

Luísa Forte Varajão Caldas

Ceramida e Ceramidase Ácida: Importância Fisiopatológica e Terapêutica

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Luísa Forte Varajão Caldas

Ceramida e Ceramidase Ácida: Importância Fisiopatológica e Terapêutica

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Luísa Forte Varajão Caldas

Ceramida e Ceramidase Ácida: Importância Fisiopatológica e Terapêutica

Luísa Forte Varajão Caldas

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro

Resumo

A ceramida é um esfingolípido tipicamente encontrado nas membranas das células eucarióticas. Para além da sua função estrutural, esta molécula lipídica tem também sido associada a funções reguladoras, nomeadamente no âmbito da apoptose onde atua como molécula pró-apoptótica. O metabolismo da ceramida é representado por uma complexa rede de reações inter-relacionadas que compreende três vias metabólicas: biossintética, catabólica e reciclagem. O catabolismo da ceramida em esfingosina e ácido gordo é assegurado por uma família de enzimas conhecidas por ceramidases. Estas enzimas atuam em diferentes compartimentos celulares sob condições fisiológicas distintas. A ceramidase ácida (aCDase) está localizada no lisossoma e é responsável pela produção da esfingosina lisossomal. Após a sua exportação para o citoplasma, a esfingosina pode ser fosforilada ou utilizada na via de reciclagem para a produção de ceramida. O balanço entre a ceramida e a esfingosina-1-fosfato pode ser utilizado como sensor de morte ou sobrevivência celular. Em virtude disso, as patologias caracterizadas por défice ou excesso de atividade enzimática de aCDase podem apresentar desequilíbrios da razão ceramida/esfingosina 1-fosfato. Por isso, essas doenças poderão ser revertidas, total ou parcialmente, através da reposição de uma quantidade adequada de aCDase funcionalmente ativa ou da inibição da expressão / atividade enzimática da aCDase, respetivamente. A potencialidade de modulação terapêutica da etapa do metabolismo catalisada pela aCDase tem sido explorada em várias áreas da Medicina, recorrendo quer a fármacos orfãos ou co-adjuvantes terapêuticos, e com resultados muito promissores.

Palavras-Chave: Cancro, Ceramida, Ceramidase ácida, Esfingolipidoses, Metabolismo.

Abstract

The ceramide is a sphingolipid typically found in membranes of eukaryotic cells. Besides its structural function, this lipid molecule has also been associated to regulatory functions, namely as a pro-apoptotic molecule in the apoptosis process. The ceramide metabolism is represented by a complex inter-connected network of reactions comprising three metabolic pathways: biosynthetic, catabolic and recycling. The ceramide catabolism in sphingosine and fatty acid is catalysed by a family of enzymes known as ceramidases. These enzymes act in different cell compartments under distinct physiologic conditions. The acid ceramidase (aCDase) is located in the lysosome being responsible for the production of the lysosomal sphingosine. After its exportation to the cytoplasm, the sphingosine can be phosphorylated or used in the recycling pathway to the production of ceramide. The balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate can be used as sensor of cell death or survival. Because of that, pathologies characterised by deficit or excess of aCDase enzymatic activity may present unbalances levels of the ratio ceramide/sphingosine 1-phosphate. Such diseases could be reverted, total or partially, in the presence of an adequate amount of functionally active aCDase or through the inhibition of aCDase expression / enzymatic activity, respectively. The potentiality of therapeutic modulation of the metabolic step catalysed by aCDase has been explored in distinct areas of Medicine, using either orphan drugs or co-adjuvant therapeutic agents, with promising results.

Keywords: Acid ceramidase, Cancer, Ceramide, Sphingolipidoses, Metabolism.

Agradecimentos

Desejo agradecer em primeiro lugar, à minha família que sempre me apoiou em todos os momentos, por me darem a força necessária para nunca desistir e por lutarem juntos comigo pelo meu sonho. Os meus pais foram incansáveis e estarei eternamente grata pela sua ajuda e esforço durante estes 5 anos.

Agradeço ao meu namorado e amigos por estarem sempre comigo, por me apoiarem e incentivarem a ser ambiciosa.

Quanto aos amigos que fiz na faculdade, sei que são amigos para a vida e as saudades já começam a apertar quando olho para trás, para todos os momentos e experiências vividas.

Quero agradecer ainda à minha orientadora, a Prof^a Doutora Maria Gil Ribeiro, que desde o início se prontificou a ajudar-me no que fosse preciso. As suas palavras transmitiram-se força e coragem para desenvolver este trabalho.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”

Fernando Pessoa

Índice

Resumo	5
Abstract.....	6
Agradecimentos	7
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas.....	10
I. Introdução.....	13
II. Revisão da Literatura	14
1. Esfingolípidos	14
1.1 Estrutura	14
1.2 Metabolismo.....	18
1.3 Função	20
1.4 Doenças hereditárias do catabolismo dos esfingolípidos.....	22
2. Ceramidases	28
2.1 Ceramidase alcalina.....	29
2.2 Ceramidase neutra	30
2.3 Ceramidase ácida.....	30
2.4 Reóstato ceramida / esfingosina-1-fosfato	31
3. Modulação da atividade da ceramidase ácida	32
3.1 Papel no cancro	33
3.2 Análogos da Ceramida	38
3.3 Inibidores da Ceramidase Ácida	40
3.4 Sobre-expressão da ceramidase ácida	45
3.4.1 Doença de Farber	45
3.4.2 Papel na Fibrose cística.....	48
3.4.3 Medicamento-órfão.....	49
III. Conclusão e perspectivas futuras	51
IV. Bibliografia.....	53

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura das três diferentes bases esfingóides que constituem os ESLs	15
Figura 2: Estrutura geral dos esfingolípidos.....	15
Figura 3: Estrutura química dos ESLs.....	17
Figura 4: Representação esquemática do metabolismo dos esfingolípidos nos diferentes compartimentos celulares.	18
Figura 5: Funções celulares da ceramida e da esfingosina-1-fosfato..	22
Figura 6: Esquema representativo das principais doenças hereditárias do catabolismo dos esfingolípidos	24
Figura 7: Reóstato ceramida / esfingosina-1-fosfato.....	31
Figura 8: Estrutura química de Tamoxifeno e seus metabolitos ativos.....	37
Figura 9: Estrutura da ceramida natural, D-erythro-C18-ceramida (C18-Cer) e ceramidas de cadeia curta sintéticas, C2-Cer, C6-Cer e C8-Cer	39
Figura 10: Estruturas dos primeiros compostos de 1 ^a geração que permitiram o desenvolvimento de novos inibidores da aCDase.	41
Figura 11: Estrutura da primeira série de análogos de LCL: LCL204 e LCL85.	42
Figura 12: Seleção de inibidores da aCDase de 2 ^a geração.....	44
Figura 13: O binómio ceramida/ceramidase ácida. A deficiente atividade enzimática da aCDase resulta na acumulação de ceramida que está associada à Doença de Farber	47

Índice de Tabelas

Tabela 1: Caracterização genérica das Esfingolipidoses.	25
Tabela 2: Família das ceramidases ¹	29
Tabela 3: Características clínicas da doença de Farber e da AJI ¹	48

Lista de Abreviaturas

5-FU – 5-Fluorouracilo

aCDase - Ceramidase ácida

ACER1/ASAH3 – Gene da ceramidase alcalina (isoforma 1)

ACER2/ASAH3L – Gene da ceramidase alcalina (isoforma 2)

ACER3/PHCA – Gene da ceramidase alcalina (isoforma 3)

AlkCDase - Ceramidase alcalina

LMA- Leucemia mieloide aguda

ASAHI - Gene da ceramidase ácida

ASAH2 - Gene da ceramidase neutra

aSMase – Esfingomielinase ácida

C1P - Ceramida-1-fosfato

CDase – Ceramidase

CDDP - Cisplatina ou *cisdiamminedichloroplatinum (II)*

Cer – Ceramida

CERT - Proteína de transferência da ceramida

CerS – Ceramida sintase

CF- Fibrose Quística

CFTR - Regulador de condutância transmembranar da fibrose cística

CG - Complexo de Golgi

CRC- Cancro cólon-rectal

DAG – 1,2-Diacilglicerol

D-e-MAPP - (*1S, 2R*) - *D-eritro-2- (N-myristoylamino) -1-fenil-1-propanol*

DF - Doença de Farber

dhCer – Dihidroceramida

DLS- Doença lisossomal de sobrecarga

DMG - *N,N-dimethylglycine*

DMT - *N-desmethyltamoxifen*

EMA- Agência Europeia do Medicamento

ER - Recetor de estrogénio

ESL - Esfingolípido

Gal- Galactose

GalCer - Galactosilceramida

GESL - Glicoesfingolípido

GLA - α - Galactosidase A

Glc- Glucose

GlcCer - Glucosilceramida

GM- Gangliosídeo

HER2 - Recetor de crescimento epidérmico 2

HNC- Cancro da cabeça e pescoço

HNSCC- Carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

JIA- Artrite Juvenil Idiopática

nCDase - Ceramidase neutra

NOE - *N-oleylethanolamine*

PR - Recetor de progesterona

RE - Retículo endoplasmático

REL - Retículo endoplasmático liso

SAR -Relação estrutura-atividade

S1P - Esfingosina-1-fosfato

S1PR1 – Recetor 1 da esfingosina-1-fosfato

SM – Esfingomielina

SMase- Esfingomielinases

Sph – Esfingosina

SPT - Serina palmitoiltransferase

I. Introdução

Os esfingolípidos (ESLs) são uma classe de lípidos que estão presentes em todos os seres vivos. Estas moléculas desempenham funções essenciais à fisiologia celular, não só como componentes estruturais das biomembranas mas também como intervenientes de processos de sinalização e transdução celulares. Nas últimas décadas, registaram-se avanços significativos a nível do conhecimento da função biológica destas moléculas. A ceramida (Cer) é uma molécula esfingolípídica que tem sido amplamente investigada ao longo do tempo devido à sua posição central no metabolismo dos ESLs. Numerosos trabalhos têm sido publicados com vista à elucidação dos genes que codificam para as proteínas envolvidas na biosíntese e catabolismo da Cer, ou do seu tráfego intracelular, dos mecanismos de ação e regulação da atividade dessas proteínas, da heterogeneidade estrutural e funcional das ceramidas, bem como dos efeitos moleculares, celulares e fisiológicos resultantes da acumulação ou défice intracelular de ceramidas (Coant *et al.*, 2017; Gangoiti *et al.*, 2010; Gault *et al.*, 2010; Hannun e Obeid, 2011; Holthuis e Igarashi, 2014; Kacher e Futerman, 2006).

O presente trabalho analisa apenas uma das etapas do metabolismo da Cer, especificamente a reação catalisada pela ceramidase ácida (aCDase), e procura estabelecer a sua importância na saúde e na doença. Para o cumprimento deste objetivo foi realizada uma pesquisa bibliográfica, essencialmente reportada aos últimos 10 anos, em bases de dados como a PubMed, B-on, entre outras, utilizando as palavras-chave ceramida, ceramidases e ceramidase ácida, e selecionadas as publicações consideradas relevantes para a elaboração da respetiva revisão narrativa sobre o tema.

II. Revisão da Literatura

1. Esfingolípidos

Os ESLs são um grupo de lípidos derivados da esfingosina e que estão tipicamente presentes nas células eucarióticas. Estas moléculas lipídicas foram descobertas pelo bioquímico alemão Johann Thudichum, há mais de um século, em amostras de cérebro e consideradas uma família de lípidos membranares (Thudichum, 1884). Desde então foram identificadas e caracterizadas quimicamente mais de 60 tipos de ESLs em células humanas. Eles representam cerca de 10-20% dos lípidos totais em células de mamíferos, tendo também sido observados em plantas, fungos, bactérias e vírus (Delgado *et al.*, 2007).

O prefixo “esfingo” teve origem no mito grego da esfinge, “The Sphinx”, que significa a magnitude do enigma associado à função destas moléculas (Ferreira, 2013). Inicialmente foram considerados apenas componentes estruturais celulares mas, na década de 80, a descoberta da função biológica da esfingosina (Sph) e, posteriormente, de outros ESLs resultantes da fosforilação da Sph e da Cer (S1P e C1P, respetivamente) revelou outras funções igualmente importantes para a fisiologia celular (Hannun *et al.*, 1986).

1.1 Estrutura

Os ESLs são constituídos por uma base esfingóide que pode variar quanto ao comprimento e quanto ao grau de saturação, hidroxilação e/ou ramificação. A base esfingóide pode ser a esfingosina, esfingonina ou fitoesfingosina (Fig.1). Nas células humanas, a base esfingóide mais comum é a esfingosina, um aminoálcool com uma cadeia insaturada de 18 átomos de carbono (Kolter, 2011; Schuchman, 2016).

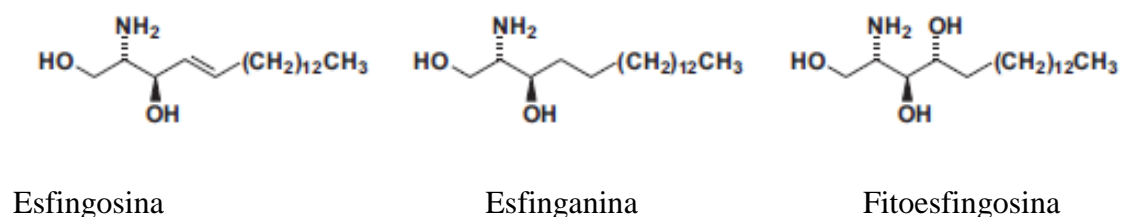


Figura 1: Estrutura das três diferentes bases esfingóides que constituem os ESLs. Figura modificada de Kolter, 2011.

A maioria dos ESLs são constituídos por um ácido gordo que estabelece uma ligação amida com o grupo amino da base esfingóide e por um grupo polar que define o tipo de esfingolípido (Fig. 2). No caso do ácido gordo, podem existir variações relativamente ao seu comprimento, grau de saturação e hidroxilação. Os ácidos gordos mais frequentemente encontrados nos ESLs são longos e saturados ou, eventualmente, insaturados no C-15 ou hidroxilados no C-2 (Nelson e Cox, 2005).

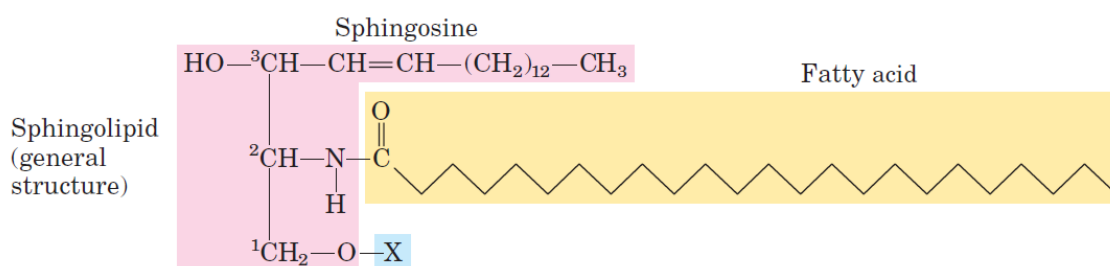


Figura 2: Estrutura geral dos esfingolípido. A base esfingóide pode ser modificada com uma molécula de ácido gordo com grau de insaturação e comprimento variáveis e por um grupo polar (X) que define o tipo de esfingolípido. Figura extraída de Nelson e Cox, 2005.

A Sph e a SIP são os ESLs mais simples e a Cer é uma Sph-N-acilada. A Cer é constituída por esfingosina e por ácido gordo com comprimento variável entre C-14 e C-26, ligadas à base esfingóide via ligação amida. A Cer é a base dos ESLs mais complexos que são formados por ligação de grupos distintos ao C-1 da Sph (Fig. 3). Quando este grupo é a fosforilcolina, o lípido é a esfingomielina (SM). A ligação de uma molécula de glucose (Glc) ou de galactose (Gal) constitui a primeira etapa para a formação dos esfingolípidos complexos, ou seja, os glicosfingolípidos (GESLs), tais como a glucosilceramida (GlcCer) e a galactosilceramida (GalCer). Os gangliosídeos (GMs) são uma classe de GESLs que contém um resíduo de ácido siálico, maioritariamente o ácido N-acetilneuramínico, no segmento da molécula correspondente ao carboidrato. Deste modo, de acordo com a natureza química do grupo polar, os GESLs são classificados em cerebrosídeos (contém um resíduo de açúcar, por exemplo a GlcCer), sulfatídeos (possuem um resíduo de açúcar modificado com um grupo sulfato) ou gangliosídeos (com um ou mais resíduos de ácido N-acetilneuramínico) (Nelson e Cox, 2015).

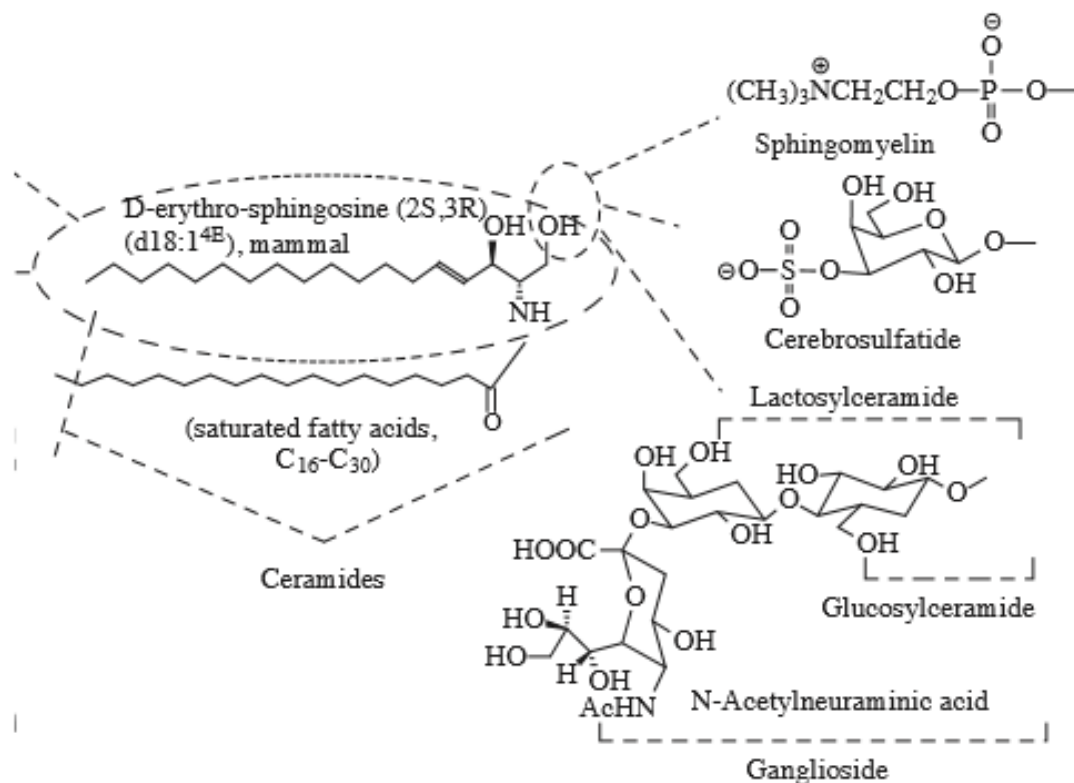


Figura 3: Estrutura química dos esfingolípidos. Os ESLs são moléculas anfipáticas constituídas por uma base de cadeia longa, geralmente a esfingosina, unida a um ácido gordo através de uma ligação de amida. A ceramida é a estrutura base de todos os ESLs e é constituída por uma base de cadeia longa acilada com um ácido gordo. A SM possui, para além da ceramida, um grupo polar de fosforilcolina. Os ESLs possuem um grupo de açúcar que varia na sua complexidade. No caso dos cerebrósidos, o açúcar é a glucose (glucosilceramida) ou a galactose (galactosilceramida). Os GESLs com estruturas mais complexas podem incluir dois açúcares, tal como na lactosilceramida, ou subclasses com componentes adicionais e que são classificados como sulfatídeos ou gangliosídeos. Figura extraída de Guo *et al.*, 2005.

1.2 Metabolismo

Apesar da sua diversidade estrutural, a produção e a degradação dos ESLs é efetuada através de vias anabólicas e catabólicas comuns. Como foi referido anteriormente, a Cer tem uma posição central na biossíntese dos ESLs, atuando como precursor de ESLs mais complexos. Para além disso a biossíntese da Cer pode ocorrer pela via metabólica *de novo*, a via de degradação ou hidrolítica, e a via de reciclagem (Fig. 4).

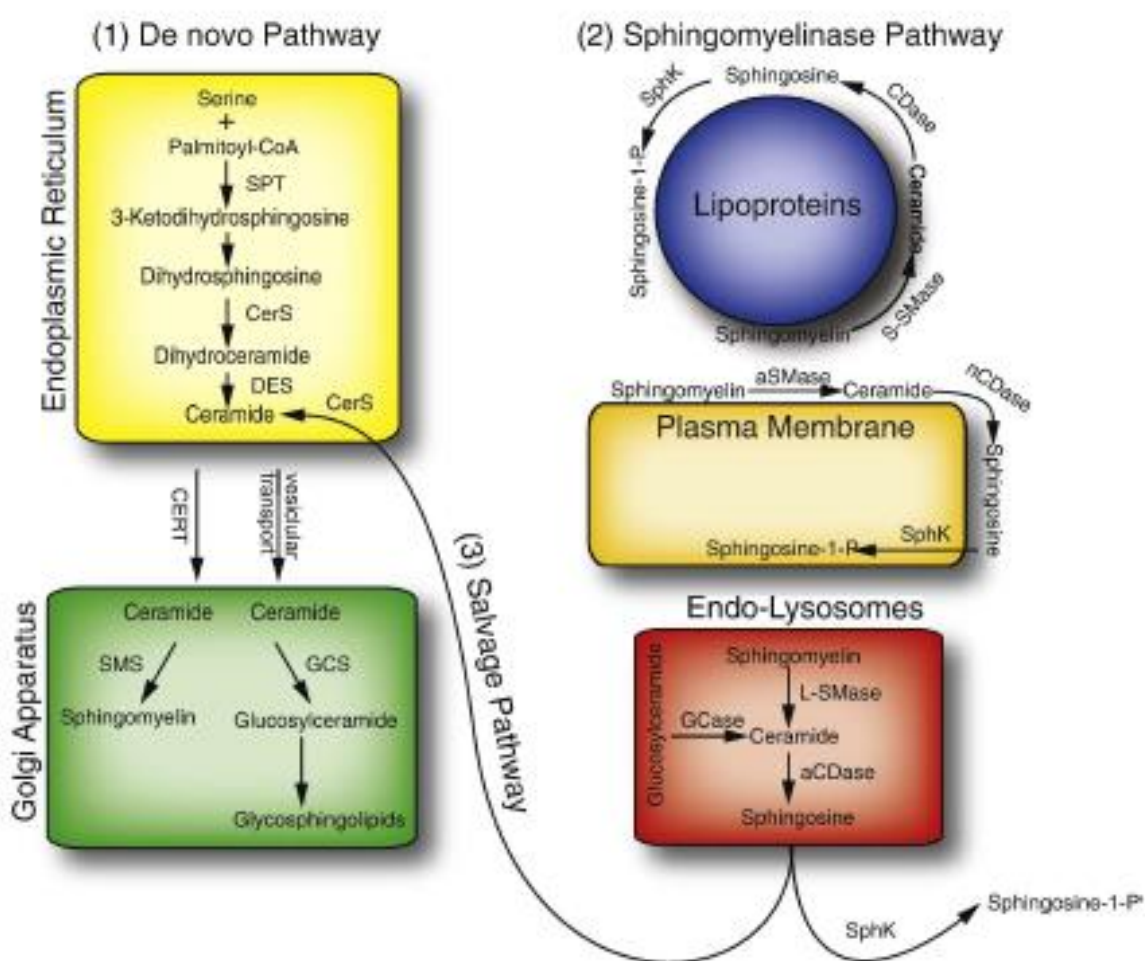


Figura 4: Representação esquemática do metabolismo dos esfingolípidos. De salientar o envolvimento de diferentes compartimentos celulares e o papel central da ceramida que é produzida através de três vias distintas (biossíntese *de novo* (1), degradação (2) e reciclagem (3). Figura extraída de Jenkins *et al.*, 2009.

A síntese *de novo* ocorre no lúmen do retículo endoplasmático liso (REL) e inicia-se com a condensação entre o palmitoil-CoA e a serina através da ação da enzima serina palmitoiltransferase (SPT), originando a 3-cetodihidroesfingosina. Esta é reduzida a dihidroesfingosina, também designada por esfinganina. A acilação da dihidroesfingosina produz a dihidroceramida (dhCer), sendo esta etapa catalizada por uma dihidroceramida sintase, também designada ceramida sintase (CerS1-6). A introdução de uma ligação dupla 4,5-*trans* por ação da dihidroceramidase reductase origina a formação da ceramida (Degroote *et al.*, 2004; Hannun e Obeid, 2011; Jenkins *et al.*, 2009).

A ceramida é transferida para o complexo de Golgi (CG) através da ação direta da proteína de transferência da ceramida (CERT) ou por tráfego vesicular. No CG, a Cer pode ser utilizada como substrato na síntese da SM e de GESLs, os quais serão posteriormente transportados para a membrana plasmática. A reação de síntese da SM é catalizada pela enzima esfingomielina sintase que promove a transferência da fosforilcolina da fosfatidilcolina para o grupo hidroxilo da ceramida, originando a SM e o 1,2-diacilglicerol (DAG). Muitos dos GESLs são derivados da GlcCer. Sob a ação da enzima glucosiltransferase, um resíduo de glicose é transferido para a posição 1 da Cer via ligação β -glicosídica. A GlcCer pode ser transferida para a membrana plasmática ou modificada por glicosilação no CG com vista à formação de esfingolípidos mais complexos (Degroote *et al.*, 2004; Hannun e Obeid, 2011; Jenkins *et al.*, 2009).

A via de degradação, ou via catabólica, ocorre no sistema endolisossomal, iniciando-se a partir de GESLs ou da SM. A degradação dos GESLs ocorre de forma sequencial até à formação de Cer. A hidrólise da SM em ceramida e fosforilcolina ocorre por clivagem da ligação fosfodiéster na presença de enzimas específicas, as esfingomielinases (esfingomielina fosfodiesterase, SMases). Esta hidrólise sucede como resposta, por exemplo, a moléculas indutoras de *stress*, como citoquinas pró-inflamatórias ou moléculas indutoras de diferenciação celular. Posteriormente, através da ação de ceramidases (CDases), a ceramida proveniente da degradação dos GESLs ou da SM pode ser convertida em Sph que, subsequentemente, pode ser convertida em S1P por ação da esfingosina cinase. Esta degradação pode ocorrer em diferentes compartimentos

celulares, dependendo do tipo de SMase. Existem vários tipos de SMases que diferem quanto à sua localização celular, pH e dependência de catiões: ácida, neutra e alcalina. A esfingomielinase ácida (aSMase) pode atuar na membrana plasmática (ciclo da SM) e no lisossoma. Já no caso da aCDase, a enzima atua em compartimentos ácidos, sendo a forma neutra aquela que geralmente atua na membrana plasmática (Hannun e Obeid, 2011; Jenkins *et al.*, 2009; Schulze e Sandhoff, 2014).

A via de reciclagem possibilita a re-acilação da esfingosina lisossomal e de outras bases esfingóides para formar a ceramida. Em células totalmente diferenciadas (e.g. neurónios), esta via contribui até 50-90% para a formação de GESLs (Schulze e Sandhoff, 2014). Após atravessar a membrana lisossomal, a Sph pode ser usada na síntese de Cer, através da ação da ceramida sintetase, ou na síntese de S1P se a reação é catalisada pela esfingosina cinase. Por outro lado, a Cer também pode ser convertida em C1P pela ação da ceramida cinase. Tal como as SMases, as CDases fazem parte de uma família cuja função é converter a ceramida em esfingosina (Hannun e Obeid, 2011; Jenkins *et al.*, 2009; Schulze e Sandhoff, 2014). Estão descritos cinco tipos de CDases que diferem quanto ao valor de pH ótimo de atividade enzimática e localização subcelular (Jenkins *et al.*, 2009). Esta família de enzimas será explorada numa outra secção deste trabalho (Schulze e Sandhoff, 2014).

1.3 Função

Os ESLs constituem uma família de lípidos de membrana que, para além da função estrutural, também desempenham um papel importante em eventos de sinalização e de regulação celular. Em associação com os esteróis, em particular o colesterol, os ESLs são capazes de formar microestruturas na superfície celular (e.g. *lipid rafts*). Esses segmentos de membrana constituem plataformas dinâmicas de recrutamento e ligação de proteínas específicas. A modificação do seu tamanho e composição em resposta a estímulos intra ou extracelulares permite regular as interações proteína-proteína e, desse modo, a ativação/repressão de cascatas de sinalização conducentes a respostas específicas

(Gangoiti *et al.*, 2010). Neste contexto, os ESLs podem atuar na regulação de processos vitais para a fisiologia celular, tais como a migração, proliferação e adesão celular, angiogênese, senescência e apoptose celular. Para além disso, os ESLs têm também sido implicados na formação da barreira da pele, nomeadamente através da regulação da fluidez membranar, funções neurais, metabolismo da glucose e resposta inflamatória. No caso dos esfingolípidos N-acilados, eles podem ainda atuar como reserva energética e fonte de energia química (Delgado *et al.*, 2007; Kolter, 2011).

Na célula, a Cer e a S1P são metabolicamente interconvertíveis e a razão das suas concentrações atua como um sensor que determina o destino da célula (Fig. 5). Enquanto a Cer é considerada um lípido pró-apoptótico, a S1P está implicada na sobrevivência e proliferação celular. O equilíbrio do “reóstato Cer/S1P” é, assim, considerado um fator elementar e fundamental da homeostasia celular uma vez que o rompimento desse equilíbrio dinâmico entre os níveis intracelulares da Cer e S1P pode determinar a sobrevivência ou morte da célula. De facto, fatores como *stress*, infeção, radiação, quimioterapia, a idade e algumas deficiências humanas fazem que com haja uma estimulação da produção de ceramida, alterando o balanço Cer/S1P. Em virtude disso, a razão entre estes ESLs tem sido implicada no aparecimento e evolução de doenças de etiologia muito diversa, tais como a doença de Alzheimer, cancro, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, entre outras. Em conclusão, a interconversão destes metabolitos através da ação de enzimas específicas cria uma intrincada rede metabólica que a célula utiliza para reajustar as respostas fisiológicas. Adicionalmente, etapas específicas dessa rede representam potenciais alvos terapêuticos de respostas fisiopatológicas mediadas por SLs (Canals *et al.*, 2011; Kolter, 2011; Liu *et al.*, 2009; Tani *et al.*, 2007).

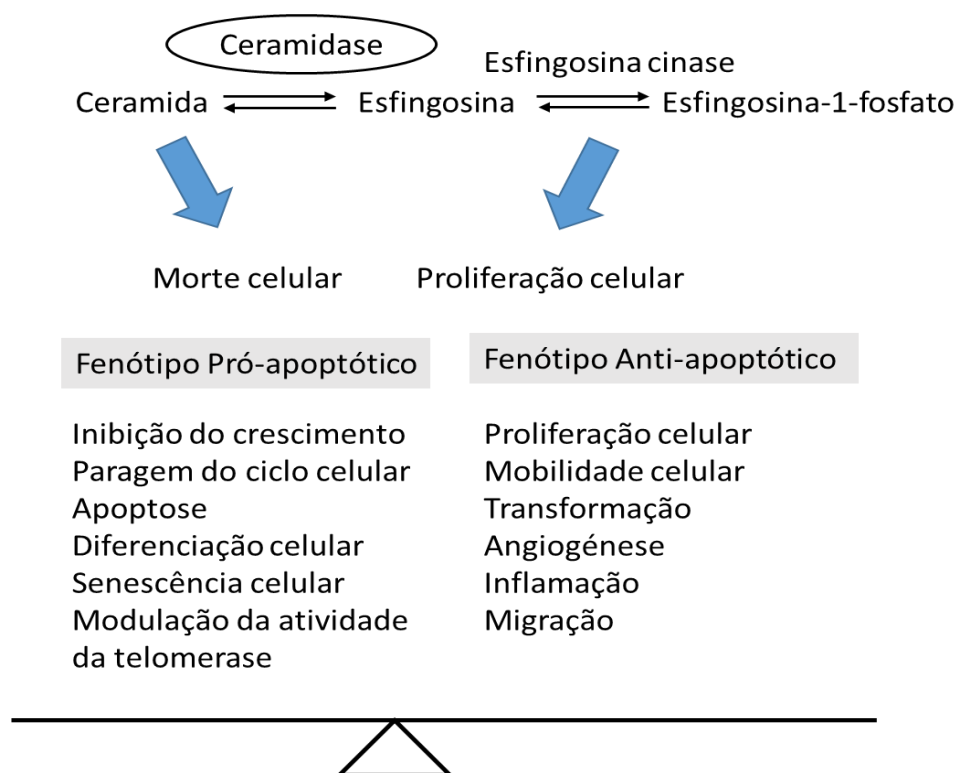


Figura 5: Funções celulares da ceramida e da esfingosina-1-fosfato. A Cer é um lípido pró-apoptótico, enquanto a S1P é uma molécula lipídica anti-apoptótica. A indução da apoptose e a senescência celular é estimulada pela Cer, enquanto a proliferação e mobilidade celulares, angiogénese, inflamação e migração é atribuída à S1P. Figura adaptada de Liu *et al.*, 2009.

1.4 Doenças hereditárias do catabolismo dos esfingolípidos

A extensa variedade estrutural observada a nível dos ESLs está associada ao desempenho de múltiplas funções biológicas. Teoricamente, o bloqueio de qualquer uma das etapas do seu metabolismo pode conduzir à disfunção celular e, eventualmente, ao aparecimento de doença. No caso do catabolismo dos GESLs estão descritas várias doenças raras conhecidas por Esfingolipidoses. Estas fazem parte dum grupo específico de doenças hereditárias do metabolismo conhecido por doenças lisossomais de sobrecarga (DLSs). Estas patologias caracterizam-se por uma acumulação intralisossomal, sobretudo de ESLs

não degradados, e são causadas por defeitos genéticos numa enzima, cofator proteico (e.g. proteínas ativadoras) ou no sistema de troca/transporte de moléculas envolvidas na atividade catabólica do lisossoma (Pinto *et al.*, 2003).

Estão descritas mais de 50 DLSs e a maioria apresenta um padrão de transmissão autossômico recessivo. Na população portuguesa, a prevalência conjunta das DLSs está estimada em cerca de 1/4000 recém-nascidos, sendo a doença de Gaucher a mais frequente (Pinto *et al.*, 2003). As DLSs apresentam uma grande variabilidade clínica. As formas mais severas são caracterizadas pelo aparecimento dos primeiros sinais/sintomas geralmente nos primeiros meses/anos de vida. São doenças caracterizadas por alterações neurológicas, ósseas, cardiovasculares, hematológicas, cutâneas, oculares, organomelia e/ou dismorfia facial. Presentemente, ainda não existe cura para estas doenças mas várias estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas ao longo dos anos. A substituição enzimática, redução do nível do substrato acumulado, a utilização de *chaperones* e o transplante da medula óssea são opções terapêuticas que têm sido utilizadas em diferentes casos para controlar a evolução das respetivas DLSs (Kolter, 2011). A Figura 6 associa as Esfingolipidoses ao catabolismo dos ESLs. A Tabela 1 resume as principais características das Esfingolipidoses em termos de défice enzimático, substrato acumulado e principais sintomas clínicos.

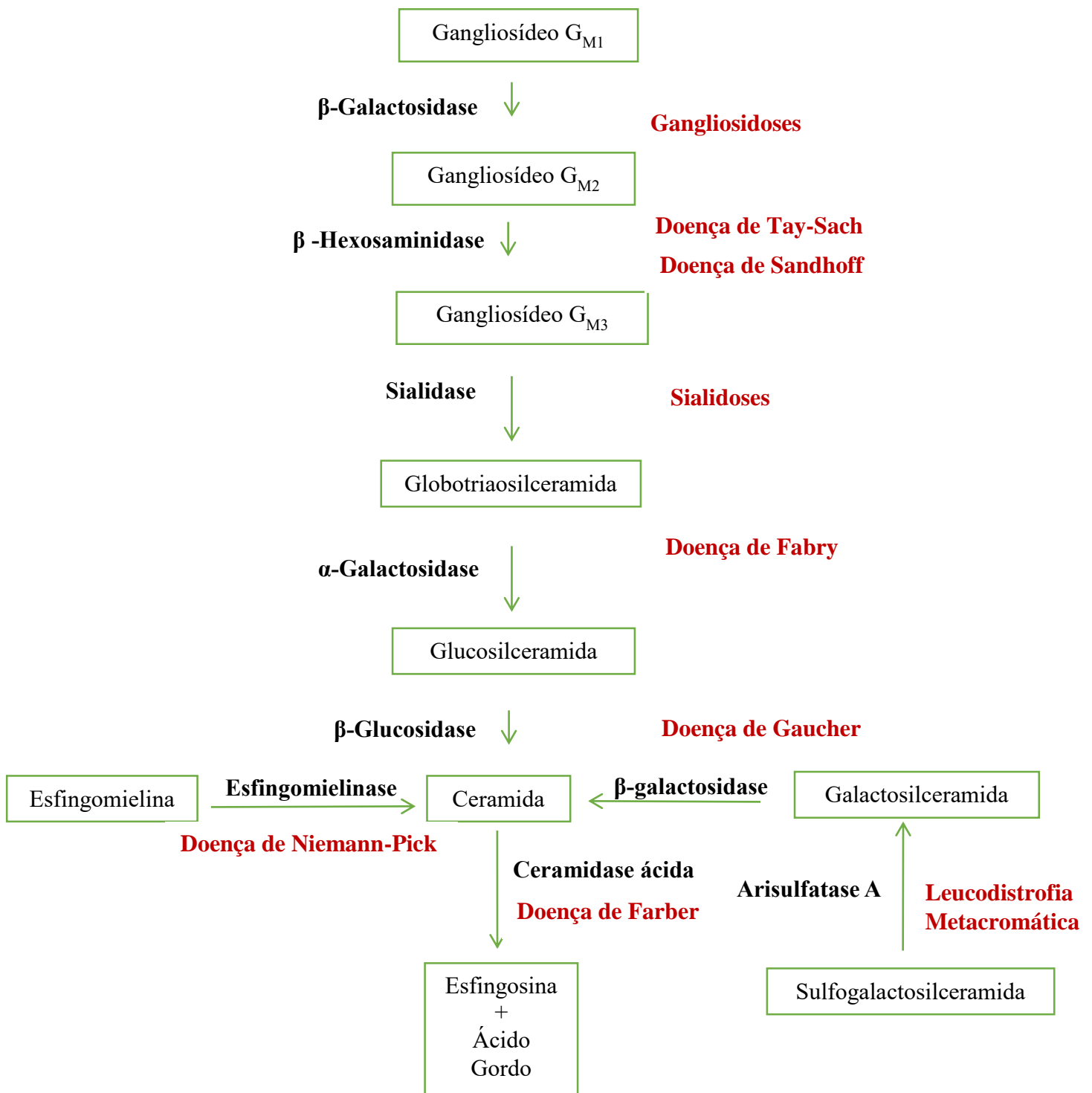


Figura 6: Doenças hereditárias do catabolismo dos esfingolípidos. A vermelho estão indicadas as esfingolipidoses mais comuns e a negrito as enzimas implicadas nas respectivas deficiências enzimáticas. Figura adaptada de Schulze e Sandhoff, 2014.

Tabela 1: Caracterização genérica das Esfingolipidoses.

Doença	Deficiência enzimática	Metabolito acumulado	Principais sintomas clínicos
Gangliosidoses	β - galactosidase	Gangliosídeo G _{M1}	Distonia, displasia do esqueleto
Tay-Sachs	β -Hexosaminidase A	Gangliosídeo G _{M2}	Atraso mental, fraqueza muscular
Sandhoff	β -Hexosaminidase A e B	Globosídeo, Gangliosídeo G _{M2}	Atraso mental, fraqueza muscular
Sialidoses	Sialidase	Gangliosídeo G _{M3}	Malformações esqueléticas, hepato e esplenomegalia
Doença de Fabry	α -Galactosidase A	Globotriaosilceramida e Digalactosilceramida	Falência renal e angioqueratomas
Leucodistrofia metacromática	Arisulfatase A	Sulfatídeo	Atraso mental e distúrbios psicológicos
Doença de Krabbe	β -Galactocerebrosidase	Galactosilceramida	Atraso mental, perda de mielina
Doença de Gaucher	β -Glucocerebrosidase	Glucosilceramida	Hepato e esplenomegalia
Doença de Niemann-Pick A/B	Esfingomielinase ácida	Esfingomielinina	Hepato e esplenomegalia
Doença de Farber	Ceramidase ácida	Ceramida	Dermatites, atraso mental, deformação nas articulações

Tal como ilustrado na Figura 6, a degradação dos GESLs inicia-se pelos gangliosídeos GM1, GM2 e GM3 na presença das enzimas respetivas, β -galactosidase, β -hexosaminidase e sialidase. A deficiência de uma destas enzimas origina o aparecimento da respetiva gangliosidose que é caracterizada pela acumulação do substrato no sistema nervoso e noutros tecidos. A gangliosidose GM1 é, então, causada pela deficiência da enzima β -galactosidase. Os sintomas podem aparecer antes 6 meses, até aos 5 anos de idade ou apenas na adolescência. A doença caracteriza-se por enfraquecimento muscular, atraso no desenvolvimento físico e intelectual, sensibilidade ao ruído e, conforme a progressão da doença, surgem as convulsões, hepatoesplenomegalia, um ponto vermelho específico na retina levando à cegueira progressiva, características faciais distintas, hipertrofia gengival e cardiomiopatia (Schulze e Sandhoff, 2014).

A deficiência em β -hexosaminidase pode originar a doença de Tay-Sachs ou a doença de Sandhoff, conforme o tipo de enzima que é afetada, a hexosaminidase A ou as hexosaminidases A e B, respetivamente. Em ambos os casos observa-se acumulação do gangliósido GM2 em células neuronais. Os sintomas desenvolvem-se, geralmente, nos primeiros anos de vida: mancha vermelha na mácula que pode levar à cegueira, surdez, atrofia muscular que leva à paralisção, deterioração das habilidades físicas e mentais, incluindo a deglutição e o aumento progressivo das convulsões e da demência. Este conjunto de sintomas fazem com que a doença se torne fatal geralmente até aos 5 anos de idade. Na doença de Sandhoff, para além da acumulação de GM2, acumulam-se também globósidos e alguns oligossacarídeos (Schulze e Sandhoff, 2014).

A Sialidose é causada pela deficiência da enzima sialidase cuja função é remover o ácido siálico do gangliosídeo GM3. Os sintomas mais comuns são: macroglossia, malformações esqueléticas, inchaço em todo o corpo logo após o nascimento, convulsões, ataxia, hepatomegalia e esplenomegalia, entre outros (Schulze e Sandhoff, 2014).

A deficiência da enzima α -galactosidase A (GLA) é responsável pela doença de Fabry. Esta doença é caracterizada pela acumulação intralisossomal de globotriaosilceramida e digalactosilceramida. Ela afeta essencialmente células vasculares endoteliais, epiteliais renais e do músculo liso, causando complicações nos rins, coração e cérebro. Ao contrário da maioria das Esfingolipidoses, o seu padrão de transmissão é ligado ao cromossoma X (Schulze e Sandhoff, 2014).

A doença de Gaucher é caracterizada pela acumulação de GlcCer devido à deficiência da enzima β -glucocerebrosidase que é responsável pela hidrólise de GlcCer em Cer e Glc. Clinicamente, esta doença compreende 3 subtipos que diferem quanto à idade de início e progressão da doença, e o grau de envolvimento neurológico. Cerca de 95% dos doentes sofrem do tipo 1 não neuropático, isto é, sem envolvimento do sistema nervoso. Os restantes 5% dos doentes sofrem do tipo 2, que tem início na idade infantil, ou do tipo 3, que se inicia na juventude. Os tipos 2 e 3 afetam o sistema nervoso sendo, por isso, formas mais severas da doença quando comparadas com o tipo 1. Num número muito reduzido de doentes que apresentam alterações na permeabilidade da pele, a morte ocorre pouco depois do nascimento. Os principais sintomas desta doença são: hepatoesplenomegalia, desconforto abdominal, dores nos ossos, fadiga, sangramento e fraturas espontâneas (Schulze e Sandhoff, 2013).

A Leucodistrofia Metacromática é causada pela deficiência da enzima arilsulfatase A. Esta enzima hidrolisa os sulfatídeos em cerebrosídeos e sulfato, originando a acumulação de sulfatídeos nos tecidos do córtex cerebral e na medula óssea. Atraso mental e distúrbios psicológicos são os principais sintomas desenvolvidos (Schulze e Sandhoff, 2014).

A doença de Niemann-Pick type A e B apresenta várias formas consoante o grau de deficiência enzimática. Desenvolve-se uma patologia neurológica severa com diminuição do tempo de vida, na qual se verifica uma acumulação de SM em virtude da deficiente atividade da enzima aSMase. A doença de Niemann-Pick tipo A é causada pela deficiência quase completa de atividade enzimática da aSMase, sendo geralmente fatal entre os 2 e 3 anos de idade. No tipo B, a enzima apresenta atividade residual que é responsável pela diminuição da severidade da doença e pela variabilidade fenotípica, geralmente com pouco envolvimento neurológico. Os principais sintomas são a hepatomegalia e a esplenomegalia (Schulze e Sandhoff, 2014). Existe ainda uma terceira forma da doença conhecida por Niemann-Pick tipo C que é caracterizada pela acumulação lisossomal de colesterol não esterificado devido ao défice de proteínas envolvidas na exportação do colesterol endolisossomal. O espectro dos sintomas clínicos é grande e muito heterogéneo. O fenótipo clínico dos doentes compreende, geralmente, manifestações psiquiátricas, neurológicas e viscerais (Evans e Hendriksz, 2017; Jenkins *et al.*, 2009).

A doença de Krabbe, também conhecida como leucodistrofia das células globóides, é originada pela deficiência da enzima β -galactosilcerebrosidase. Esta enzima é responsável pela hidrólise da GalCer em Cer e Gal. Esta doença é caracterizada pela acumulação do substrato GalCer em células neuronais. Os principais sintomas são: má coordenação nos movimentos, convulsões, surdez, cegueira, espasmos, e deterioração da função mental e motora (Schulze e Sandhoff, 2014).

Por fim, a deficiência da enzima aCDase, responsável pela hidólise da Cer em Sph e ácido gordo, está associada à doença de Farber (DF) que é caracterizada pela acumulação lisossomal de Cer (Schulze e Sandhoff, 2014). Esta deficiência enzimática será detalhada numa secção posterior do presente trabalho.

Em conclusão, estas doenças ilustram bem a importância dos SLs para a homeostasia celular uma vez que défices, totais ou parciais, das enzimas envolvidas no catabolismo destas moléculas lipídicas resultam na acumulação lisossomal dos respetivos substratos e conduzem, em geral, ao desenvolvimento de um quadro clínico severo (Schulze e Sandhoff, 2014).

2. Ceramidases

As ceramidases (N-acilesfingosina amidohidrolase, EC 3.5.1.23, CDases) são enzimas que catalisam a hidrólise da Cer em Sph e ácido gordo. Até à data foram identificadas 3 famílias de CDases que se diferenciam quanto à estrutura primária, pH ótimo de atividade, mecanismo de ação e localização intracelular: a ceramidase alcalina que inclui a forma 1 (AlkCDase1, gene *ACER1/ASAH3*), a forma 2 (AlkCDase2, gene *ACER2/ASAH3L*) e a forma 3 (AlkCDase3, gene *ACER3/PHCA*), a ceramidase neutra (nCDase, gene *ASAH2*) e a a ceramidase ácida (aCDase, gene *ASAHI*). Estas enzimas residem em diferentes compartimentos celulares e atuam em diferentes condições fisiológicas (Kitatani *et al.*, 2015; Saied e Arenz, 2014). A Tabela 2 resume as principais características diferenciadoras das ceramidases.

Tabela 2: Família das ceramidases ¹.

	Ácida	Neutra	Alcalina		
Proteína	aCDase	nCDase	Alk-CDase 1	Alk-CDase 2	Alk-CDase 3
Gene	ASAH1	ASAH2	Acer 1	Acer 2	Acer 3
Localização	Lisossoma	Mitocôndria e RE	RE	Golgi	RE e Golgi
Expressão	Fígado, pulmão, placenta, cérebro, músculo esquelético (coração)	Distribuição ubíqua (pulmão, músculo esquelético, coração)	Distribuição ubíqua (pele)	Pâncreas, coração (placenta)	Distribuição ubíqua (placenta)
Enzima	Cer/Sph	Cer/Sph	Cer/Sph	Cer/Sph	Cer/Sph
Catiões	Ativação	-----	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺
	Inibição		Zn ²⁺ ; Cu ²⁺ ; Mn ²⁺	-----	Zn ²⁺
pH ótimo	4,5	7,5-8,5	8,5	9,0	9,5

¹ Tabela adaptada de Kitatani *et al.*, 2015.

2.1 Ceramidase alcalina

Tal como acima referido, estão descritas três isoformas da AlkCDase codificadas por genes distintos. Os respetivos produtos proteicos correspondem a ~ 31 kDa, o seu pH ótimo de atividade varia entre 8,5-9,5 e estão localizados no RE e/ou CG. A atividade enzimática destas CDases é dependente da presença de catiões Ca²⁺. (Canals *et al.*, 2011; Saied e Arenz, 2014).

A AlkCDase1 está localizada no RE e é altamente expressa nas células da pele, tendo um papel importante na diferenciação dos queratinócitos. Tem especial afinidade para ceramidas insaturadas de cadeia muito longa. A AlkCDase2 está localizada no CG, é muito expressa na placenta, coração e pâncreas e moderadamente noutros tecidos. Usa como substrato ceramidas de cadeia muito longa. A AlkCDase3 encontra-se tanto no RE como no CG e tem preferência por ceramidas de cadeia longa. Tal como acontece com a AlkCDase2, a AlkCDase3 é altamente expressa na maioria dos tecidos, especialmente na placenta. Desta forma, nos tecidos em que as AlkCDases são particularmente expressas a

produção de Sph e SIP, no RE e/ou CG, dependerá da ação destas enzimas (Canals *et al.*, 2011; Coant *et al.*, 2017).

2.2 Ceramidase neutra

Esta enzima foi descrita inicialmente no duodeno humano, em 1969, como uma CDase com pH ótimo de 7,6 (Nilsson, 1969). Posteriormente, a nCDase foi identificada em bactérias, outros tecidos humanos, ratinhos, plantas e fungos. Nas células eucarióticas, esta enzima está localizada no RE e na mitocôndria, podendo também ser encontrada na membrana plasmática e em endossomas. Tem elevada expressão no rim, fígado, intestino (pode ser secretada no lúmen intestinal onde apresenta resistência às proteases pancreáticas) e coração. É uma proteína glicosilada de 116 kDa e a sua atividade enzimática não é afetada pela presença de cátions divalentes (Canals *et al.*, 2011).

2.3 Ceramidase ácida

A aCDase foi descrita em 1963, por Shimon Gatt, a partir de um extrato de cérebro de ratinho (Gatt, 1963). Em meados dos anos 90, a aCDase humana presente na urina humana foi purificada e, passados alguns anos, o cDNA/*ASAH1* foi clonado. Subsequentemente, a enzima foi purificada e caracterizada a partir de diversos tecidos humanos (Li *et al.*, 1998).

A aCDase é produzida sob a forma de um precursor polipeptídico de 53-55 kDa, que é proteoliticamente processado em duas subunidades, a subunidade- α (13 kDa) e a subunidade β (40 kDa), que se mantêm unidas por uma ligação covalente. A enzima localiza-se maioritariamente nos lisossomas, um compartimento celular crucial para a digestão e reciclagem celular (Canals *et al.*, 2011; Zeidan *et al.*, 2008).

A aCDase, embora expressa ubiquamente, é especialmente expressa nos rins, pulmão, placenta, cérebro, músculo-esquelético e coração. O seu pH ótimo de atividade enzimática é 4,5 e apresenta maior afinidade para ceramidas insaturadas de cadeia média (Saied e Arenz, 2014)

2.4 Reóstato ceramida / esfingosina-1-fosfato

Tal como anteriormente referido, as CDases catalisam a reação da hidrólise da Cer em Sph e ácido gordo. A Cer é um lípido que atua como molécula mensageira secundária com o intuito de promover a apoptose e inibir a proliferação celular (Fig. 7). Havendo uma desregulação no nível de transcrição dos respetivos genes codificantes das CDases com repercussão na quantidade de proteína produzida, uma cascata de acontecimentos pode ser desencadeada e afetar negativamente a fisiologia celular. As vias de sinalização afetadas dependerão, pelo menos em parte, da origem subcelular da Cer e/ou das espécies de Cer acumuladas (Canals *et al.*, 2011; Gangoiiti *et al.*,2010; Kolter, 2011; Liu *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2015; Tani *et al.*, 2007).

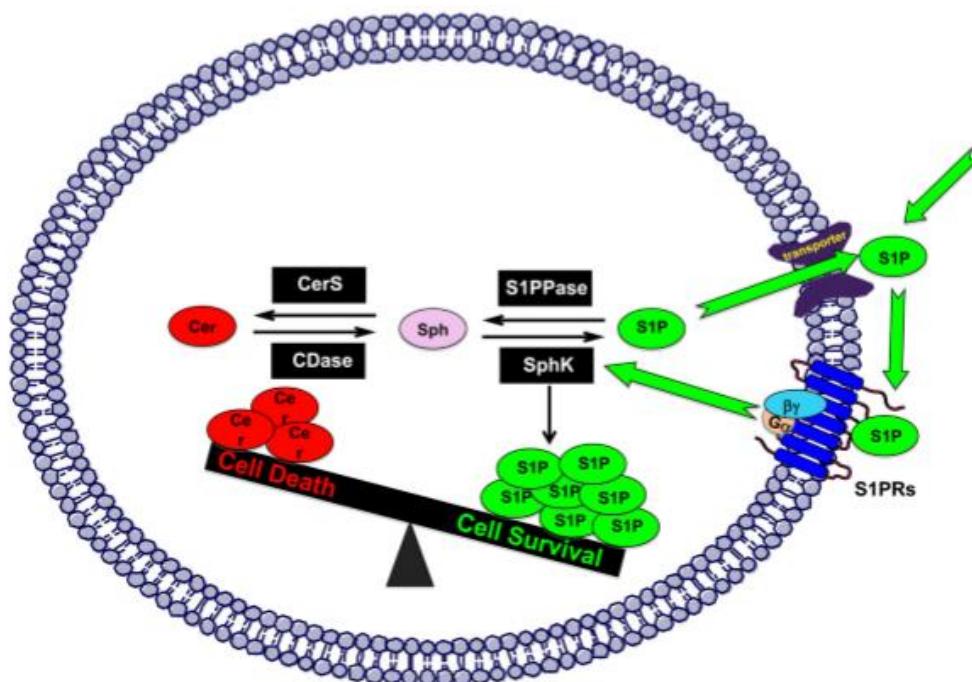


Figura 7: Reóstato ceramida / esfingosina-1-fosfato. A representação do reóstato esfingolipídico evidencia a importância das CDases na regulação dos níveis de Cer e de S1P, incluindo a sinalização membranar S1P/S1PR1 (receptor da S1P). Figura extraída de Newton *et al.*, 2015.

Tal como as outras CDases, a aCDase tem a capacidade de controlar o processo de sinalização mediada por ESLs, reduzindo o nível de ceramida e aumentando, concomitantemente, os níveis de Sph e S1P interferindo, deste modo, com o “reóstato Cer/S1P”. De facto, foi observada a sobre expressão da aCDase na progressão de tumores e na proteção contra a apoptose celular em vários tipos de cancro. Para além disso, estudos recentes sugerem que a sobre expressão da aCDase pode estar implicada na resistência às terapias convencionais utilizadas no tratamento do cancro (Vethakanraj *et al.*, 2015). Por outro lado, a deficiência da aCDase está associada à doença de Farber que é uma doença hereditária do metabolismo dos ESLs, tal como anteriormente referido (Canals *et al.*, 2011). A possibilidade de regulação metabólica da etapa catalizada pela aCDase com vista à reversão destas situações é a seguir desenvolvida.

3. Modulação da atividade da ceramidase ácida

A versatilidade funcional da etapa do metabolismo catalisada pela aCDase sugere que esta enzima pode representar um importante alvo terapêutico em doenças de etiologia diversa. De facto, a aCDase tem sido investigada como um alvo promissor do tratamento do cancro uma vez que a sua inibição sensibiliza as células tumorais à ação das terapias convencionais, reduz o crescimento tumoral e previne as recidivas (Roh *et al.*, 2015; Saied e Arenz, 2015). A possibilidade oposta, correspondente ao aumento da atividade enzimática sob a forma de aCDase recombinante, tem sido igualmente investigada para o tratamento da doença de Farber (Schuchman, 2016). Estas duas situações ilustram a dualidade e importância terapêutica da etapa catabólica dos ESLs catalizada pela aCDase e serão a seguir desenvolvidas.

3.1 Papel no cancro

Tal como mencionado anteriormente, a regulação da transdução de sinal pode ser influenciada pelos ESLs. Deste modo, não é surpreendente que eles possam ter um papel importante na patogénese e na terapia do cancro. De facto, vários estudos têm demonstrado que a quantidade de diversos tipos de ESLs e o nível de expressão de várias enzimas envolvidas no seu metabolismo estão alterados nesta patologia (Kolter, 2011; Gangoiti *et al.*, 2010).

De entre as moléculas esfingolípídicas, a diminuição do nível de Cer tem sido particularmente implicado como causa, direta ou indireta, do cancro. Resultados de vários estudos sugerem que esta alteração bioquímica contribui para a inflamação, maior suscetibilidade de infeções e indução da morte celular. Como já foi referido anteriormente, a aCDase está sobre expressa em vários tipos de cancro, o que resulta na diminuição do nível de Cer e no aumento do nível de S1P. Estas alterações bioquímicas foram relacionadas com a estimulação da proliferação celular e a progressão do cancro. Deste modo, a utilização de inibidores da atividade enzimática da aCDase pode representar um importante co-adjuvante terapêutico, contribuindo para aumentar a apoptose das células tumorais e/ou superar a resistência aos tratamentos por quimioterapia e radioterapia (Delgado *et al.*, 2006; Mahdy *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2015; Saied e Arenz, 2015). No entanto, existe a possibilidade do aumento da atividade da aCDase ser um mecanismo de *feedback* das células tumorais para manter os níveis de Cer baixos após exposição celular ao *stress* sistémico e, desse modo, evitar as suas propriedades apoptóticas (Furuya *et al.*, 2011). Foi, no entanto, demonstrado que a atividade elevada da aCDase altera significativamente a qualidade de expressão das espécies de Cer e, em virtude disso, desencadeia múltiplos efeitos, entre eles o crescimento do tumor, sobrevivência das células cancerígenas e a resistência à terapêutica (Liu *et al.*, 2009).

A sobre expressão da aCDase está descrita em vários tipos de cancro, designadamente no cancro da cabeça e pescoço, próstata, cólon, mama, leucemias e no melanoma (Canals *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2006; Schuchman, 2016).

O cancro da cabeça e pescoço (HNC) refere-se a um tumor que surge no trato aerodigestivo superior, incluindo a cavidade oral e nasal, faringe e laringe. Mais de 90% são carcinomas, denominado por carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (HNSCC) (Sanderson e Ironside, 2002). É o oitavo tipo de cancro mais comum em todo o mundo, registando-se anualmente meio milhão de novos casos. Cerca de metade dos casos detetados já se encontra em fase avançada e o seu tratamento inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cisplatina ou *cisdiamminedichloroplatinum* (II) (CDDP) é usada como um agente de primeira linha em tratamentos do HNC por quimioterapia e radioterapia. Apesar dos avanços registados a nível do seu diagnóstico e terapêutica, as taxas globais de sobrevivência não aumentaram substancialmente nas últimas três décadas. Este facto pode ser explicado, pelo menos em parte, pela resistência das células cancerígenas às terapias, incluindo a cisplatina e a radiação. Foi demonstrada a sobre expressão de aCDase em mais de 70% nos tecidos e linhas celulares HNC comparativamente aos tecidos e células de indivíduos saudáveis, e essa sobre expressão associada à resistência aos agentes quimioterápicos convencionais. A aCDase atua cooperativamente com uma proteína cinase B, também conhecida por Akt, que tem um papel importante no processo de proliferação celular, promovendo a invasividade e a resistência à apoptose. Foi também demonstrado que o efeito citotóxico da quimioterapia ou da radioterapia é aumentado quando a produção de ceramidas é inibida. Deste modo, a modulação do metabolismo da ceramida, nomeadamente através da redução da atividade enzimática da aCDase, representa uma abordagem terapêutica atrativa (Roh *et al.*, 2015). De facto, o efeito citotóxico da cisplatina no HNC foi avaliado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Roh *et al.*, 2015). Inicialmente, células de HNC foram administradas a ratinhos e após o seu implante e formação de nódulos palpáveis, o tratamento foi iniciado. Os ratinhos foram randomizados em quatro grupos: veículo, cisplatina, NOE (*N-oleylethanolamine*, inibidor da aCDase) e cisplatina + NOE. O diâmetro e volume dos tumores foi medido todos os dias. A combinação do tratamento com cisplatina e NOE suprimiu sinergicamente o crescimento do tumor *in vivo* e a produção de ceramida foi maior nos tecidos cancerígenos tratados com cisplatina combinada com NOE do que apenas a cisplatina. Com base nestes resultados, os autores do estudo concluíram que o efeito citotóxico da cisplatina no HNC é substancialmente aumentado através do

sinergismo com NOE. Para além disso, a taxa de inibição da atividade enzimática de aCDase correlacionou-se com aumento da concentração de ceramida (Roh *et al.*, 2015).

O cancro da próstata é o tipo de cancro mais frequente nos EUA e o segundo tipo de cancro mais mortal em homens americanos. Apesar da consciencialização que presentemente existe sobre a doença e da melhoria dos métodos de deteção precoce, uma grande proporção de doentes com cancro da próstata morrem de doença metastática e recorrente que é resistente às terapias convencionais, incluindo cirurgia e/ou radiação. Após terapia por radiação, cerca de 20-25% dos doentes sofrem recidiva da doença. Uma das razões para o fracasso na erradicação das células cancerígenas é a radiorresistência dos tumores (Furuya *et al.*, 2011). Foi demonstrado que a aCDase está sobre expressa nos tecidos do cancro da próstata primário, o que sugere que a enzima deverá ter um papel decisivo no desenvolvimento deste tipo de cancro (Camacho *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009; Seelan *et al.*, 2010). Os resultados de vários estudos sugerem, de facto, que a aCDase funciona como um regulador crítico da progressão do cancro da próstata, afetando não só a proliferação e migração das células tumorais, mas também as respostas à quimioterapia (Furuya *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2009). Assim, também neste tipo de cancro a aCDase pode ser uma enzima-chave do processo de controlo da resistência à radiação e/ou quimioterapia.

O cancro cólon-rectal (CRC) é o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado em países ocidentais. A idade, obesidade, inatividade física, dieta rica em carne vermelha e processada, consumo de álcool, entre outros são fatores de risco para o desenvolvimento do CRC. A hereditariedade também pode ser um fator importante envolvido na sua ocorrência (Liu *et al.*, 2009). Resultados de diversos estudos mostraram que a aCDase está sobre expressa no CRC, tornando as células mais resistentes à apoptose, mesmo sob ação farmacológica. No entanto, como a nCDase tem elevada expressão no intestino e cólon não é de excluir o seu envolvimento na carcinogénese do cólon. Apesar da expressão da aCDase não ser particularmente expressiva no cólon, fármacos dirigidos para a inibição da atividade da enzima têm sido investigados uma vez que a sua inibição sensibiliza as células tumorais quanto aos efeitos de agentes antineoplásicos, como é o exemplo do NOE e D-e-MAPP, (1*S*, 2*R*) - *D*-erythro-2- (*N*-myristoylamino) -1-phenil-1-propanol (Realini *et al.*, 2013). Estes compostos possuem várias limitações que irão ser

abordadas posteriormente. Na tentativa de ultrapassar essas limitações, surgiu o Carmofur, um potente inibidor *in vivo* da atividade intracelular da aCDase. Este composto é clinicamente utilizado no Japão desde 1981 no tratamento do CRC (Doan *et al.*, 2017). Foi demonstrado que o efeito anti-proliferativo do Carmofur está associado à modulação da atividade enzimática da aCDase. Modificações na estrutura química da molécula levaram à descoberta de outros inibidores mais eficazes (Realini *et al.*, 2013). Recentemente, a aCDase foi identificada como um regulador da sobrevivência de células do cancro do cólon. A inibição da sua atividade enzimática resultou no aumento do nível de Cer, na perda de β -catenina que é uma das proteínas implicadas no desenvolvimento do cancro de cólon, e na diminuição do crescimento do tumor. Estas observações sugerem que a aCDase pode emergir como alvo terapêutico no cancro do cólon (Coant *et al.*, 2016).

O cancro da mama é o tipo de cancro mais comum nas mulheres, sendo a causa mais comum de morte em mulheres entre os 20-59 anos. Este tipo de cancro é classificado em três subtipos de acordo com o tipo de recetor hormonal que é produzido - recetor de estrogénio (ER), recetor de progesterona (PR) e o recetor de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Cerca de 70% dos tumores expressam o ER (Vethakanraj *et al.*, 2015).

O tamoxifeno é um pró-fármaco com afinidade para o ER que é metabolizado no citocromo P450, no fígado, produzindo os metabolitos ativos *4-hydroxytamoxifen* e o *N-desmethyltamoxifen* (DMT) (Fig.8), sendo este último o mais proeminente nos humanos. O tamoxifeno é o princípio ativo de primeira escolha o cancro da mama ER+, induzindo morte celular por antagonizar seletivamente a sobrevivência e a proliferação celular mediada pelo estrogénio. No entanto, este efeito também foi observado em cancros da mama ER-, o que indica que o seu efeito é independente do ER. No cancro da mama também é observada resistência aos tratamentos por quimioterapia. Estudos recentes sugerem que a sobre expressão da aCDase tem um papel importante no desenvolvimento dessa resistência (Morad e Cabot, 2015; Vethakanraj *et al.*, 2015). A primeira demonstração da inibição da aCDase pelo tamoxifeno foi conduzida em células do cancro da mama mutadas para p53. Neste caso, apenas os metabolitos ativos do tamoxifeno inibiram a atividade enzimática da aCDase. Em linhas celulares do cancro da mama, o tamoxifeno é considerado mais potente que outros inibidores da aCDase, tais como NOE, B13 e DM102. Entretanto, Ceranib-2 tem mostrado ser mais potente que o tamoxifeno

devido à sua habilidade em induzir a apoptose tanto em câncros do tipo ER+ como ER-. Deste modo, é possível que, no futuro, Ceranib-2 venha a ser utilizado como agente terapêutico do cancro da mama (Morad e Cabot, 2015).

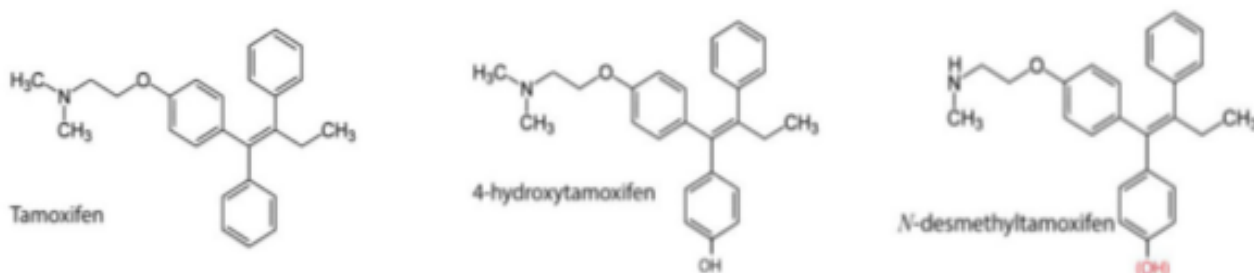


Figura 8: Estrutura química de Tamoxifeno e seus metabolitos ativos. O tamoxifeno é composto por um núcleo aromático trifeniletileno e por uma cadeia lateral aminoetoxi. Os seus metabolitos ativos são *4-hidroxitamoxifen* e *N-desmetiltamoxifen*. O *4-hidroxitamoxifen* é um potente anti-estrogénio. Figura adaptada de Morad e Cabot, 2015.

A leucemia mieloide aguda (AML) é um grupo de doenças heterogêneas hematológicas caracterizadas por alterações moleculares em células hematopoiéticas que originam diferenciação e proliferação descontrolada. Os doentes com AML apresentam, geralmente, níveis elevados de células leucémicas imaturas que se acumulam na medula óssea e no sangue periférico, com infiltração nos órgãos. A quimioterapia revela-se eficaz em 50-80% dos casos. A aCDase foi identificada como um novo alvo terapêutico para a AML. Depois de vários estudos, Tan *et al.*, mostraram que a aCDase encontra-se elevada em pacientes com AML, aumentando os níveis de ceramida e diminuindo os de S1P, ou seja, pode estimular a sobrevivência da AML. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que LCL204 diminui a viabilidade celular induzindo a apoptose, aumenta os níveis de Cer em apenas 12h e diminui o lípido anti-apoptótico, S1P (Tan *et al.*, 2016). A sobreexpressão da aCDase foi interpretada como conferindo resistência farmacológica à indução da apoptose, enquanto a sua inibição sensibiliza as células à ação terapêutica anti-cancro (Ortega *et al.*, 2017).

O melanoma é uma das formas mais agressivas do cancro humano que geralmente está associado a um mau prognóstico se não for diagnosticado numa fase precoce. O melanoma é muito resistente à quimioterapia e à radioterapia. A expressão da aCDase está marcadamente aumentada em melanócitos normais humanos e em linhas celulares proliferativas do melanoma, comparativamente a outras células celulares como queratinócitos e fibroblastos. Uma expressão elevada de aCDase foi também observada em biópsias de tecidos humanos com melanoma numa fase mais avançada da doença. Para além disso, foi observado que para níveis elevados de expressão da aCDase, as células do melanoma produzem proporcionalmente menores quantidades de ceramidas do que os melanócitos (Realini *et al.*, 2016). Os fármacos utilizados como terapia adjuvante são a cisplatina, taxol, dacarbazina, entre outros. Deste modo, os inibidores da atividade enzimática da aCDase poderão ser utilizados como adjuvantes na terapia do melanoma avançado (Lai *et al.*, 2017).

3.2 Análogos da Ceramida

Tal como referido anteriormente, uma das estratégias que tem vindo a ser utilizada para aumentar o nível de apoptose e reduzir o crescimento celular consiste no aumento indireto do nível intracelular de Cer por via farmacológica. Deste ponto de vista, a utilização de análogos da Cer endógena também representaria uma possibilidade atrativa. No entanto, a baixa solubilidade e biodisponibilidades dos análogos de Cer, especialmente ceramidas com ácidos gordos de cadeia longa, levantam problemas na sua distribuição como agentes quimioterápicos *in vivo* (Ponnusamy *et al.*, 2010).

As ceramidas contêm uma base esfingóide de cadeia longa, a Sph, que se encontra ligada a um ácido gordo através de uma ligação amida. Uma característica comum a todas as ceramidas é a presença da ligação dupla 4,5-trans no esqueleto da Sph. Deste modo, o desenvolvimento de análogos de ceramida, tais como S18, PDMP e FTY720, recapitulou esta característica. Os segmentos 2-amino-1,3-propanediol ou 2-aminopropanol são consideradas características comuns dos análogos das ceramidas. Para aumentar a sua

solubilidade em água, o ácido gordo da cadeia longa da Cer é substituído por ácidos gordos de cadeia curta (e.g., ácido acético, hexanóico e octanóico) com formação de ceramidas C2-, C6- e C8-. (Fig. 9). Em vários estudos pré-clínicos, a exposição das células cancerígenas a ceramidas de cadeia curta resultou numa atividade anticancerígena semelhante à obtida com o aumento do nível de Cer endógena (Liu *et al.*, 2013)

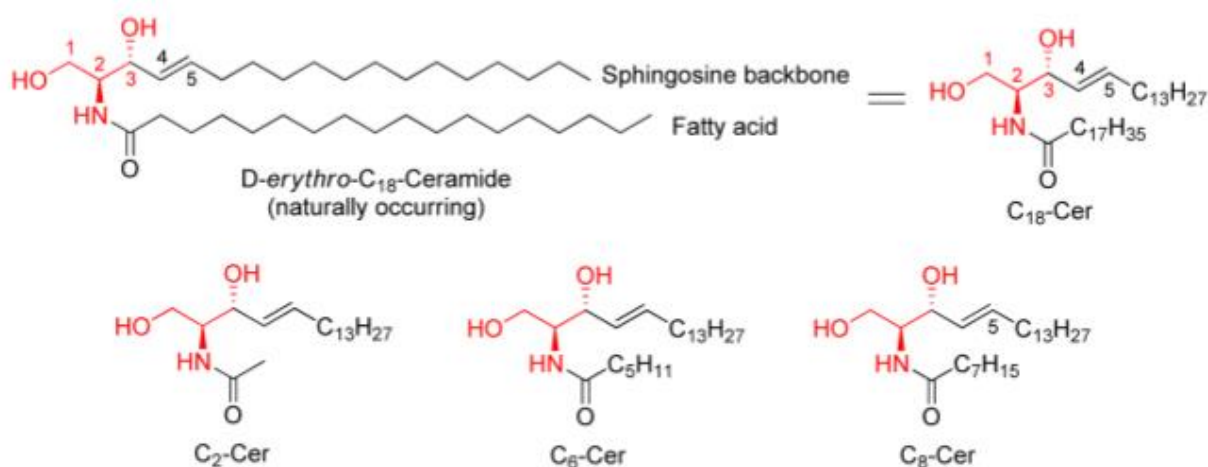


Figura 9: Estrutura da ceramida natural e de ceramidas sintéticas. D-erythro-C18-ceramida (C18-Cer) e ceramidas de cadeia curta sintéticas, C2-Cer, C6-Cer e C8-Cer. Figura retirada de Liu *et al.*, 2009.

3.3 Inibidores da Ceramidase Ácida

Segundo a literatura, os inibidores da aCDase são descritos como potentes compostos de pequenas moléculas capazes de inibir a enzima *in vivo* (Pizzirani *et al.*, 2013). NOE (*N-oleylethanolamine*) (Fig.10) foi o primeiro composto inibidor da aCDase usado em estudos de biologia celular. Conhecido atualmente como uma molécula endocanabinóide, sabe-se que aumenta os níveis endógenos de Cer e induz a apoptose em diferentes linhas celulares. Possui baixa afinidade (0.5 M) e pouca seletividade, o que o exclui de qualquer uso terapêutico. Em estudos posteriores, uma série de estruturas análogas do NOE foram desenvolvidas e detalhadas segundo a relação estrutura-atividade (SAR), revelando alguns desses análogos como inibidores mais potentes da atividade enzimática da aCDase (Saied e Arenz, 2015).

Bielawska e colaboradores, em 2008, desenvolveram, um conjunto de análogos de ceramida aromática lipofílica como agentes anticarcinogénicos que aumentam os níveis de ceramida endógena e induzem a apoptose em diferentes linhas celulares. O (1S, 2R) - *D-erythro-2- (N-myristoylamino) -1-phenil-1-propanol* (D-e-MAPP) (Fig.10) inibe seletivamente a alkCDase isolada a partir do extrato de células de leucemia promielocítica. (Saied e Arenz, 2015; Delgado *et al.*, 2006). Adicionalmente, também atua como inibidor seletivo no melanoma humano (Proksch *et al.*, 2010).

B-13 (Fig. 10), análogo do D-e-MAPP, é um inibidor potente e seletivo inibidor da atividade enzimática da aCDase *in vitro*, sem atividade contra a alkCDase e a nCDase (Bai *et al.*, 2017). No melanoma humano, aumenta o nível de Cer e induz a apoptose em linhas celulares cancerígenas (Proksch *et al.*, 2010). Resultados de vários estudos mostraram também que este composto é eficaz em induzir, em cerca de 90%, a apoptose das células do cancro do cólon e reduzir o crescimento do tumor no cólon em ratinhos (Canals *et al.*, 2011). No entanto, o composto é uma molécula lipofílica neutra e, portanto, não é capaz de se acumular de forma eficiente e específica nos lisossomas, local onde a aCDase reside. O mecanismo de inibição da aCDase não é, por isso, bem conhecido (Proksch *et al.*, 2010).

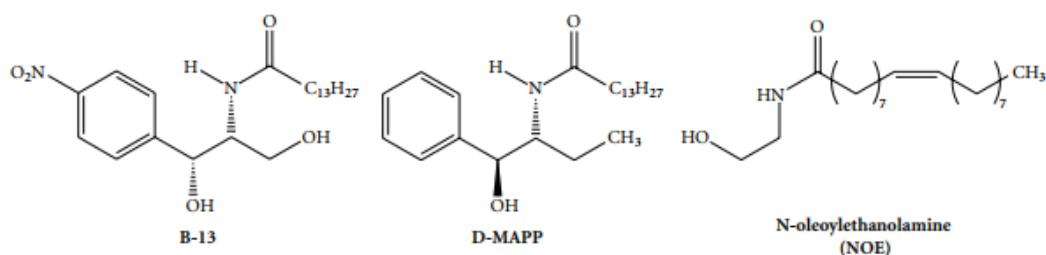


Figura 10: Estruturas dos inibidores de 1^a geração da aCDase. Figura extraída de Proksch *et al.*, 2010.

No sentido de melhorar a potência e a seletividade da inibição enzimática da aCDase, foram desenvolvidos uma primeira série de análogos de LCL, incluindo o LCL204 (análogo lisossomotrópico de B13) e o LCL85 (análogo mitocondrótico catiónico de D-e-MAPP) (Fig.11). Estes apresentam maiores taxas de enriquecimento subcelular e inibição *in situ* da aCDase geralmente maiores do que os compostos de origem. Em células do cancro da mama e do cancro do cólon, o LCL85 apresenta menor toxicidade e um maior efeito inibitório do crescimento celular quando comparado com o D-MAPP. Adicionalmente, também sensibiliza as células do cancro da próstata à radiação e diminui o crescimento do tumor. Relativamente ao LCL204, foi observado que induz o aumento do nível de Cer e diminui o nível de Sph em células do cancro da próstata e que induz as células do HNC à morte celular, *in vitro* e *in vivo* (Canals *et al.*, 2011). Foi também observado que induz a permeabilização lisossomal e a degradação da aCDase (Proksch *et al.*, 2010).

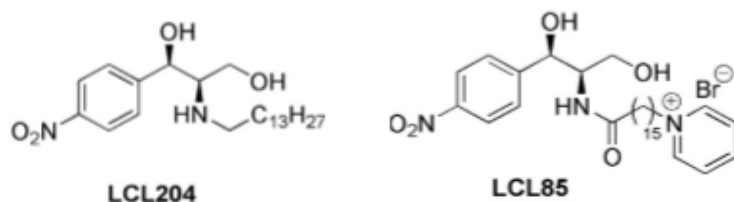


Figura 11: Estrutura da primeira série de análogos de LCL. LCL204 e LCL85 são análogos estruturalmente modificados de B13 e D-e-MAPP, respectivamente. Figura retirada de Saied e Arenz, 2015.

LCL464, um representante da segunda série de análogos, inibe significativamente a atividade lisossomal da aCDase em células MCF-7 (linha celular de cancro da mama), com uma maior potência relativamente ao B13, mas mostrou inibir a aCDase apenas *in vitro* (Saied e Arenz, 2015).

Como foi referido anteriormente, B13 não se acumula de forma eficiente nos lisossomas. Para tentar ultrapassar este problema, Bai et al., desenvolveram um conjunto de pró-fármacos *N,N*-dimethylglycine (DMG) -B13, entre eles, o LCL521, LCL522 e LCL596. Em células MCF-7, todos os pró-fármacos DMG-B13 têm mostrado ser eficientes na libertação do B13, sendo esta completa no caso dos mono-DMG-B13 (LCL522 e LCL596) e menos eficiente com os derivados Di-DMG-B13 (LCL521). De facto, todos os derivados DMG-B13 mostraram inibir a atividade enzimática da aCDase e essa inibição foi acompanhada da drástica diminuição de Sph, e de forma coincidente com o aumento do nível do B13 na forma livre (Bai *et al.*, 2017). No entanto, o LCL521 mostrou ser o análogo mais ativo porque inibe especificamente a atividade enzimática da aCDase, ao contrário do observado com o LCL522 e o LCL596 que também inibem a atividade enzimática da alkCDase e da nCDase. A sua utilização em combinação com a aplicação de radiação ionizante previne a recidiva do tumor do cancro da próstata. No geral, a

grande desvantagem destes inibidores é a sua baixa afinidade e potência. No entanto, o desenvolvimento e caracterização dos inibidores de 1^a geração foram importantes para explorar a potencialidade terapêutica da inibição da atividade enzimática da aCDase (Elojeimy *et al.*, 2007; Proksch *et al.*, 2010; Saied e Arenz, 2015).

Draper e colaboradores, em 2011, identificaram uma nova classe de compostos baseados em quinolinona. O composto representativo desta classe é o Ceranib-2 (Fig. 12). Os estudos efetuados com Ceranib-2 mostraram a sua capacidade de inibição, independentemente da dose, da atividade da aCDase em ensaios *in vitro*, bem como a acumulação de ceramidas e a redução dos níveis de esfingosina e S1P. Além disso, a utilização de Ceranib-2, isolado ou em combinação com paclitaxel, inibe a proliferação celular, interrompe o ciclo celular e o crescimento do tumor do ovário humano sem supressão hematológica ou sinais de toxicidade. (Draper *et al.*, 2011; Saied e Arenz, 2015).

Pizzirani *et al.*, identificaram e caracterizaram 2,4-dioxopirimidina-1-carboxamida como uma nova classe de pequenas moléculas inibidoras da aCDase. Concluíram que os derivados de uracilo são críticos na inibição da atividade enzimática da aCDase. Esta observação desencadeou o aparecimento do primeiro inibidor nanomolar desta enzima. Esta classe atua sinergicamente com fármacos anti-neoplásicos, como 5-fluorouracilo (5-FU) e taxol, inibindo a proliferação das células cancerígenas (Pizzirani *et al.*, 2013). Através de estudos preliminares, o mesmo grupo identificou Carmofur (Fig. 12) como o primeiro inibidor nanomolar da atividade da aCDase usado clinicamente no tratamento do cancro colo-retal. É um pró-fármaco que liberta 5-FU para inibir a timidilato sintase. A sua capacidade de interferir com atividade da enzima é uma ação essencial para os seus efeitos anti-proliferativos, aumentando os níveis de ceramida intracelular *in vivo* e *in vitro* (Pizzirani *et al.*, 2013). Deste modo, a sua modulação estrutural poderá possibilitar, no futuro, o aumento da eficácia terapêutica de fármacos antitumorais padrão (Realini *et al.*, 2013; Saied e Arenz, 2015).

O mesmo grupo de investigadores identificou uma nova classe de benzoxazolona carboxamidas, como os primeiros inibidores potentes e sistemáticos da aCDase

intracelular. Esta classe de compostos é caracterizada por inibir a atividade da aCDase através de uma ligação covalente (via S-acilação) à cisteína catalítica (Cys-143) da enzima (Bach *et al.*, 2015). Com os estudos SAR da benzoxazinolona 3-carboxamida, foi concluído que a 3-carboxamida é componente estrutural obrigatório para a inibição da atividade enzimática e que a introdução de um grupo *p*-fluorofenilo no anel de benzoxazinolona é vantajosa porque aumenta a estabilidade do composto (Pizzirani *et al.*, 2015). Um dos compostos análogos desenvolvidos durante esses estudos, 17a (Fig. 12), mostrou ser eficiente na inibição da aCDase, com elevada estabilidade. Verificou-se ser eficaz nas células cancerígenas do cólon, aumentando o nível intracelular de Cer e diminuindo o nível de Sph (Saied e Arenz, 2015).

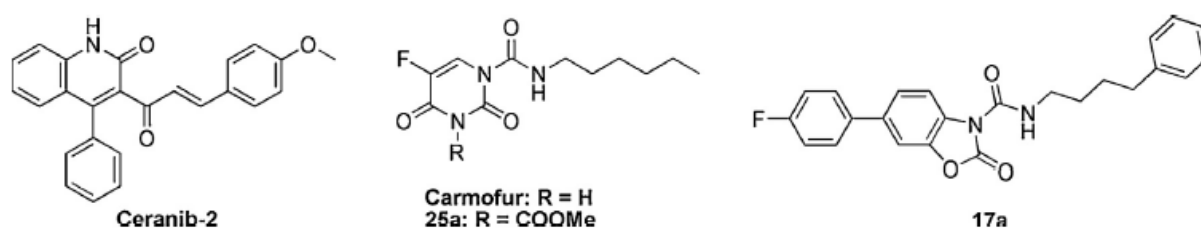


Figura 12: Seleção de inibidores de 2ª geração da aCDase. Figura extraída de Saied e Arenz, 2015.

A pesquisa de novos inibidores da atividade enzimática da aCDase, com uma potência e seletividade superior, baseiam-se em estudos de SAR que implicam a utilização de ensaios enzimáticos. Vários ensaios foram desenvolvidos para determinar a atividade enzimática da aCDase, tanto *in vitro* como *in vivo*. Um dos ensaios mais comuns e originalmente usado na identificação do déficit enzimático na doença de Farber consiste na utilização de ceramidas marcadas radioativamente. Uma alternativa a este tipo de ensaios são os ensaios espectroscópicos de fluorescência, que determinam a atividade enzimática da aCDase monitorizando, por fluorimetria, a liberação, após hidrólise, da

molécula fluorescente do substrato, por exemplo o Cer-C12-BODIPY. A grande vantagem da fluorescência não é apenas evitar a utilização de compostos radioativos, mas também a possibilidade de combinar esses ensaios com a análise semi-automática através de HPLC (*High-performance liquid chromatography*). No entanto, esta semi-automatização não está adaptada para permitir o estudo, em simultâneo, de muitas amostras e, subsequentemente, a avaliação da capacidade inibitória de vários compostos. Outra desvantagem inerente à de substratos sintéticos para monitorizar a atividade da aCDase prende-se com o facto de estes poderem conduzir a resultados discrepantes daqueles que seriam obtidos com substratos naturais. Outra alternativa para a determinação da atividade enzimática da aCDase é usar a ceramida natural como substrato. Neste tipo de ensaios, a atividade ceramidase pode ser detetada a partir da intensidade de emissão fluorescente da esfingosina produzida, depois da sua derivatização com compostos fluorescentes (Bernardo *et al.*, 1995; Saied e Arenz, 2015). Recentemente foram desenvolvidas sondas baseadas na atividade do composto inibidor Carmofur para visualização (com fluorescência) e identificação (biotinilado) da atividade da aCDase humana (Ouaiiry *et al.*, 2015).

3.4 Sobre-expressão da ceramidase ácida

3.4.1 Doença de Farber

A Doença de Farber (DF), também conhecida por lipogranulomatose, é uma doença rara e fatal. Foi descrita pela primeira vez em 1957, por Sidney Farber, como um transtorno metabólico hereditário (Farber *et al.*, 1957). Até agora, a doença foi identificada em apenas 80 pessoas em todo o mundo (Coant *et al.*, 2017). O respetivo défice enzimático de aCDase foi demonstrado em 1972, por Sugita *et al.*, em tecidos *post mortem* de dois doentes com DF e em fibroblastos da pele cultivados ou glóbulos brancos do sangue periférico de outros doentes. As amostras biológicas foram incubadas com ceramida radioativa e a análise comparativa com amostras controlo mostrou que as células dos doentes não degradavam a ceramida exógena marcada radioativamente, ao contrário do que era observada em células controlo de indivíduos clinicamente não afetados com a doença. A maioria da ceramida radioativa foi observada na fração lisossomal,

confirmando, assim, tratar-se de um déficit enzimático lisossomal e permitindo definir a DF como uma DLS (Sugita *et al.*, 1972).

A DF é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene *ASAHI* que codifica a aCDase. A aCDase é uma enzima lisossomal solúvel responsável por degradar a ceramida. Baixos níveis da atividade de aCDase ($\leq 10\%$) resultam numa acumulação progressiva de Cer nos tecidos, nomeadamente a nível do coração, fígado, rim e baço (Fig. 13). Esta doença é caracterizada pela tríade de sintomas correspondentes a deformação articular, responsável por fortes dores nas articulações e tendões, rouquidão progressiva, e desenvolvimento de nódulos subcutâneos. Os doentes podem apresentar esplenomegalia, linfocitose e excesso de infiltração de macrófagos para vários órgãos. A doença afeta principalmente crianças. Os sintomas aparecem, geralmente, poucos meses após o nascimento e continuam a acentuar-se progressivamente, com alterações cardíacas, envolvimento neurológico e insuficiência respiratória, conduzindo frequentemente à morte durante os primeiros anos de vida (Sands, 2013). A DF compreende aparenta ter três subtipos clínicos principais: a forma clássica da doença, com envolvimento neurológico, em que os doentes apresentam um início precoce de sintomas, geralmente a partir dos 3-6 meses de idade, e morrem entre o primeiro e terceiro ano de vida; a forma intermédia na qual predominam as dores articulares e o sistema nervoso central não está necessariamente afetado; e a forma mais suave em que os doentes apresentam sintomas menos graves, sem envolvimento neurológico e podem sobreviver até à idade adulta (Sands, 2013; Schuchman, 2016). O transplante de células estaminais hematopoiéticas é o único tratamento atualmente disponível para esta doença, mas não é consistentemente bem-sucedido (Dworski *et al.*, 2016). Este tratamento reduz a dor e, em alguns casos, os nódulos desaparecem, aumentando a mobilidade. No entanto, não previne o deterioramento progressivo neurológico (Schuchman, 2016).

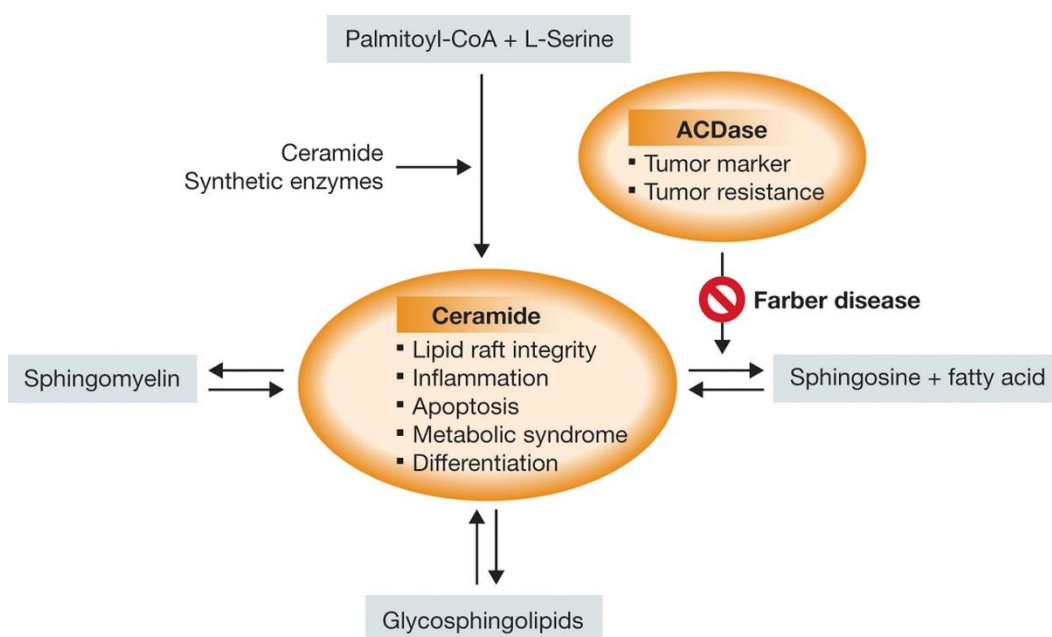


Figura 13: O binómio ceramida/ceramidase ácida na doença de Farber. A deficiente atividade enzimática da aCDase resulta na acumulação de ceramida que está associada à Doença de Farber. Figura extraída de Sands, 2013.

O diagnóstico da DF pode ser efetuado através da determinação da atividade da aCDase e/ou identificação de mutações patogénicas através da sequenciação do gene *ASAH1*. A atividade da enzima é determinada em leucócitos isolados a partir de sangue periférico ou a partir de culturas de fibroblastos da pele obtidos por biópsia. No entanto, a DF pode estar subdiagnosticada uma vez que o reduzido número de casos clínicos descritos até à data não permite estabelecer um historial alargado a formas atípicas da doença que, desse modo, não serão identificadas. Por outro lado, as alterações articulares que se observam na DF podem ser confundidas com a artrite juvenil idiopática (JIA). De facto, cerca de 36% de casos de doentes com DF foram inicialmente diagnosticados com JIA (Hugle *et al.*, 2014).

Tabela 3: Características clínicas da doença de Farber e da Artrite Juvenil Idiopática ¹.

Doença de Farber	Artrite Juvenil Idiopática
Doença progressiva	Doença episódica
Articulações grandes e pequenas afetadas, com simetria bilateral	Articulações afetadas de forma irregular
Primeiros sintomas geralmente antes do primeiro ano de idade	Sintomas antes do primeiro ano de vida é muito raro
Nódulos subcutâneos múltiplos	Presença de nódulos é muito raro (com exceção de adolescentes seropositivos de artrite)
Dor nas articulações é a dor predominante	Dor nas articulações em crianças é raro
Outros sintomas: voz rouca, hepatomegalia, esplenomegalia e uveíte crónica	Outro sintoma: uveíte crónica

¹ Tabela adaptada de Hugle et al., 2014.

3.4.2 Papel na Fibrose Cística

A Fibrose Cística (CF) é uma doença hereditária com transmissão autossómica recessiva. Esta doença é causada por mutações no gene *CFTR* (regulador de condutância transmembranar da fibrose cística), resultando em complicações pulmonares e intestinais. Na CF, a doença pulmonar é a causa mais prevalente de morbidade e mortalidade e inclui infeções agudas e crónicas com vários patógenos. Esta doença é caracterizada pela inflamação crónica das vias aéreas com desequilíbrios entre as citocinas (Schuchman, 2016).

Vários estudos demonstraram que a deficiência no CFTR resulta numa acumulação de Cer nos brônquios, traqueia, intestinos, células epiteliais nasais e macrófagos alveolares de doentes com CF. A acumulação de ceramidas contribui para a vasoconstrição pulmonar mediada pelo CFTR e a perda da função do CFTR prejudica a função da barreira das células endoteliais do pulmão e aumenta a suscetibilidade ao dano microvascular causado pelo fumo do cigarro (Shuchman, 2016). Mais de 80% de doentes adultos com CF estão infetados com *P.aeruginosa*. Nas vias aéreas destes doentes, o nível de Cer está aumentado e observa-se uma diminuição da Sph. Foi também demonstrado que um nível adequado de Cer e Sph defende e protege contra a infeção por *P.aeruginosa*. Neste caso, a terapia com aCDase pode simultaneamente restaurar o balanço entre estas moléculas esfingolípídicas, ou seja, diminuir a Cer e aumentar a Sph de modo a corrigir a infecciosidade e reduzir a inflamação crónica. Os doentes com a DF têm maior probabilidade de adquirir infeções pulmonares. Pode ser interessante estudar a função da CFTR em doentes de Farber já que é a insuficiência respiratória que, geralmente, conduz à morte (Schuchman, 2016).

3.4.3 Medicamento-órfão

Cerca de 30 milhões de pessoas que vivem na União Europeia sofrem de uma doença rara. A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) desempenha um papel central na promoção do desenvolvimento de medicamentos para doenças raras, denominados de medicamentos órfãos, bem como na autorização para a sua comercialização. De acordo com a EMA, o investimento necessário à investigação de medicamentos para tratar doenças raras pode ser desproporcionado em relação ao retorno esperado do ponto de vista económico, por ser destinado a um número restrito de doentes. Segundo o 3º artigo do Regulamento CE n.º 141/2000, “um medicamento órfão é aquele que se destina ao diagnóstico, prevenção ou tratamento de uma patologia que ponha a vida em perigo, seja cronicamente debilitante e que afete até cinco em cada 10 mil pessoas, ou uma patologia que ponha a vida em perigo, seja gravemente debilitante ou seja grave e crónica, sendo pouco provável que, sem incentivos, a comercialização desse medicamento possa gerar receitas que justifiquem o investimento necessário”. Este artigo veio criar incentivos à investigação e desenvolvimento de medicamentos órfãos, assim como à sua introdução

no mercado, contribuindo de forma significativa para o aumento da investigação na área das doenças raras.

Atualmente, a forma recombinante da ceramidase ácida humana, conhecida por RVT-801, encontra-se em fase de avaliação pré-clínica. É considerada um medicamento-órfão que poderá ser utilizado no tratamento da doença de Farber. Este medicamento órfão poderá ter outras aplicações, nomeadamente nas situações clínicas em que a diminuição da atividade enzimática de aCDase esteja secundariamente implicada na patogénese da doença, como é o caso da fibrose cística, e em situações venham a ser identificadas, no futuro, e que beneficiem deste tipo de terapia de substituição enzimática (Schuchman, 2016).

III. Conclusão e perspectivas futuras

O estudo da aCDase teve início há mais de 50 anos por um pequeno grupo de bioquímicos que investigaram os princípios básicos do metabolismo dos ESLs. A sua importância no metabolismo da Cer tem sido explorada desde então, com impacto significativo no avanço do conhecimento sobre a importância da Cer / aCDase na fisiologia celular. A desregulação primária do metabolismo dos ESLs está associado a um grupo de patologias graves, as Esfingolipidoses. No entanto, a desregulação secundária desse metabolismo tem sido implicada em doenças diversas, tais como a doença de Alzheimer, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e o cancro (Schuchman, 2016).

A aCDase é uma enzima que hidrolisa a Cer em Sph e ácido gordo. A Sph pode, subsequentemente, ser convertida em S1P por ação da esfingosina cinase. Alterações na atividade enzimática da aCDase podem ter impacto no nível de equilíbrio de Cer/S1P. Como esta razão funciona como um sensor intracelular, a alteração no nível intracelular de Cer ou S1P pode determinar o destino da célula. Deste ponto de vista, a Cer atua como molécula pró-apoptica e a S1P como molécula anti-apoptica. Também por isso, a aCDase tem sido investigada como um alvo promissor do tratamento do cancro, uma vez que a sua inibição sensibiliza as células tumorais à ação dos agentes terapêuticos convencionais, reduz o crescimento tumoral e previne as recidivas. Neste âmbito, os estudos de identificação e caracterização de análogos da Cer e de inibidores da atividade enzimática da aCDase tem suscitado especial interesse, constituindo atualmente uma área ativa e exponencialmente crescente da investigação do cancro. A possibilidade oposta, representada pelo aumento da atividade enzimática sob a forma de aCDase recombinante, tem sido igualmente investigada para o tratamento de doenças caracterizadas por défice de atividade enzimática da aCDase, como é o caso da Esfingolipidose conhecida por doença de Farber. Apesar da aCDase ser uma enzima solúvel, a tecnologia da aCDase recombinante ainda é muito recente. Estes estudos encontram-se em fase pré-clínica, mas os investigadores acreditam que a sua continuidade trará resultados promissores (Coant *et al.*, 2017; Gangoiti *et al.*, 2010; Gault *et al.*, 2010; Hannun e Obeid, 2011; Holthuis e Igarashi, 2014; Schuchman, 2016).

Em conclusão, a modulação da atividade enzimática da aCDase representa uma estratégia promissora na terapia de doenças que apresentem alterações no metabolismo da Cer, designadamente a nível da etapa catalisada por esta enzima. Essa estratégia combinada com os padrões terapêuticos atuais deverão resultar na diminuição da morbidade e mortalidade e, subsequentemente, na melhoria da qualidade de vida dos doentes afetados com essas doenças.

A continuidade da investigação nesta área deverá permitir uma melhor compreensão acerca, por exemplo, da importância biológica dos diferentes tipos de ceramidas, e seus derivados, e da sua localização subcelular, dos mecanismos de ação dos inibidores da atividade enzimática da aCDase, bem como da importância destes ESLs como biomarcadores de processos patológicos. Futuramente, a aCDase recombinante pode vir a ser utilizada como agente anti-infeccioso noutros contextos distintos da fibrose cística, incluindo doentes imunodeprimidos, sépsis ou com feridas abertas (Schuchman, 2016).

IV. Bibliografia

Bach, A., Pizzirani, D., Realini, N., Vozella, V., Russo, D., Penna, I., Melzig, L., Scarpelli, R., Piomelli, D. 2015. Benzoxazolone Carboxamides as Potent Acid Ceramidase Inhibitors: Synthesis and Structure- Activity Relationship (SAR) Studies. *J.Med.Chem* 58:9258-9272.

Bai, A., Mao, C., Jenkins, R., W., Szulc, Z., M., Bielawska, A., Hannun, Y., A. (2017). Anticancer actions of lysosomally targeted inhibitor, LCL521, of acid ceramidase. *Plos One* 12 (6):10

Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R., J., Ferlinz, K., Schuchman, E., H., Sandhoff, K. (1995). Purification, characterization and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol Chem* 19: 11098-102.

Bielawska, A., Bielawski, J., Szulc, Z., M., Mayroo, N., Liu, X., Bai, A., *et al.* (2008). Novel analogs of D-e-MAPP and B13. Part 2: Signature effects on bioactive sphingolipids. *Bioorg. Med. Chern.* 16: 1032-1045.

Camacho, L., Meca-Cortés, O., Abad, J., L., García, S., Rubio, N., Díaz, A., *et al.* (2013). Acid ceramidase as a therapeutic target in metastatic prostate cancer. *Journal of Lipid Research.* 54: 1207-1220.

Canals, D., Perry, D, M., Jenkins, R., W., Hannun, Y., A. (2011). Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *British Journal of Pharmacology* 163 (4): 694-712.

Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C., Hannun, Y. (2017). Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in Biological Regulation Ceramidase* 63: 122–131.

Degroote, S., Wolthoorn, J., Meer, G. (2004), The cell biology of glycosphingolipids. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15: 375-387.

Delgado, A., Casas, J., Llebaria, A., Abad, J., L., Fabrias, G. (2007). Chemical Tools to Investigate Sphingolipid Metabolism and Functions. *ChemMedChem* 2: 580-606.

Delgado, A., Casas, J., Llebaria, A., Abad, J., L., Fabrias, G. (2006). Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 1957-1977.

Doan, N., B., Nguyen, H., S., Montoure, A., Al-Gizawiy, M., M., Mueller, W., M., Kurpad, S., *et al.* (2017). Acid ceramidase is a novel drug to target for pediatric brain tumors. *Oncotargets* 8(15): 24753-24761.

Draper, J., M., Xia, Z., Smith, R., A., Zhuang, Y., Xang, W., Smith, C., D. (2011). Discovery and evaluation of inhibitors of human ceramidase. *Mol Cancer Ther* 10: 2052-2061.

Dworski, S., Lu, P., Khan, A., Maranda, B., Mitchell, J., J., Parini, R., *et al.* (2016). Acid ceramidase deficiency is characterized by a unique plasma cytokine and ceramida profile that is altered by therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863: 386-394.

Elojeimy, S., Liu, X., McKillop, J., C., *et al.* (2007). Role of acid ceramidase in resistance to FasL: therapeutic approaches based on acid ceramidase inhibitors and FasL gene therapy. *Mol Ther* 15: 1259-1263.

Evans, W., R., H., Hendriksz, C., J., (2017). Niemann-Pick type C disease- the tip of the iceberg? A review of neuropsychiatric presentation, diagnosis and treatment. *BJPsych Bull* 41(2): 109-114.

Farber, S., Cohen, J., Uzman, L., L. (1957). Lipogranulomatosis: a new lipo-glyco-protein "storage" disease. *J Mt Sinai Hosp N Y.* 24(6):816:37.

Ferreira, N. Lipid alterations in Farber Disease. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar- Universidade do Porto, 2013.

Furuya, H., Simizu, Y., Kawamori, T. (2011). Sphingolipids in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30: 567- 576.

- Gangoiti, P., Camacho, L., Arana, L., Ouro, A., Granada, M., H., Brizuela, L., *et al.* (2010). Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: implications in disease. *Progress in Lipid Research* 49: 316-334.
- Gatt, S. (1963). Enzymic hydrolysis and synthesis of ceramides. *J Biol Chem* 238: 3131–3133.
- Gault, C.R., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol.* 688: 1-23.
- Guo, Z., Vikbjerg, A., F., Xu, X. (2005). Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances* 23(3):203-259.
- Hannun, Y., A., Loomis, C., R., Merrill, A., H., Bell, R., M. (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 261: 12604-12609.
- Hannun Y., Obeid L.M. (2011). Many ceramides. *The Journal of Biological Chemistry* 286(32): 27855-62.
- Holthuis, J., Igarashi, Y. (2014). New frontiers in sphingolipid biology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841: 645-646.
- Hugle, B., Mueller, L., Levade, T. (2014). Why Farber Disease may be misdiagnosed as juvenile idiopathic arthritis. *Journal The Rheumatologist*. [Disponível em: <http://www.the-rheumatologist.org/article/why-farber-disease-may-be-misdiagnosed-as-juvenile-idiopathic-arthritis/>] [Consultado em: 1-09-17]
- Jenkins, R., W., Canals, D., Hannun, Y., A. (2009). Roles and Regulation of Secretory and Lysosomal Acid Sphingomyelinase. *Cell Signal* 21(6): 836-846.
- Kacher, Y., Futerman, A., H. (2006). Genetic diseases of sphingolipid metabolism: Pathological mechanisms and therapeutic options. *FEBS Letters* 580: 5510–5517.
- Kitatani, K., Taniguchi, M., Okazaki, T. (2015). Role of Sphingolipids and Metabolizing Enzymes in Hematological Malignancies. *Mol. Cells* 38(6): 482-495.
- Kolter, T (2011). A view on sphingolipids and disease. *Chemistry and Physics of Lipids* 164: 590-606.

- Lai, M., Realini, N., La Ferla, M., Passalacqua, I., Matteoli, G., Ganesan, A., Pistello, M., Mazzanti, C., M., Piomelli, D. (2017). Complete acid ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Scientific Reports* 7:7411.
- Li, C., M., Hong, S., B., Kopal, G., *et al.* (1998) Cloning and characterization of the full-length cDNA and genomic sequences encoding murine acid ceramidase. *Genomics* 50: 267-274.
- Liu, X., Cheng, J., C., Turner, L., S., Elojeimy, S., Beckham, T., H., Bielawska, A., Keane, T., E., Hannun, Y., A., Norris, J., S. (2009). Acid Ceramidase Up-regulation in Prostate Cancer: Role in Tumor Development and Implications for Therapy. *Expert Opin Ther Targets* 13(12): 1449-1458.
- Madhy, A., E., Cheng, J., C., Li, J., *et al.* (2009). Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiance: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Mol Ther* 17: 430-438.
- Morad, S., A., F., Cabot, M., C. (2015). Tamoxifen regulation of sphingolipid metabolism- therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 1851(9): 1134-1145.
- Nelson, D., Cox, M. (2005). Principles of biochemistry. 4. ed. USA: W.H. Freeman and Company 343-368.
- Newton, J., Lima, S., Maceyka, M., Spiegel, S. (2015). Revisiting the sphingolipid rheostat: evolving concepts in cancer therapy. *Exp Cell Res*. 333: 195-200.
- Nilsson, A. (1969). The presence of sphingomyelin and ceramide-cleaving enzymes in the small intestinal tract. *Biochim Biophys Acta* 176: 339–347.
- Ortega, J., A., Arencibia, J., M., La Sala, G., Borgogno, M., Bauer, I., Bono, L., Braccia, C., Armirotti, A., Giroto, S., Ganesan, A., De Vivo, M. (2017). Pharmacophore identification and scaffold exploration to discover novel, potent, and chemically stable inhibitors of acid ceramidase in melanoma cells. *J. Med. Chem.* 60(13): 5800-5815.
- Ouairy, C., M., J., Ferraz, M., J., Boot, R., G., Baggelaar, M., P., Stelt, M., V., Appelman, M., Marel, G., A., *et al.* (2015). Development of an acid ceramidase activity-based probe. *Chem. Commun* 51: 6161-6163.

Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H., *et al.* (2003). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *European Journal of Human Genetics* 12: 87-92.

Pizzirani, D., Pagliuca, C., Realini, N., Branduardi, D., Bottegoni, G., Mor, M., Bertozzi, F., *et al.* (2013). Discovery of a New Class of Highly Potent Inhibitors of Acid Ceramidase: Synthesis and Structure- Activity Relationship (SAR). *J.Med.Chem.* 56: 3518:3530.

Pizzirani, D., Bach, A., Realini, N., Armirotti, A., Mengatto, L., Bauer, I., Giroto, S., *et al.* (2015). Benzoxazolone carboxamides: potent and systemically active inhibitors of intracellular acid ceramidase. *Angew Chem Int Ed Engl.* 54(2):485-9.

Ponnusamy, S., Meyers-Needham, M., Senkal, C., E., Sadoughi, S., A., Sentelle, D., Selvam, S., P., Salas, A., Ogretmen, B. (2010). Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* 6(10): 1603-1624.

Proksch, D., Klein, J., J., Arenz, C. (2010). Potent inhibition of Acid Ceramidase by Novel B-13 Analogues. *Hindawi Publishing Corporation, Journal of Lipids.* 2011:8.

Realini, N., Palese, F., Pizzirani, D., Pontis, S., Basit, A., Bach, A., *et al.* (2016). Acid ceramidase in melanoma: Expression, localization and effects of pharmacological inhibition. *J. Biol. Chem.* 291 (5): 2422- 2434.

Realini, N., Solorzano, C., Pagliuca, C., Pizzirani, D., Armirotti, A., Luciani, R., *et all.* (2013). Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity. *Scientific reports* 3: 1035.

Roh, JL., Park, J., Y., Kim, E., H., Jang, H., J. (2015). Targeting acid ceramidase sensitises head and neck cancer to cisplatin. *European Journal of Cancer* 52: 163-172.

Saied, E., M., Arenz, C. (2015). Inhibitors of Ceramidases. *Chemistry and Physics of Lipids* 197: 60-68.

Saied, E., M., Arenz, C. (2014). Small Molecule Inhibitors of Ceramidases. *Cellular Physiology and Biochemistry* 34: 197-212.

Sanderson, R., J., Ironside, J., A., D. (2002). Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ*. 325(7368): 822–827.

Sands, M., S. (2013). Farber disease: understanding a fatal childhood disorder and dissecting ceramide biology. *Journal EMBO Molecular Medicine* 5: 799-801.

Seelan, R., S., Qian, C., Yokomizo, A., Bostwick, D., G., Smith, D., I., Liu, W. (2000). Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 29(2): 137-146.

Schuchman, E., H. (2016). Acid Ceramidase and the treatment of ceramide diseases: The expanding role of enzyme replacement therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1862: 1459-1471.

Schulke, H., Sandhoff, K. (2014). Sphingolipids and lysosomal pathologies. *Biochim Biophys Acta* 1841 (5): 799-810.

Sugita, M., Dulaney, J.T., Moser, H.W. (1972). Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). *Science* 178: 1100-1102.

Tan, S., Liu, X., Fox, T., E., Barth, B., M., Sharma, A., Turner, S., D., *et al.* (2016). Acid ceramidase is upregulated in AML and represents a novel therapeutic target. *Oncotarget* 7(50):83208-83222.

Tani, M., Ito, M., Igarashi, Y. (2007). Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cellular Signalling* 19: 229-237.

Thudichum, J., L., W. (1884). A treatise on the Chemical Constitution: The Brain. *Royal College of Physicians of London*. 1: 338.

Vethakanraj, H., S., Thabraz, A., B., Sudarsanan, G., B., Duraisamy, P., K., Kumar, S., A. (2015). Targeting ceramide metabolic pathway induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464: 833-839.

Zeidan, Y., H., Jenkins, R., W., Korman, J., B., Norris, J., S-. Hannun, Y., A. (2008).
Molecular Targeting of Acid Ceramidase: Implications to Cancer Therapy. *Curr Drug
Targets*: 9(8): 653-661.