

Ana Catarina Sousa Barbosa

Abordagens terapêuticas em doenças hereditárias do metabolismo dos esfingolípidos

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade das Ciências da Saúde

Porto, 2011

Ana Catarina Sousa Barbosa

Abordagens terapêuticas em doenças hereditárias do metabolismo dos esfingolípidos

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade das Ciências da Saúde

Porto, 2011

Ana Catarina Sousa Barbosa

Abordagens terapêuticas em doenças hereditárias do metabolismo dos esfingolípido

Eu, Ana Catarina Sousa Barbosa atesto a originalidade deste trabalho

«Trabalho apresentado à
Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestrado
Integrado em Ciências
Farmacêuticas»

Resumo

Os esfingolípidos são lípidos existentes na membrana plasmática de todas as células eucarióticas, sendo especialmente abundantes nas células do sistema nervoso. A sua síntese inicia-se no retículo endoplasmático e termina no complexo de Golgi. As moléculas são depois integradas na membrana plasmática e posteriormente endocitadas e degradadas ao nível do lisossoma. Para além da sua função estrutural, estas moléculas têm sido envolvidas em processos de biossinalização e associadas a eventos celulares diversos, nomeadamente crescimento e diferenciação, apoptose, inflamação e angiogénese. A importância dum nível adequado de esfingolípidos para o bom funcionamento das células neuronais é ilustrada pela existência dum conjunto de doenças hereditárias metabólicas neurodegenerativas conhecidas por Esfingolipidoses. Estas patologias são causadas por mutações em genes que codificam enzimas lisossomais que estão envolvidas no catabolismo dos esfingolípidos, o que origina a acumulação intralisossomal do respectivo substrato. Apesar dos avanços significativos que se registaram nas últimas décadas ao nível da caracterização do defeito primário das Esfingolipidoses (desde a caracterização do tipo de substrato, à identificação do gene e da proteína) pouco se sabe, ainda, acerca das consequências celulares a jusante do defeito primário. No entanto, várias abordagens terapêuticas têm sido investigadas, algumas das quais revelando resultados promissores para a cura destas doenças. Assim, este trabalho descreve a estrutura, a função e o metabolismo dos esfingolípidos, relacionando o bloqueio de etapas específicas do seu catabolismo lisossomal com o aparecimento de Esfingolipidoses. As diversas estratégias terapêuticas, presentemente em fase experimental ou em fase clínica, são revistas e discutidas de forma prospectiva.

Abstract

The sphingolipids are lipids that exist in the plasma membrane of all eukaryotic cells, being especially abundant in cells of the nervous system. The synthesis starts in the endoplasmic reticulum and ends in the Golgi complex. The molecules are then integrated into the surface of the plasma membrane as integral components, and then endocytosed and degraded at the lysosome. In addition to its structural function, these molecules have been implicated in processes of biosignaling and associated with various cellular events, including growth and differentiation, apoptosis, inflammation and angiogenesis. The importance of an adequate level of sphingolipids for the proper functioning of neuronal cells is illustrated by the existence of a group of neurodegenerative hereditary metabolic diseases known as Sphingolipidoses. These diseases are caused by mutations in genes coding for enzymes involved in the catabolism of sphingolipids, which leads to the intralysosomal accumulation of its substrate. Despite significant advances that have occurred in recent decades in terms of characterization of the primary defect of Sphingolipidoses (from the characterization of the substrate to the identification of the gene and the protein) little is known about the consequences for the cell downstream of the primary defect. However, several therapeutic approaches have been investigated, some of which reveal promising results for the cure of these diseases. Thus, this work describes the structure, function and metabolism of sphingolipids, and relates the blockage of specific steps of lysosomal catabolism with the respective Sphingolipidosis. The various therapeutic strategies, presently in the experimental or clinical stage, are reviewed and discussed on a prospective basis.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família pelos sacrifícios que fizeram por mim e pelo seu amor, em particular ao meu avô que investiu a sua reforma na minha formação fazendo com que fosse possível a concretização deste sonho, juntamente com a minha avó; à minha querida mãe que é o pilar da minha vida em tudo, pelo seu amor, que sempre me apoiou nos bons e maus momentos, e que fez sempre tudo para que nada me faltasse; e à minha irmã pelo seu amor, que sempre me deu o seu maior sorriso nas minhas vitórias e que me segurou nas minhas derrotas, tendo sempre uma palavra de carinho. Agradeço a Deus pela força e coragem que me deu para conseguir atingir os meus objectivos.

Agradeço aos meus amigos, pela sua amizade, por estarem sempre presentes ao longo deste caminho e me darem apoio total, fazendo tudo que estava ao seu alcance, e aos meus amigos que conheci durante o curso, que nunca esquecerei e que fizeram tudo por mim a todos os níveis.

Finalmente, mas não sem menor importância, agradeço à minha orientadora, a Doutora Maria Gil Ribeiro que foi incansável, ajudou-me sempre estando disponível quando precisei. Foi indispensável para a realização deste trabalho.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	5
Índice de Tabelas.....	5
Abreviaturas e siglas.....	6
Capítulo I- Introdução.....	7
Capítulo II – Desenvolvimento.....	10
1) Esfingolípídeos: estrutura, função e metabolismo.....	11
2) Lisossoma: estrutura, função e biogénese.....	17
3) Esfingolipidoses.....	20
4) Abordagens terapêuticas.....	25
Capítulo IV: Conclusões e Perspectivas futuras.....	34
Bibliografia.....	37

Índice de Figuras

Figura 1 - Características estruturais das moléculas esfingolípídicas.....	12
Figura 2 - Biossíntese dos esfingolípídeos nas células de mamíferos.....	14
Figura 3 - Lisossoma: topologia das principais proteínas integrais.....	18
Figura 4 - Biossíntese das hidrolases lisossomais pela via M6P.....	20
Figura 5 - Catabolismo lisossomal dos esfingolípídeos e Esfingolipidoses.....	22
Figura 6 - Potenciais abordagens terapêuticas em DLSs.....	26

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos diferentes tipos de esfingomielinases.....	16
Tabela 2 - Caracterização bioquímica e clínicas das Esfingolipidoses.....	23

Abreviaturas e siglas

BMT – Transplante de medula óssea

C- Carbono

CG – Complexo de Golgi

CoA – Coenzima A

DAG - Diacilglicerol

DLS – Doença lisossomal de sobrecarga

DTT - Ditioneitol

ESL – Esfingolípido

GalCer - Galactosilceramida

GlcCer – Glucosilceramida

GESL – Glicoesfingolípido

LacCer – Lactosilceramida

LAMP- Proteína extrínseca da membrana lisossomal

LIMP – Proteína intrínseca da membrana lisossomal

LGP – Glicoproteína da membrana lisossomal

M6P – Manose-6-fosfato

Mg - Magnésio

NADPH – Dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato reduzido

NB-DGJ – N-butilgalactogiramicina

NB-DNJ - N-butildesoxinogiramicina

NKT – *Natural Killer Cells*

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

RE – Retículo endoplasmático

RER – Retículo endoplasmático rugoso

SAP - Saposina

SM – Esfingomiélin

SMase - Esfingomiélinase

SNC – Sistema nervoso central

TFEB – Factor de transcrição EB

UDP – Difosfato de uridina

Zn - Zinco

Capítulo I

Introdução

Os organismos multicelulares complexos possuem milhares de células, as quais desempenham funções diversas consoante o local onde se encontram. Assim, sabendo que o bom funcionamento celular é crucial para a homeostasia de um ser humano, é fácil perceber que qualquer dano ou alteração no seu metabolismo provocará disfunções, que podem ser reversíveis ou irreversíveis, e eventualmente causar alterações celulares graves com implicações patológicas.

Neste trabalho descreve-se a estrutura e a função de uma classe específica de moléculas lipídicas, os esfingolípidos, relacionando-se a disfunção ao nível do seu catabolismo lisossomal com o aparecimento e tratamento de doenças hereditárias metabólicas graves conhecidas por Esfingolipidoses.

Os esfingolípidos são constituídos por um grupo esfingóide, uma molécula de ácido gordo e um grupo polar. Em células humanas foram identificadas mais de 60 esfingolípidos, tratando-se, por isso, de um grupo de moléculas estruturalmente diverso. Os esfingolípidos são especialmente abundantes nas membranas dos neurónios, pelo que a sua função deverá ser de particular relevância para o bom funcionamento dessas células. Contudo, a sua função exacta não é ainda conhecida. No entanto, sabe-se que, para além da sua função estrutural, alguns esfingolípidos constituem locais de reconhecimento na superfície celular e, nas últimas décadas, eles têm sido implicados em processos de sinalização intracelular. Estas moléculas caracterizam-se por um metabolismo complexo, envolvendo a participação de diversas enzimas localizadas em vários organelos e estruturas celulares, nomeadamente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, membrana plasmática e lisossoma. O catabolismo ocorre na presença de hidrolases ácidas lisossomais. O bloqueio enzimático numa das etapas desse catabolismo origina a acumulação do substrato lipídico respectivo, dando origem a uma Esfingolipidose específica. A maioria destas patologias apresenta um padrão de transmissão autossómico recessivo, integrando o grupo das doenças hereditárias metabólicas. Apesar dos avanços registados no conhecimento do defeito bioquímico e das causas genéticas das Esfingolipidoses o que, subsequentemente, permitiu o desenvolvimento de testes bioquímicos e genéticos específicos para a identificação destas doenças, presentemente não é ainda possível intervir em termos terapêuticos sobre o defeito primário de todas essas doenças. No entanto, várias abordagens têm sido estudadas desde o final da década de 90, e algumas têm-se revelado relativamente

eficazes em Esfingolipidoses sem envolvimento neuronal, impedindo a progressão da doença e permitindo até, em alguns casos, a reversão dos sintomas e sinais clínicos. Neste domínio, a caracterização de modelos naturais e artificiais tem proporcionado avanços significativos e promissores.

Neste contexto, o presente trabalho foi elaborado com o objectivo de reunir a informação relevante sobre as potencialidades das diferentes abordagens terapêuticas actualmente conhecidas para o tratamento das Esfingolipidoses. Para a sua concretização foi efectuada uma revisão bibliográfica reportada às últimas três décadas, o que permitiu reunir informação não só para definir o estado da arte sobre o tema como também perspectivar novos rumos da investigação ao nível do tratamento destas patologias.

Capítulo II

Desenvolvimento

1) **Esfingolípidos: Estrutura, função e metabolismo**

Os esfingolípidos (ESLs) foram descobertos há mais de um século em amostras de cérebro (revisto em Sourkes, 1995). Desde então diversas espécies de esfingolípidos foram identificadas e caracterizadas quimicamente. De facto, os esfingolípidos formam uma classe quimicamente heterogénea de lípidos que apresentam propriedades estruturais e biofísicas conservadas desde os fungos até aos mamíferos (Delgado *et al.*, 2007). Estas moléculas são particularmente abundantes nas membranas plasmáticas das células eucarióticas onde representam, 10-20% dos lípidos totais (Sillence e Platt, 2003).

Estrutura e função

Os ESLs são constituídos por 3 componentes:

- Uma base esfingóide, que pode variar no comprimento e no grau de saturação, de hidroxilação e de ramificação. Nos humanos, a base esfingóide mais comum é a esfingosina;

- Um ácido gordo que estabelece uma ligação amida com o grupo amino da base esfingóide. Dependendo do tipo celular, podem ser observadas variações quanto ao seu comprimento, grau de saturação e de hidroxilação. As espécies mais abundantes são ácidos gordos longos e saturados, sendo por vezes insaturados no C-15 ou hidroxilados no C-2;

- Um grupo polar, o qual define o tipo de esfingolípido.

As ceramidas são os ESLs mais simples e formam-se por N-acilação de bases esfingóides com uma grande variedade de ácidos gordos, sendo que os mais comuns nos mamíferos são os ácidos gordos C18 e C20. Os esfingolípidos mais complexos são glicosfingolípidos (GESLs) que se formam pela ligação de uma ou mais oses à ceramida.

A estrutura dos esfingolípídeos mais comuns é apresentada na Figura 1. A ceramida é a base de todos os ESLs mais complexos que são formados por ligação de grupos distintos ao C-1. Quando este grupo é a fosforilcolina, o ESL designa-se esfingomielina (SM). A ligação de uma molécula de glucose ou de uma molécula de galactose constitui o primeiro passo para a formação dos esfingolípídeos complexos, ou seja, os GESLs tais como a glucosilceramida (GlcCer) (revisto em Degroote *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2007; revisto em Huwiler *et al.*, 2000). Os gangliosídeos são uma subclasse de GESLs que contém um resíduo de ácido siálico (maioritariamente ácido N-acetil neuramínico) no segmento da molécula correspondente ao carboidrato.

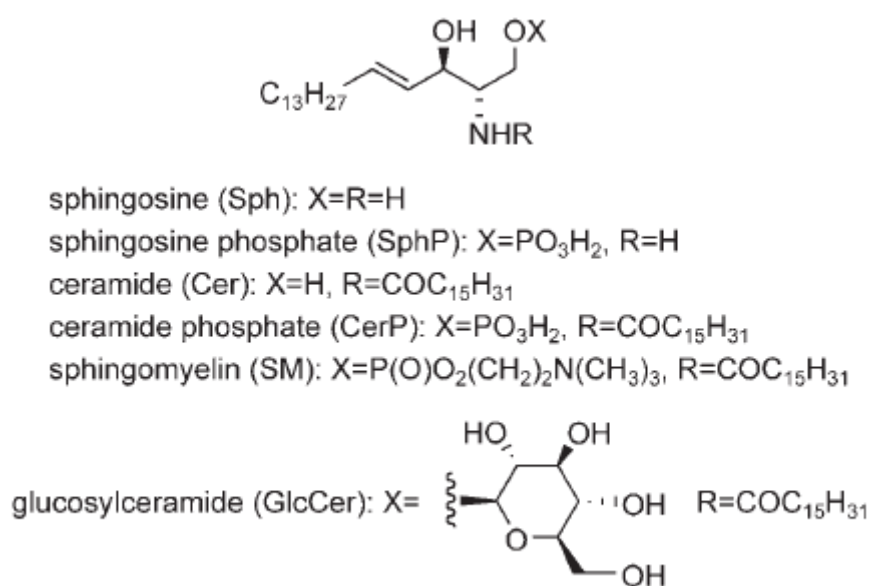


Figura 1 – Características estruturais das moléculas esfingolípídicas mais abundantes em células de mamíferos. Figura extraída de Delgado *et al.* (2007).

A diversidade estrutural que se observa ao nível deste grupo de moléculas lipídicas sugere uma considerável heterogeneidade funcional. De facto, para além do seu papel estrutural ao nível da membrana plasmática, estas moléculas também estão envolvidas em eventos de biossinalização, nomeadamente a ceramida, a esfingosina e os respectivos derivados fosforilados, isto é, a ceramida-1-fosfato e a esfingosina-1-fosfato.

Ao nível da membrana plasmática, os ESLs têm sido implicados em processos diversos tais como o crescimento, diferenciação e adesão celulares, apoptose, ontogénese, angiogénese, reconhecimento de certas toxinas, vírus e bactérias, etc.

(revisto em Kolter e Sandhoff, 2006). Vários estudos sugerem que na membrana plasmática, os ESLs integram microdomínios específicos ricos em proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol, esfingomiélin e colesterol. Estes microdomínios são conhecidos por *lipid rafts*. No caso de incorporarem proteínas designadas por caveolinas, estes microdomínios passam a designar-se por cavéolas. Por conseguinte, é possível que os ESLs que integram estes domínios membranares específicos se encontrem particularmente envolvidos nos processos celulares acima mencionados. De facto, a ceramida dos *lipid rafts* em associação com outros lípidos e com o colesterol influencia as propriedades biofísicas das membranas, nomeadamente quanto ao nível de concentração e oligomerização de proteínas específicas (Simons e Gerl, 2010; Staubach e Hanisch, 2011). Adicionalmente, os ESLs também têm sido implicados na regulação da actividade de proteínas membranares específicas. Por exemplo, a ausência de um GESL complexo, o gangliosídeo G_{M3} , *in vivo*, leva ao aumento da fosforilação do receptor da insulina, potenciando a sua actividade. Mais recentemente, esfingolípidos específicos, nomeadamente as ceramidas, da camada mais externa da pele, têm sido associados ao aumento da impermeabilização à água (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

Pelo facto dos ESLs serem moléculas funcionalmente multifacetadas, elas têm sido implicadas em processos patológicos de etiologia diversa para além dos distúrbios provocadas por alterações específicas no seu catabolismo lisossomal. Em doenças infecciosas, os ESLs apresentam-se como receptores de patogénios e podem controlar a infecção e a defesa do hospedeiro. No sistema imunitário, os GESLs desempenham o papel de antigénios (sistema ABO), mas podem também estimular a produção de auto-anticorpos na fase de pós-infecção em doenças auto-imunes como o Síndrome Guillain-Barré ou no Síndrome Miller-Fisher pois actuam como ligandos das moléculas CD1d de células T específicas (células NKT) (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

Adicionalmente, moléculas específicas esfingolípídicas também têm sido implicadas na oncogénese e no aparecimento e na progressão de doenças cardiovasculares, da obesidade e de infecções virais (Delgado *et al.*, 2007; Watts, 2003). Contudo, o seu mecanismo molecular exacto ainda não é conhecido.

Metabolismo

Nas células de mamíferos, a ceramida possui um papel importante na biossíntese dos ESLs, podendo ser produzida pela via anabólica ou síntese *de novo*, pela degradação da esfingomiéline ou pelo catabolismo de GESLs. A Figura 2 ilustra as principais vias de síntese e de degradação dos ESLs, as etapas de inter-relação entre estas duas vias, bem como a compartimentação celular do metabolismo destas moléculas.

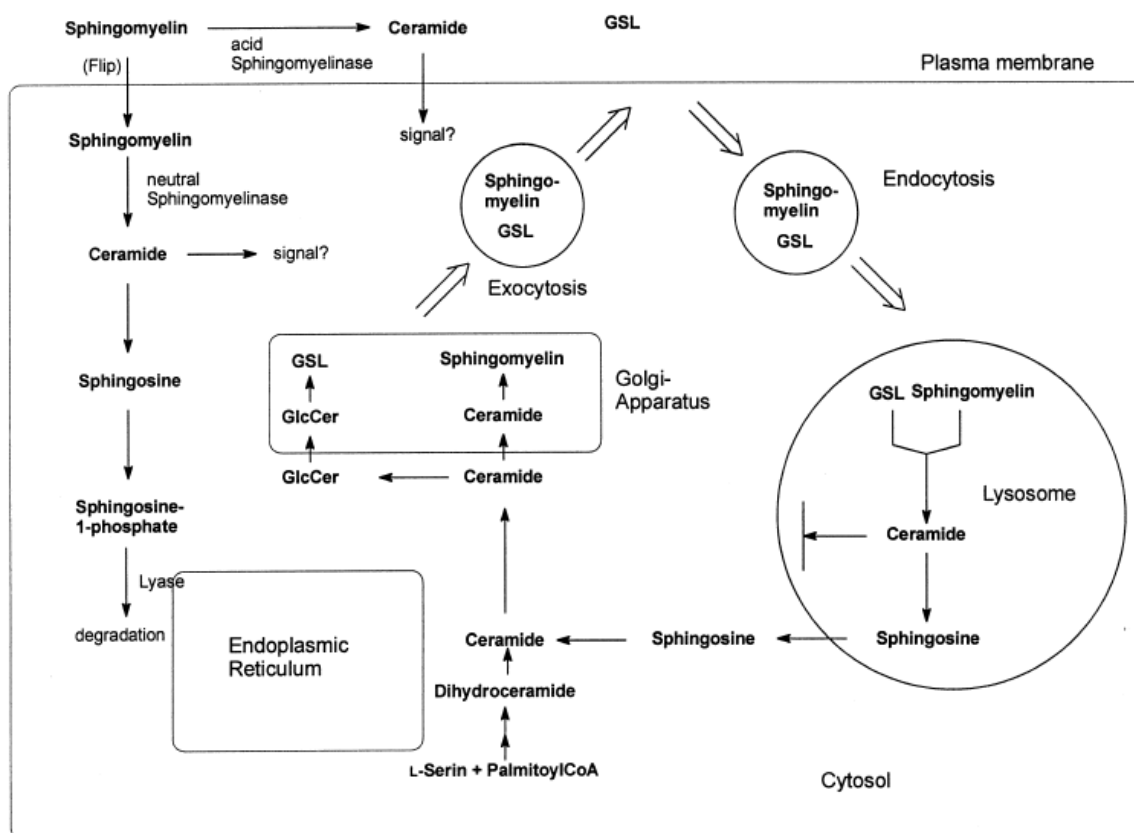


Figura 2 – Biossíntese dos esfingolípídeos nas células de mamíferos. Figura extraída de em Huwiler *et al.* (2000).

A primeira etapa da via de formação da ceramida ocorre na face citoplasmática da membrana do retículo endoplasmática a partir da condensação da serina e da palmitoil-CoA, catalisada pela enzima serina palmitoil transferase, em 3-cetoesfinganina (precursor de todas as bases esfingóides). Esta enzima catalisa a etapa limitante desta via biossintética representando, por isso, um importante ponto de regulação. No entanto,

o seu mecanismo de regulação ainda não está completamente esclarecido. Em seguida, a 3-cetoesfinganina é reduzida a D-eritro-esfinganina pela 3-cetoesfinganina redutase numa reacção dependente do NADPH. Seguidamente, a esfinganina é acilada a dihidroceramida pela enzima esfinganina N-aciltransferase. A desnaturação da dihidroceramida a ceramida é catalisada pela dihidroceramida transferase. Todas as enzimas implicadas na síntese a ceramida estão localizadas no RE. A ceramida é o precursor comum da esfingomiéline e dos glicoesfingolípidos, ambos sintetizados no complexo de Golgi (CG). A ceramida é transferida para o CG com a ajuda duma proteína de transferência específica. As reacções de glicosilação subsequentes são catalisadas por glicotransferases do complexo de Golgi (revisto em Degroote *et al.*, 2004; revisto em Huwiler *et al.*, 2000).

Muitos dos glicolípidos são derivados estruturalmente e biossinteticamente da GlcCer. Nesta molécula, o resíduo de glucose faz ligação β -glicosídica á posição 1 da ceramida através da acção da glucosiltransferase que utiliza a UDP-glucose como dador do grupo glicosilo. Esta enzima está localizada na parte citosólica do CG. Aqui a GlcCer pode atingir directamente a membrana plasmática por transporte directo ou pode ser modificada por glicosilação no CG. A lactosilceramida (LacCer), é formada pela transferência de uma porção de galatose da UDP-Gal para a GlcCer catalizada pela galactosiltransferase I. A formação da LacCer e as reacções subsequentes ocorrem na parte luminal do CG. Assim, a GlcCer é usada na síntese de outros glicolípidos estruturalmente mais complexos. A adição sequencial de resíduos osídicos à LacCer leva à formação dos gangliosídeos, que possuem um ou mais resíduos de ácido siálico (revisto em Degroote *et al.*, 2004; revisto em Huwiler *et al.*, 2000). Os glicolípidos de série-gala são os únicos glicolípidos que são estruturalmente e biossinteticamente derivados da galactosilceramida em vez da glicosilceramida. Estes glicolípidos, especialmente a galactosilceramida (GalCer) e sulfatídeo (GalCer-3-sulfato), existem em grande concentração em espaços multilamelares das bainhas de mielina, rodeando os axónios das células neuronais. Esta reacção é catalisada por uma proteína membranar do lúmen do RE (revisto em Degroote *et al.*, 2004; revisto em Huwiler *et al.*, 2000).

No caso da síntese da SM, a reacção é catalisada pela enzima esfingomiéline sintase, a qual promove a transferência da fosfocolina da fosfatidilcolina para o grupo hidroxilo

da ceramida originando a esfingomiélinina e o 1,2-diacilglicerol (DAG) (revisto em Degroote *et al.*, 2004; revisto em Huwiler *et al.*, 2000).

Relativamente ao catabolismo dos ESLs, este ocorre no sistema endolisossomal com excepção da SM cuja hidrólise em ceramida pode ocorrer em diversos compartimentos celulares. Até à data foram descritos vários tipos de esfingomiélinases que diferem, nomeadamente, quanto à dependência de cofactores e à localização subcelular (Tabela 1). A hidrólise da SM da membrana plasmática ocorre em resposta, por exemplo, a moléculas indutoras de stress como citoquinas pró-inflamatórias, ou moléculas indutoras de diferenciação celular. A ceramida produzida pode ser usada posteriormente na síntese de SM, razão pela qual esta inter-conversão entre a SM e a ceramida é conhecida por ciclo da esfingomiélinina (revisto em Huwiler *et al.*, 2000; Levade *et al.*, 1999).

Tabela 1 - Classificação dos diferentes tipos de esfingomiélinases.

Esfingomiélinases	Localização Celular
SMase ácida	Lisossoma
SMase neutra (Mg ²⁺ dependente)	Membrana Plasmática
SMase neutra (Mg ²⁺ independente)	Mielina e citosol
SMase neutra Mg ²⁺ -DTT	Células de rato
SMase neutra	Cromatina
SMase (Zn ²⁺ dependente)	Soro
SMase alcalina	Aparelho digestivo

SMase, Esfingomiélinase; Mg, Magnésio; DTT, Ditioneitol; Zn, Zinco. Adaptado de Levade *et al.*, 1999.

Nos lisossomas, os GESLs são degradados de forma sequencial na presença de hidrolases específicas que podem ser auxiliadas por cofactores proteicos cujo objectivo principal é promover a orientação correcta e acessibilidade da enzima, geralmente hidrossolúvel, ao substrato de natureza apolar (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006). O

catabolismo dos GESLs é desenvolvido na secção seguinte do presente trabalho. No caso dos esfingolípidos da membrana plasmática, estes são endocitados e conduzidos até aos compartimentos endossomais e lisossomais por tráfego vesicular. Aqui, as exohidrolases clivam os resíduos osídicos sequencialmente a partir da extremidade da molécula até se formar a ceramida, a qual é finalmente desacilada por uma ceramidase ácida para formar a esfingosina. Os fragmentos osídicos, os ácidos gordos e as bases esfingóides podem deixar o lisossoma e re-entrar na via biossintética. Se alguma enzima lisossomal estiver deficiente, o substrato lípidico correspondente não é degradado, acumulando-se no compartimento lisossomal (revisto em Huwiler *et al.*, 2000).

Em conclusão, o metabolismo dos ESLs é complexo, envolvendo vários compartimentos intracelulares e diversas enzimas responsáveis pela produção de intermediários que são transportados intracelularmente até ao local onde se integram na etapa específica da rede metabólica. No caso específico da degradação dos esfingolípidos, esta ocorre no compartimento ácido da célula, ou seja, no endossoma tardio ou no lisossoma. No entanto, a degradação da esfingomiéline pode também ocorrer nas membranas extralisossomais em resposta a estímulos extra e intracelulares; presumivelmente na membrana plasmática e/ou na membrana endossomal.

2) Lisossomas: estrutura, função e biogénese

O lisossoma é um organelo ácido, de membrana simples, existente em todas as células nucleadas e que estão envolvidos na degradação de moléculas extracelulares ou patogénios internalizados por endocitose ou fagocitose (heterofagia). São também responsáveis pelo *turnover* de moléculas intracelulares e organelos, o qual ocorre através dum processo celular específico chamado de autofagia. Para concretizar estas funções, este organelo possui mais de 50 hidrolases que incluem proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases (revisto em Wraith, 2001). Esta variedade enzimática assegura a degradação das macromoléculas nos seus monómeros estruturais (aminoácidos, ácidos gordos, nucleótidos e açúcares simples). Adicionalmente, o lisossoma promove a reciclagem para o citoplasma dos produtos da digestão, os quais ficam disponíveis para o metabolismo celular biossintético (revisto em Rouillé *et al.*, 2000). As enzimas lisossomais são preferencialmente activas em meio

ácido (~ pH 4.0-5.0). A acidificação do lúmen é efectuada por uma bomba de prótons localizada na membrana do lisossoma (Figura 3) (Alberts *et al.*, 2002).

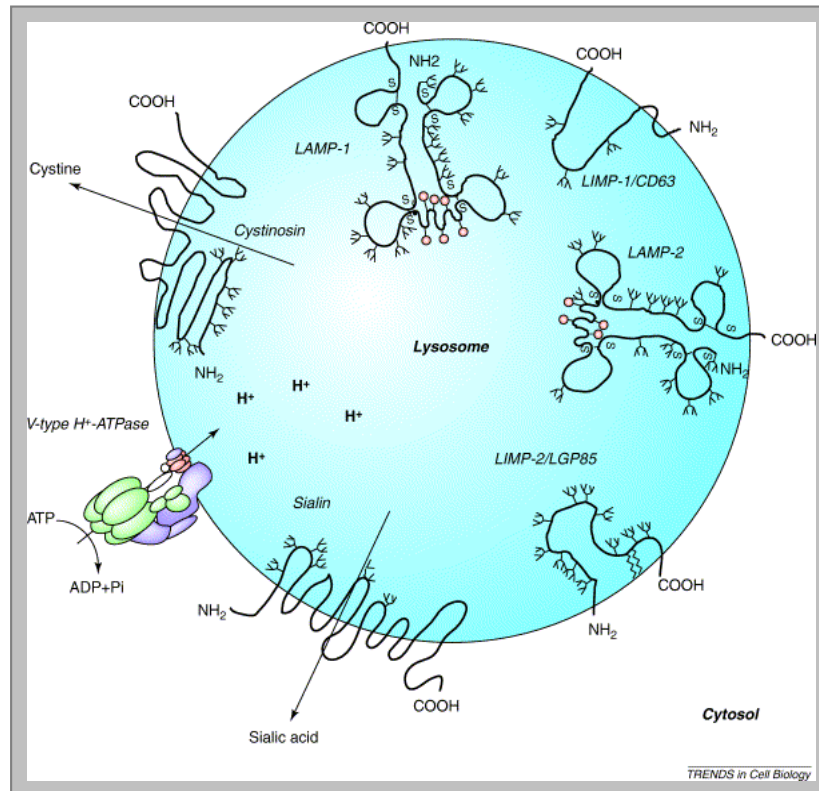


Figura 3 - Lisossoma: topologia das principais proteínas integrais. H^+ -ATPase promove a acidificação do lúmen lisossomal; LAMP- *Lysosome-associated membrane protein*; LIMP - *Lysosomal integral membrane protein*; LGP - *lysosomal membrane glycoprotein*. Figura extraída de Eskelinen *et al.* (2003).

A célula está protegida contra ataques do próprio sistema digestivo uma vez que a membrana do lisossoma mantém as enzimas digestivas isoladas do citoplasma (essa função é exercida, aparentemente, pelas oses de glicoproteínas orientadas para a face luminal); no caso de uma eventual lise da membrana lisossomal a acção destas enzimas estará inibida a pH citoplasmático (~ 7.2).

No caso específico da degradação lisossomal dos esfingolípidos, esta ocorre por acção de hidrolases hidrofílicas específicas. Contudo, no caso de esfingolípidos mais hidrofóbicos e, subsequentemente, ocupando uma posição mais central na estrutura das

membranas, esta digestão ocorre em cooperação com cofactores proteicos. Estes cofactores, também designados por proteínas activadoras, têm por função tornar o lípido membranar mais acessível à hidrolase solúvel que promoverá a sua degradação. Estas proteínas são codificadas por genes localizados em diferentes cromossomas: a proteína activadora GM2 no cromossoma 5, e o precursor da saposina (prosaposina) no cromossoma 10, o qual é processado para formar as proteínas activadoras homólogas ou saposinas (SAP-A, SAP-B, SAP-C e SAP-D) (revisto em Ozkara, 2004).

As proteínas lisossomais são, na sua maioria, glicoproteínas constituídas por oligossacáridos ricos em manose. A sua síntese ocorre nos ribossomas associados ao retículo endoplasmático rugoso (RER), com subsequente translocação dos polipéptidos para o lúmen do RER onde são N-glicosilados em resíduos específicos de asparagina (Asn-X-Ser/Thr). Estas glicoproteínas são transportada para a fase *cis* do CG e resíduos de manose dos N-oligossacáridos são fosforilados. Durante o seu transporte vectorial no CG, as glicoproteínas são alvo de processamento proteolítico e oligossacarídico, nomeadamente conversão dos N-oligossacáridos ricos em manose em N-oligossacáridos complexos ou em estruturas híbridas e adição do grupo fosfato a resíduos específicos de manose com formação do marcador de endereçamento lisossomal manose-6-fosfato (M6P). Na rede *trans* do CG, as glicoproteínas lisossomais ligam-se a receptores específicos membranares (receptores M6P). Os referidos receptores reconhecem resíduos de M6P e são responsáveis pelo transporte vesicular das glicoproteínas lisossomais até aos endossomas tardios (Figura 4). Deste modo, a segregação entre as proteínas lisossomais e as proteínas de secreção ocorre na rede *trans* do CG. Nos endossomas tardios, a diminuição do pH origina a separação entre os receptores e as proteínas lisossomais. Adicionalmente, as enzimas lisossomais são desfosforiladas para impedir o seu retorno ao CG. Os receptores M6P são incluídos na membrana de vesículas que os transportam de regresso ao CG ou à membrana plasmática, onde são reutilizados (Figura 4). Desta forma, os lisossomas definem-se não só pela presença de hidrolases ácidas e de glicoproteínas integrais de membrana, mas também, pela ausência de dois receptores de manose-6-fosfato, o que os distingue molecularmente dos endossomas (revisto em Kornfeld e Mellman 1989; revisto em Luzio *et al.* 2000; revisto em Mullins e Bonifacino, 2001).

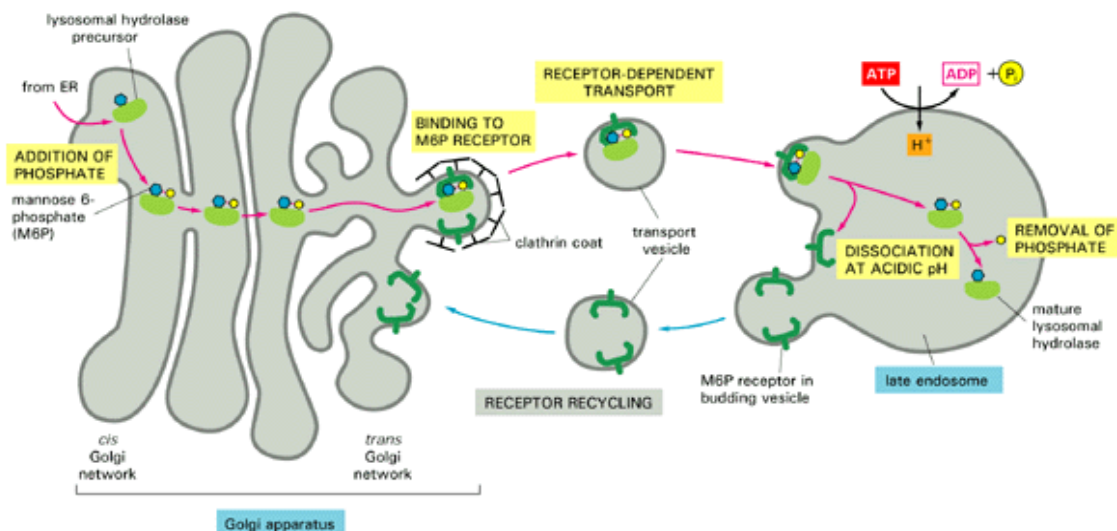


Figura 4 – Biossíntese das hidrolases lisossomais pela via M6P. Figura foi extraída de Alberts *et al.*, 2002.

Uma outra via, que não depende dos receptores de M6P, é responsável pela incorporação de certas proteínas na membrana lisossomal e da fosfatase ácida nos lisossomas. Estas proteínas são transportadas por vesículas desde a rede *trans* do CG, até à membrana plasmática. A partir da membrana plasmática são incorporadas em vesículas de endocitose, que as transportam até aos endossomas precoces, estrutura a partir da qual podem circular repetidamente até à membrana plasmática. A partir dos endossomas precoces, estas proteínas são transportadas até aos lisossomas via endossomas tardios (revisto em Rouillé *et al.*, 2000).

3) Esfingolipidoses

A importância celular dos esfingolípídeos é bem evidenciada pela existência de várias doenças genéticas, as Esfingolipidoses. Estas patologias são causadas por bloqueios específicos no catabolismo lisossomal dos esfingolípídeos, originando a acumulação intralisossomal destas moléculas, razão pela qual são conhecidas por doenças de sobrecarga de esfingolípídeos.

As Esfingolipidoses fazem parte dum grupo específico de doenças hereditárias do metabolismo conhecido por doenças lisossomais de sobrecarga (DLSs). Após a descoberta dos lisossomas por Duve e a demonstração do primeiro defeito enzimático por Hers em 1963, a primeira disfunção enzimática lisossomal foi caracterizada em 1965 e os restantes defeitos enzimáticos foram sendo demonstrados ao longo das três décadas seguintes. Em 1984 foi descoberta a primeira proteína activadora e proposto o conceito de Esfingolipidose. Nos anos que se seguiram, a investigação conduziu à identificação e caracterização dos genes que codificam as enzimas lisossomais e à elucidação da base genética das Esfingolipidoses (revisto em Ozkara, 2004). A maioria destas doenças apresenta um padrão de transmissão autossómico recessivo, excepto a doença de Fabry que está associada ao cromosoma X (Watts, 2003). Actualmente são conhecidas mais de quarenta DLSs, as quais podem ser causadas por um defeito numa enzima ou num cofactor (como as proteínas activadoras), ou no sistema de troca ou transporte de moléculas envolvidas na degradação lisossomal, causando uma sobrecarga neste organelo. Embora as DLSs sejam consideradas doenças raras, no seu conjunto apresentam uma prevalência de aproximadamente 1:4000 nascimentos em Portugal (Pinto *et al.*, 2004), que é o dobro da prevalência estimada para a população Australiana e Holandesa, 1:7700 (Meikle *et al.*, 1999) e 1:7143 (Poorthuis *et al.*, 1999), respectivamente.

Com base na natureza química do substrato/molécula acumulada, os principais grupos de DLSs incluem: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, mucolipidoses, doenças de armazenamento de glicoproteínas, doenças de armazenamento de glicogénio e ceroido-lipofiscinose neuronais.

No grupo das lipidoses, as esfingolipidoses (Figura 5) constituem o grupo de DLSs mais prevalente. Uma excepção é a etapa correspondente à degradação de lactosilceramida, dado que nenhum defeito na enzima ou no activador que origine o armazenamento de lactosilceramida seja conhecido. No entanto, o seu nível pode estar secundariamente alterados em várias DLSs. (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

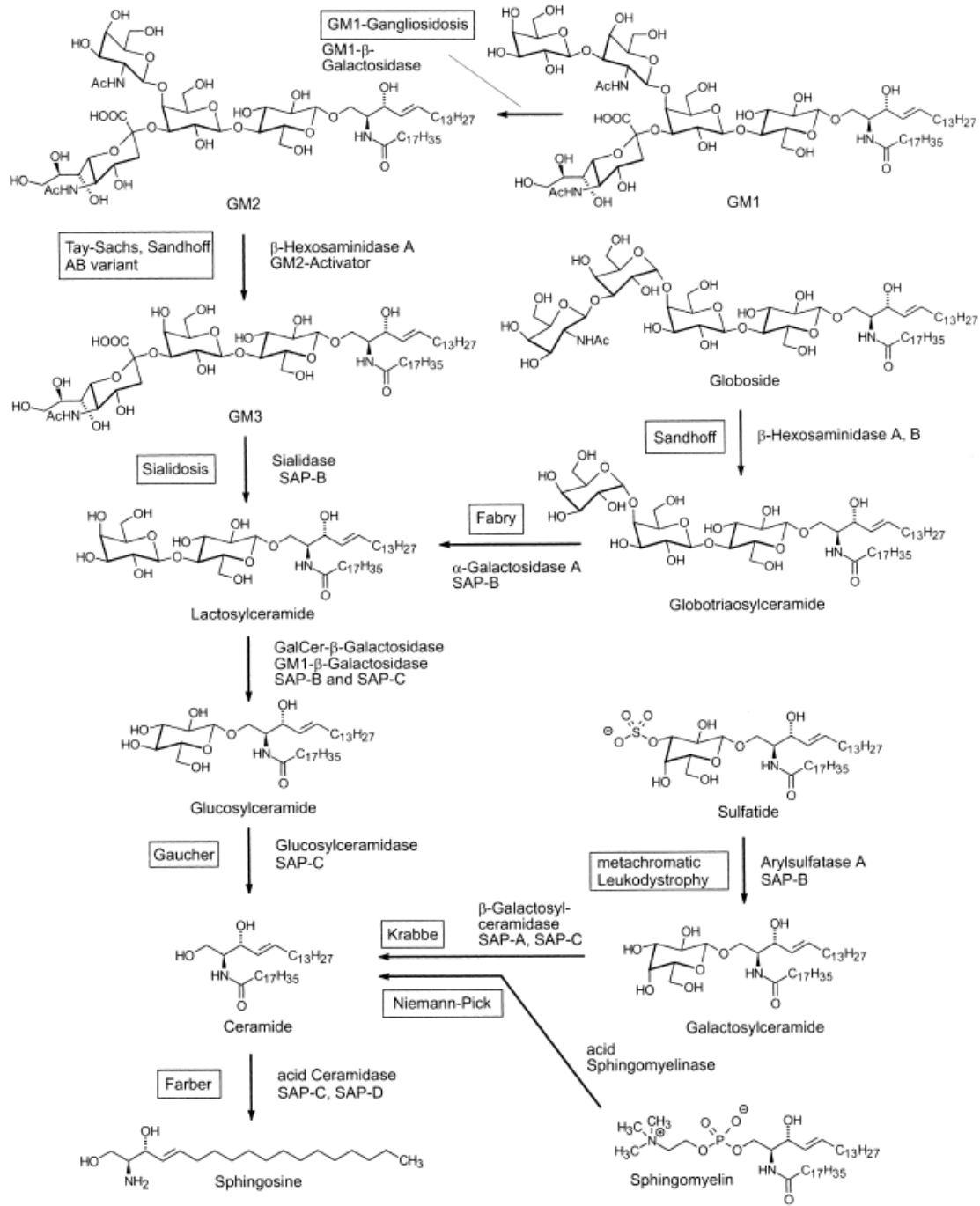


Figura 5 - Catabolismo lisossomal dos esfingolípídeos e Esfingolipidoses. Figura extraída de Huwiler *et al.*, 2000.

Nas Esfingolipídeos, a acumulação lipídica ocorre majoritariamente no tipo de células e órgãos em que o lípido é predominantemente sintetizado. No entanto, todas as doenças relacionadas com a acumulação de GESLs devem-se a uma falha na via degradativa e não a um aumento da sua biossíntese. A Tabela 2 resume as principais características bioquímicas e clínicas de algumas Esfingolipídeos.

Tabela 2 - Caracterização bioquímica e clínica das Esfingolipídeos.

Esfingolipídose	Enzima afectada	Principais lípidos acumulados	Principais sintomas clínicos
Gangliosidose GM1	GM1- β -galactosidase	Gangliosídeo GM1	Distonia, displasia do esqueleto
Tay-Sachs	Hexosaminidase A	Gangliosídeo GM2	Atraso mental, fraqueza muscular
Sandhoff	Hexosaminidase A e B	Globosídeo, GA2, GM2	Atraso mental, fraqueza muscular
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriosilceramida	Erupção da pele, falência do rim
Gaucher	β -Glucocerebrosidase	Glucosilceramida	Hepato e esplenomegalia
Leucodistrofia Metocromática	Arilsulfatase A	Sulfatídeo	Atraso mental e distúrbios psicológicos
Krabbe	β -Galactocerebrosidase	Galactosilceramida, Galactosilesfingosina	Atraso mental, perda de mielina
Niemann-Pick A/B	Esfingomielinase ácida	Esfingomielina	Hepato e esplenomegalia
Farber	Ceramidase ácida	Ceramida	Dermatites, atraso mental, deformação nas articulações

É importante notar que os lípidos formados pela degradação lipídica não estão capacitados para fazer parte dos processos de sinalização dentro ou fora das células. É o

caso particular da ceramida que é libertada da esfingomielina neste compartimento (lisossoma) pela acção da esfingomielinase ácida e que por ser uma molécula hidrofóbica não deverá atravessar a membrana lisossomal. No entanto, a sinalização de esfingolípidos pode ser iniciada neste compartimento. De facto, a esfingosina, produzida pela acção da ceramidase ácida sobre a ceramida, pode atravessar a membrana lisossomal e no citosol ser convertida em ceramida ou em esfingosina-1-fosfato; também a catepsina D (protease lisossomal) pode ser activada pela ceramida e, subsequentemente, os produtos resultantes da acção da catepsina D serem transportados para o citosol (revisto em Huwiler *et al.*, 2000). Por conseguinte, a disfunção celular que se verifica nestas doenças deverá resultar não só do defeito primário (bloqueio específico da via catabólica lisossomal) mas também de alterações secundárias desencadeadas a jusante da alteração primária.

Tal como referido anteriormente, as Esfingolipidoses são doenças hereditárias metabólicas de sobrecarga lisossomal causadas por mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no catabolismo lisossomal dos esfingolípidos. A maioria das enzimas e cofactores envolvidos nas Esfingolipidoses têm sido caracterizados ao nível do gene e da proteína, possibilitando a sua identificação laboratorial, por ensaios genéticos bioquímicos e moleculares, em indivíduos com suspeita clínica de DLSs. Os ensaios genéticos bioquímicos consistem na determinação do nível de actividade enzimática, recorrendo geralmente a substratos artificiais, cromogénicos ou fluorogénicos, que são específicos da enzima que se pretende estudar. No caso dos ensaios moleculares procede-se ao rastreio de mutações no gene implicado na patologia por métodos correntes de biologia molecular (por exemplo, análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ou sequenciação de produtos de PCR) (revisto em Wraith, 2002).

Os sintomas e a progressão destas doenças são variáveis. A idade de aparecimento dos primeiros sintomas ou sinais clínicos da doença pode variar entre o período neonatal até à idade adulta (formas crónicas) mas é frequente a doença manifestar-se durante a infância conduzindo, neste caso, a uma morte prematura nos primeiros anos de vida. A natureza dos primeiros sinais clínicos também é variável, podendo observar-se hidròpsia fetal, atraso no desenvolvimento psico-motor, ataxia, epilepsia, alterações oftalmológicas, alterações cardíacas, organomegalia, dismorfia facial e envolvimento

neuroológico. A medula óssea é afectada em muitas destas doenças, no entanto também pode afectar a pele e órgãos viscerais. (revisto em Wraith, 2002). De facto, há DLSs cujo envolvimento neuroológico é variável, não obstante o gene afectado ser o mesmo. É o caso, por exemplo, da Doença de Gaucher, que compreende forma neuropáticas e não-neuropáticas. A variabilidade clínica pode estar associada a uma heterogeneidade alélica que é evidenciada pela presença de diferentes tipos de mutações num mesmo gene (*missense*, *nonsense*, *splice-site*, inserções e deleções). Nesses casos, a actividade residual da enzima mutada pode correlacionar-se inversamente com a gravidade do fenótipo clínico (revisto em Huwiler *et al.*, 2000). Porém, em muitos casos não há uma óbvia correlação fenótipo-genótipo, e, não raramente, o mesmo genótipo é identificado em doentes com diferente grau de severidade clínica (revisto em Futerman e van Meer, 2004). Assim, apesar de serem doenças monogénicas, a severidade de uma dada DLS poderá não estar unicamente relacionada com a natureza da alteração génica e outros factores, tais como o tipo e o nível de substrato acumulado, genes modificadores e factores ambientais poderão influenciar a progressão da doença. No futuro, espera-se que sejam elucidadas as alterações secundárias provocadas pela acumulação de um substrato específico (ou grupo de substratos bioquimicamente semelhantes) nas vias metabólicas e celulares, bem como o grau de vulnerabilidade de diferentes tipos de células a essa acumulação. Globalmente, esse conhecimento permitirá uma melhor compreensão das causas da variabilidade clínica observada nestas patologias.

4) Abordagens terapêuticas

Para a maioria destas patologias não existe, ainda, uma forma definitiva de tratamento, o que normalmente acarreta grande responsabilidade para o doente e família. Na ausência de uma terapia que corrija o defeito bioquímico primário, o tratamento consiste em aliviar os sintomas clínicos, nomeadamente através de intervenções médico-cirúrgicas como, por exemplo, a esplenectomia se ocorrer aumento do volume do baço como se observa na Doença de Gaucher que é causada pela deficiência enzimática da β -glucocerebrosidase. No entanto, nas últimas duas décadas ocorreram avanços significativos no sentido de encontrar uma terapia que possa restaurar a capacidade catabólica lisossomal evitando, assim, a acumulação do(s) respectivo(s) substrato(s) (revisto em Kolter e Sandhoff, 2000).

As estratégias terapêuticas para as Esfingolipidoses (e também para as outras DLSs) incluem substituição enzimática, terapia génica, terapia mediada por células (ex. transplante de medula óssea, BMT), terapia de privação de substrato e terapia química por *chaperones* (revisto em Okzara, 2004). Estas abordagens terapêuticas, que estão ilustradas na Figura 6, actuam directamente sobre a causa da doença, ou ao nível do substrato acumulado ou sobre a enzima ou gene mutados.

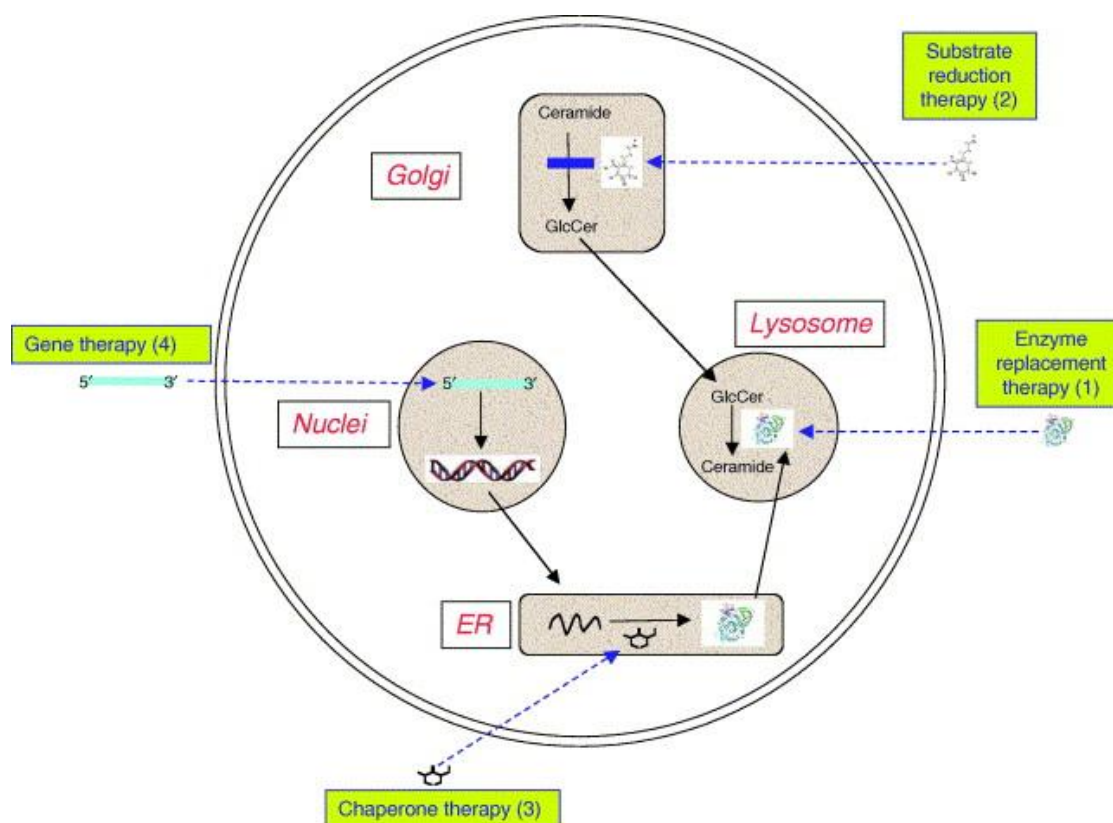


Figura 6 - Potenciais abordagens terapêuticas em DLSs. A figura ilustra uma doença lisossomal específica, a doença de Gaucher que é caracterizada pela acumulação de glucosilceramida (GlcCer). Figura extraída de Kacher e Futerman, 2006.

As Esfingolipidoses (e a generalidade das DLSs) são consideradas boas candidatas a terapias que tenham por objectivo o aumento da actividade enzimática, como é o caso da terapia por substituição enzimática e da terapia mediada por *chaperones*, porque, em princípio, um pequeno aumento de actividade da enzima deverá ser suficiente para impedir a progressão da doença. De facto, nas formas com um fenótipo mais suave,

como por exemplo as formas adultas crónicas que são caracterizadas pelo aparecimento da doença na idade adulta, a enzima mutante apresenta uma actividade residual que impede o aparecimento da doença numa idade mais precoce. No entanto, como a actividade da enzima decresceu para um valor crítico (actividade residual), observa-se numa dada altura acumulação de substrato de nível patológico (revisto em Huwiler *et al.*, 2000). Por outro lado, para que a terapia seja eficaz, ela deverá ser iniciada o mais precocemente possível, idealmente antes do aparecimento dos primeiros sintomas ou sinais clínicos. Para a identificação dos doentes numa fase pré-sintomática é essencial a referenciação da família afectada para uma consulta de aconselhamento genético visando a identificação dos portadores e subsequentemente, dos casais em risco para a patologia. Através dum diagnóstico pré-natal é possível estabelecer se o feto é ou não afectado com a patologia e, dessa forma, proceder ao melhor encaminhamento terapêutico após o nascimento (revisto em Wraith, 2002).

Terapia de substituição enzimática

O principal objectivo desta terapia é diminuir a acumulação de substrato substituindo a enzima lisossomal em falta ou mutante por uma enzima tipo-selvagem. Desta forma, espera-se repor a actividade da etapa do catabolismo lisossomal que se encontra bloqueada e, subsequentemente, produzir uma melhoria significativa ao nível dos sintomas clínicos ou, eventualmente, a sua reversão completa. Esta terapia consiste na administração de enzima exógena funcional através de repetidas infusões intravenosas ao longo da vida do doente (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

No caso das Esfingolipidoses, a primeira doença a ser tratada por esta abordagem foi a Doença de Gaucher. A doença de Gaucher é a forma mais comum das Esfingolipidoses. Deve-se à deficiência enzimática de glucocerebrosidase, o que origina a acumulação intralisossomal de glucosilceramida. Esta doença pode apresentar-se sobre 3 tipos clínicos: o tipo I, não neuropático, e os tipos II e III, que são formas neuropáticas e, consequentemente, a esperança de vida dos doentes com estas formas é menor do que no tipo I. No tipo I, a acumulação do substrato ocorre principalmente nos macrófagos, enquanto que nos tipos II e III o substrato acumula-se sobretudo nas células do sistema nervoso central (SNC), as quais degeneram com a progressão da

doença. Como a enzima não atravessa a barreira hemato-encefálica, a terapia por substituição enzimática é eficaz apenas no tratamento do tipo I. (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006; Raas-Rothschild *et al.*, 2004).

Quando este tratamento surgiu, em 1991, a enzima usada na reposição da actividade enzimática era extraída e purificada a partir de placenta humana. Apenas em 1994 a enzima passou a ser produzida de forma sintética, através da tecnologia de DNA recombinante, tornando o tratamento acessível a um maior número de doentes. No entanto, para assegurar que a enzima (proteína associada à membrana e que não é transportada para o lisossoma pela via da M6P) atinge as células alvo (macrófagos) durante a terapia, é usada uma enzima quimicamente modificada. A modificação consiste na fosforilação de resíduos de manose da enzima, para a produção de M6P o que, subsequentemente, promove o seu reconhecimento por parte dos receptores M6P existentes na membrana plasmática dos macrófagos e posterior internalização até ao sistema endolisossomal.

Actualmente esta terapia está disponível não só para a doença de Gaucher tipo I mas também para a doença de Fabry. A doença de Fabry manifesta-se frequentemente à nascença e é caracterizada pelo défice de actividade da enzima α -galactosidase A e subsequente acumulação de globotriosilceramida. Normalmente não apresenta envolvimento do SNC pois a deposição deste composto ocorre principalmente no coração, rins, olhos e córnea e em células do sistema autónomo. No entanto, com o evoluir da patologia, aparecem complicações ao nível dos rins, coração e cérebro levando á morte por volta dos 4/5 anos (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006; Raas-Rothschild *et al.*, 2004). Nesta doença, a enzima reposta é a α -galactosidase A derivada de fibroblastos humanos ou de células CHO (células uterinas de hamster) (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006). Na maioria dos doentes de Gaucher e de Fabry observou-se uma melhoria dos sintomas em resultado da intervenção terapêutica (Huwiller *et al.*, 2000; revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

Ao nível das desvantagens desta abordagem terapêutica é de referir o seu custo elevado e o facto de só poder ser usada em doenças não neuropáticas. Muitas enzimas glicoproteicas, devido à sua dimensão e massa molecular elevadas, não conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica e, por isso, não atingem a célula-alvo nas

doenças com envolvimento neuronal e que é a célula neuronal. Desta forma, ao nível das Esfingolipidoses a terapia de substituição enzimática é de aplicação limitada à doença de Gaucher tipo I e à doença de Fabry (revisto em Huwiler *et al.*, 2000; revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

Terapia Génica

Nestas doenças, o gene que codifica a enzima sofreu uma mutação que pode originar a ausência da enzima ou a perda parcial da sua actividade enzimática para um valor crítico que origina a acumulação de substrato. Esta terapia visa, assim, introduzir o gene tipo selvagem em células somáticas de um organismo, com o objectivo de substituir a enzima/proteína deficiente e, assim, conduzir à reversão, parcial ou total, do fenótipo clínico. A expressão endógena da enzima tipo selvagem pode ocorrer por manipulação de células *ex vivo* ou *in vivo* (revisto em Huwiler *et al.*, 2000).

Na manipulação celular *ex vivo*, fibroblastos, células hematopoiéticas ou sinoviócitos são retirados do doente, mantidos numa cultura celular e transfectadas ou transduzidas com o gene de interesse para posteriormente serem re-introduzidas no paciente. Esta abordagem apresenta a vantagem da correcção ser direccionada exactamente para as células alvo uma vez que as células podem ser repostas num local específico. Apesar de ser uma técnica segura, a grande desvantagem reside no facto de implicar um trabalho intensivo e, por isso, ainda não é o método mais usado no tratamento de Esfingolipidoses. Frequentemente, este método é utilizado conjuntamente com o transplante de medula óssea.

Na manipulação *in vivo*, a transferência génica é feita directamente nas células alvo do paciente com a ajuda de um vector viral ou de lipossomas. Os vectores virais mais usados são formas não patogénicas de adenovírus e de retrovírus. Esta abordagem apresenta várias desvantagens: a segurança é reduzida pois pode acarretar várias complicações como o facto de as células alvo não serem alcançadas e existe a possibilidade de ocorrer resposta imunitária, mutagénese dos vectores virais e/ou reacção inflamatória.

Ao nível das Esfingolipidoses, a terapia génica foi já reportado com algum sucesso na doença de Gaucher, quer em modelos animais quer em doentes, e há registo de progressos promissores em modelos animais de Tay-Sachs, Niemann-Pick, Fabry e Krabbe (revisto em Huwiler *et al.*, 2000; revisto em Okzara, 2004).

Terapia mediada por células

As células podem ser usadas como agentes terapêuticos no caso de reporem ou compensarem a população de células com defeito enzimático restaurando, deste modo, a função do órgão, ou para libertar enzimas que serão endocitadas pelas células vizinhas com deficiência enzimática. Esta técnica pode ocorrer por transplante da medula óssea (BMT) ou usando células embrionárias (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

O transplante de medula óssea é feito a partir de doadores sãos. Supostamente, as células medulares devem suprimir o defeito metabólico existente ao repor a enzima funcional que, desse modo, reduzirá a quantidade de lípidos armazenados (revisto em Huwiler *et al.*, 2000). Os macrófagos contidos na medula têm a capacidade de repor as enzimas deficientes para o sistema nervoso, pois estes atravessam a barreira hematoencefálica. Por esta razão é normalmente usada em doenças com vertente neuropática juntamente com a terapia génica, como na doença de Gaucher e de Krabbe, esta última caracterizada por destruição de oligodendrócitos. Na doença de Niemann-Pick há deficiência enzimática de esfingomielinase que leva à acumulação de esfingomielina, o qual é um componente importante para a formação da mielina das células neuronais, o que sugere desde logo que afecta principalmente o SNC. Clinicamente, a doença compreende 3 formas (A, B e C). Os sintomas são geralmente hepatoesplenomegalia e deterioração progressiva do sistema nervoso central. Apenas na forma C existe sobrevivência até á idade adulta, sendo os tipos A e B os mais letais e fatais. (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006; Raas-Rothschild *et al.*, 2004). Num estudo em modelo de rato que mimetiza o tipo B humano, foi observado que o transplante na fase inicial da doença tem um efeito positivo, originando a diminuição de alguns sintomas tais como o tamanho do fígado e do baço (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006). As principais desvantagens deste método consiste na dificuldade de reunir doadores sãos compatíveis

(revisto em Huwiler *et al.*, 2000) e no facto do tratamento estar associado a uma elevada morbidade e mortalidade (revisto em Okzara, 2004).

Relativamente à potencialidade das células embrionárias, esta é uma área em que presentemente não há ainda resultados definitivos, mas esperam-se avanços significativos no futuro. A possibilidade de transplante de células neuronais fetais ou de células embrionárias directamente para o cérebro, permitirá ultrapassar o problema decorrente da existência da barreira hemato-encefálica que é selectiva para a maior parte das moléculas. Contudo, não há presentemente certeza quanto à ocorrência de interacção célula-célula e se os neurónios maduros, enzimaticamente deficientes, serão capazes de endocitar a enzima funcional libertada pelas células vizinhas (Watts, 2003).

Terapia de privação de substrato

Esta abordagem consiste na utilização de um inibidor enzimático, normalmente da fase inicial da biossíntese dos ESLs, como a N-butildesoxinogiramicina (NB-DNJ) que inibe a glicosiltransferase que catalisa o primeiro passo da biossíntese dos GESLs. Geralmente esta abordagem é aplicada em doentes que exibem uma actividade enzimática residual, e usada individualmente ou em combinação com outros métodos, nomeadamente aqueles que visam normalizar o nível de actividade enzimática tal como a terapia de substituição enzimática. A NB-DNJ inibe o primeiro passo da biossíntese da GESLs isto é, a etapa em que a glicose é transferida para a ceramida, formando a glicosilceramida. Como a glicosilceramida é o precursor dos restantes GESLs, a NB-DNJ tem potencialidades para tratar todas as patologias caracterizadas pela acumulação de GESLs (doença de Gaucher tipos 1, 2 e 3, Fabry, Tay-Sachs, Sandhoff e Gangliosidose GM1). A potencialidade da utilização de uma terapia combinada (terapia de privação de substrato e terapia de substituição enzimática) assenta no pressuposto de não ser necessário normalizar o nível de actividade enzimática mas apenas promover um aumento moderado de actividade enzimática já que o nível total de substrato na célula irá ser balanceado pela inibição da sua biossíntese promovida pela NB-DNJ (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006). Num modelo de rato com doença de Tay-Sachs a aplicação de NB-DNJ numa fase assintomática levou à redução da sobrecarga lipídica no cérebro, enquanto que num modelo de rato com doença de Sandhoff se observou o

aumento da esperança de vida (Andersson *et al.*, 2000). Os bons resultados que têm sido alcançados com a aplicação desta abordagem terapêutica das formas neuropáticas destas doenças devem-se ao facto de o material armazenado nas células alvo ser acessível á droga. No entanto, são ainda várias as desvantagens que lhe estão associadas. A dose de NB-DNJ que deve ser usada no tratamento das formas neurológicas destas doenças é elevada para garantir que a sua concentração no fluido cerebrospinal é cerca de 10% do nível sérico. Por outro lado, este inibidor não é selectivo e suprime, pelo menos parcialmente, a actividade enzimática de várias enzimas. Consequentemente, os custos são elevados, ocorrem efeitos secundários indesejáveis decorrentes da utilização de uma elevada concentração de inibidor e do facto de não ser selectivo, tais como diarreia (porque inibe as dissacaridases intestinais), especialmente se o tratamento for prolongado. Adicionalmente, algumas características clínicas, tais como alterações esqueléticas, respondem lentamente ao tratamento. Os custos são provavelmente muito elevados para esta terapia (revisto em Platt *et al.*, 2005). O análogo NB-DGJ (galactose) é também um inibidor selectivo de glicosiltransferases. *In vitro*, foi demonstrado uma eficácia comparável à do NB-DNG em alguns casos, mas este não inibe, por exemplo, a β -glucocerebrosidase. No entanto, o tratamento com NB-DGJ não causa tantos efeitos secundários como a NB-DNJ (Andersson *et al.*, 2000; revisto em Platt *et al.*, 2005). Desenvolvimentos futuros deverão contribuir para a identificação de outros inibidores da biossíntese dos GESLs, que actuem de forma eficaz, mais selectiva e possuam menos efeitos secundários.

Terapia por *Chaperones*

As enzimas hidrolíticas lisossomais são glicoproteínas cuja biossíntese se inicia no RER. Estão descritas mutações que originam alterações conformacionais na proteína, que estão na origem da sua retenção no lúmen do RER e subsequente degradação. Contudo, a mutação não interfere directamente com o centro catalítico da enzima. A terapia mediada por *chaperones* farmacológicos fundamenta-se na associação reversível de ligandos específicos de baixo peso molecular às proteínas, com o propósito de as estabilizar conformacionalmente e assegurar o seu transporte correcto até ao lisossoma (Ellgaard e Helenius, 2001). Assim, estas moléculas têm sido usadas como “activadores” nas DLS de armazenamento lipídico, produzindo um aumento residual da

actividade enzimática suficiente para produzir a reversão, pelo menos parcial, dos sinais e sintomas específicos da doença (revisto em Kacher e Futerman, 2006).

Esta abordagem terapêutica tem sido aplicada com sucesso na doença de Fabry e na doença de Gaucher. Por exemplo, na doença de Fabry um *chaperone* quimicamente modificado com galactose foi testado com sucesso num doente com patologia cardíaca associada, conjuntamente com o inibidor NB-DGJ. Esta terapia combinada foi também testada num modelo animal, e em ambos os casos observou-se um aumento da actividade enzimática da α -galactosidase A no coração e uma redução do nível de acumulação de globotriaosilceramida (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006). Como vantagens desta abordagem terapêutica é de referir o facto destes agentes farmacológicos poderem ser administrados por via oral, atravessarem a barreira hematoencefálica e não acarretarem custos elevados (revisto em Okzara, 2004).

Em conclusão, apesar de todos os esforços que têm sido desenvolvidos no sentido de encontrar uma terapia que permita, de facto, a cura das doenças lisossomais, até à data apenas num número reduzido de doenças é possível propor um tratamento que alivie os sintomas e a progressão da doença. Muito recentemente foi publicado um estudo (Medina *et al.*, 2011) que descreve as potencialidades dum método completamente inovador. Este método baseia-se na entrada de cálcio para o interior dos lisossomas, fazendo com que o conteúdo do organelo acumulado (substrato) seja exocitado. Isto acontece porque o factor de transcrição EB (TFEB) regulador de exocitose lisossomal aumenta a concentração de cálcio intracelular através da activação do gene *MCOLN1* que codifica o canal de cálcio lisossomal Muco1ipina 1. Subsequentemente, a depleção de cálcio lisossomal origina a aproximação dos lisossomas à membrana plasmática, fusão e exocitose do seu conteúdo luminal. Este método foi testado *in vitro* em vários tipos celulares, nomeadamente em células progenitoras neuronais e em fibroblastos embrionários de ratinho de diversos modelos de DLSs, e em fibroblastos de doentes com DLS. Os resultados obtidos ao nível do restabelecimento da morfologia celular sugerem que esta nova abordagem terapêutica por exocitose lisossomal poderá reduzir os sintomas provocados pela sobrecarga lisossomal e aumentar a esperança média de vida. Nessa medida, a indução farmacológica de TFEB poderá vir a representar, no futuro, uma nova esperança para os doentes e seus familiares.

Capítulo IV

Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho teve como objectivo principal apresentar, mediante pesquisa bibliográfica, as diferentes abordagens terapêuticas relativas a doenças hereditárias do catabolismo esfingolipídico, as Esfingolipidoses. Deste modo, foi efectuado um enquadramento temático sobre os esfingolípidos ao nível da sua estrutura e função celular, e também quanto ao seu metabolismo. Para uma melhor compreensão da etiologia deste tipo de patologias, caracterizou-se o catabolismo dos esfingolípidos que ocorre nos lisossomas por acção de hidrolases ácidas específicas. A deficiência enzimática duma destas hidrolases e subsequente acumulação do respectivo substrato está na origem das Esfingolipidoses. As Esfingolipidoses são doenças atractivas em termos terapêuticos porque, teoricamente, um pequeno aumento de actividade acima da actividade enzimática residual deverá ser suficiente para a reversão da doença. Deste modo, a estratégia terapêutica mais atractiva consiste na reposição dessa falha enzimática, a qual ao ocorrer de forma eficaz deverá impedir o aparecimento da doença, nomeadamente ao nível dos sintomas e sinais específicos associados aos órgãos particularmente afectados pela acumulação intralissossomal de substrato, e restabelecer a esperança média de vida. Neste âmbito, a utilização de modelos animais (rato, mais frequentemente) revelou-se particularmente importante antes da fase da experimentação em modelos humanos. As doenças lisossomais compreendem formas neurológicas e formas não-neurológicas. Apesar de presentemente serem conhecidas várias abordagens terapêuticas, as formas neurológicas continuam a constituir um enorme desafio para a cura efectiva da doença. No caso das formas sem envolvimento neurológico, como é o caso da doença de Gaucher (tipo 1) e da doença de Fabry, têm sido reportados bons resultados na melhoria dos sintomas e no aumento da esperança média de vida, designadamente quando tratados com a terapia de substituição enzimática. No entanto, trata-se de uma abordagem terapêutica que acarreta custos económicos muito elevados e que, em alguns casos, tem sido demonstrada uma maior eficácia terapêutica quando administrada conjuntamente com a terapia de privação de substrato. No entanto, esta última abordagem ainda encerra efeitos secundários indesejáveis que deverão ser, futuramente, minimizados.

Dada as áreas emergentes em que os esfingolípidos têm sido envolvidos, nomeadamente cancro, diabetes, aterosclerose e infecções virais, é provável que as abordagens terapêuticas nas Esfingolipidoses venham a beneficiar dos avanços técnico-científicos que se venham a verificarem nessas patologias ao nível da função dos

esfingolípidos, até porque o tratamento das Esfingolipidoses também pode ser encarado a partir da correção das alterações secundárias que se observem nas células a jusante do defeito primário. Adicionalmente, a terapia celular também é uma abordagem muito promissora e neste domínio é de esperar que os avanços técnico-científicos que se venham a registar no tratamento de outras doenças neurológicas, como por exemplo a doença de Alzheimer, revertam favoravelmente para o tratamento das Esfingolipidoses com envolvimento neurológico.

Em conclusão, a continuidade da investigação nesta área deverá permitir, no futuro, encontrar formas terapêuticas mais eficazes, nomeadamente para o tratamento das doenças com envolvimento neurológico, e compreender melhor as vantagens e as desvantagens da aplicação conjunta de diferentes tipos de terapia.

BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell* 4th Edition, Garland science, New York. 744.

Andersson U, Butters T, Dwek R, Platt F (2000). N-Butyldeoxygalactonojirimycin: A more selective inhibitor of glycosphingolipid biosynthesis than N-Butyldeoxynojirimycin, in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology* 59: 821-829.

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 JL, Fabriás G (2007). Chemical Tools to Investigate Sphingolipid Metabolism and Functions. *ChemMedChem* 2: 580-606.

Downing DT (1992). Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *Journal of lipid research* 33: 301-313.

Dwek R, Butters T, Neises G, Platt F (1994). N-Butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 8362-8365.

Ellgaard L, Helenius A (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13: 431-437.

Eskelinen E, Tanaka Y, Saftig P (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Cell Biology* 13: 137-145.

Futerman AH e van Meer G (2004). The cell biology of lysosomal storage diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 554-65.

Huwiller A, Kolter T, Pfeilschifer J, Sandhoff K (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1485: 63-99.

Kacher Y, Futerman AH (2006). Genetic diseases of sphingolipid metabolism: pathological mechanisms and therapeutic options. *FEBS Lett* 580: 5510-5517

Kolter T, Sandhoff K (2006). Sphingolipid metabolism diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 2057-2079.

Kornfeld S, Mellman I (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5: 483-525.

Levade T, Jaffrézou JP (1999). Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?. *Biochim Biophys Acta* 1438: 1-17.

Luzio J, Rous B, Bright N, Pryor P, Mullock B, Piper R (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *Journal of Cell Science* 113: 1515-1524.

Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki K (2007). The function of sphingolipids in the nervous system: lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies. *Journal of Neurochemistry* 103: 32–38.

Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, Puri C, Pignata A, Martina JA, Sardiello M, Palmieri M, Polishchuk R, Puertollano R, Ballabio A (2011). Transcriptional Activation of Lysosomal Exocytosis Promotes Cellular Clearance. *Developmental Cell* 21: 421-430.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 281: 249-254.

Mullins C, Bonifacino J (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23: 333-43.

Okzara H (2004). Recent advances in the biochemistry and genetics of sphingolipidoses. *Brain & Development* 26: 497–505.

Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC (2003). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *European Journal of Human Genetics* 12: 87-92.

Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, Dwek RA, Butters TD (2005). New developments in treating glycosphingolipid storage diseases. *Adv Exp Med Biol* 564: 117-126.

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human Genetic* 105: 151-156.

Raas-Rothschild A, Pankova-Kholmyansky I, Kacher Y, Futerman AH (2004). Glycosphingolipidoses: beyond the enzymatic defect. *Glycoconjugate Journal* 21: 295-304.

Rouillé Y, Rohn W, Hoflack B (2000). Targeting of lysosomal proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11: 165-171.

Sillence DJ, Platt FM (2003). Storage diseases: new insights into sphingolipid functions. *TRENDS in Cell Biology* 13: 195-203.

Simons K, Gerl MJ (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 688-699.

Sourkes TL (1995). The protagon phoenix. *Journal of the history of the neuroscience* 4: 37-62.

Staubach S, Hanisch FG (2011). Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev Proteomica* 8: 263-277.

Watts, RWE (2003). A historical perspective of the glycosphingolipids and sphingolipidoses. *Phil Trans R Soc Lond* 358: 975-983.

Wertz PW, van den Bergh B (1998). The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chemistry and physics of lipids* 91: 85-96.

Wraith JE (2002). Lysosomal disorders. *Seminars in neonatology* 7: 75-83.