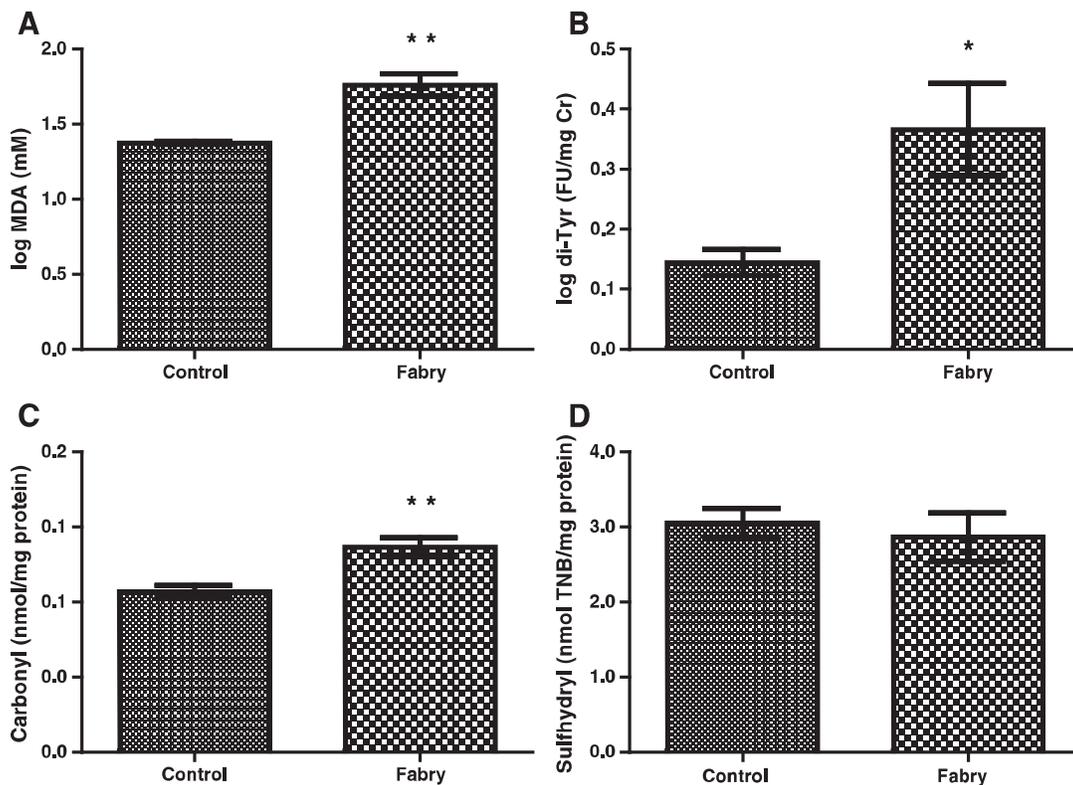
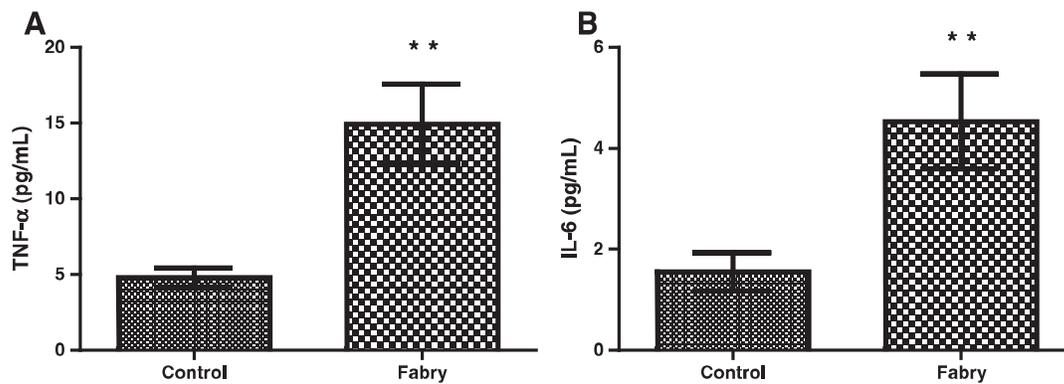


Fig. 2. Oxidative damage to lipids [MDA (A)] and proteins [di-Tyr (B), carbonyl groups (C), sulfhydryl groups (D)] in Fabry patients under ERT ( $n = 12-14$ ) and controls ( $n = 6-13$ ). Data represent mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Student's  $t$  test for unpaired samples) compared to the control group.



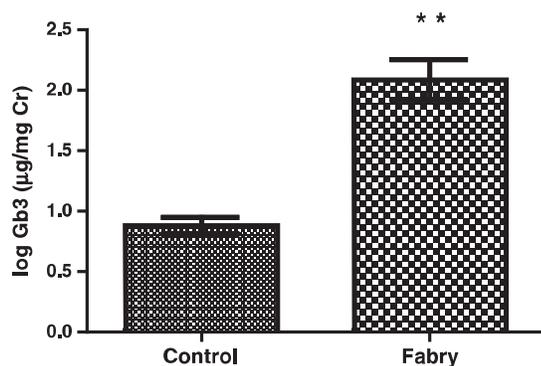
**Fig. 3.** Pro-inflammatory cytokines [TNF- $\alpha$  (A) and IL-6 (B)] in Fabry patients under ERT ( $n=9-12$ ) and controls ( $n=9-12$ ). Data represent mean  $\pm$  SEM. \*\* $p<0.01$  (Student's  $t$  test for unpaired samples) compared to the control group.

(as Gb3 in Fabry disease) exacerbates the pathologic process as shown by Shen et al. [11]. The researchers found, by an *in vitro* study in cultured cells, an increase of ROS and adhesion molecules in response to Gb3.

Many studies have shown the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of more than a hundred of human diseases [23], including cancer [24–27], inflammatory processes [23] and in-born errors of metabolism (IEM) [28–33]. Recent studies of our group showed evidences that oxidative stress may be involved in the pathophysiology of mucopolysaccharidosis type II (MPS II) and ERT seemed to protect against lipid and protein oxidative damage in patients [32,33].

The aim of this study was to investigate oxidative stress parameters, pro-inflammatory cytokines and Gb3 levels in Fabry patients treated with ERT, in order to establish a possible relationship between them.

We found decreased levels of antioxidant defenses (erythrocyte GSH content and GPx activity) in FD patients when compared to controls. The low GSH content implies low GPx activity and may lead to higher susceptibility to oxidative damage. GSH is the most important non-enzymatic antioxidant, being preferentially oxidized by reactive species and then preserving more important biomolecules [34]. This deficient scavenger content of GSH, added to the increased SOD/CAT ratio verified in this study indicates that probably hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is more available to oxidize biological molecules in Fabry patients. Furthermore, the low GPx activity confirms this hypothesis of  $H_2O_2$  excess, since it is also the substrate of GPx. In the presence of  $Fe^{2+}$ ,  $H_2O_2$  yields the highly toxic hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ), by the called Fenton reaction. This radical attacks all types of biomolecules around it, being extremely dangerous to the cell [34]. Hence, the



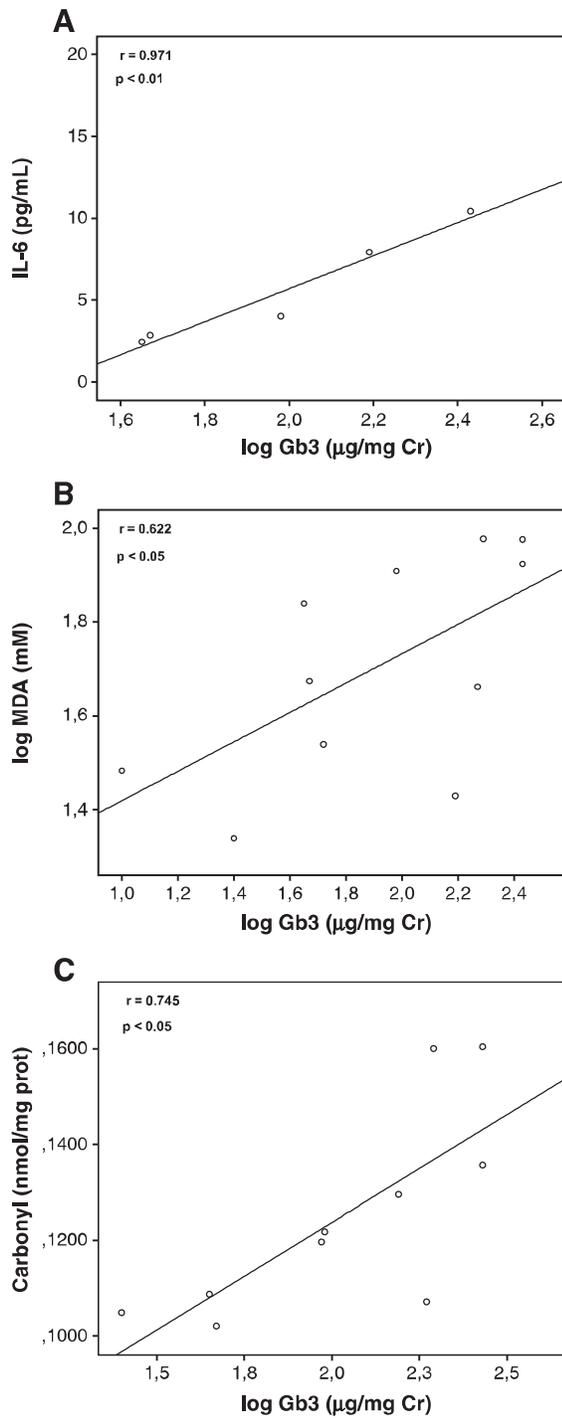
**Fig. 4.** Gb3 urinary levels in Fabry patients under ERT and controls. Data represent mean  $\pm$  SEM. \*\* $p<0.01$  (Student's  $t$  test for unpaired samples) compared to the control group.

low GSH content and GPx activity and high SOD/CAT ratio presented by Fabry patients probably contribute to the oxidative stress process.

In relation to oxidative damage to biomolecules, we found increased levels of MDA and carbonyl in plasma of Fabry patients when compared to controls. These data suggest that patients present lipid peroxidation and protein damage in significant higher levels. The continued oxidation and fragmentation of fatty acid side chains can produce aldehydes as MDA (formed from peroxidation of linoleic, arachidonic, or docosahexaenoic acids), that may lead to rupture of lysosomal (and other organelles) membrane and bind avidly to membrane proteins, inactivating enzymes and receptors and even attack DNA, forming mutagenic lesions [34,35]. Thus, the increased levels of MDA that we observed in Fabry patients must be a result of the lysosome destabilization and also may be acting in the maintenance of chain reactions with other molecules. Also, it is important to emphasize that the positive correlation between Gb3 and MDA levels that was found in this study suggest that Gb3 induces lipid peroxidation in FD. Moreover, it was verified a significant increase in MDA levels in Fabry patients at diagnosis moment and under ERT when compared to control group (data not shown). It allows us to suggest that the observed effect is due to the disease and could explain, at least in part, the pathophysiology of FD.

In this study, we verified a significant increase in plasma carbonyl groups as well as in urinary di-Tyr levels in Fabry patients. The alteration of proteins by formation of carbonyl groups can be recognized as “non-self” by the immune system and lead to autoimmune response [23]. Some studies have shown that possibly the FD has an autoimmune component in its pathophysiology [36–39]. The positive correlation found in this study between Gb3 and carbonyl levels suggests that Gb3 may be acting also as an inducer of protein damage in Fabry patients. We found no statistical difference between patients and controls in what concern to sulfhydryl groups. Although the amino acids containing this sulfur groups (cysteine and methionine) are readily oxidized, literature suggest that this parameter may give misleading data on the extent of oxidation in the case of chronic oxidant stress [40]. In this case, the repair mechanism may compete effectively and differences are not evident, as occurred in this study. On the other hand, the high carbonyl groups levels found in this study are indicative of severe damage to proteins since heavily carbonylated proteins tend to form high-molecular-weight aggregates that are resistant to degradation by the proteasomal system [41]. Moreover, it is important to emphasize that it was verified no significant correlation between proteinuria – as well as other renal function parameters (urea, creatinine and eGFR-MDRD) – and the oxidative stress parameters in these patients.

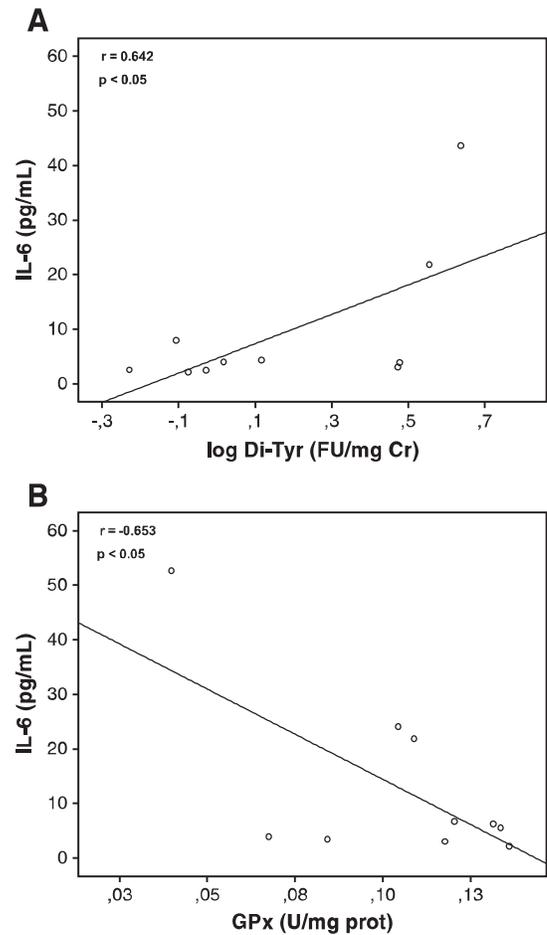
Flow cytometry studies revealed abnormalities in the number of immune cell in Fabry patients [42]. Also, there are evidences that vascular endothelium and leukocytes are under inflammatory activation in FD [11,43]. Our findings concerning to the inflammatory cytokines



**Fig. 5.** Correlations between Gb3 and IL-6 (A), MDA (B) and carbonyl groups (C) in Fabry patients under ERT.

IL-6 and TNF- $\alpha$ , both significantly increased in Fabry patients, provide evidence that the pro-inflammatory state occurs in these patients. Besides, IL-6 was positively correlated with di-Tyr, which indicates oxidative damage to proteins, as well as with Gb3 and negatively correlated with GPx activity. These findings may suggest that the inflammatory process is associated to protein damage and may be induced by Gb3 in Fabry patients.

The present study confirms the *in vitro* results from Shen et al. [11] in what concern to Gb3 and oxidative stress induction and provides new data to understand the pathophysiology of Fabry disease. Fabry patients presented high lipid and protein oxidative damage, decreased



**Fig. 6.** Correlations between IL-6 and di-Tyr (A) and GPx activity (B) in Fabry patients under ERT.

antioxidant defenses and increased inflammatory biomarkers. The most significant novelty in the present *in vivo* study is the presence of correlations between the oxidative stress parameters, pro-inflammatory cytokines and Gb3 levels. However, our results must be interpreted carefully, since only treated patients were evaluated.

In conclusion, our results indicate that pro-oxidant and pro-inflammatory states occur, are correlated and seem to be induced by Gb3 in Fabry patients. Possibly, these data may provide new targets to future therapeutic strategies in order to improve the quality of life of Fabry patients. Further research and clinical trials are needed to reveal how safe and effective would be the supplementation of antioxidants in combination with ERT in Fabry patients.

#### Conflict of interest disclosure

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

#### Acknowledgements

This study was supported by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq), FAPERGS and FIPE/HCPA.

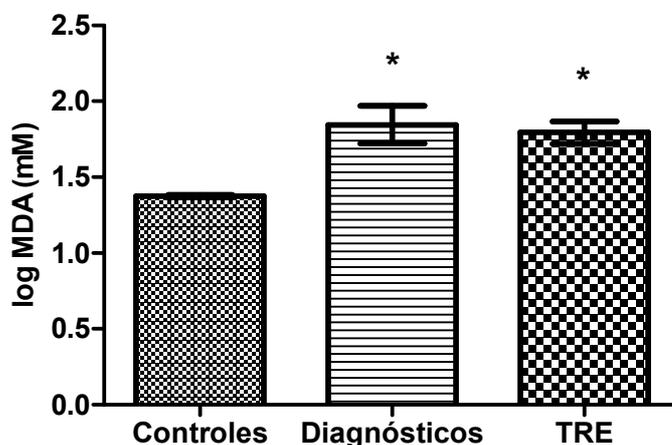
#### References

- [1] R.J. Desnick, Y.A. Ioannou, C.M. Eng,  $\alpha$ -Galactosidase A deficiency: Fabry disease, in: C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill Inc., New York, 2001, pp. 3733–3774.

- [2] R.P. El Dib, G.M. Pastores, Enzyme replacement therapy for Anderson–Fabry disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* 5 (2010) CD006663.
- [3] D.F. Moore, F. Ye, M.L. Brennan, S. Gupta, B.A. Barshop, R.D. Steiner, W.J. Rhead, R.O. Brady, S.L. Hazen, R. Schiffmann, Ascorbate decreases Fabry cerebral hyperperfusion suggesting a reactive oxygen species abnormality: an arterial spin tagging study, *J. Magn. Reson. Imaging* 20 (2004) 674–683.
- [4] P.F. Bodary, Y. Shen, F.B. Vargas, X. Bi, K.A. Ostenson, S. Gu, J.A. Shayman, D.T. Eitzman, Alpha-galactosidase A deficiency accelerates atherosclerosis in mice with apolipoprotein E deficiency, *Circulation* 111 (2005) 629–632.
- [5] D.F. Moore, L.T.C. Scott, M.T. Gladwin, G. Altarescu, C. Kaneski, K. Suzuki, M. Pease-Fye, R. Ferri, R.O. Brady, P. Herscovitch, R. Schiffmann, Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy, *Circulation* 104 (2001) 1506–1512.
- [6] B. Halliwell, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity cause or consequence? *Lancet* 344 (1994) 721–724.
- [7] M.C. Polidori, B. Frei, A. Cherubini, G. Nelles, G. Rordorf, J.F. Keaney Jr., L. Schwamm, P. Mecocci, W.J. Koroshetz, M.F. Beal, Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke, *Free Radic. Biol. Med.* 25 (1998) 561–567.
- [8] A. Terman, T. Kurz, B. Gustafsson, U.T. Brunk, Lysosomal labilization, *IUBMB Life* 58 (2006) 531–539.
- [9] A. Terman, U.T. Brunk, Oxidative stress, accumulation of biological ‘garbage’, and aging, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 197–204.
- [10] U.T. Brunk, J. Neuzil, J.W. Eaton, Lysosomal involvement in apoptosis, *Redox Rep.* 6 (2001) 91–97.
- [11] J.-. Shen, X.-. Meng, D.F. Moore, J.M. Quirk, J.A. Shayman, R. Schiffmann, C.R. Kaneski, Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 163–168.
- [12] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [13] B. Kirschbaum, Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators, *Clin. Nephrol.* 58 (2002) 344–349.
- [14] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [15] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer’s disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [16] R.W. Browne, D. Armstrong, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods Mol. Biol.* 108 (1998) 347–352.
- [17] H. Aebi, Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [18] C. Auray-Blais, D. Cyr, A. Ntwari, M. West, J. Cox-Brinkman, D.G. Bichet, D.P. Germain, R. Laframboise, S.B. Melançon, T. Stockley, J.T.R. Clarke, R. Drouin, Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease, *Mol. Genet. Metab.* 93 (2008) 331–340.
- [19] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.I. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [20] A.H. Futerman, G. Van Meer, The cell biology of lysosomal storage disorders, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 554–565.
- [21] S.U. Walkley, Pathogenic cascades in lysosomal disease — why so complex? *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 (2009) 181–189.
- [22] E.B. Vitner, F.M. Platt, A.H. Futerman, Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases, *J. Biol. Chem.* (2010) 20423–20427.
- [23] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York, 2006.
- [24] S. Toyokuni, Persistent oxidative stress in cancer, *FEBS Lett.* 358 (1995) 1–3.
- [25] G. Mantovani, A. Macciò, C. Madeddu, L. Mura, G. Gramignano, M.R. Lusso, C. Mulas, M.C. Mudu, V. Murgia, P. Camboni, E. Massa, L. Ferrelli, P. Contu, A. Rinaldi, E. Sanjust, D. Atzei, B. Elsener, Quantitative evaluation of oxidative stress, chronic inflammatory indices and leptin in cancer patients: correlation with stage and performance status, *Int. J. Cancer* 98 (2002) 84–91.
- [26] R.V. Blackburn, D.R. Spitz, X. Liu, S.S. Galoforo, J.E. Sim, L.A. Ridnour, J.C. Chen, B.H. Davis, P.M. Corry, Y.J. Lee, Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 419–430.
- [27] M. López-Lázaro, A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy, *Mol. Med.* 16 (2010) 144–153.
- [28] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, A.T. Barden, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment, *Metab. Brain Dis.* 23 (2008) 71–80.
- [29] C.R. Vargas, M. Wajner, L.R. Sirtori, L. Goulart, M. Chiochetta, D. Coelho, Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy, *Biochim. Biophys. Acta* 1688 (2004) 26–32.
- [30] A. Sitta, A.G. Barschak, M. Deon, A.T. Barden, G.B. Biancini, P.R. Vargas, C.F. de Souza, C. Netto, M. Wajner, C.R. Vargas, Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients, *Int. J. Dev. Neurosci.* 27 (2009) 243–247.
- [31] G.S. Ribas, V. Manfredini, J.F. de Mari, C.Y. Wayhs, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, A. Sitta, M. Deon, M. Wajner, C.R. Vargas, Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation, *Int. J. Dev. Neurosci.* 28 (2010) 127–132.
- [32] L. Filippin, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, I.N. Pereira, V. Manfredini, A. Sitta, M.C.R. Peralba, I.V.D. Schwartz, R. Giugliani, C.R. Vargas, Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 121–127.
- [33] L. Filippin, C.A.Y. Wayhs, D.M. Atik, V. Manfredini, S. Herber, C.G. Carvalho, I.V.D. Schwartz, R. Giugliani, C.R. Vargas, DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy, *Mutat. Res.* 721 (2011) 206–210.
- [34] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312–322.
- [35] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81–128.
- [36] D.F. Moore, E. Goldin, M.P. Gelderman, C. Robinson, J. Baer, M. Ries, A. Elkhoulou, R.O. Brady, R. Schiffmann, Apoptotic abnormalities in differential gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with Fabry disease, *Acta Paediatr.* 97 (2008) 48–52.
- [37] P. Rahman, D.D. Gladman, J. Wither, M.D. Silver, Coexistence of Fabry’s disease and systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Rheumatol.* 16 (1998) 475–478.
- [38] C. Whybra, A. Schwarting, J. Kriegsmann, A. Gal, E. Mengel, C. Kampmann, F. Baehner, E. Schaefer, M. Beck, IgA nephropathy in two adolescent sisters heterozygous for Fabry disease, *Pediatr. Nephrol.* 21 (2006) 1251–1256.
- [39] P. Martinez, M. Aggio, P. Rozenfeld, High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 365–369.
- [40] M.J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T. Dean, Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1151–1163.
- [41] I. Dalle-Donne, G. Aldini, M. Carini, R. Colombo, R. Rossi, A. Milzani, Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression, *J. Cell. Mol. Med.* 10 (2006) 389–406.
- [42] P. Rozenfeld, E. Agriello, N. De Francesco, P. Martinez, C. Fossati, Leukocyte perturbation associated with Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 155 (2009) 1–11, doi: 10.1007/s10545-009-1060-9.
- [43] T. DeGraba, S. Azhar, F. Dignat-George, E. Brown, B. Boutière, G. Altarescu, R. McCarron, R. Schiffmann, Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients, *Ann. Neurol.* 47 (2000) 229–233.

## Resultados suplementares

Os resultados apresentados no Capítulo 1 foram encontrados em pacientes tratados com TRE em comparação com indivíduos saudáveis (grupo controle). Em função da importância de se investigar pacientes antes de iniciar o tratamento (momento diagnóstico), quantificamos MDA nas amostras que tínhamos disponíveis de pacientes no momento do diagnóstico e comparamos com pacientes em TRE e controles. Os resultados estatísticos comparando os três grupos estão dispostos abaixo (Figura 2). Pode-se observar que não houve diferença estatística entre os pacientes no momento do diagnóstico e durante a TRE quanto ao MDA e que ambos os grupos possuem MDA aumentado em relação aos controles.



**Figura 2.** Conteúdo de MDA em pacientes com DF (no momento do diagnóstico e em TRE) e controles. Resultados expressos em média  $\pm$  S.E.M (Controles: n=6; Diagnósticos: 4; TRE: 11). \* $p < 0,05$ , comparado aos controles (ANOVA de uma via seguido de Duncan).

#### IV. Discussão

Apesar de a causa primária das DLDs (mutações monogênicas que levam à síntese de uma enzima com atividade deficiente ou nula) serem bem conhecidas e o acúmulo do substrato ser identificado nos mais variados tipos celulares, a sua fisiopatologia ainda não está completamente descrita. No que diz respeito à DF, uma DLD com acúmulo de glicosfingolípídeos (majoritariamente o Gb3), alguns fatores têm sido propostos como participantes no mecanismo fisiopatológico, entre eles o estresse oxidativo e a inflamação (Futerman e van Meer, 2004; Rozenfeld *et al.* 2009; Shen *et al.*, 2008).

Embora o estresse oxidativo venha sendo proposto desde 2001 (Moore *et al.*, 2001) como possível fator envolvido na fisiopatologia da DF e considerado recentemente numa revisão sobre as vias fisiopatológicas ativadas nas DLDs (Vitner, Platt e Futerman, 2010), poucos foram os trabalhos na literatura que avaliaram estresse oxidativo em pacientes com DF. O primeiro artigo científico observou uma diminuição da hiperperfusão regional cerebral e de nitrotirosina nos vasos de biópsias de pele de pacientes com DF tratados com TRE *versus* placebo. Tal observação sugeriu um envolvimento de espécies reativas de nitrogênio na DF (Moore *et al.*, 2001). O segundo trabalho observou uma diminuição da hiperperfusão cerebral em pacientes com DF tratados com TRE após a infusão de ascorbato e sugeriu que tal efeito fosse pelas sabidas propriedades antioxidantes dessa vitamina (Moore *et al.*, 2004). Um outro estudo, em modelo animal de aterosclerose, observou que camundongos com deficiência de  $\alpha$ -Gal A desenvolveram aterosclerose mais rapidamente e apresentaram aumento de Gb3, nitrotirosina e iNOS (óxido

nítrico sintase induzível) nas placas ateroscleróticas de vasos cerebrais (Bodary *et al.*, 2005). O último trabalho científico publicado antes deste trabalho havia sido o estudo *in vitro* em células endoteliais cultivadas de pacientes com DF, que verificou que o Gb3 extracelular induziu a formação de ERO e a expressão de moléculas de adesão e que as mesmas células, quando incubadas com plasma de pacientes com DF tratados com TRE também produziam mais EROs.

Portanto, até o desenvolvimento do presente trabalho, haviam sugestões de um possível envolvimento de estresse oxidativo na fisiopatologia da DF, porém nenhum trabalho havia avaliado o estresse oxidativo em termos de defesas antioxidantes e dano oxidativo a biomoléculas em pacientes com DF. Também, não haviam estudos *in vivo* correlacionando Gb3, inflamação e estresse oxidativo.

Neste trabalho, observamos que pacientes com DF tratados com TRE possuem diminuição de defesas antioxidantes tanto não-enzimáticas quanto enzimáticas. O conteúdo de glutathiona (GSH), a mais importante defesa não-enzimática, mostrou-se diminuído nos pacientes em relação aos controles. A GSH age contra espécies reativas à medida que as sequestra, oxidando-se, e protegendo biomoléculas importantes (Halliwell, 2006). Dessa maneira, lipídeos e proteínas podem estar mais vulneráveis ao ataque de espécies reativas nesses pacientes - o que foi confirmado pelos experimentos de avaliação de dano. A atividade da GPx também estava diminuída nos pacientes, o que pode ser explicado pelos baixos níveis de GSH encontrados (pois a GSH é necessária para a atividade da GPx). Também avaliamos a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT expressando o resultado através da razão

entre elas (razão SOD/CAT) e observamos nos pacientes uma maior razão SOD/CAT que nos controles. Como o produto da SOD, o  $H_2O_2$ , é o substrato da CAT, uma razão aumentada indica que o mesmo está mais disponível na célula para causar dano a biomoléculas (Halliwell, 2006). Ainda, a baixa atividade da GPx corrobora com essa hipótese, pois assim como a CAT, a GPx também possui atividade peroxidativa, ou seja, de remoção do  $H_2O_2$ .

O  $H_2O_2$ , uma ERO, é considerado um oxidante fraco. Porém, sua lipossolubilidade permite que se difunda pelas membranas celulares e, ao encontrar íons como  $Fe^{2+}/Cu^{2+}$ , forme o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) - pela conhecida Reação de Fenton quando íon for  $Fe^{2+}$ . Tal radical é altamente danoso a todas as classes de biomoléculas, formando rapidamente peróxidos lipídicos e radicais orgânicos (Halliwell, 2009). Além disso, o  $H_2O_2$  tem sido descrito como um importante sinalizador e está envolvido em processos de proliferação, senescência e morte celular (Stone e Yang, 2006).

Neste trabalho, avaliamos também o dano oxidativo a biomoléculas. Os pacientes com DF estudados apresentaram aumento significativo de MDA e de grupamentos carbonilas no plasma quando comparados aos controles. Tais resultados sugerem que os pacientes apresentam dano a lipídeos e proteínas em níveis significativamente superiores. A contínua oxidação e fragmentação de ácidos graxos dos lipídeos de membrana formam aldeídos como o MDA (formado pela oxidação dos ácidos linolênico, araquidônico ou docosahexaenoico) que podem romper as membranas de organelas e se ligar fortemente a proteínas, inativando enzimas e receptores e até mesmo atacar o DNA, originando lesões mutagênicas (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991; Halliwell, 2006). Ainda, verificamos uma correlação direta entre MDA e Gb3 nos

pacientes, o que nos leva a sugerir que o aumento de MDA pode estar relacionado com a desestabilização lisossômica encontrada nas DLDs em função do acúmulo de substratos na organela. Ainda, o Gb3 pode estar induzindo o dano a lipídeos nesses pacientes. Como consequência, o extravazamento do conteúdo lisossomal (de pH ácido e rico em metais) no citosol pode atrapalhar o metabolismo celular e até mesmo levar a apoptose (Brunk, Neuzil e Eaton, 2001).

O aumento de grupamentos carbonilas no plasma e de di-Tyr na urina observados nos pacientes com DF estudados em relação aos controles sugerem dano oxidativo a proteínas. Tal dano pode ser prejudicial *in vivo* por efeitos diretos (alteração ou perda de função de enzimas ou transportadores) ou por contribuir indiretamente no dano a outras biomoléculas (p. ex. dano a enzimas de reparo pode perpetuar o dano ao DNA). Ainda, a alteração direta da estrutura protéica por oxidação pode desencadear resposta autoimune, à medida que as proteínas modificadas são reconhecidas como não-próprias pelo sistema imune (Halliwell e Whiteman, 2004).

Estudos tem evidenciado um possível componente autoimune na DF, uma vez que é alta a incidência de autoanticorpos em pacientes com DF e há relatos de coexistência da DF e doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico - LES, artrite reumatóide e nefropatia de IgA (Martinez, Aggio e Rozenfeld, 2007; Rahman *et al.*, 1998; Whybra *et al.*, 2006). O estudo de Martinez e colaboradores detectou a presença de anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (anti-ENA) em 21% dos pacientes com DF estudados e de pelo menos um dos autoanticorpos investigados (contra DNA, anticoagulante lúpico, cardiolipina e fosfatidil serina) em 57% dos pacientes (Martinez, Aggio e

Rozenfeld, 2007). Anticorpos anti-ENA são achados característicos de doença reumática e preditores no diagnóstico de LES (Sanchez-Guerreto *et al.*, 1996). Ainda, cabe salientar que aproximadamente 39% dos casos de DF são primariamente diagnosticados como doenças reumáticas (Mehta *et al.*, 2004). Acredita-se que os glicosfingolípídeos acumulados na DF estimulem cronicamente o sistema imune, porém devem ser correlacionados clinicamente para determinar um possível componente autoimune na fisiopatologia da DF, já que o mecanismo pelo qual ocorre essa ativação do sistema imune ainda não está descrito (Martinez, Aggio e Rozenfeld, 2007).

Os achados deste trabalho em relação ao dano a proteínas, partindo-se do pressuposto que tal dano pode gerar reconhecimento autoimune, fornecem evidências para investigações futuras mais aprofundadas sobre essa inter-relação e, possivelmente, para estudos com antioxidantes como moduladores da resposta imune. Cabe salientar que este trabalho é o primeiro estudo em pacientes com DF já publicado que avalia dano a lipídeos e proteínas no plasma.

O ataque de radicais livres a proteínas pode originar radicais de aminoácidos, que podem reagir com O<sub>2</sub> formando radicais peroxil e gerar mais radicais livres e peróxidos protéicos em reação em cadeia potencializada por metais de transição (Headlam e Davies, 2003). Os grupamentos carbonilas, parâmetro mais utilizado para avaliar dano a proteínas, podem ter origem pela oxidação direta dos aminoácidos por espécies reativas, pela ligação de aldeídos como o MDA e até mesmo por glicação de proteínas, não sendo, portanto uma medida do dano necessariamente oxidativo (Halliwell e Whiteman, 2004).

Todavia, neste trabalho, também medimos outro parâmetro de dano a proteínas, a di-Tyr, e encontramos aumento significativo em pacientes. A di-Tyr é um produto estável da oxidação dos resíduos de Tyr das mais diversas proteínas e reflete, portanto, o dano de origem oxidativa (Halliwell e Whiteman, 2004). A correlação direta encontrada entre carbonilas e Gb3 sugere que esse metabólito acumulado esteja induzindo o dano a proteínas encontrado nos pacientes. Ainda, o aumento de carbonilas reflete dano oxidativo severo a proteínas, uma vez que proteínas carboniladas podem formar agregados intracelulares de alto peso molecular resistentes à degradação pelo sistema proteassoma (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Neste trabalho, não encontramos diferença estatística entre os grupos quanto aos grupamentos sulfidrilas. Isso já está relatado na literatura nos casos de estresse oxidativo crônico. Mesmo que os aminoácidos contendo os grupamentos sulfidrilas (cisteína e metionina) sejam rapidamente oxidados, nesses casos de cronicidade os mecanismos de reparo podem agir eficientemente e a medida de grupamentos sulfidrilas não ser um parâmetro fidedigno, de modo que não se observa diferença entre os grupos mesmo havendo dano (Davies *et al.*, 1999).

Considerando que a perda da função renal e proteinúria são achados comuns em pacientes com DF, testamos a correlação entre todos os parâmetros de estresse oxidativo e os de função renal (proteinúria, uréia, creatinina e taxa de filtração glomerular estimada) e nenhuma correlação significativa foi encontrada. Dessa maneira, podemos concluir que as alterações encontradas não sofrem influência do comprometimento renal apresentado pelos pacientes.

Estudos anteriores mostraram evidências de um componente inflamatório na DF. Através de citometria de fluxo, pesquisadores encontraram anormalidades no número de células do sistema imune em pacientes com DF bem como em moléculas de superfície e tais pesquisadores foram os primeiros a relatar o acúmulo de Gb3 em linfócitos (Rozenfeld *et al.*, 2009). Ainda, o endotélio vascular e leucócitos parecem estar sob ativação inflamatória na DF (Shen *et al.*, 2008; DeGraba *et al.*, 2000).

Nossos achados acerca das interleucinas próinflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ , ambas aumentadas nos pacientes com DF por nós estudados, também mostram evidências de um estado proinflamatório nesses pacientes. Além disso, as correlações diretas da IL-6 com di-Tyr e Gb3, bem como a correlação inversa da IL-6 com GPx indicam que o processo inflamatório está associado ao estresse oxidativo e pode estar sendo induzido por Gb3 nesses pacientes. Cabe salientar que estresse oxidativo e inflamação são processos já sabidamente associados em diversas patologias (Halliwell, 1994 e 2009).

Neste trabalho encontramos que pacientes com DF possuem diminuição de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, níveis aumentados de dano oxidativo a lipídeos e proteínas, bem como de citocinas próinflamatórias. Os resultados de estresse oxidativo confirmam os achados *in vitro* de Shen e colaboradores, que haviam observado aumento na formação de espécies reativas (medido por oxidação de sonda DCF) induzido por Gb3 extracelular (Shen *et al.*, 2008). Além de demonstrar a ocorrência de estresse oxidativo *in vivo*, ainda investigamos o perfil de antioxidantes e de dano a lipídeos e proteínas bem como biomarcadores de processo inflamatório, o que confere

novos dados para a construção do conhecimento acerca da fisiopatologia da DF.

A maior inovação deste trabalho foi a presença de correlações entre parâmetros de estresse oxidativo, citocinas próinflamatórias e Gb3. Contudo, somente pacientes em tratamento com TRE foram incluídos nesse estudo. Desta maneira, os resultados necessitam ser interpretados com cuidado. A falta de um grupo de pacientes sem o tratamento com TRE, entretanto, não invalida os resultados encontrados neste estudo uma vez que quanto ao MDA, (parâmetro de dano a lipídeos que teve correlação direta com Gb3) pacientes no momento do diagnóstico possuíam níveis elevados estatisticamente iguais aos dos pacientes durante o tratamento com TRE. Mesmo não tendo como comparar, quanto aos demais parâmetros, pacientes tratados e no momento do diagnóstico, as alterações encontradas corroboram com a conclusão da revisão sobre TRE publicada em 2010, a qual enfatiza a necessidade de novos estudos propondo novas abordagens terapêuticas complementares à TRE (El Dib e Pastores, 2010).

Em suma, nossos resultados indicam que os estados próinflamatório e pró-oxidante ocorrem, estão correlacionados e parecem ser induzidos por Gb3 em pacientes com DF. Possivelmente, esses achados contribuirão para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em prol do aumento da qualidade de vida dos pacientes com DF. Pesquisas e estudos clínicos futuros são necessários para revelar o quão segura e efetiva seria a suplementação com antioxidantes em combinação com a TRE nos pacientes com DF.

## V. CONCLUSÕES

Os pacientes com DF submetidos à TRE apresentam:

1. diminuição de defesas antioxidantes enzimáticas (GPx e razão SOD/CAT) e não-enzimáticas (GSH);
2. aumento de dano a lipídeos (MDA) e proteínas (carbonilas e di-Tyr);
3. aumento de Gb3 na urina;
4. aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ ;
5. correlação significativa positiva de Gb3 com inflamação (IL-6) e dano a lipídeos (MDA) e proteínas (carbonilas);
6. correlação significativa positiva de IL-6 com dano a proteínas (di-Tyr) ;
7. correlação significativa negativa de IL-6 com defesa antioxidante enzimática (GPx).

Dessa maneira, conclui-se que os estados pró-inflamatório e pró-oxidante ocorrem, estão correlacionados e parecem ser induzidos por Gb3 em pacientes com DF submetidos à TRE.

## VI. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho estudando pacientes com DF antes de iniciar o tratamento com TRE (no momento do diagnóstico) e ao longo dos primeiros meses de terapia. Para tanto, repetiremos a metodologia deste trabalho nesse novo grupo de pacientes e faremos várias outras análises adicionais. Dentre essas, dosaremos um novo biomarcador para a DF: o liso-Gb3, que é detectado somente em pacientes com DF (não em controles), bem como parâmetros inflamatórios e de função renal. Faremos também um teste *in vitro* com antioxidantes, para verificar o efeito da suplementação com antioxidantes em conjunto com a TRE.

Dessa maneira, as perspectivas são:

- a) Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (através da medida da atividade das enzimas CAT, SOD e GPx) e não-enzimáticas (através da quantificação de GSH) em eritrócitos;
- b) Avaliar as defesas antioxidantes não enzimáticas (Status Antioxidante Total – TAS – e Reatividade Antioxidante Total – TAR) no plasma e na urina;
- c) Avaliar o dano oxidativo a lipídeos (através da quantificação de MDA em plasma e de isoprostanos e hidroperóxidos na urina) e proteínas (através da quantificação de grupamentos carbonilas e sulfidrilas em plasma e de di-Tyr na urina);
- d) Avaliar o dano ao DNA e realizar um teste *in vitro* com antioxidantes;
- e) Quantificar a formação de NO (através da quantificação de nitrato e nitrito no plasma);
- f) Quantificar Gb3 e liso-Gb3 no plasma e na urina;

- g) Quantificar biomarcadores inflamatórios (IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína C reativa e  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida) no plasma;
- h) Avaliar parâmetros de função renal (taxa de filtração glomerular e proteinúria);
- i) Correlacionar todos os parâmetros entre si.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altarescu G., Moore D.F., Pursley R., Campia U., Goldstein S., Bryant M., Panza J.A., Schiffmann R., Enhanced endothelium-dependent vasodilation in Fabry disease, *Stroke* 32 (2001) 1559-1562.

Banikazemi M., Bultas J., Waldek S., Wilcox W.R., Whitley C.B., McDonald M., Finkel R., Packman S., Bichet D.G., Warnock, D.G., Desnick R.J., Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial, *Ann. Intern. Med.* 146 (2007) 77–86.

Barschak A.G., Sitta A., Deon M., Barden A.T., Dutra-Filho C.S., Wajner M., Vargas C.R., Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment, *Metab. Brain Dis.* 23 (2008) 71-80.

Beaudet A.L., Scriver C.R., Sly W.S., Valle D., Genetics, biochemistry, and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes, em: C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª edição, McGraw-Hill Inc., New York (2001) pp. 3-43.

Beck M., Agalsidase alfa - A preparation for enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease, *Expert Opin. Investig. Drugs* 11(2002) 851-858.

Bierer G., Balfe D., Wilcox W.R., Mosenifar Z., Improvement in serial cardiopulmonary exercise testing following enzyme replacement therapy in Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 572–579.

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

Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J. W., Lysosomal involvement in apoptosis, *Redox Rep.* 6 (2001) 91-97.

Clarke J.T.R., Narrative review: Fabry disease, *Ann. Intern. Med.* 146 (2007) 425–433.

Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A., Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression, *J. Cell. Mol. Med.* 10 (2006) 389-406.

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

DeGraba T., Azhar S., Dignat-George F., Brown E., Boutière B., Altarescu G., McCarron R., Schiffmann R., Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients, *Ann. Neurol.* 47 (2000) 229–233.

Desnick R.J., Ioannou Y.A., Eng C.M.,  $\alpha$ -Galactosidase A deficiency: Fabry disease, em: C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>a</sup> edição, McGraw-Hill Inc., New York (2001), pp. 3733–3774.

El Dib R.P., Pastores G.M., Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* 5 (2010) CD006663

Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, Caplan L., Linthorst G.E., Desnick R.J. Safety and efficacy of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase a replacement therapy in Fabry's disease, *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 9-16.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81–128.

Filippon L., Vanzin C.S., Biancini G.B., Pereira I.N., Manfredini V., Sitta A., Peralba M.C.R, Schwartz I.V.D, Giugliani R., Vargas C.R., Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 121-127.

Fontella F.U., Pulrolnik V., Gassen E., Wannmacher C.M., Klein A.B., Wajner M., Dutra-Filho C.S., Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats, *Neuroreport* 11 (2000) 541–544.

Futerman A.H.,van Meer G., The cell biology of lysosomal storage disorders, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 554-565.

Gal A, Hughes DA, Winchester B. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a european expert group, *J Inherit Metab Dis.* 34 (2011) 509-514.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?, *J. Neurochem.* 97 (2006) 1634-1658.

Halliwell B., Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity cause or consequence?, *Lancet* 344 (1994) 721–724.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*, 4<sup>a</sup> edição. Oxford University Press, New York, 2007.

Halliwell B., The wanderings of a free radical, *Free Radic. Biol. and Med.* 46 (2009) 531-542.

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

Halliwell, B., Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312-322.

Headlam H.A., Davies M.J., Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals, *Free Radic. Biol. and Med.* 34 (2003) 44-55.

Hughes D.A., Elliott P.M., Shah J., Zuckerman J., Coghlan G., Brookes J., Mehta A.B., Effects of enzyme replacement therapy on the cardiomyopathy of Anderson-Fabry disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial of agalsidase alfa, *Heart* 94 (2008) 153–158.

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

Mangeney M., Lingwood C.A., Taga S., Caillou B., Tursz T., Wiels J., Apoptosis induced in burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen, *Cancer Res.* 53 (1993) 5314-5319.

Mantovani,G., Macciò, A., Madeddu C., Mura L., Gramignano G., Lusso M.R., Mulas C., Mudu M.C., Murgia,V., Camboni P., Massa E., Ferreli L., Contu P., Rinaldi A., Sanjust E., Atzei D., Elsener B., Quantitative evaluation of oxidative stress, chronic inflammatory indices and leptin in cancer patients: Correlation with stage and performance status, *Int. J. Cancer.* 98 (2002) 84-91.

Martinez P., Aggio M., Rozenfeld P., High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 365-369.

Mc Guire P.J., Parikh A., Diaz G.A., Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 173–180.

Mehta A., Ricci R., Widmer U., Dehout F., Garcia De Lorenzo A., Kampmann C., Linhart A., Sunder-Plassmann G., Ries M., Beck M., Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey, *Eur. J. Clin. Invest.* 34 (2004) 236-242.

Moore D.F., Altarescu G., Ling G.S., Jeffries N., Frei K.P., Weibel T., Charria-Ortiz G., Ferri R., Arai A.E., Brady R.O., Schiffmann R., Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement, *Stroke* 33 (2002) 525–531.

Moore D.F., Krokhin O.V., Beavis R.C., Ries M., Robinson C., Goldin E, Brady R.O., Wilkins J.A., Schiffmann R., Proteomics of specific treatment-related

alterations in Fabry disease: A strategy to identify biological abnormalities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104 (2007) 2873-2878.

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

Moore D.F., Ye F., Brennan M.L., Gupta S., Barshop B.A., Steiner R.D., Rhead W.J., Brady R.O., Hazen S.L., Schiffmann R., Ascorbate decreases Fabry cerebral hyperperfusion suggesting a reactive oxygen species abnormality: an arterial spin tagging study, *J. Magn. Reson. Imaging* 20 (2004) 674–683.

Mori T., Kiyokawa N., Katagiri Y.U., Taguchi T., Suzuki T., Sekino T., Satoa N., Ohmia K., Nakajimaa H., Takedab T., Fujimoto J., Globotriaosyl ceramide (CD77/Gb3) in the glycolipid-enriched membrane domain participates in B-cell receptor-mediated apoptosis by regulating lyn kinase activity in human B cells, *Exp. Hematol.* 28 (2000) 1260-1268.

Okumiya T., Ishii S., Kase R., Kamei S., Sakuraba H., Suzuki Y., Alpha-galactosidase gene mutations in Fabry disease: heterogeneous expressions of mutant enzyme proteins, *Hum. Genet.* 95 (1995) 557–561.

Pastores G.M., Thadhani R., Enzyme-replacement therapy for anderson-fabry diseases, *Lancet* 358 (2001) 601-603.

Polidori M.C., Frei B., Cherubini A., Nelles G., Rordorf G., Keaney Jr J.F., Schwamm L., Mecocci P., Koroshetz W. J., Beal M. F., Increased plasma levels

of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke, *Free Rad. Biol. Med.* 25 (1998) 561-567.

Rahman P., Gladman D.D., Wither J., Silver M. D., Coexistence of Fabry's disease and systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Rheumatol.* 16 (1998) 475-478.

Ribas G.S., Manfredini V., de Mari J.F., Wayhs C.Y., Vanzin C.S., Biancini G.B., Sitta A., Deon M., Wajner M., Vargas C.R., Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: A possible protective role of L-carnitine supplementation, *Int. J. Dev. Neurosci.* 28 (2010)127-132.

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

Rozenfeld P., Agriello E., De Francesco N., Martinez P., Fossati C., Leukocyte perturbation associated with Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 155 (2009) 1-11.

Sánchez-Guerrero J., Lew R.A., Fossel A.H., Schur P.H., Utility of anti-sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, and anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 39 (1996) 1055-1061.

Saudubray J.M., Charpentier C., Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms, em: C.R. Scriver, W.A. Sly, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and*

Molecular Bases of Inherited Disease, 8<sup>a</sup> edição, McGraw-Hill Inc., New York (2001) pp. 1327-1403.

Scriver C.R., Sly W.A., Beaudet A.L., Valle D., The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8<sup>a</sup> edição, McGraw-Hill Inc., New York (2001).

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

Sitta A., Barschak A.G., Deon M., Barden A.T., Biancini G.B., Vargas P.R., de Souza C.F., Netto C., Wajner M., Vargas C.R., Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients, *Int. J. Dev. Neurosci.* 27 (2009) 243-247.

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

Stone J.R., Yang S., Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger, *Antioxid and Redox Signal.* 8 (2006) 243-270.

Swain S.D., Rohn T.T., Quinn M.T., Neutrophil priming in host defense: Role of oxidants as priming agents, *Antioxid. and Redox Signal.* 4 (2002) 69-83.

Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunk U.T., Lysosomal labilization, *IUBMB Life* 58 (2006) 531-539.

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

Thomaidis T., Relle M., Golbas M., Brochhausen C., Galle P.R., Beck M., Schwarting A., Downregulation of  $\alpha$ -galactosidase A upregulates CD77: Functional impact for Fabry nephropathy, *Kidney Int.* 75 (2009) 399-407.

Thurberg B.L., Byers R.H., Granter S.R., Phelps R.G., Gordon R.E., O'Callaghan M., Monitoring the 3-year efficacy of enzyme replacement therapy in Fabry disease by repeated skin biopsie, *J. Invest. Dermatol.* 122 (2004) 900-908.

Toyokuni S., Persistent oxidative stress in cancer, *FEBS Lett.* 358 (1995) 1-3.

Vargas C.R., Wajner M., Sirtori L.R., Goulart L., Chiochetta M., Coelho D., Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1688 (2004) 26-32.

Vedder A.C., Breunig F., Donker-Koopman W.E., Mills K., Young E., Winchester B., Ten Berge I.J.M., Groener J.E.M., Aerts J.M.F.G., Wanner C., Hollak C.E.M., Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: Effects on antibody formation and GL-3, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 319-325.

Vitner E.B., Platt F.M., Futerman A.H., Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases, *J. Biol. Chem.* (2010) 20423-20427.

Wei E.P., Kontos H.A., Beckman J.S., Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 271 (1996) H1262-H1266.

Whybra C., Schwarting A., Kriegsmann J., Gal A., Mengel E., Kampmann C., Baehner F., Schaefer E., Beck M., IgA nephropathy in two adolescent sisters heterozygous for Fabry disease, *Pediatr. Nephrol.* 21 (2006) 1251-1256.

Wilcox W.R., Banikazemi M., Guffon N., Waldek S., Lee P., Linthorst G.E., Desnick R.J., Germain D., Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004) 65-74.

Zhang R., Brennan M., Fu X., Aviles R.J., Pearce G.L., Penn M.S., Topol E.J., Sprecher D.L., Hazen S.L., Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease, *J. Am. Med. Assoc.* 286 (2001) 2136-2142.

**LISTA DE FIGURAS**

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Via metabólica do catabolismo de glicosfingolípídeos, destacando-se os metabólitos acumulados na DF: galactosilceramida, globotriaosilceramida (Gb3) e glicosfingolípídeos do grupo sanguíneo B.	12
<b>Figura 2.</b> Conteúdo de MDA em pacientes com DF (no momento do diagnóstico e em TRE) e controles.	21



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

**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

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

**Projeto:** 100177

**Versão do Projeto:** 05/05/2010

**Versão do TCLE:** 17/06/2010

**Pesquisadores:**

ANGELA SITTA

MARION DEON

ALETHEA GATTO BARSCHAK

IZABELA NETTO PEREIRA

DAIANE GRIGOLO BARDEMAKER RODRIGUES

DIANA MONTI ATIK

GIOVANA BRONDANI BIANCINI

LAURA BANNACH JARDIM

ROBERTO GIUGLIANI

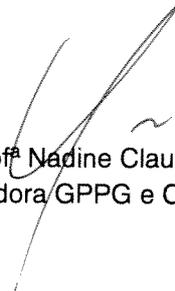
CRISTINA BRINCKMANN OLIVEIRA NETTO

CARMEN REGLA VARGAS

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

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

Porto Alegre, 14 de julho de 2010.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

### **Pacientes com Doença de Fabry**

O presente projeto de pesquisa tem por objetivo investigar parâmetros de estresse oxidativo (efeitos da ação dos radicais livres, como através de radiação solar, e de substâncias antioxidantes como vitaminas) em pacientes com Doença de Fabry e correlacioná-los com a quantidade de Gb3 (metabólito acumulado nesses pacientes), marcadores inflamatórios e função renal. Também será avaliado o efeito da terapia de reposição enzimática (TRE), tratamento preconizado para esses pacientes, sobre esses parâmetros investigados.

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com os pacientes e/ou responsáveis, das consultas médicas e da medida dos parâmetros em sangue e urina. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras dos pacientes, não sendo necessário o comparecimento dos pacientes em consultas extras.

As coletas repetidas serão realizadas no Hospital Dia do HCPA, imediatamente antes da infusão enzimática. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue e urina para exames laboratoriais de rotina. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que o indivíduo terá acesso às mesmas.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo estão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa. Telefone para contato: 3359.8011 (Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a mestrandia Giovana Brondani Biancini).

Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data:

Nome:

Nome do responsável legal:

Assinatura:

HCPA / GMFG  
VERSÃO APROVADA  
14/07/2010  
ME 100177

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

#### **Indivíduos controles**

Vimos através deste convidar você a participar do trabalho cujo objetivo é avaliar a ação de radicais livres (por exemplo, radiação solar) e substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes portadores de doenças metabólicas herdadas geneticamente, as quais causam danos graves à saúde. Também pretendemos avaliar o efeito do tratamento utilizado rotineiramente nestas doenças sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres. Você está sendo convidado a participar deste estudo como controle, ou seja, por não ser portador de doenças metabólicas.

Para participar você fará exames de sangue e de urina, as quais serão coletadas juntamente com as que serão utilizadas para os testes de acompanhamento, solicitados rotineiramente pelo seu médico. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue e urina para exames laboratoriais de rotina. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para estas doenças, bem como para o melhor entendimento destas patologias. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado ao doador acesso às mesmas.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são confidenciais. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo.

HCPA / CIMP3  
VERSÃO APROVADA  
14/07/2010  
ME 100177

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, completamente gratuitas para você.

Caso você queira se retirar em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O seu material (sangue e urina) coletado será destruído e os seus dados excluídos do nosso banco de dados.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo estão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa. Telefones de contato: 3359.8011 (Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e mestranda Giovana Brondani Biancini).

Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data:

Nome:

Nome do responsável legal:

Assinatura:

UNIPA / UNPG  
VERSÃO APROVADA  
19/07/2010  
MR 100177