

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Ciências
ULisboa

**Novas abordagens para o tratamento da fenilcetonúria:
pequenas moléculas moduladoras da atividade e estabilidade
da fenilalanina hidroxilase humana**

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Raquel Rodrigues Lopes

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Ana Paula Leandro
Professor Doutor Francisco Pinto

Agradecimentos

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Bioquímica me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À *Professora Maria João Silva*, que me trouxe até ao grupo Metabolismo e Genética do Instituto do Medicamento (iMed.UL) da Faculdade de Farmácia da ULisboa, no qual conheci pessoas fantásticas e onde fui tão bem-recebida!

À *Professora Ana Paula Leandro*, orientadora desta tese, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação, pelo incentivo, pela disponibilidade e apoio que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu ao integrar-me neste Grupo de Investigação e reconhecimento, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do Projecto.

Aos *Meus Colegas de Laboratório*, João, Sofia, Kátia, Hana, Carolina, e Marco, um Muito Obrigada pelos vossos ensinamentos, a vossa amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

Aos *Meus Amigos*, que estiveram ao meu lado durante esta fase, pela amizade, força e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao *Meu Namorado*, meu amigo e companheiro, por todos os momentos vividos, por estar sempre presente, mesmo quando ausente, para me ouvir e incentivar. Obrigada por sempre acreditares em mim e por me teres feito acreditar que era capaz.

À *Minha Família*, em especial aos *Meus Pais*, à *Minha Irmã*, à *Minha Avó* e aos *Meus Tios e Primos*, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Resumo

A fenilcetonúria (PKU; OMIM #261600) é o erro hereditário mais comum do metabolismo de aminoácidos em populações Caucásicas, afetando cerca de 1 em cada 10.000 recém-nascidos. Esta doença metabólica é caracterizada por mutações no gene *PAH*, que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase humana (hPAH; EC 1.14.16.1). A hPAH é uma enzima homotetramérica, que catalisa a conversão da L-fenilalanina (L-Phe) em L-tirosina (L-Tyr) por *para*-hidroxilação da cadeia lateral aromática daquele aminoácido. Para que esta reação ocorra, a hPAH requer o cofator tetrahidrobiopterina (BH₄), ferro não hémico e oxigénio molecular (O₂).

Até muito recentemente a terapia dietética era a única abordagem disponível para o tratamento dos doentes PKU, de modo a evitar o desenvolvimento de danos cerebrais irreversíveis. No entanto, e devido à dificuldade em aderir ao tratamento dietético, novas abordagens terapêuticas, menos restritivas, estão em estudo. Sendo a PKU classificada como doença conformacional por *loss of function* a administração da BH₄ como chaperone farmacológico é uma nova abordagem terapêutica recente. No entanto, estes tratamentos estão longe de abranger todo o espectro fenotípico da doença, em especial o fenótipo de PKU clássica, mais grave.

Os grupos de Metabolismos e Genética e Química Bio-orgânica do Instituto de Investigação do Medicamento (iMed-ULisboa) têm estado envolvidos no desenvolvimento de compostos que possam ativar e/ou estabilizar a hPAH de modo a constituírem novas abordagens terapêuticas da PKU. Com base no conhecimento da estrutura da hPAH postulámos que os derivados de 3-hidroxiquinolin-2-onas (3-HQs) poderiam ser um modelo útil para o desenho de novos moduladores da atividade e/ou estabilidade desta proteína.

Neste trabalho foi constituída uma pequena biblioteca de compostos (derivados da 3-HQ) que foram testados pelo seu efeito na atividade, estabilidade e conformação da hPAH selvagem. Foi ainda avaliada a sua toxicidade celular. Dos 22 derivados 3-HQs, identificamos com sucesso dois conjuntos de moléculas que visam dois modos de ação diferentes atuando como: (i) “chaperones de atividade” pela sua capacidade de pré-ativar a hPAH (C4 / C6 / C12; 1,7 / 1,6 / 1,6 vezes, respetivamente) ou por permitir a ativação pela L-Phe (C5 / C6 / C14 / C16; aumento de 3,2 / 1,5 / 1,7 / 2,0 vezes, respetivamente) e, (ii) “chaperones farmacológicos” uma vez que aumentam a temperatura de desnaturação (T_m) do domínio regulador (C2 / C6 / C13 / C20; aumento do T_{m1} de 8,3°C / 4,0°C / 7,8°C / 2,6°C, respetivamente) ou do domínio catalítico (C20 / C21; aumento do T_{m2} de 4,2°C / 2,2°C, respetivamente) da hPAHwt.

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que o núcleo 3-HQ é um *scaffold* adequado para o desenho e desenvolvimento de compostos com atividade sobre a hPAH e um excelente ponto de partida para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a PKU.

Palavras-Chave: fenilcetonúria, fenilalanina hidroxilase humana, chaperones farmacológicos.

Abstract

Phenylketonuria (PKU, OMIN # 261600) is the most common inherited defect of amino acid metabolism in Caucasian populations, affecting about 1 in 10.000 newborns. This metabolic disease is characterized by mutations in the *PAH* gene, which encodes the human phenylalanine hydroxylase (hPAH, EC 1.14.16.1). The hPAH is a homotetrameric enzyme, which catalyzes the conversion of L-phenylalanine (L-Phe) to L-tyrosine (L-Tyr) by *para*-hydroxylation of the aromatic side chain of that amino acid. For this reaction to occur, hPAH requires the tetrahydrobiopterin cofactor (BH₄), non-heme iron and molecular oxygen (O₂).

Till very recently, dietary therapy was the only approach available for the treatment of PKU patients in order to prevent the development of irreversible brain damage. However, as adherence to this dietetic treatment is difficult, new and less restrictive therapeutic approach are under study. Since PKU is classified as conformational disease by loss of function, administration of BH₄ as a pharmacological chaperone is recent and innovative therapeutic approach. However, these treatments are far from encompassing the entire phenotypic spectrum of the disease, especially the most severe form (classical PKU).

The Metabolism and Genetics (Met&Gen) and Bioorganic Chemistry Groups from the Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), have been involved in the development of compounds that can activate and/or stabilize hPAH to constitute a new therapeutic approach for PKU. Based on the knowledge of hPAH structure, we postulated that 3-hydroxyquinolin-2-ones (3-HQs) derivatives could be a useful scaffold for the design of new modulators of the activity and/or stability of this protein.

In this work a small library of compounds (3HQs derivatives) was created and was tested for their effect on the activity, stability and conformation of the wild-type hPAH. The cellular toxicity was also evaluated. From the 22 compounds, we successfully identified two sets of molecules targeting two different modes of action: (i) acting as “activity chaperones” for their ability to pre-activate hPAH (**C4** / **C6** / **C12**; 1,7 / 1,6 / 1,6-fold, respectively) or to allow L-Phe activation (**C5** / **C6** / **C14** / **C16**; increase of 3,2 / 1,5 / 1,7 / 2,0-fold respectively), and (ii) acting as “pharmacological chaperones” for their effect upon the thermostability of the hPAH regulatory (**C2** / **C6** / **C13** / **C20**; T_{m1} increase of 8,3 / 4,0 / 7,8°C / 2,6°C, respectively) and catalytic domain (**C20** / **C21**; T_{m2} increase of 4,2 / 2,4°C, respectively).

The results obtained in this work demonstrate that the 3HQ core is a suitable scaffold for the design and development of compounds with activity on hPAH and an excellent starting point for the development of new therapeutic agents for PKU.

Key Words: phenylketonuria, human phenylalanine hydroxylase, pharmacological chaperones

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Palavras-Chave.....	iii
Abstract	iv
Key Words	iv
Índice	v
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiii
Abreviaturas	xv
I. INTRODUÇÃO	1
1. Fenilalanina hidroxilase humana	1
1.1. Via Metabólica.....	1
1.2. O gene PAH.....	2
1.3. Características bioquímicas	3
1.4. Características estruturais	4
1.4.1. Domínio regulador	4
1.4.2. Domínio catalítico.....	5
1.4.3. Domínio de oligomerização.....	6
1.5. Regulação	6
2. Fenilcetonúria	7
2.1. Espectro Mutacional e Incidência	7
2.2. Classificação	8
2.3. Patogenicidade	9

2.4. Diagnóstico e Monitorização	10
2.5. Tratamento	11
2.5.1. Terapêuticas em utilização.....	12
2.5.1.1. Dieta	12
2.5.1.2. Tetrahydrobiopterina / Kuvan	13
2.5.2. Terapêuticas em desenvolvimento.....	14
2.5.2.1. Glicomacropéptidos.....	15
2.5.2.2. Aminoácidos grandes e neutros (LNAA – Large neutral amino acids).....	15
2.5.2.3. Terapia enzimática.....	15
2.5.2.4. Probióticos	17
2.5.2.5. Terapia génica	17
2.5.2.6. PAH-tag	18
2.5.2.7. Chaperones farmacológicos	18
3. Doenças conformacionais.....	19
3.1. O folding proteico	20
3.2. O misfolding proteico	21
3.3. O misfolding proteico como base das Doenças Conformacionais	21
3.4. Abordagens terapêuticas para as doenças conformacionais.....	22
3.5. A fenilcetonúria como doença conformacional	23
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
1. Materiais	27
1.1. Reagentes	27
1.2. Células, estirpe de bactérias e vetores de expressão.....	27
1.3. Compostos em estudo.....	28
2. Métodos	28
2.1. Expressão e purificação da proteína recombinante hPAHwt	28

2.1.1.	Indução e Expressão proteica.....	28
2.1.2.	Purificação da hPAH.....	29
2.1.3.	Cromatografia de Afinidade com Iões Imobilizados (IMAC).....	29
2.1.4.	Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC).....	29
2.1.5.	Determinação da concentração de proteína pelo Método de Bradford	30
2.1.6.	Análise por Eletroforese (SDS-PAGE).....	30
2.2.	Ensaio enzimático	31
2.3.	Caraterização do perfil de estabilidade térmica	32
2.4.	Proteólise limitada.....	33
2.5.	Ensaio de inibição da tripsina.....	33
2.6.	Ensaio de citotoxicidade.....	33
2.7.	Ensaio de ressonância paramagnética eletrónica	34
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
1.	Rendimento e grau de pureza da proteína recombinante produzida	35
2.	Efeito dos derivados 3-HQs na estrutura e função da hPAHwt	37
2.1.	Caracterização funcional e estrutural da hPAHwt.....	37
2.1.1.	Atividade enzimática.....	37
2.1.2.	Perfil de estabilidade térmica.....	38
2.1.3.	Proteólise limitada.....	39
2.2.	Efeito dos compostos derivados de 3HQs	40
2.2.1.	Atividade enzimática.....	43
2.2.2.	Perfil de estabilidade térmica.....	46
2.2.3.	Proteólise limitada.....	48
2.2.4.	Ensaio de citotoxicidade.....	51
2.2.5.	Ensaio de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica.....	53
3.	Optimização de um método para determinação da atividade da hPAHwt por fluorescência .54	
V.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	57

VI. BIBLIOGRAFIA.....	59
VII. ANEXOS.....	67

Índice de Figuras

Figura I.1. Esquema representativo do metabolismo da fenilalanina. A fenilalanina no organismo humano é maioritariamente proveniente da ingestão dietética. Na presença de oxigénio molecular (O_2), ocorre a hidroxilação da fenilalanina em tirosina pela fenilalanina hidroxilase (PAH), na presença da tetrahydrobiopterina (BH_4), o seu cofator natural. Esta via metabólica conduz posteriormente à formação de CO_2 e H_2O . Por descarboxilação, há produção de vários metabolitos que são excretados na urina, constituindo a via alternativa ao catabolismo da fenilalanina2

Figura I.2. Representação da estrutura do gene PAH que se encontra localizado no braço longo do cromossoma 12 e que contém 13 exões que codificam para um polipéptido de 452 aminoácidos.⁽⁷⁾2

Figura I.3. Reação catalisada pela fenilalanina hidroxilase e via de regeneração do cofator, tetrahydrobiopterina (BH_4).3

Figura I.4. Representação da estrutura e organização dos domínios da PAH humana (hPAH). (A) Estrutura do domínio funcional da hPAH: domínio regulador (RD), domínio catalítico (CD) e domínio de oligomerização (OD). (B e C) Modelos do monómero (B) e tetrâmero (C) da hPAH obtidos pela combinação da estrutura da forma dimérica da PAH de rato truncada a C-terminal e a forma tetramérica da hPAH truncada a N-terminal. As cores dos domínios (RD a vermelho, CD a azul e OD a verde) da representação esquemática em A correspondem às mesmas cores do monómero representado em B e este também aparece nas mesmas cores em (C). Um dos monómeros em C está representado pela mesma cor representada em B, enquanto os outros monómeros estão representados em cinzento, roxo e laranja4

Figura I.5. Localização e interações do ferro na estrutura da hPAH. Os domínios regulador, catalítico e de oligomerização/tetramerização encontram-se representados a azul, amarelo e verde, respetivamente. Em detalhe é mostrado o ferro não hémico (vermelho) localizado no domínio catalítico, hexacoordenado com três moléculas de água (azul), a His285, a His290 e o Glu330. São também mostrados alguns resíduos que estão associados a mutações na fenilcetonúria (Thr278, Glu280, Pro281, Trp326, Phe331) e que estão localizados perto do ferro no centro ativo.5

Figura I.6. Potenciais mecanismos responsáveis pela deficiência neurocognitiva observada nos doentes hiperfenilalaninémicos.⁽⁴⁴⁾ (BBB) barreira hemato encefálica; (LAT1) transportador de aminoácidos L do tipo I; (LNAA) aminoácidos grandes e neutros.10

Figura I.7. Reação catalisada pela fenilalanina amónia liase (PAL).16

Figura I.8. Paisagem energética de folding e misfolding de proteínas. As interações energeticamente favoráveis intramoleculares (verde) estão associadas a um aumento da estabilidade conformacional no decurso da progressão do folding da proteína até ao estado nativo. Durante este processo, as proteínas podem adotar conformações energeticamente favoráveis, mas não-nativas. Estes estão localizados em zonas de baixa energia (parcialmente folded ou estados misfolded). Além disso, os estados cineticamente desfavoráveis são propensos a estabelecer interações intermoleculares (vermelho), que resultam em agregados proteicos (agregados amorfos, folhas beta ricas em oligómeros e fibrilhas

amilóides). Os chaperones ajudam a ultrapassar as barreiras energéticas, inibem as interações intermoleculares e, portanto, promovem o correto folding para o estado nativo.....20

Figura III.1. Estrutura química do núcleo 3-hidroxi-2-quinolinonas (3-HQs).....28

Figura III.2. Esquema da adição dos diversos componentes da reação enzimática para estudo do efeito dos derivados da 3-HQs sobre a atividade da hPAHwt.31

Figura IV.1. Análise por SDS-PAGE do perfil de eluição da proteína hPAHwt após purificação por IMAC utilizando 6 x 500 µL de solução tampão de lise contendo 250 mM de imidazol (1 a 6). (MM) marcador de massas moleculares pré-corado (NzyColour protein marker II). É indicada a MM da hPAHwt de fusão (54 kDa) e que corresponde à MM da hPAHwt (52 kDa) e do péptido de fusão 6xHis (2 kDa).35

Figura IV.2. Análise por SDS-PAGE do perfil de purificação por IMAC da hPAHwt. Flow through (1); Lavagens com tampão de lise contendo 20 mM (2 e 3), 50 mM (4 e 5) e 75 mM (6) de imidazol. Eluição com tampão de lise contendo 250 mM de imidazol (7 a 9). Em todas as amostras foi aplicado o volume de 16 µL. (MM) Marcador de massas moleculares pré-corado36

Figura IV.3. Perfil cromatográfico da proteína recombinante hPAHwt, obtido por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Os números indicam os volumes de eluição das formas agregadas (1), octâmeros/hexâmeros (2), tetrâmeros (3) e dímeros (4).....36

Figura IV.4 Perfil de estabilidade térmica da proteína recombinante hPAHwt obtido por fluorimetria diferencial de varrimento (DSF). Os perfis apresentados representam a hPAHwt na presença de DMSO 1% (○) e na presença de L-Phe a 1 mM (◐). O perfil bifásico da curva de desnaturação permite determinar duas transições associadas ao T_{m1} e T_{m2} (indicados).38

Figura IV.5. Perfil da proteólise limitada da hPAHwt pela tripsina, na presença de tampão (●) e na presença de 1 mM de L-Phe (◐).39

Figura IV.6. Racional para a utilização de derivados de 3-hidroxi-2-quinolinonas (3-HQs) como moduladores da hPAHwt. Em A é apresentado o mecanismo de coordenação do núcleo 3-HQ com íons metálicos (M) como o Fe(II) ou Co(II). Em B é mostrado o bioisosterismo entre a glicina e parte da estrutura da 3-HQ.....40

Figura IV.7. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt na condição “Não Ativado”. Os dados são apresentados como média ± SD. A linha indica o valor obtido para o ensaio controle (DMSO a 1%). Os compostos foram testados numa concentração de 100 µM.43

Figura IV.8. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt na condição “Pré-Ativação pelo Composto”. Os dados são apresentados como média ± SD. As linhas indicam os limites de 25, 50 e 75% da atividade em relação ao valor obtido para o ensaio controle onde foi utilizado DMSO a 1% como composto (■). Os compostos foram testados numa concentração de 100 µM.44

Figura IV.9. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt nas condições “Não Ativado” (■) e “Pré-Ativação pelo Composto” (◐). Os dados são apresentados como média ± SD. O significado estatístico é dado por *P<0,1; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001 (n=3), para a

ativação relativa entre as condições “Pré-Ativação pelo Composto” e “Não Ativado”. Os compostos foram testados numa concentração de 100 μ M.44

Figura IV.10. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt nas condições “Pré-Ativação pelo Composto” (■) e “Pré-Ativação pelo Composto e Substrato” (■). Os dados são apresentados como média \pm SD. O significado estatístico é dado por *P<0,1; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001 (n=3), para a ativação relativa entre a condição “Pré-Ativação pelo Composto” e a condição “Pré-Ativação pelo Composto e Substrato”. Os compostos foram testados numa concentração de 100 μ M.45

Figura IV.11. Perfil de estabilidade térmica da proteína recombinante hPAHwt obtido por fluorimetria diferencial de varrimento (DSF). Os perfis apresentados representam a hPAHwt na presença de DMSO 1% (○), na presença de L-Phe a 1 mM (○), na presença do composto C11 (○) e na presença do composto C20 (○).46

Figura IV.12. Valores das temperaturas de desnaturação térmica do domínio regulador (T_{m1}) e domínio catalítico (T_{m2}) da hPAHwt na presença dos compostos em estudo. Os dados são apresentados como média \pm SD. O significado estatístico é dado por *P<0,1; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001 (n=3). Os compostos foram testados numa concentração de 100 μ M. O ensaio realizado na presença de 1% de DMSO foi considerado o ensaio controlo (T_{m1} 43,4°C e T_{m2} 53,5°C).47

Figura IV.13. Perfil de proteólise limitada da hPAHwt pela tripsina, na presença de DMSO 1% (●), C6 (●), C9 (●) e C21 (●). Os compostos foram testados numa concentração de 100 μ M.48

Figura IV.14. Valores de tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) obtidos por proteólise limitada pela tripsina na ausência e presença dos derivados 3-HQs em estudo (100 μ M). O ensaio realizado na presença de 1% de DMSO foi considerado o ensaio controlo ($t_{1/2}$ 9,49 min).49

Figura IV.15. Atividade da tripsina monitorizada pelo aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo por libertação de 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) após hidrólise do substrato N-CBZ-Gly-Gly-Arg-AMC. DMSO 1% (●), composto C6 (●), composto C9 (●), composto C10 (●) e composto C18 (●).50

Figura IV.16. Atividade relativa da tripsina na presença dos derivados 3-HQs a 100 μ M. A atividade na ausência de compostos (DMSO 1%) foi considerada como sendo 100%.50

Figura IV.17. Percentagem de redução de Alamar Blue na presença dos derivados 3-HQs nas concentrações de 50 μ M (■) e 100 μ M (■) para monitorização da citotoxicidade. O valor obtido na presença de meio de cultura (controlo negativo) foi considerado 100%. O SDS foi utilizado como controlo positivo (efeito citotóxico).51

Figura IV.18. Taxa de retenção de iodeto de propídio (PI) na presença dos derivados 3-HQs nas concentrações de 50 μ M (■) e 100 μ M (■) para monitorização da citotoxicidade. O valor obtido na presença de meio de cultura (controlo negativo) foi considerado 1. O SDS foi utilizado como controlo positivo (efeito citotóxico).52

Figura IV.19. Espectro de EPR da hPAHwt, na presença dos derivados 3-HQs C1, C2, C5 e C17 (100 μ M). O DMSO a 1% foi utilizado controlo.53

Figura IV.20. Curva de calibração da L-Tyr, obtida por leitura da sua intensidade de fluorescência natural no leitor de placas de 96 poços FLUOstar OMEGA, equipado com um sistema de injeção e filtros de 260 nm (λ_{exc}) e 310 nm (λ_{em}). Ver texto para detalhes.	54
Figura IV.21. Medição em contínuo da atividade da hPAHwt sem (■) e com (●) pré-ativação pelo substrato L-Phe (1 mM) através da monitorização do aumento na intensidade de fluorescência do meio reacional pela produção de L-Tyr.	55
Figura VII.1. Vetor de expressão utilizado para a produção da hPAHwt.	67
Figura VII.2. Curva de calibração utilizada na quantificação proteica pelo método de Bradford utilizando como padrões albumina de soro bovino (BSA).	68

Índice de Tabelas

Tabela IV.1. Análise das propriedades enzimáticas da proteína recombinante hPAHwt.	37
Tabela IV.2. Valores das temperaturas de desnaturação (T_m) determinadas por fluorimetria diferencial de varrimento (DSF), na ausência e na presença de 1 mM L-Phe.	38
Tabela IV.3. Parâmetros indicativos da suscetibilidade da hPAHwt à ação da tripsina na ausência e na presença de 1 mM L-Phe.	39
Tabela IV.4. Estrutura e massa molecular dos vinte e dois compostos derivados das 3-hidroxiquinolin-2-onas (3-HQS) em estudo.	40
Tabela VII.1. Curva de calibração utilizada na quantificação proteica pelo método de Bradford.	68
Tabela VII.2. (a) Ensaio enzimático realizado em condições padrão (75 μ M BH4 e 25°C), (b) Atividade enzimática determinada com pré-incubação com L-Phe e Composto (100 μ M L-Phe e 100 μ M Composto, 6 minutos) nas mesmas condições padrão, (c) Atividade enzimática determinada com pré-ativação pelo composto nas mesmas condições padrão (100 μ M Composto, 6 minutos); os valores apresentados representam o valor médio \pm desvio padrão. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.	69
Tabela VII.3. Valores da temperatura de desnaturação (T_m) para a proteína recombinante hPAHwt, a proteína hPAHwt na presença de DMSO a 1% como controlo para os ensaios com os Compostos a 100 μ M; os valores apresentados representam o valor médio \pm desvio padrão. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.	70
Tabela VII.4. Valores da constante de proteólise (k) obtidos por digestão controlada da hPAHwt pela tripsina (proteólise limitada).	71

Abreviaturas

4a-OH-BH₄	pterina 4a-carbinolamina
AAAH	hidroxilases dos aminoácidos aromáticos
Amp	ampicilina
BBB	barreira hemato-encefálica
BH₄	6(R)-L-eritro-5,6,7,8- tetra-hidrobiopterina
BSA	albumina sérica bovina
CD	domínio catalítico
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CO₂	dióxido de carbono
DHPR	dihidropteridina redutase
DMSO	dimetilsulfóxido
DSF	fluorimetria diferencial de varrimento
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe	ferro
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	transferência de energia de ressonância por fluorescência
H₂O	água
HEK-293T	<i>human embryonic kidney epithelial cell line</i>
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxi-1-piperazinil)-etanossulfônico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPA	hiperfenilalaninemia
hPAH	fenilalanina hidroxilase humana

HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
IMAC	cromatografia de afinidade com iões imobilizados
IPTG	isopropil-1-tiol- β -D-galactosídeo
kb	quilobases
kDa	quiloDalton
L-Asp	L-aspartamo
LAT-1	transportador de aminoácidos L tipo 1
LB	meio de cultura Luria-Bertani
L-Ile	L-isoleucina
L-Leu	L-leucina
L-Met	L-metionina
LNAA	aminoácidos grandes e neutros
L-Phe	L-fenilalanina
L-Trp	L-triptofano
L-Tyr	L-tirosina
L-Val	L-valina
MAO-B	monoamina oxidase B
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NADH	nicotinamida adenina dinucleótico (estado reduzido)
O₂	oxigénio molecular
OD	domínio de oligomerização
ON	<i>over night</i>
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAH	fenilalanina hidroxilase
PAL	fenilalanina amónia liase
PEG-PAL	fenilalanina ammonia liase peguilada

PKA	proteína cinase A
PKU	fenilcetonúria
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PQC	controlo de qualidade proteica
qBH₂	dihidropterina quinóide
QI	quociente de inteligência
RD	domínio regulador
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEC	cromatografia de exclusão molecular
SNC	sistema nervoso central
TH	tirosina hidroxilase
T_m	temperatura de <i>melting</i>
TPH	triptofano hidroxilase
wt	selvagem

I. Introdução

1. Fenilalanina hidroxilase humana

A fenilalanina hidroxilase humana (hPAH; E.C. 1.14.16.1) é uma enzima homotetramérica que catalisa a conversão de L-fenilalanina (L-Phe) em L-tirosina (L-Tyr) por *para*-hidroxilação da cadeia lateral aromática daquele aminoácido. Para que esta reação ocorra, a hPAH requer o cofator tetrahydrobiopterina (BH₄), ferro não hémico e oxigênio molecular (O₂).⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

Uma vez que o organismo não apresenta capacidade de síntese da L-Phe, este é classificado como aminoácido essencial. Assim, a via de catabolismo da L-Phe é finamente regulada de modo a evitar a sua degradação completa, mantendo os níveis adequados às necessidades do organismo (por exemplo para a síntese de proteínas). A hPAH tem, assim, um papel crucial na manutenção da homeostase da L-Phe.⁽⁴⁾

1.1. Via Metabólica

O passo inicial e limitante no catabolismo completo da L-Phe em CO₂ e H₂O é a sua hidroxilação em L-Tyr catalisada pela hPAH. Esta via ocorre principalmente no fígado e é responsável pela síntese de metabolitos que poderão entrar no ciclo de Krebs, como por exemplo o fumarato, sendo então completamente catabolizado em CO₂ e H₂O.⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Embora a *para*-hidroxilação da L-Phe seja essencial para a rutura do anel de benzeno, não é necessária para o metabolismo adicional da cadeia lateral da L-Phe (Figura I.1.). Nesta via alternativa, a L-Phe sofre uma reação de transaminação formando fenilpiruvato, o qual é depois convertido em diversos metabolitos, tais como o fenilactato, fenilacetato e o *o*-hidroxifenilacetato, que são excretados na urina. Numa outra via alternativa, a L-Phe pode ser descarboxilada a feniletilamina, originando posteriormente fenilacetoglutamato. No entanto, é de realçar que estas vias alternativas apenas se tornam relevantes quando a célula não tem capacidade para hidroxilar a L-Phe.⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Em face do exposto, a síntese de L-Tyr depende da disponibilidade de L-Phe no organismo. Assim, embora a L-Tyr seja considerado um aminoácido não essencial, quando existe um bloqueio na sua síntese, devido a uma deficiência da hPAH, este passa a ser um aminoácido essencial tornando o seu aporte, através da dieta, indispensável.⁽⁹⁾ Deste modo, a hPAH assume também um papel de relevo na manutenção dos níveis de catecolaminas (L-dopa, dopa, epinefrina e norepinefrina) e de melanina, uma vez que estes metabolitos têm como precursor comum a L-Tyr.

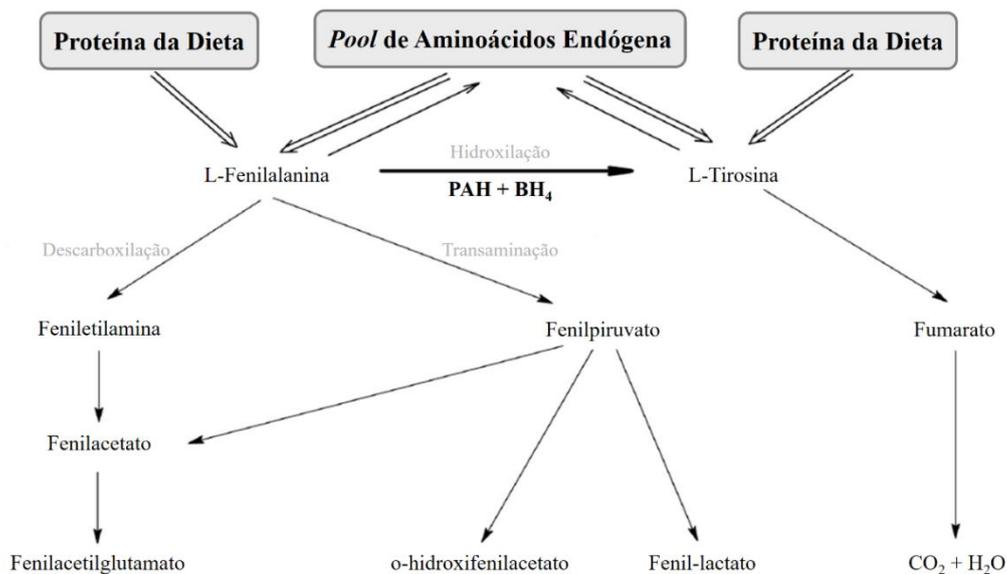


Figura I.1. Esquema representativo do metabolismo da fenilalanina. A fenilalanina no organismo humano é maioritariamente proveniente da ingestão dietética. Na presença de oxigénio molecular (O_2), ocorre a hidroxilação da fenilalanina em tirosina pela fenilalanina hidroxilase (PAH), na presença da tetrahydrobiopterina (BH_4), o seu cofator natural. Esta via metabólica conduz posteriormente à formação de CO_2 e H_2O . Por descarboxilação, há produção de vários metabolitos que são excretados na urina, constituindo a via alternativa ao catabolismo da fenilalanina.⁽⁷⁾

1.2. O gene *PAH*

A fenilalanina hidroxilase humana é codificada pelo gene *PAH*, que se localiza no braço longo do cromossoma 12, mais precisamente na região 12q23.2. Este gene possui cerca de 171 kb e contém 13 exões, sendo o comprimento total do transcrito (mRNA) de $\approx 2,4$ kb (Figura I.2.).⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾ Foram identificadas 31 variantes alélicas diferentes que provocam pequenas alterações na sequência do gene, sendo que este é o único gene associado à deficiência de fenilalanina hidroxilase humana.⁽⁵⁾

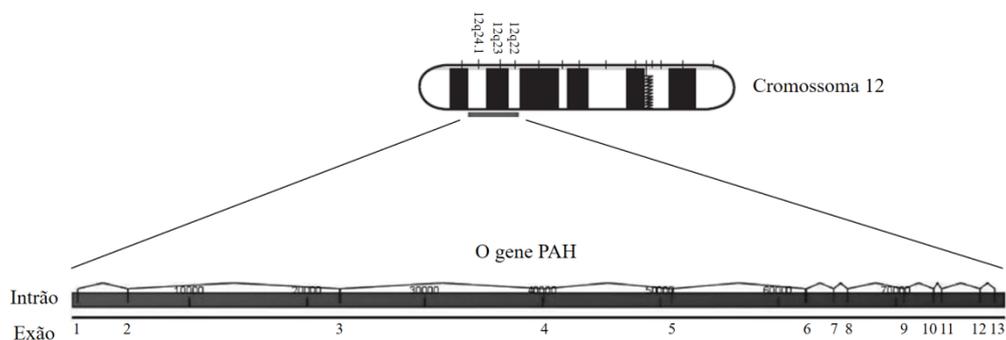


Figura I.2. Representação da estrutura do gene *PAH* que se encontra localizado no braço longo do cromossoma 12 e que contém 13 exões que codificam para um polipéptido de 452 aminoácidos.⁽⁷⁾

1.3. Características bioquímicas

A hPAH juntamente com a tirosina hidroxilase (TH; E.C. 1.14.16.2) e a triptofano hidroxilase (TPH; E.C. 1.14.16.4) formam a família estrutural e funcionalmente relacionada das hidroxilases dos aminoácidos aromáticos (AAAH), apresentado cerca de 65% de identidade na sua sequência (80% de homologia na sequência do domínio catalítico). Esta família de enzimas partilha o mecanismo catalítico referido anteriormente para a hPAH, utilizando o oxigénio molecular, o ferro não-hémico reduzido e o cofator BH_4 .⁽¹⁾⁽³⁾ Estruturalmente, apresentam-se como homotetrâmeros em que cada subunidade é constituída por um domínio N-terminal com propriedades reguladoras, um domínio central catalítico e um domínio C-terminal responsável pela oligomerização (tetramerização).⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

A especificidade para o substrato e o mecanismo de regulação são as características que distinguem as três enzimas desta família, que apresenta massas moleculares que variam entre os 204 e 217 kDa. Os produtos da TH e da TPH, respetivamente a L-dopa e o 5-hidroxi-triptofano, são precursores de neurotransmissores e hormonas incluindo as catecolaminas (TH) e a serotonina e melatonina (TPH).⁽¹⁾

Como referido anteriormente, as AAAHs apresentam um mecanismo enzimático semelhante. Relativamente à hPAH, a incorporação de um átomo de oxigénio no anel aromático da L-Phe é concomitante com a hidroxilação do cofator BH_4 a 4a-OH- BH_4 (pterina 4a-carbinolamina), pelo que o cofator é considerado co-substrato (Figura I.3.).⁽¹⁾ Assim, na via principal, quando a L-Phe é hidroxilada a L-Tyr, o cofator BH_4 é oxidado a 4a-OH- BH_4 e é regenerado à sua forma reduzida formando, primeiro, pela ação da pterina 4a-carbinolamina desidratase, a dihidropterina quinóide (qBH_2) que, por sua vez, é reduzida então, pela dihidropteridina redutase (DHPR), numa reação dependente de NADH, à forma ativa do cofator.⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

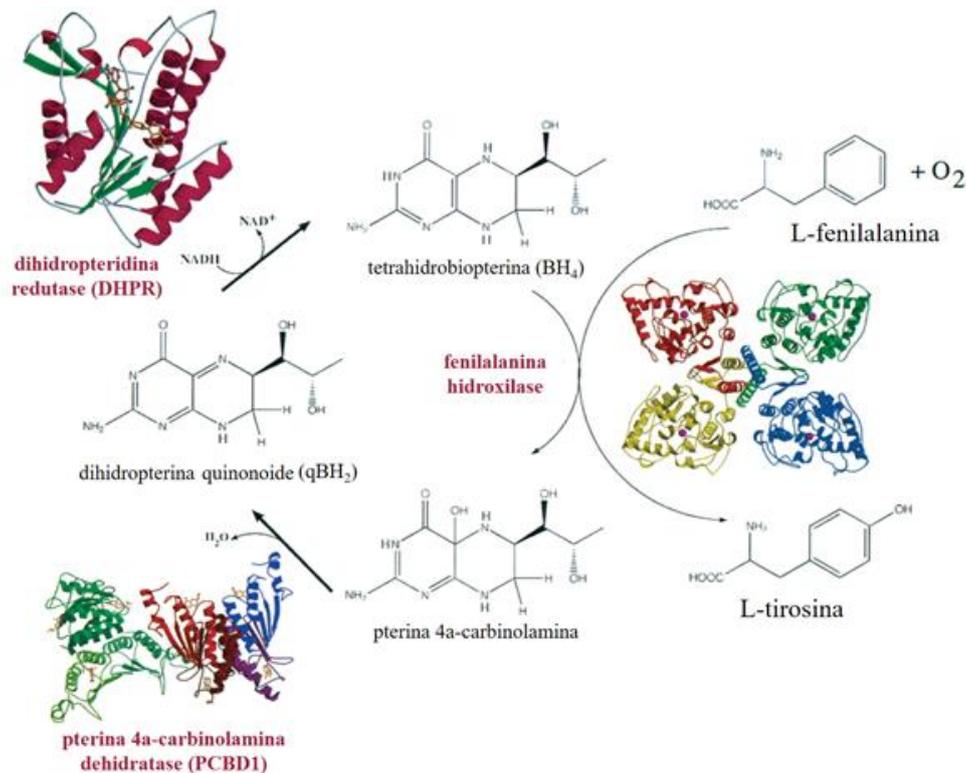


Figura I.3. Reação catalisada pela fenilalanina hidroxilase e via de regeneração do cofator, tetrahydrobiopterina (BH_4). Adaptado de ⁽¹⁵⁾.

A hPAH em solução encontra-se num equilíbrio entre homotetrâmeros e homodímeros, que depende do pH e da concentração de L-Phe. Estas formas oligoméricas apresentam propriedades enzimáticas distintas. Assim, quando comparada com a forma dimérica, a forma tetramérica da hPAH apresenta maior atividade catalítica, maior afinidade para o substrato e maior resposta à ativação pelo substrato.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾ Enquanto o dímero apresenta uma cinética do tipo Michaelis-Menten para a L-Phe, os tetrâmeros têm uma resposta sigmoideal com cooperatividade positiva ($h > 1$).⁽³⁾

1.4. Características estruturais

Cada subunidade da hPAH é constituída por uma cadeia polipeptídica de 452 aminoácidos (≈ 52 kDa) que se organiza em três domínios estruturais e funcionais (Figura I.4.): (i) o domínio regulador N-terminal (RD; resíduos 1 - 117), que contém o local de fosforilação (Ser16) e uma sequência autorreguladora (ARS, resíduos 1 - 33); (ii) o domínio catalítico (CD; resíduos 118 - 410), que inclui os locais de ligação ao substrato e cofator, e (iii) o domínio de tetramerização/oligomerização localizado na região C-terminal (OD; resíduos 411 - 452).⁽²⁾⁽¹⁸⁾

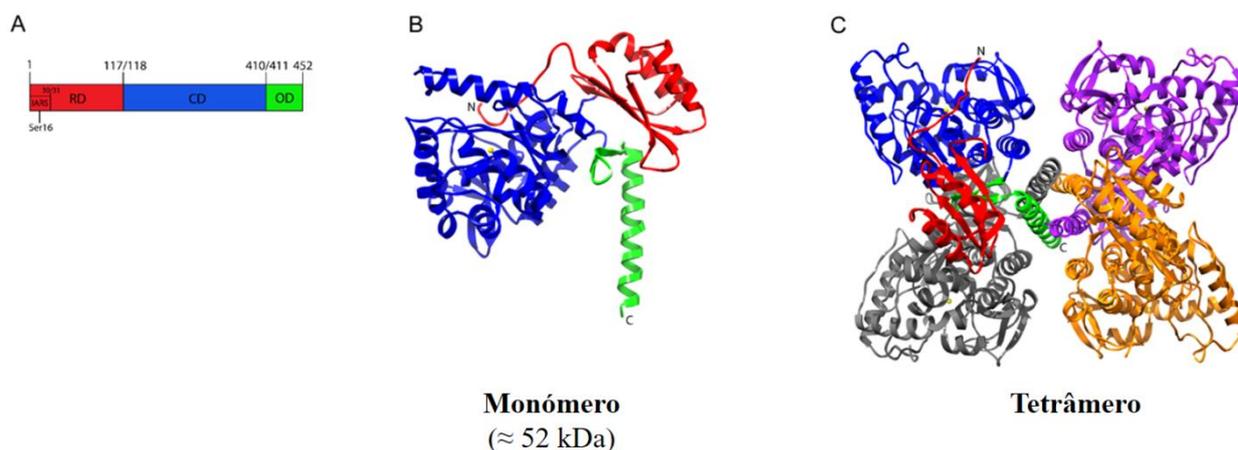


Figura I.4. Representação da estrutura e organização dos domínios da PAH humana (hPAH). (A) Estrutura do domínio funcional da hPAH: domínio regulador (RD), domínio catalítico (CD) e domínio de oligomerização (OD). (B e C) Modelos do monómero (B) e tetrâmero (C) da hPAH obtidos pela combinação da estrutura da forma dimérica da PAH de rato truncada a C-terminal e a forma tetramérica da hPAH truncada a N-terminal. As cores dos domínios (RD a vermelho, CD a azul e OD a verde) da representação esquemática em A correspondem às mesmas cores do monómero representado em B e este também aparece nas mesmas cores em (C). Um dos monómeros em C está representado pela mesma cor representada em B, enquanto os outros monómeros estão representados em cinzento, roxo e laranja. Adaptado de ⁽¹⁹⁾.

1.4.1. Domínio regulador

Estruturalmente o RD é do tipo *sandwich* α/β . Neste é possível identificar o módulo estrutural designado por domínio ACT, o qual é constituído pelo motivo $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Ser36 - Leu109), sendo que as quatro folhas β são do tipo antiparalelas e encontram-se flanqueadas pelas duas α -hélices curtas. O domínio ACT, que pode dimerizar, é identificado em várias proteínas não relacionadas entre si, mas que têm como característica comum ligar pequenas moléculas, incluindo aminoácidos, na interface do dímero.⁽²⁰⁾ Em muitos casos, as proteínas que contêm o domínio ACT são enzimas alostéricas, reguladas através da transição de alterações conformacionais após a ligação do ligando.⁽¹⁸⁾

Relativamente à hPAH, ainda não se encontra completamente esclarecida a existência de um local adicional de ligação alostérico da L-Phe no domínio ACT do RD, responsável pelo fenómeno de ativação da proteína pelo próprio substrato. No entanto, a perda de ativação pelo substrato após remoção do domínio regulador, parece confirmar a sua existência.⁽¹⁾⁽³⁾

O domínio regulador tem uma região de ligação (Arg111 - Thr117) que permite uma articulação flexível entre este e o domínio catalítico. Esta região é também responsável por estabelecer diversos contactos com o domínio catalítico da subunidade adjacente dentro do dímero.⁽¹⁾

A topologia característica do domínio ACT é responsável pela sua flexibilidade conferindo-lhe uma menor estabilidade, como é geralmente observado em ensaios de desnaturação térmica. Nestes ensaios, o domínio regulador apresenta uma temperatura de *unfolding* mais baixa do que a apresentada pelo domínio catalítico mais compacto.⁽²¹⁾

1.4.2. Domínio catalítico

Estruturalmente o CD é composto por 13 hélices α e por 6 folhas β . O centro ativo encontra-se acessível ao solvente e a ligandos exógenos devido à sua localização numa espécie de “bolsa” com 13 Å de profundidade e 10 Å de largura. Próximo do centro ativo é encontrado um canal de 16 Å de comprimento e 8 Å de largura, pelo qual se pensa que o substrato seja transportado até ao centro ativo.⁽³⁾⁽²²⁾

O domínio catalítico da hPAH contém não só os locais de ligação ao cofator e substrato, mas também ao Fe. Este encontra-se hexacoordenado estabelecendo ligação a três moléculas de H₂O e às cadeias laterais de dois resíduos de histidina (His285 e His290) e de um resíduo de glutamato (Glu330) (Figura I.5.)⁽¹⁾⁽¹¹⁾, como demonstrado por mutagénese dirigida dos resíduos His285 e His290.⁽³⁾

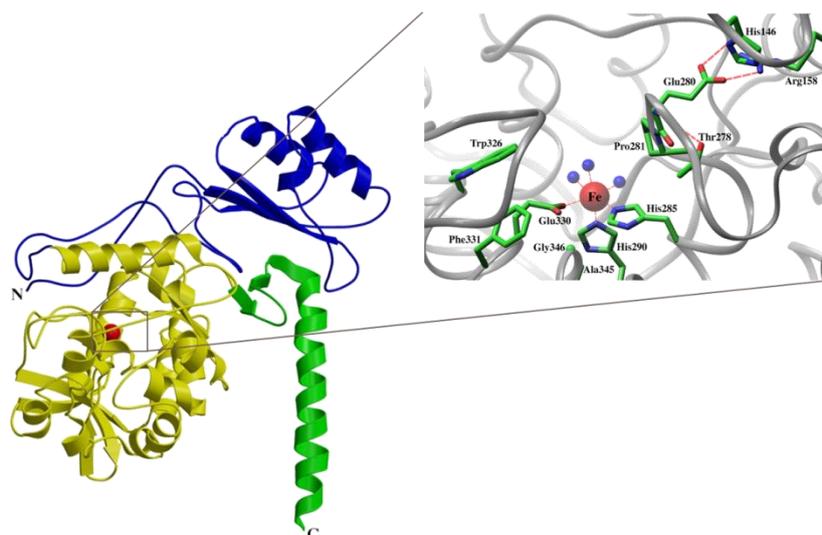


Figura I.5. Localização e interações do ferro na estrutura da hPAH. Os domínios regulador, catalítico e de oligomerização/tetramerização encontram-se representados a azul, amarelo e verde, respetivamente. Em detalhe é mostrado o ferro não hémico (vermelho) localizado no domínio catalítico, hexacoordenado com três moléculas de água (azul), a His285, a His290 e o Glu330. São também mostrados alguns resíduos que estão associados a mutações na fenilcetonúria (Thr278, Glu280, Pro281, Trp326, Phe331) e que estão localizados perto do ferro no centro ativo. Adaptado de ⁽¹¹⁾.

O cofator BH₄ liga-se no centro ativo, próximo do Fe, onde mantém interações com o resíduo Phe254. Hufton *et al.* sugeriram que o domínio catalítico contém um motivo de 27 aminoácidos (resíduos His263 a His289), altamente conservado nas AAAHs, responsável pela ligação do cofator BH₄ e do Fe(II).⁽³⁾⁽¹²⁾⁽²³⁾ De acordo com as estruturas obtidas de formas binárias da hPAH complexadas com análogos da L-Phe, o cofator deverá ligar-se na segunda esfera de coordenação do Fe, interagindo com o oxigénio do grupo carbonilo do resíduo Glu286, envolvendo uma alteração conformacional no centro ativo da enzima (mecanismo *induced fit*).⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽²⁴⁾

Na estrutura dos complexos ternários da hPAH duplamente truncada (complexada com a BH₄ e a 3-(2-tienil)-L-alanina ou norleucina), a ligação dos análogos não fisiológicos da L-Phe parece ocorrer também na segunda esfera de coordenação do Fe. É de salientar que a ligação dos análogos da L-Phe parece induzir grandes alterações estruturais não só no domínio catalítico, mas em toda a subunidade, tendo também a capacidade de ativar a enzima. Com base nestes complexos, foram identificadas não só regiões flexíveis (*hinge bending regions*), que permitem que ocorram as alterações conformacionais propostas após ligação do substrato à enzima, mas também os resíduos que deverão interagir com o substrato nomeadamente Arg270, Thr278, His285, Ser349, Tyr277, Pro281, Trp326, Phe331, Gly346, Ser350 e Glu353.⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾

1.4.3. Domínio de oligomerização

O domínio de oligomerização é formado por dois motivos, um de dimerização (resíduos 411 - 424) e outro de tetramerização (resíduos 428 - 452). O motivo de dimerização é composto por duas cadeias β que permanecem juntas por um *loop* e, para a manutenção do dímero, contribuem as interações van der Waals e duas ligações de hidrogénio que se estabelecem entre os dois *loops*. Os resíduos 428 - 452, os últimos 24 resíduos no C-terminal, constituem o motivo de tetramerização, que consiste numa hélice α de 40 Å de comprimento.⁽¹⁾⁽³⁾

Na estrutura da hPAH, é possível observar uma distorção na simetria do homotetrâmero, uma vez que o tetrâmero é constituído por dois dímeros com conformações diferentes. Este facto deve-se à adoção por parte do domínio catalítico e de tetramerização de orientações relativas diferentes.⁽³⁾⁽²⁷⁾

1.5. Regulação

Como referido anteriormente, devido à sua importância na homeostasia da L-Phe, a hPAH é uma enzima finamente regulada. Os principais mecanismos de regulação incluem a ativação pelo substrato L-Phe, a inibição pelo cofator BH₄ e ativação por fosforilação. O BH₄ atua como um regulador negativo, bloqueando a ativação pela L-Phe. De facto, na ausência de L-Phe a ligação da BH₄ à hPAH leva à formação de um complexo hPAH-BH₄ inativo.

A fosforilação atua como um mediador da ativação pela L-Phe diminuindo a concentração de substrato necessária para ativar a enzima.⁽¹⁸⁾ A fosforilação do resíduo Ser16 induz alterações conformacionais que permitem o melhor acesso do substrato ao centro ativo. Através da ação da proteína cinase dependente do AMP cíclico (PKA) e de uma proteína cinase dependente do Ca²⁺/calmodulina, o glucagon e agentes α -adrenérgicos conseguem estimular a fosforilação da hPAH hepática, exercendo assim um mecanismo de controlo sobre a mesma através de um processo de

fosforilação-desfosforilação. É de salientar que dados experimentais sugerem que os níveis intracelulares do próprio substrato, L-Phe, poderão levar a um aumento da atividade da PKA e consequente incremento de hPAH fosforilada.⁽⁷⁾ Contrariamente, níveis elevados de BH₄ inibem a fosforilação.⁽³⁾⁽¹²⁾⁽²⁸⁾

Utilizando estes diferentes mecanismos, é possível à célula estabelecer uma boa regulação das concentrações de L-Phe, níveis esses considerados suficientes para a manutenção da biossíntese de proteínas e uma minimização dos níveis sanguíneos de fenilalanina quando estes se apresentam elevados.⁽⁷⁾

2. Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU; OMIM #261600) é uma doença genética, autossômica recessiva, caracterizada por mutações no gene *PAH* responsáveis pela expressão de variantes de hPAH com atividades enzimáticas deficitárias.⁽²⁹⁾ A PKU é o erro congénito mais comum do metabolismo de aminoácidos em populações Caucásicas ($\approx 1:10.000$ recém-nascidos).⁽³⁰⁾⁽³¹⁾ Na ausência de tratamento adequado os doentes PKU poderão apresentar um atraso intelectual progressivo e alterações adicionais que podem incluir autismo, convulsões, hipopigmentação (cabelo, pele e íris), epilepsia e deficiências motoras.⁽³¹⁾⁽³²⁾

Uma deficiente atividade da hPAH tem, como principal consequência, o aumento nos níveis sanguíneos de L-Phe (hiperfenilalaninémia; HPA) e, consequentemente, uma diminuição dos níveis sanguíneos de L-Tyr. De modo a poder dar início a um tratamento adequado, o mais cedo possível, de forma a evitar danos cerebrais irreversíveis, a PKU faz parte dos programas de rastreio neonatal na maior parte dos países considerados desenvolvidos.⁽⁷⁾

2.1. Espectro Mutacional e Incidência

Até à data, já foram identificadas mais de 900 mutações no gene *PAH* causadoras-de-doença (*disease-causing*). Devido ao elevado número de mutações, a maioria dos doentes PKU apresenta duas mutações diferentes sendo, por isso, classificados como heterozigóticos compostos.⁽²⁾⁽⁵⁾⁽³²⁾⁽²⁹⁾ As informações referentes às mutações identificadas, haplótipos associados, prevalência, zona geográfica, etc, podem ser encontradas no banco de dados *PAH Locus Knowledgebase* (PAHdb; <http://www.pahdb.mcgill.ca/>).

As mutações observadas no gene *PAH* podem ser: (i) mutações do tipo *missense* (62%) ou *nonsense* (5%); (ii) grandes e pequenas deleções (13%); (iii) mutações que afetam o *splicing* e que ocorrem nas junções de processamento alternativo em qualquer um dos intrões intervenientes (11%); (iv) polimorfismos silenciosos (6%) e; (v) inserções (2%).⁽⁵⁾⁽⁷⁾

Numa perspetiva mundial, observa-se uma variação da incidência da PKU nas diferentes populações.⁽³²⁾⁽³³⁾ Assim, a maior incidência é observada na Turquia ($\approx 1:4.000$ recém-nascidos). A PKU é também relativamente comum nalgumas regiões da China e é rara no continente Africano.

⁽²⁹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾ Países como a Finlândia e o Japão também apresentam taxas de incidência baixas, com menos de um caso de PKU em 100.000 recém-nascidos. Em Portugal, a incidência é de cerca de 1:11.000 recém-nascidos.⁽³⁴⁾ As diferenças entre as taxas de incidência devem-se essencialmente a fatores como a consanguinidade, no caso da elevada incidência e prevalência na Turquia, ou a um forte efeito fundador negativo presente na Finlândia e à deriva genética na fundação da população japonesa.⁽⁷⁾⁽³²⁾ Na PKU é também observada uma distribuição de mutações específica para cada população, ou seja, é observado um espectro mutacional específico. Assim, países classificados como mediterrânicos (ex: Portugal) apresentam um espectro mutacional diferente dos países do norte da Europa.

O conhecimento do genótipo de um doente PKU e seus familiares permite oferecer a possibilidade de efetuar um diagnóstico pré-natal.⁽²⁹⁾ No entanto, este teste raramente é solicitado, uma vez que, quando tratados atempadamente, os doentes PKU poderão ter um desenvolvimento psicomotor normal.

Nem todas as mutações do gene *PAH* apresentam o mesmo grau de severidade, dependendo este do seu efeito na estrutura e função da enzima.⁽⁷⁾⁽³²⁾ Assim, a perda de atividade total ou parcial da hPAH está relacionada com o fenótipo apresentado pelo doente.⁽³²⁾ A repercussão de uma mutação na enzima expressa pode ser avaliada de várias formas incluindo ensaios enzimáticos *in vitro*, estudos isotópicos *in vivo* (capacidade de metabolização de L-Phe marcada em CO₂ marcado) ou ainda por análise da expressão do gene em células eucariotas.⁽³⁵⁾ Nalguns casos é possível estabelecer uma boa relação entre a severidade das mutações e a taxa de metabolização da L-Phe (em doentes PKU), e mesmo com o quociente de inteligência (QI).⁽³⁶⁾ Através da análise da expressão *in vitro* de formas recombinantes da PAH, foi possível identificar três grupos de mutações que diferem no seu comportamento cinético e/ou estabilidade, nomeadamente: (i) mutações que afetam ambas as propriedades cinéticas e de estabilidade enzimática; (ii) mutações estruturalmente estáveis com propriedades cinéticas alteradas, e (iii) mutações com cinéticas normais, mas com estabilidade reduzida *in vitro* e *in vivo*.⁽¹¹⁾

2.2. Classificação

A deficiência em hPAH apresenta diversas classificações que, na sua maioria, têm em consideração os valores de L-Phe aquando do diagnóstico e a tolerância à L-Phe, ou seja, a quantidade de L-Phe da dieta que é tolerada pelo doente de forma a manter os níveis circulantes de L-Phe dentro dos valores não-patológicos (<300 µM; 5 mg/dL). É de realçar que o valor considerado normal para a L-Phe plasmática é de ≈120 µM (2 mg/dL).

Assim, de acordo com Kayaalp e colaboradores a deficiência em PAH é organizada em três grupos: (i) a PKU, que engloba os doentes cujas concentrações plasmáticas de L-Phe, no diagnóstico, são superiores a 1000 µM e que apresentam uma tolerância à L-Phe inferior a 500 mg/dia; esta forma é, de entre os três tipos, considerada a forma mais grave tendo em conta que se encontra associada a um elevado risco de comprometimento do desenvolvimento cognitivo; (ii) a HPA não-PKU, onde as concentrações plasmáticas de L-Phe no diagnóstico estão acima de 120 µM mas com concentrações de L-Phe abaixo de 300 µM com uma dieta normal e; (iii) a PKU variante, a qual se encontra associada aos indivíduos que não se encaixam nas duas classes anteriores, quer em relação aos valores de fenilalanina na altura do diagnóstico, quer na tolerância dietética à fenilalanina.⁽⁵⁾⁽³⁵⁾

Em 1998, Guldberg e colaboradores descreveram quatro classes com base na tolerância à L-Phe observada aos cinco anos de idade: (i) a PKU clássica, em que se considera que há uma perda total ou quase total da atividade da hPAH; nesta classe os indivíduos portadores apresentam uma tolerância à L-Phe entre 250 e 350 mg/dia; esta é a forma mais severa e, caso não haja tratamento adequado, estes doentes podem vir a desenvolver uma deficiência intelectual irreversível; (ii) a PKU moderada, onde a tolerância à L-Phe é de 350-400 mg/dia; (iii) a PKU suave na qual os indivíduos afetados toleram entre 400 e 600 mg/dia de L-Phe e; (iv) a hiperfenilalaninemia suave (MHP), que se caracteriza por concentrações de L-Phe plasmática inferiores a 600 µM (10 mg/dL), quando os doentes se encontram submetidos a uma dieta normal.⁽⁵⁾⁽³⁷⁾

2.3. Patogenicidade

Na PKU, e na ausência de tratamento adequado, o cérebro é o órgão mais afetado pelas concentrações elevadas de L-Phe que resulta nas já mencionadas alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e da função cognitiva. São vários os mecanismos que podem contribuir para os défices neurológicos observados (Figura I.6).

Um dos mecanismos encontra-se diretamente relacionado com o conteúdo de substância branca do SNC e com o seu teor em mielina (hipomielinização e/ou desmielinização). No entanto, ainda se encontra por esclarecer qual o agente (L-Phe ou metabolito das vias secundárias de degradação) responsável pela perda de capacidade de produção de mielina que ocorre nos oligodendrócitos.⁽³⁸⁾ A mielina é uma estrutura lipoproteica que, em condições normais, permanece ligada ao corpo celular dos oligodendrócitos e é suportada pelo tempo de vida destas células. A mielina possui um papel crucial na condução do impulso nervoso e, portanto, poderá ocorrer desenvolvimento das alterações neuropsicológicas se os oligodendrócitos não produzirem mielina (hipomielinização) ou se os axónios perderem a mielina (desmielinização).⁽³⁹⁾

Adicionalmente, as elevadas concentrações de L-Phe no sangue vão saturar o transportador LAT1 localizado na barreira hemato-encefálica (*blood brain barrier*; BBB) e responsável pelo transporte dos designados “aminoácidos grandes e neutros” (*large neutral amino acids*; LNAA) e que incluem a L-Phe, L-Tyr, L-Trp, L-Val, L-Met, L-Leu e L-Ile.⁽¹⁾⁽⁴⁰⁾ O transporte preferencial da L-Phe para o cérebro poderá conduzir ao efeito sobre a bainha de mielina mencionado anteriormente e, por outro lado, a diminuição da entrada de L-Tyr e L-Trp poderá potenciar a disfunção dos neurotransmissores e a disponibilidade dos LNAA para a síntese proteica.⁽³²⁾

Na realidade, os níveis diminuídos de neurotransmissores, incluindo a dopamina (sintetizada a partir da L-Tyr) e serotonina (que tem como precursor o L-Trp), são suscetíveis de desempenhar um papel importante nas deficiências cognitivas observadas nos doentes PKU⁽³⁹⁾, através de dois mecanismos distintos.⁽³⁸⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾ De acordo com a “teoria da tirosina/dopamina”, as dificuldades cognitivas resultam de níveis diminuídos de L-Tyr, o precursor da dopamina.⁽³⁹⁾⁽⁴¹⁾

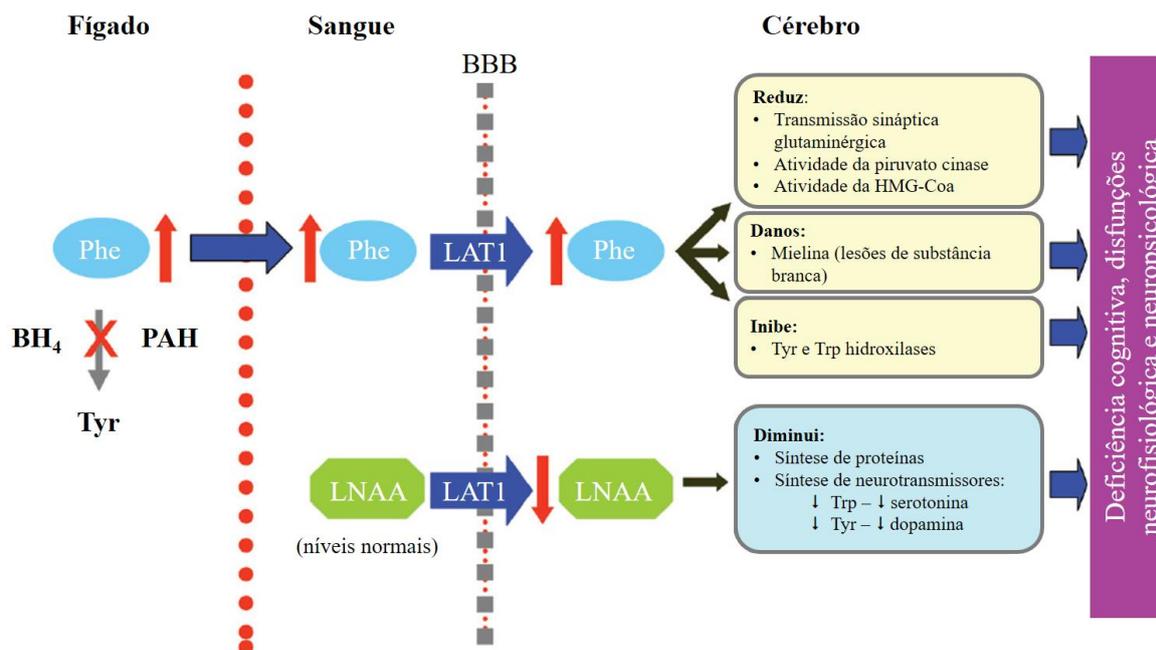


Figura I.6. Potenciais mecanismos responsáveis pela deficiência neurocognitiva observada nos doentes hiperfenilalaninêmicos.⁽⁴⁴⁾ (BBB) barreira hemato encefálica; (LAT1) transportador de aminoácidos L do tipo I; (LNAA) aminoácidos grandes e neutros.

No entanto, esta teoria não explica porque é que em ratos PKU, após normalização dos valores de L-Phe circulante, há uma normalização dos níveis de mielina e dopamina em zonas específicas do cérebro sem que tenha ocorrido normalização dos valores de L-Tyr no SNC. Na “teoria mielina/dopamina” é postulado que a reposição dos níveis de dopamina ocorra por sobre-expressão de enzimas que participam na via biossintética da dopamina, e em particular da TH, a qual poderá estar condicionada pelas interações que ocorrem entre a mielina e os axónios posteriormente responsáveis pela transdução de sinais e que regulam positivamente a expressão destes genes.⁽³⁹⁾

Para além da neuropatologia característica dos doentes fenilcetonúricos, outros mecanismos alternativos que podem estar associados ao comprometimento da função cognitiva incluem alterações na transmissão sináptica glutaminérgica, inibição moderada da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA; E.C. 1.1.1.88) na via biossintética do colesterol, inibição da piruvato cinase no metabolismo da glucose e função reduzida da monoamina oxidase B (MAO-B) como resultado de genes modificados.⁽³²⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾ Em estudos recentes, o stress oxidativo e, conseqüentemente, danos no DNA têm sido também implicados na patogénese da PKU.⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾

2.4. Diagnóstico e Monitorização

Presentemente a PKU é identificada na população de recém-nascidos por implementação do rastreio neo-natal o qual permite a instauração do tratamento (dietético) rapidamente após o nascimento. O diagnóstico e tratamento atempado só são possíveis, hoje em dia, devido a três descobertas chave: (i) nos anos 30, Asbjorn Folling identificou níveis elevados de L-Phe no sangue (HPA) como a causa subjacente dos défices neuropsicológicos; (ii) nos anos 50, Horst Bickel

introduziu uma dieta com baixo consumo de L-Phe para o tratamento da fenilcetonúria e; (iii) nos anos 60, Robert Guthrie introduziu um teste de diagnóstico adequado para a triagem em massa da HPA, um ensaio de inibição de crescimento bacteriano, que ficou conhecido como o “Teste de Guthrie”.⁽³²⁾

No entanto, uma vez que o teste de Guthrie, para além de ser semi-quantitativo, não pode ser efetuado em recém-nascidos sujeitos a antibioterapia, nos anos 80 em Portugal, assim como em muitos outros países, foi substituído por métodos quantitativos, nomeadamente pelo método fluorimétrico (Labsystems) e, mais tarde, por um método enzimático mais específico (Quantase). Desde 2005 o rastreio desta doença faz-se por espectrometria de massa em tandem (MS/MS), simultaneamente com o de outras doenças hereditárias.⁽³⁴⁾ A maioria dos países europeus, tal como muitos outros países classificados como desenvolvidos, têm programas nacionais de rastreio neonatal, que inclui testes para a PKU, hipotireoidismo congénito, síndrome adrenogenital, hemoglobinopatias entre outros erros hereditários do metabolismo.⁽³¹⁾ O diagnóstico precoce e a pronta intervenção terapêutica permitem que a maioria dos indivíduos com PKU não desenvolva uma incapacidade mental grave.⁽¹⁸⁾

No entanto, é de referir que deficiências na síntese de BH₄, cofator das AAAHs (hPAH, hTH e hTPH) e da sintase do óxido nítrico (NOS) também levam a uma HPA e a uma diminuição da síntese de L-dopa, dopamina, catecolaminas, serotonina e óxido nítrico no SNC. Estas patologias são designadas de um modo geral por PKU maligna ou atípica e o seu rastreio é efetuado por medição daqueles neurotransmissores e de metabolitos da via de síntese da BH₄, no líquido cefalorraquidiano (LCR).⁽⁵²⁾

2.5. Tratamento

O tratamento da PKU tem como objetivo primário diminuir os níveis de L-Phe circulantes, de forma a evitar o desenvolvimento das alterações neurológicas e psicológicas características da doença. Uma vez que a L-Phe na corrente sanguínea depende não só da atividade residual da hPAH mas também da ingestão dietética de L-Phe, o tratamento passa por uma restrição na ingestão de alimentos ricos em L-Phe.⁽²⁹⁾ É de salientar que, desde a introdução de um tratamento dietético há cinquenta anos, a PKU é considerada o protótipo de uma doença genética tratável.⁽³⁰⁾⁽⁵³⁾

O tratamento dietético deve ser iniciado precocemente, o mais cedo possível após o nascimento, de modo a evitar alterações neurológicas irreversíveis. Esta dieta deve ser mantida durante toda a infância, pois é nesta fase da vida que há maior desenvolvimento neurológico.⁽⁷⁾ Presentemente, com a instauração dos programas de triagem neonatal, é possível iniciar a dieta nos primeiros dias de vida, entre os 8 e 10 dias de vida, o que evita a maioria das complicações neuropsicológicas.⁽³¹⁾⁽³²⁾

Embora o início precoce e contínuo da dieta restrita em L-Phe tenha mostrado ser muito eficaz na prevenção da deficiência mental, este tratamento não é isento de efeitos adversos.⁽⁴⁴⁾⁽⁵⁴⁾ A principal falha a apontar são as deficiências nutricionais associadas a uma dieta altamente restritiva. Presentemente existem formulações desenvolvidas com a finalidade de melhorar a qualidade nutricional e a palatabilidade das mesmas. No entanto, continua a ser frequente a observação de um atraso no crescimento que se pensa ser consequência de deficiências nutricionais específicas, tais como deficiência em vitamina D e B12 e em oligoelementos como o zinco, iodo, selénio, ferro e cálcio.⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾ É de salientar que as carnes vermelhas, peixe, frutos do mar e cereais, que são relativamente ricos em zinco e outros oligoelementos, são alimentos proibidos na dieta restrita em L-

Phe. Em particular, um déficit de selênio nutricional pode apresentar-se como uma miopatia periférica, e influencia o crescimento por modulação secundária da síntese das hormonas da tiroide.⁽⁵⁷⁾

De um modo geral, os doentes PKU sujeitos a terapia dietética apresentam também uma densidade mineral óssea menor do que a normal, embora as razões para isso não sejam claras. Os níveis de ácidos gordos polinsaturados são também frequentemente baixos no plasma e nos eritrócitos das crianças PKU.⁽²⁹⁾ Para além das carências nutricionais a que os doentes PKU estão sujeitos, existem também problemas adicionais associados ao peso económico e social sobre o doente e os seus familiares.⁽⁵⁸⁾

Embora a restrição dietética seja universalmente aceite, nem todos os doentes PKU têm uma boa resposta ao tratamento dietético com comprometimento das funções neurológicas e cognitivas. É vital monitorizar os níveis de L-Phe, geralmente através de análises ao sangue, e vários índices nutricionais como a vitamina B12, o folato, o ferro, o cálcio, fosfatos e ácidos gordos essenciais. Os parâmetros de crescimento também deverão ser monitorizados.⁽²⁹⁾

Tendo em conta o referido anteriormente, torna-se evidente que o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da PKU é bastante importante. Estas aproximações pretendem não só diminuir os níveis sanguíneos de L-Phe mas também melhorar o neurodesenvolvimento e a evolução neurológica a longo prazo, promover o crescimento corporal normal combatendo as deficiências nutricionais e contribuindo para o bem-estar psicossocial do doente.⁽⁵⁹⁾

2.5.1. Terapêuticas em utilização

2.5.1.1. Dieta

Uma dieta restrita em L-Phe, é uma dieta com um baixo consumo de alimentos naturais ricos em proteínas como ovos, leite, queijo, carnes, feijões secos e leguminosas.⁽⁴⁴⁾ Os doentes PKU têm que ter particular atenção aos alimentos que contenham aspartamo (éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina) um edulcorante artificial que, quando metabolizado, liberta L-Phe, L-aspartato (L-Asp) e metanol.⁽⁷⁾⁽²⁹⁾⁽³²⁾

Após o nascimento e diagnóstico, a dieta instaurada baseia-se no aporte de pequenas quantidades de L-Phe provenientes do leite materno ou de fórmulas comerciais para lactentes adaptadas. A redução da quantidade de L-Phe proveniente da dieta deverá ser ponderada, de forma a atingir um nível que possibilite o crescimento e desenvolvimento normais, mas sem que haja ao mesmo tempo valores muito elevados nas concentrações de L-Phe no organismo. Em paralelo com a restrição dietética devem ser utilizadas fórmulas médicas disponíveis para o tratamento da PKU que, para além de apresentarem uma quantidade mínima ou nula de L-Phe, são normalmente ricas em L-Tyr. À medida que a criança cresce, as fórmulas comerciais e o leite materno vão sendo substituídos por frutas, legumes e alimentos ricos em amido. Estas orientações dietéticas devem ser seguidas por um nutricionista e têm, como base, o cálculo da ingestão diária de L-Phe permitida tendo em conta as concentrações sanguíneas daquele aminoácido.⁽⁶⁰⁾ Neste sentido é calculada a ingestão diária de proteínas, atribuindo-se um determinado número de gramas ou unidades de proteína diária, dependendo das concentrações longitudinais de L-Phe no plasma.⁽⁷⁾

No caso de gravidez, as doentes PKU devem manter uma dieta restrita e rigorosa antes e durante a gravidez, de forma a prevenir lesões fetais graves, incluindo microcefalia, atraso mental, problemas comportamentais e problemas cardíacos congénitos, a chamada PKU maternal.⁽⁶¹⁾

Os doentes PKU devem efetuar uma monitorização frequente uma vez que os fatores que podem afetar os níveis de L-Phe variam de indivíduo para indivíduo. Estes fatores incluem o tipo de mutação, o crescimento, o grau da doença e a ingestão de L-Phe superior às necessidades diárias do doente.⁽⁶⁰⁾

Como referido anteriormente, os benefícios da dieta restrita em L-Phe são evidentes e incluem a prevenção no aumento das concentrações sanguíneas daquele aminoácido, que leva a uma melhoria no desempenho neurológico e psicológico, evitando o desenvolvimento de alterações psico-motoras. No entanto, existem desafios inerentes ao tratamento dietético que devem ser tidos em conta, como o cumprimento da dieta, a exigência de apoio social e o risco de desequilíbrio de nutrientes essenciais.⁽⁷⁾⁽²⁹⁾

2.5.1.2. Tetrahydrobiopterina / Kuvan

Em 1999, Kure e colaboradores observaram que alguns doentes PKU eram sensíveis à administração de doses farmacológicas de BH₄ resultando num aumento da atividade enzimática da hPAH e conseqüente redução da L-Phe circulante. Aqueles autores propuseram então que a administração do cofator poderia ser uma boa opção para um tratamento a longo prazo dos doentes PKU como alternativa ao tratamento dietético.⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾

Na realidade, alguns doentes PKU respondem à ingestão oral do cofator BH₄ com uma redução da concentração de L-Phe na corrente sanguínea sendo que, atualmente, a administração de BH₄ é aceite como uma nova abordagem terapêutica. Embora os mecanismos subjacentes à resposta ao BH₄ sejam multifatoriais, o principal efeito resulta da estabilização da proteína mutante. O cofator atua assim como um chaperone farmacológico, impedindo o *misfolding*, a agregação das subunidades, a degradação proteolítica e a inativação térmica.^{(32)(59)(63) (64)}

Contudo, é de salientar que o designado “fenótipo responsivo à BH₄” é determinado pelo genótipo uma vez que essa resposta irá depender das mutações presentes no gene *PAH*.⁽²⁾ As mutações associadas a fenótipos de PKU moderada ou suave, onde a proteína mutante apresenta uma capacidade enzimática residual são em geral as mutações associadas a fenótipos-responsivos (ex: p.Y414C ou p.E390G). Pelo contrário, mutações associadas a fenótipos de PKU clássica ou com proteínas mutantes sem atividade residual estão relacionadas com fenótipos não-responsivos (ex: p.R408W). No entanto, embora o teste genético seja extremamente útil na previsão da resposta à BH₄, atualmente é considerado insuficiente para determinar quem deve receber esse tratamento.⁽⁶⁵⁾ Por isso, antes de ser aplicada esta terapêutica, deve ser também efetuada uma avaliação de forma a confirmar se o doente é ou não responsivo ao tratamento com BH₄, através de um “teste de sobrecarga”.⁽⁶⁶⁾ Existem diferentes protocolos utilizados para esta avaliação. Nos centros europeus são geralmente aplicados testes mais curtos (24 - 48h) conforme os propostos por Blau e colaboradores.⁽⁶⁶⁾ Esta avaliação consiste na monitorização das concentrações de L-Phe no sangue às 0, 8, 16 e 24 horas, durante dois dias consecutivos, ao mesmo tempo que é administrada uma dose de 20 mg/kg/dia de BH₄ ao doente. Ao iniciar estes ensaios, recomenda-se que os níveis basais de L-Phe sejam superiores a 400 µmol/L e que estes tenham sido monitorizados nos dias anteriores, a fim de evitar resultados falsos negativos ou

positivos. Uma diminuição dos níveis de L-Phe no sangue, em relação ao valor basal, de pelo menos 30% é considerada uma resposta positiva (doente responsivo a BH₄). O resultado é negativo quando há uma redução de menos de 20%. Se a redução observada se situar entre os 20% e 30% é recomendada a aplicação de um protocolo mais longo (com a duração de 1 a 3 semanas), com medições diárias da concentração de L-Phe no sangue, de forma a estabelecer a capacidade de resposta ao BH₄.⁽⁵⁹⁾ É de salientar que o teste de sobrecarga em BH₄ pode ser influenciado por vários fatores além do genótipo, como por exemplo, a gravidade da HPA no momento do teste, o estado nutricional, a idade do doente ou a coadministração com alimentos ricos em calorías.⁽⁶⁵⁾

O dicloridrato de sapropterina (Kuvan, Biomarin Pharma) é a forma sintética da BH₄ desenvolvida para administração por via oral e que recebeu a designação de “medicamento órfão” para o tratamento da PKU. O Kuvan mostrou ser uma terapia segura e eficaz em doentes portadores de HPA e PKU leve a moderada em ensaios clínicos de fase II e III.⁽⁷⁾ Normalmente a dose de sapropterina é de 20 mg/kg/dia. Estudos farmacológicos sugerem um pico de concentração sanguínea após 2 - 4h da ingestão e uma semi-vida de 6 horas. A maioria dos doentes PKU é tratada com uma única dose diária. No entanto, a administração em duas ou três doses diárias tem sido sugerida como benéfica para alguns doentes PKU, evitando as flutuações diárias no nível de L-Phe no sangue.⁽⁵⁹⁾ O uso de BH₄ durante a gravidez é uma opção alternativa para alcançar os níveis sanguíneos desejados de L-Phe durante a gravidez, de modo a evitar danos ao feto (PKU maternal).⁽⁵⁹⁾

Nos doentes PKU responsivos à BH₄, o tratamento com sapropterina proporciona reduções significativas e estáveis das concentrações séricas de L-Phe e, conseqüentemente, um relaxamento considerável das restrições dietéticas.⁽⁶⁵⁾ No entanto, convém salientar que este tratamento só é aplicável a cerca de 60% da população PKU ficando de fora as formas mais graves da doença associadas a genótipos de PKU clássica. Presentemente, em Portugal (e na maioria dos países europeus) o tratamento com Kuvan é participado a 100% pelo Sistema Nacional de Saúde devido ao seu preço elevado, incomportável para a maioria das famílias. Se considerarmos que: uma criança de 5 anos, no percentil 50, pesará cerca de 18 Kg; a dose recomendada é de 20 mg/kg/dia e; o preço de uma embalagem de Kuvan (30 comprimidos de 100 mg cada) é de 701,78 €, o valor do tratamento por semana para uma criança de 5 anos é de 673€ (32.000€/ano).

2.5.2. Terapêuticas em desenvolvimento

Embora a restrição dietética em L-Phe seja a terapêutica universalmente aceite para o tratamento da PKU, as dificuldades associadas ao cumprimento desta dieta levaram a uma intensa investigação para desenvolvimento de novas opções de tratamento.⁽⁷⁾⁽³²⁾ Na realidade, terapias alternativas que permitissem a liberalização das restrições dietéticas melhorariam em muito a qualidade de vida dos doentes PKU.⁽⁶⁷⁾

Esta investigação tem sido efetuada em várias áreas que incluem o desenvolvimento de suplementos mais palatáveis (glicomacropéptidos), administração de LNAAs, terapia de substituição enzimática com fenilalanina amónia liase peguilada (PEG-PAL), probióticos, terapia génica, PAH-tag e chaperones farmacológicos.⁽³¹⁾

2.5.2.1. Glicomacropéptidos

O glicomacropéptido é uma proteína derivada do soro de queijo, rica em aminoácidos essenciais específicos, mas que não contém L-Phe, L-Tyr e L-Trp (aminoácidos aromáticos). Esta proteína pode ser um adjuvante útil a adicionar à dieta com restrição em L-Phe uma vez que serviria de aporte de aminoácidos não-aromáticos.⁽³¹⁾⁽³²⁾ Os glicomacropéptidos melhoram a convivência com a dieta bem como a sua variedade e sabor para além de melhorar a saciedade. Consequentemente, melhoram a complacência dietética, controlo metabólico e, finalmente contribuem para uma melhor qualidade de vida dos doentes PKU.⁽⁵³⁾⁽⁶⁸⁾

2.5.2.2. Aminoácidos grandes e neutros (LNAA – Large neutral amino acids)

Como referido anteriormente, os LNAA (incluindo a L-Phe) possuem como característica comum a utilização do mesmo transportador (LAT1) para atravessarem a BBB. Assim, ao aumentar-se a concentração de LNAA no sangue haverá uma diminuição da entrada de L-Phe para o cérebro evitando o seu efeito neurotóxico. Um mecanismo semelhante pode também ocorrer ao longo do trato gastrointestinal, sendo que a L-Phe é menos absorvida no intestino quando existe uma suplementação de LNAA na dieta.⁽²⁹⁾ Adicionalmente, o aumento da ingestão de L-Tyr e L-Trp (constituintes dos LNAA) pode ser benéfico uma vez que são precursores de neurotransmissores.⁽⁷⁾ De salientar que em ensaios efetuados em doentes PKU, aos quais foi administrado LNAAs por um período de duas semanas, verificou-se uma redução significativa na concentração de L-Phe no sangue, provavelmente como resultado da competição para o transporte de L-Phe no trato gastrointestinal.⁽¹⁾⁽⁶⁹⁾ A suplementação oral com LNAAs deverá contribuir para a diminuição das concentrações de L-Phe no cérebro resultando numa melhoria neuropsicológica dos doentes PKU. As diferenças nos resultados conseguidos com o tratamento são dependentes da composição do suplemento, da concentração, da via de administração e da duração da suplementação.⁽⁵³⁾⁽⁷⁰⁾

Apesar das vantagens que a suplementação com LNAA parece apresentar, a sua eficácia na redução dos níveis plasmáticos de L-Phe é ainda limitada, e são necessários estudos adicionais que comprovem a sua eficácia e segurança a longo prazo. Os ensaios efetuados até à data promoveram a avaliação dos LNAA apenas para períodos de tempo curtos e num número limitado de doentes utilizando doses variáveis (250 – 1000 mg de LNAA/kg/dia) e diferentes formulações de LNAA.⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾ Será pouco provável que os LNAA sejam prescritos como tratamento único, sem qualquer restrição dietética de L-Phe, pelo menos durante a infância e gravidez. Contudo, pode ser uma abordagem útil para adultos, na medida em que melhora clinicamente os indivíduos incapazes de seguir a dieta restrita em L-Phe, além de melhorar as funções executivas dos mesmos.⁽²⁹⁾⁽⁵³⁾

2.5.2.3. Terapia enzimática

Como referido anteriormente, as formas mais graves de PKU nomeadamente a PKU clássica, tendem a não responder ao tratamento com BH₄. Esta ausência de resposta pode ser devido à inexistência de atividade residual de hPAH suficiente para poder ser recuperada ou à ausência de proteína expressa. Ao contrário da terapia com BH₄, a resposta a uma terapia enzimática não dependeria do genótipo do doente PKU, apresentando assim uma vantagem para os indivíduos que não respondem ao tratamento com BH₄.⁽⁷⁾

A substituição da enzima poderia ser facilitada pelo transplante hepático parcial ou de hepatócitos normais. Em situações muito específicas de doentes fenilcetonúricos, o transplante parcial do fígado permitiu corrigir o fenótipo metabólico PKU. No entanto, o transplante hepático não é uma prática rotineira nestes casos devido aos elevados riscos associados a este tipo de cirurgia e à imunossupressão requerida ao longo da vida.⁽⁷⁾⁽⁷¹⁾ Para além disso, o transplante de hepatócitos está sob investigação porque as células dadoras, para serem eficazes, precisam ter uma vantagem de crescimento seletivo sobre os hepatócitos nativos.⁽⁵³⁾

A terapia enzimática como tratamento para a PKU é uma outra opção para redução dos níveis séricos de L-Phe, através da introdução de enzimas metabolizadoras deste aminoácido, alterando assim o fenótipo metabólico da PKU, independentemente do genótipo.⁽⁵³⁾ Para desenvolvimento desta terapia podem ser utilizadas duas aproximações: (i) reposição enzimática com a hPAH ou; (ii) substituição enzimática com a fenilalanina amónia liase (PAL; E.C. 4.3.1.5).⁽⁵³⁾⁽⁷²⁾

A PAL é uma enzima não-humana que catalisa a desaminação da L-Phe em amónia livre e ácido trans-cinâmico, um metabolito não tóxico convertido em ácido benzoico o qual é rapidamente excretado na urina como hipurato (Figura I.7). Assim, a PAL pode atuar como um substituto da hPAH que se encontra deficitária, uma vez que converte o excesso da L-Phe sistémica nos produtos acima referidos.⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽⁵³⁾⁽⁷²⁾⁽⁷³⁾ Quando comparada com a hPAH, a PAL é estrutural e cataliticamente menos complexa, fisicamente mais estável e não requer um cofator.⁽⁵⁹⁾

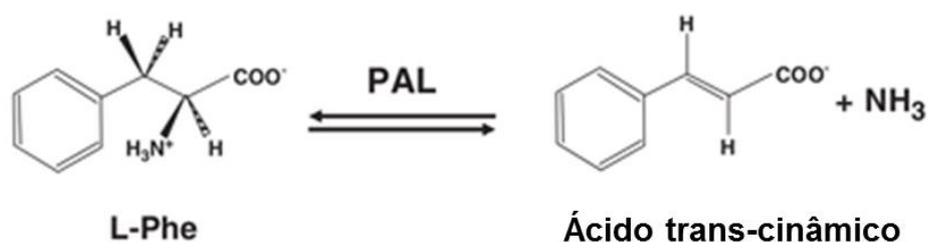


Figura I.7. Reação catalisada pela fenilalanina amónia liase (PAL).⁽⁵⁹⁾

Os primeiros estudos envolvendo a PAL foram efetuados no início dos anos 90. Foram ensaiadas apresentações orais e a implantação subcutânea de biorreactores contendo PAL, mas as duas aproximações não mostraram resultados satisfatórios. Contudo, a simples injeção subcutânea da enzima PAL em ratinhos *Pah^{enu2}* (o modelo animal de PKU clássica), mostrou ser eficaz na correção completa das concentrações de L-Phe, efeito mantido durante um ano, com injeções semanais da enzima. No entanto, a eficácia da PAL diminui após injeções repetidas.⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁷⁾⁽⁷⁴⁾⁽⁷⁵⁾

De forma a melhorar a estabilidade da enzima, esta foi peguilada com polietileno glicol (PEG). Esta formulação já se encontra em ensaios clínicos de Fase III em humanos (na forma de injeção subcutânea em dose única). Durante estes ensaios clínicos, observou-se uma redução dos níveis sanguíneos de L-Phe quando foi usada a dose mais elevada testada. No entanto, a administração repetida de PEG-PAL leva a um aumento da resposta imunitária.⁽²⁹⁾⁽⁶⁸⁾

2.5.2.4. Probióticos

Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro”.⁽⁶⁾⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾ Os probióticos comumente usados pertencem a dois grupos de microrganismos produtores de ácido lático: os *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* (LAB), que incluem *Enterococcus*, *Lactonacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*.⁽⁶⁾⁽⁷⁷⁾ Os LAB estão presentes em alimentos fermentados e foram consumidos pelo ser humano durante milhares de anos, sem quaisquer efeitos adversos.⁽⁶⁾ Os *Lactobacillus* também têm outros efeitos benéficos, mas menos documentados, tais como a síntese de vitamina B, a melhoria da absorção de minerais e nutrientes, a degradação de fatores antinutricionais ou a modulação da fisiologia intestinal e a redução da percepção da dor. Os *Lactobacillus* podem assim ser benéficos para a saúde e ajudar a proteger contra algumas doenças.⁽⁷⁷⁾

Uma nova aplicação dos probióticos prende-se com a utilização de formas geneticamente modificadas para expressar enzimas metabólicas.⁽⁶⁾ Deste modo, a PKU poderá vir a beneficiar da utilização de probióticos como via de “entrega” da enzima PAL no intestino.⁽⁶⁾ O primeiro estudo conduzido em 1999, mostrou que a administração oral de *Escherichia coli* geneticamente modificada para expressar a PAL, a ratos *Pah^{enu2}* levou a uma redução de 31% e 44% dos níveis plasmáticos de L-Phe após uma e duas horas, respetivamente.⁽⁶⁾⁽⁷²⁾⁽⁷³⁾⁽⁷⁸⁾ Apesar do observado, sabe-se que a *E. coli* manipulada pode ter consequências prejudiciais, uma vez que, em seres humanos, a interação com o seu equivalente *wild type* pode torná-la patogénica ou pode alterar a composição microbiota do lúmen intestinal.⁽⁶⁾ Além disso, a *E. coli* coloniza preferencialmente o intestino grosso, mas a maioria dos aminoácidos provenientes da dieta, incluindo a L-Phe, são absorvidos na região distal do intestino delgado.⁽⁷⁹⁾ Estudos mais recentes mostraram uma diminuição significativa dos níveis de L-Phe em ratos HPA tratados com PAL expressa em *Lactococcus lactis* (formulação oral), em relação grupo controlo, após nove dias de tratamento.⁽⁷⁸⁾ As vantagens de expressar a PAL em *L. lactis* incluem a proteção da enzima da inativação por acidez gástrica e de enzimas digestivas intestinais e de aquele microrganismo exercer os seus efeitos benéficos principalmente no intestino delgado. Embora tenha ocorrido uma redução significativa de L-Phe nos ratos tratados, os animais utilizados para este estudo não representam um modelo de PKU ortólogo humano e, por isso, será necessário confirmar os resultados em modelos ortólogos de PKU humana (ex: ratos *Pah^{enu2}*).⁽⁶⁾⁽⁷⁸⁾

Apesar de serem necessários estudos adicionais para avaliação da segurança e eficácia dos probióticos geneticamente modificados, estes parecem ser úteis como terapia alternativa para a PKU, permitindo uma dieta menos restritiva.⁽⁶⁾

2.5.2.5. Terapia génica

A terapia génica como tratamento da PKU tem sido o foco de estudo de diferentes grupos de investigação ao longo das duas últimas décadas, tendo sido efetuados progressos importantes. Com a utilização de vírus adeno-associado (AAV) como vetores de transferência de genes direcionados para o fígado, tem sido possível obter uma menor resposta imunitária contribuindo para um maior sucesso do tratamento a longo prazo.⁽⁶¹⁾ Assim, foi já possível observar em ratos *Pah^{enu2}* que a terapia génica direcionada para o fígado proporcionava uma correção da HPA durante o período de um ano.⁽⁵⁹⁾⁽⁶¹⁾⁽⁸⁰⁾ No entanto, a correção da atividade da hPAH não foi permanente, uma vez que o genoma do vetor não tem a capacidade de se integrar no DNA dos hepatócitos, sendo que haverá sempre eliminação de genomas do vetor episomal rAAV devido à regeneração dos hepatócitos. Por outro lado, a re-injeção

do vetor do mesmo serotipo leva à sua destruição por uma resposta imunitária mediada por anticorpos.⁽⁵³⁾

Estudos recentes realizados em ratos *Pah*^{enu2} demonstraram que a terapia génica pode ter como alvo tecidos não-hepáticos, como por exemplo o músculo esquelético.⁽³¹⁾⁽⁸¹⁾ Este tecido é um órgão alvo interessante para a terapia génica uma vez que não sofre divisão celular contínua e, além disso, é mais facilmente acessível.⁽⁵⁹⁾ No entanto, no caso da PKU, terá que ser fornecida a maquinaria de síntese da BH₄ uma vez que esta não é expressa em tecidos extra-hepáticos periféricos.

Outra abordagem direcionada para o gene consiste na utilização de antibióticos aminoglicosídeos para a leitura sequencial de mutações *nonsense*. Esta é uma aproximação extremamente interessante uma vez que aproximadamente 10% dos doentes PKU possuem mutações *nonsense* que resultam na inserção de um codão *stop* prematuro (*premature termination codon*; PTC). A utilização destes antibióticos, tais como a gentamicina G-418, tem como objetivo promover a leitura sequencial de codões STOP que são inseridos precocemente, resultando assim na produção da proteína *full-length*.⁽⁵³⁾⁽⁸²⁾ No caso da PKU, a eficácia dos aminoglicosídeos foi comprovada em sistemas de expressão *in vitro* utilizando duas linhas celulares de mamífero (COS-7 e HEX 293). No entanto, ainda não foi possível determinar se o nível de leitura no fígado é suficiente para restaurar a tolerância à L-Phe uma vez que os modelos animais de PKU moderada (ratos *Pah*^{enu1}) e clássica (ratos *Pah*^{enu2}) não são portadores de uma mutação *nonsense*.⁽⁵³⁾⁽⁸²⁾

2.5.2.6. PAH-tag

Uma nova abordagem terapêutica promissora assenta na utilização dos mecanismos de *delivery* de proteínas quando estas se encontram associadas a pequenos péptidos conhecidos como domínios de transdução proteica. Estes péptidos facilitam a entrada das proteínas de fusão através das membranas de uma grande variedade de células eucariotas.⁽⁸³⁾

Embora o mecanismo de ação envolvido neste processo de internalização não se encontre totalmente conhecido pensa-se que não envolva endocitose mediada por recetor (clatrina), nem fagocitose.⁽⁸³⁾ Dos muitos domínios de transdução de proteínas que existem, o mais estudado até à data é o trans-ativador da transcrição (TAT) do vírus HIV. Foi também comprovado que as proteínas de fusão com TAT são eficientemente entregues em células em cultura, tecido intacto e tecidos vivos (quando injetados em ratinhos). De realçar que as proteínas entregues por este péptido mantêm a sua atividade após a internalização.⁽⁸³⁾⁽⁸⁴⁾⁽⁸⁵⁾ Num estudo recente conduzido sobre a farmacocinética da proteína de fusão TAT-β-galactosidase, observou-se que o fígado é o órgão alvo para o *delivery* desta proteína de fusão.

No caso da hPAH, o órgão alvo é o fígado o que implica que esta proteína pode ser fundida com o TAT para a construção de uma proteína de fusão direcionada para o fígado, sendo assim uma potencial candidata para o tratamento da PKU, como de outras doenças metabólicas raras.⁽⁸³⁾

2.5.2.7. Chaperones farmacológicos

Um chaperone farmacológico é uma pequena molécula que tem a capacidade de resgatar a função da proteína, induzindo a estabilidade conformacional de proteínas alvo *misfolded*. Esta

capacidade resulta do estabelecimento de interações específicas e reversíveis com as proteínas *misfolded*, aumentando, deste modo a disponibilidade de espécies de proteínas funcionais na célula.⁽⁸⁶⁾⁽⁸⁷⁾

Para que um chaperone farmacológico possa exercer a sua ação é necessário que: (i) a proteína alvo apresente uma mutação que a torne instável mas que não a inative completamente; (ii) estabeleçam interações com a variante proteína com alta afinidade (permitindo a sua utilização em concentrações baixas) e especificidade e; (iii) ser apenas necessário uma quantidade baixa de proteína estável (*threshold*).⁽⁸⁸⁾

De um modo geral, os ligandos proteicos “naturais” podem atuar como chaperones farmacológicos. Estes englobam cofatores proteicos, agonistas e antagonistas e inibidores.⁽⁸⁶⁾⁽⁸⁸⁾⁽⁸⁹⁾ Na realidade, a utilização do cofator natural da hPAH (BH₄), para estabilização de variantes *misfolded*, é um caso paradigmático da ação de um ligando proteico natural como chaperone farmacológico.⁽⁸⁸⁾⁽⁹⁰⁾⁽⁹¹⁾ No caso da PKU, a maioria das variantes proteicas apresenta alterações no seu *fold*ing (*misfold*ing) que levam à agregação e consequente degradação acelerada da enzima no meio intracelular. Como referido anteriormente, a BH₄ promove uma estabilização conformacional das variantes proteicas atenuando aquela tríade, aumentando a concentração de hPAH funcional e resgatando o fenótipo bioquímico e a função da enzima *in vivo*.⁽⁸⁸⁾

A identificação de derivados do cofator natural da hPAH ou de novas moléculas que tenham também a capacidade de estabilizar a enzima surge como objetivo para o desenvolvimento de novos chaperones farmacológicos com propriedades farmacêuticas mais favoráveis no que diz respeito à síntese, biodisponibilidade e estabilidade.⁽⁸⁸⁾ Têm sido várias as aproximações utilizadas para identificação de novas moléculas. Desde o rastreio aleatório de grandes bibliotecas de compostos por técnicas de *high throughput* até abordagens mais direcionadas utilizando, num primeiro passo, uma triagem virtual com base na estrutura de bibliotecas de compostos. Na primeira aproximação, foi rastreada uma biblioteca de 6000 compostos tendo sido identificados quatro com capacidade de estabilização da forma selvagem da hPAH.⁽⁹²⁾ Na segunda aproximação, a triagem virtual inicial identificou 84 moléculas com potencial para se ligarem ao centro ativo da hPAH. As potenciais moléculas foram estudadas e, destas, apenas duas (5-benzilhidantoína e 6-amino-5-benzilamino-uracilo) apresentaram capacidade para estabilizar a hPAH, aumentando substancialmente a oxidação da L-Phe *in vivo* e, consequentemente, reduzindo a concentração sérica deste aminoácido em ratos *Pah^{enu1}*.⁽⁹³⁾

3. Doenças conformacionais

As proteínas são centrais para todos os processos biológicos. Para se tornarem funcionalmente ativas, as cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas têm de adquirir uma conformação tridimensional única (estrutura nativa). Este processo é geralmente designado por *fold*ing e tem como base a informação fornecida pela sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica.⁽⁹⁴⁾

As propriedades da ligação peptídica conferem um elevado grau de flexibilidade conformacional ao esqueleto da proteína, enquanto as cadeias laterais de aminoácidos permitem um grande número de interações principalmente não covalentes. Assim, a cadeia proteica pode

teoricamente adotar um grande número de conformações diferentes. No entanto, apenas um número muito limitado destas conformações corresponde ao seu estado nativo que é suficientemente estável e biologicamente ativo sob condições fisiológicas.⁽⁹⁴⁾

3.1. O *fold*ing proteico

Na visão atual o *fold*ing proteico é descrito como um processo complexo pelo qual uma cadeia polipeptídica (com um elevado grau de energia) atinge a sua estrutura nativa (energeticamente mais baixo) experimentando o espaço conformacional através de uma superfície de energia multidimensional ou "paisagem de energia" (Figura I.8).⁽⁹⁵⁾ De acordo com este modelo, o *fold*ing de uma proteína não segue apenas um caminho específico, mas é um processo complexo de auto-organização que geralmente não ocorre através de uma série obrigatória ou única de intermediários, mas sim através de vias descendentes no funil do *fold*ing.⁽⁹⁶⁾ Durante o processo de *fold*ing, a cadeia polipeptídica pode preencher estados intermediários de forma a ajudar a proteína a encontrar o estado nativo, mesmo que estas formas intermediárias atuem como "armadilhas cinéticas" com maior propensão a evoluírem para formas *misfolded*.

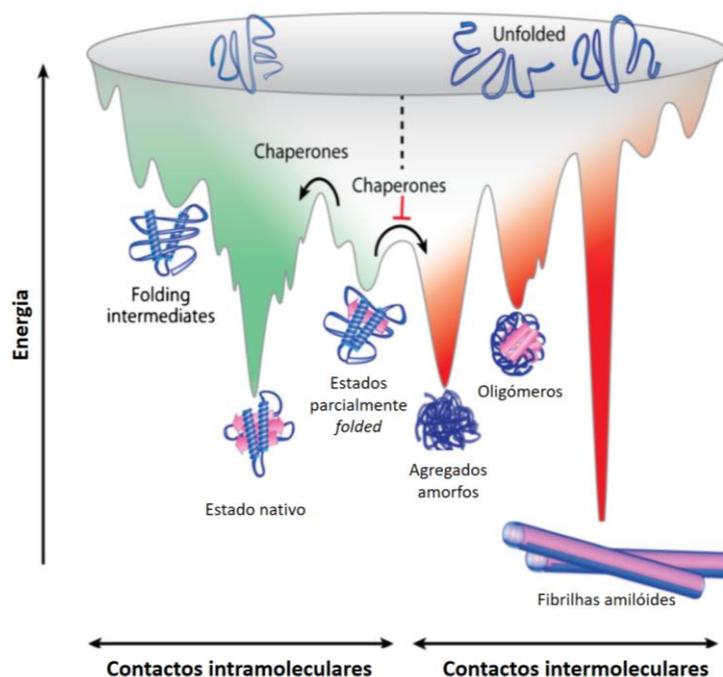


Figura I.8. Paisagem energética de *fold*ing e *misfold*ing de proteínas. As interações energeticamente favoráveis intramoleculares (verde) estão associadas a um aumento da estabilidade conformacional no decurso da progressão do *fold*ing da proteína até ao estado nativo. Durante este processo, as proteínas podem adotar conformações energeticamente favoráveis, mas não-nativas. Estes estão localizados em zonas de baixa energia (parcialmente *folded* ou estados *misfolded*). Além disso, os estados cineticamente desfavoráveis são propensos a estabelecer interações intermoleculares (vermelho), que resultam em agregados proteicos (agregados amorfos, folhas beta ricas em oligómeros e fibrilhas amilóides). Os chaperones ajudam a ultrapassar as barreiras energéticas, inibem as interações intermoleculares e, portanto, promovem o correto *fold*ing para o estado nativo. Adaptado de ⁽⁸⁸⁾.

No nível de energia mais elevado, a cadeia polipeptídica não se encontra estruturada. À medida que a proteína adquire estruturas mais organizadas e nativas, a sua energia diminui. No final do processo de *fold*ing, e à medida que as proteínas adquirem as suas conformações nativas, atingem o seu mínimo de energia.⁽⁹⁷⁾

Para além de não serem funcionais as proteínas *misfolded* podem só por si serem prejudiciais para a célula, uma vez que expõem resíduos hidrofóbicos, podem interagir com outras proteínas *misfolded*, resultando na formação de agregados proteicos que podem interferir com a função celular e por isso são considerados tóxicos.⁽⁶⁴⁾

Embora *in vitro* muitas proteínas possam adquirir o seu estado nativo espontaneamente sem o auxílio de componentes adicionais, *in vivo* o processo é mais complexo e é geralmente auxiliado e controlado por um grupo de proteínas, coletivamente conhecidas como chaperones moleculares. Juntamente com os sistemas de ubiquitina-proteassoma e a autofagia seletiva, os chaperones moleculares constituem o sistema de controlo de qualidade proteica (*protein quality control*; PQC) intracelular, atuando em diferentes compartimentos celulares, trabalhando em conjunto para reduzir a acumulação de proteínas *misfolded*, quer ajudando no *refold*ing ou destruindo-as, ajudando à manutenção de conformações proteicas nativas estáveis.⁽⁹⁴⁾⁽⁹⁸⁾ Assim, os chaperones moleculares (ex: Hsp40/Hsp70, Hsp90 ou TRiC) são componentes do sistema PQC que regulam a proteostase celular, ou seja contribuem para a manutenção do equilíbrio entre síntese proteica/*fold*ing/localização/e degradação. Alguns chaperones moleculares são altamente específicos na sua função; outros são muito gerais e podem ajudar no *fold*ing de uma grande variedade de proteínas.⁽⁹⁶⁾

3.2. O *misfold*ing proteico

O *misfold*ing proteico é inerente à cadeia polipeptídica e ocorre de forma contínua, influenciado tanto por fatores intrínsecos como extrínsecos. A composição em aminoácidos, a presença de mutações e condições ambientais (como aumento de temperatura, alterações de pH, agitação, glicação anormal ou presença de agentes oxidativos) podem levar à perda da conformação nativa das proteínas. O processo pelo qual o estado nativo é interrompido é chamado de desnaturação e, geralmente, resulta do *misfold*ing/*unfold*ing das proteínas. Devido à falta de uma conformação nativa, as proteínas *misfolded/unfolded* não são funcionais (ou, em alguns casos adquirem uma nova função). É importante salientar que o estado *unfolded* é termodinamicamente desfavorável e instável e assim estas formas têm tendência a agregar de modo a atingir estados energeticamente mais baixos e por isso mais estáveis.⁽⁹⁹⁾

3.3. O *misfold*ing proteico como base das Doenças Conformacionais

As alterações na cadeia polipeptídica, quer sejam resultado de variações genéticas (mutações) herdadas ou adquiridas ou de modificações de aminoácidos resultado de fatores esporádicos (tais como condições intracelulares adversas), podem alterar o processo de *fold*ing e dar origem a uma proteína *misfolded*. O destino da proteína *misfolded* depende da própria natureza da proteína, do compartimento celular em que ocorre o *misfold*ing, do sistema PQC, para além de fatores genéticos e das condições celulares e ambientais.⁽¹⁰⁰⁾

A proteína *misfolded* pode agregar levando à acumulação destas formas que sendo tóxicas para a célula, adquirem uma nova função (*gain-of-function*) ou pode ser reconhecida como estando *misfolded* e ser prematuramente eliminada pelo sistema PQC originando níveis intracelulares mais baixos com consequente perda de função (*loss-of-function*).⁽⁸⁹⁾⁽¹⁰¹⁾

Várias doenças humanas são hoje reconhecidas como sendo causadas por defeitos no *fold*ing proteico sendo classificadas como Doenças Conformacionais. Exemplos destas patologias incluem a Doença de Alzheimer e de Parkinson, encefalopatias espongiformes, polineuropatia amiloide familiar, e vários erros hereditários do metabolismo, tais como a PKU e defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, entre muitas outras.

Nas doenças conformacionais por ganho-de-função são geralmente observadas, nos tecidos afetados, fibrilas semelhantes a “cordas” que nalguns casos se agrupam em placas.⁽¹⁰²⁾⁽¹⁰³⁾ A apresentação clínica destas doenças conformacionais reflete o seu mecanismo molecular, que se inicia de forma particularmente lenta e insidiosa, acompanhando o processo de transição da proteína normal.⁽¹⁰⁴⁾

3.4. Abordagens terapêuticas para as doenças conformacionais

As estratégias desenvolvidas para tratamento das doenças conformacionais têm como objetivo recuperar a conformação nativa da proteína ou induzir a estabilização de estados intermédios de *fold*ing.⁽⁸⁶⁾ Nestas aproximações o alvo terapêutico pode ser a proteína *misfolded* ou uma proteína envolvida no sistema de manutenção da proteostase da proteína alvo. Deste modo, moléculas pequenas capazes de estabilizar os intermediários de *fold*ing e/ou estados semelhantes ao estado nativo (*native-like*), ou capazes de afetar o processo de *fold*ing são potenciais candidatas a serem utilizadas como moléculas terapêuticas.⁽⁵³⁾ Estas pequenas moléculas podem então atuar como chaperones químicos, chaperones farmacológicos ou reguladores da proteostase.⁽¹⁰⁵⁾⁽¹⁰⁶⁾

O chaperone químico é um termo normalmente associado a compostos de baixa massa molecular, tais como o glicerol, a trealose, a glicina e o N-óxido de trimetilamina (TMAO), que podem estabilizar e auxiliar o correto *fold*ing das proteínas atuando como osmólitos. Uma das limitações do uso de chaperones químicos para a correção terapêutica de doenças conformacionais é a sua falta de especificidade e a exigência de concentrações elevadas (\geq mM) que eventualmente poderá ser tóxica para a célula.

Pelo contrário, os chaperones farmacológicos são concebidos para se ligar e estabilizar especificamente a proteína alvo, podem ser eficazes a baixas concentrações.⁽⁹⁸⁾ Um chaperone farmacológico deverá estabilizar a proteína mutante ou propensa a *misfold*ing conduzindo-as para as formas com um mínimo de energia livre aumentando o número de espécies com um *fold*ing apropriado as quais não terão tendência a agregar impedindo a formação de oligómeros ou fibras amiloides.

Os reguladores da proteostase irão modular o sistema PQC da célula podendo regular as interações da proteína *misfolded*, quer com os chaperones moleculares responsáveis pelo *fold*ing, quer aqueles que estão envolvidos com a degradação.

3.5. A fenilcetonúria como doença conformacional

A PKU é considerada uma doença conformacional por perda-de-função, uma vez que a maioria das proteínas hPAH mutantes apresenta alterações no seu *fold*ing, diminuindo a sua estabilidade e conseqüentemente aumentando a sua tendência para agregar e ser reconhecida pelo sistema PQC intracelular e enviada para degradação. A recuperação da funcionalidade enzimática, verificada no tratamento com BH₄ resulta da correção do *misfold*ing das variantes hPAH.⁽¹⁾⁽³⁰⁾⁽⁶⁴⁾⁽¹⁰⁷⁾

II. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo identificar pequenas moléculas que possam ser utilizadas para modular a atividade e/ou estabilidade da hPAH e que potencialmente poderão atuar como chaperones farmacológicos ou ativadores. Estas moléculas foram especificamente desenhadas para interagir com a hPAH uma vez que apresentam como módulos estruturais a 3-hidroxiquinolina (3HQs) e a L-Phe. Pretende-se que estes elementos direcionem os derivados sintetizados para o centro ativo da hPAH uma vez que a 3HQ tem capacidade para coordenar o Fe e a L-Phe é o substrato da enzima. Com este objetivo foram sintetizados 22 derivados de 3HQs pelo grupo de Química Bio-Orgânica do Instituto do Medicamento (iMed.Ulisboa) da Faculdade de Farmácia da ULisboa que foram testados na forma recombinante da hPAH selvagem (hPAHwt).

III. Materiais e Métodos

1. Materiais

1.1. Reagentes

O isopropil-1-tio- β -D-galactosídeo (IPTG) e a lisozima foram adquiridos à Nzytech. O sulfato de amônio ferroso é proveniente da Merck, enquanto o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) foi adquirido à Sigma-Aldrich.

Para a determinação da atividade enzimática, além do tampão NaHepes utilizou-se o substrato L-Phe, a catalase e a tetrahidrobiopterina (BH₄), provenientes da Sigma-Aldrich. O sulfato de amônio ferroso, o ditioneitol (DTT) e o ácido ascórbico foram adquiridos à Merck.

O meio RPMI 1640, o soro bovino, a penicilina G sódica, o sulfato de estreptomicina e a L-glutamina foram adquiridos à Life Technologies.

1.2. Células, estirpe de bactérias e vetores de expressão

Para a produção da proteína PAH recombinante foram utilizadas células de *Escherichia coli* TOP10 (F-, mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG) e o sistema de expressão procariota pTrcHisB, ambos provenientes da Invitrogen. O cDNA hPAH (GenBank U49897) encontra-se clonado no local *Bam*HI do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vetor de expressão procariota pTrcHisB (Invitrogen) de acordo com o descrito por Leandro e colaboradores.⁽¹⁰⁸⁾ Este vetor apresenta a montante do MCS (Anexo, Figura VII.1.): (i) o promotor trc (Ptrc), constituído por uma parte da sequência do promotor trp e parte da sequência do promotor lac (trp-lac); (ii) a sequência do gene *LacIq* que codifica a proteína repressora Lac; (iii) um potenciador de tradução, proveniente do gene 10 do bacteriófago T7; (iv) a sequência de reconhecimento de ligação ao ribossoma (RBS); (v) o códon de iniciação da tradução ATG; (vi) uma sequência de seis códons CAT que codifica o péptido hexa-histidil (6xHis), com afinidade para metais e que permite a posterior purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade com iões metálicos (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*; IMAC); (vii) a sequência codificante do epítipo Xpress (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) e; (viii) a sequência codificante do péptido reconhecido pela enterocinase (EK; Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-↓-X) e que permite a posterior clivagem e remoção do péptido de fusão. Este vetor apresenta ainda a marca de resistência à ampicilina (Amp) e a origem de replicação ColE1.

Nos estudos com cultura de células, utilizou-se as células HEK 293T (*human embryonic kidney epithelial cell line*, ATCC CRL-11268).

1.3. Compostos em estudo

Os compostos avaliados neste trabalho são derivados de 3-hidroxiquinolin-2-onas (3HQs) (Figura III.1.) e foram sintetizados pelo grupo de Química Bio-Orgânica liderado pelo Prof. Pedro Góis (iMed.U LISboa). A estrutura química dos compostos foi confirmada após caracterização por espectroscopia de NMR (Anexo VII.5). Os compostos foram solubilizados em 100% de DMSO de forma a obter uma concentração de 10 mM, tendo sido armazenados a -20°C, em alíquotas. Para cada ensaio foi retirada uma alíquota, a qual foi diluída no tampão apropriado de modo a obter uma concentração final de 100 µM (1% DMSO).

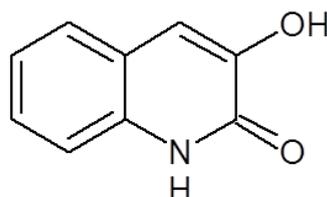


Figura III.1. Estrutura química do núcleo 3-hidroxiquinolin-2-onas (3-HQs).

2. Métodos

2.1. Expressão e purificação da proteína recombinante hPAHwt

2.1.1. Indução e Expressão proteica

Para proceder à expressão das proteínas hPAHwt uma alíquota de 100 µL de células de *E. coli* TOP10 competentes, foram transformadas com 10 ng de DNA respetivo (5 µL). Estas células foram incubadas durante a noite, a 37°C, após espalhamento em meio LB sólido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,17M, pH 7, agar 1,5%) contendo ampicilina (Amp) numa concentração final de 100 µg/mL (LB/Amp). Dos transformados obtidos, foi selecionada uma colónia bem isolada, para inocular 5 mL de meio LB líquido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,17M, pH 7) contendo Amp numa concentração final de 100 µg/mL (LB/Amp).

Após incubação com agitação durante a noite, a 37°C, a cultura celular obtida foi utilizada para inocular 1 L de meio LB/Amp contendo 0,1 mM de sulfato amónio ferroso. Esta cultura foi novamente incubada a 37°C, com agitação, até ser atingida a fase exponencial de crescimento, monitorizada pela leitura da absorvência a 600 nm ($Abs_{600nm} \approx 0,5$) num espectrofotómetro Shimadzu (modelo UV-1800). A expressão da proteína em estudo foi induzida através da adição de 500 µM de IPTG. Simultaneamente foi efetuada uma nova suplementação de sulfato amónio ferroso (0,1 mM). Após quatro horas de indução, a 37°C, com agitação constante, foi obtido o sedimento bacteriano, por centrifugação a 3.220xg, a 4°C, durante 20 minutos, o qual foi armazenado a -20°C, nunca por períodos superiores a três meses.

2.1.2. Purificação da hPAH

As células bacterianas foram ressuspensas em tampão de lise ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,8 e glicerol a 10%) contendo lisozima (1 mg/mL) e PMSF (1 mM) na proporção de 1 L de cultura/10 mL de tampão de lise. Após incubação de 30 minutos a 4°C, as células foram lisadas por sonicação (Vibra Cell, SONICS Materials) a 4°C, em 3 ciclos de 60 segundos (*duty free cycle* de 50%) com um intervalo de 30 segundos entre cada ciclo para evitar sobre-aquecimento. Seguidamente os lisados foram centrifugados a 12.800xg, durante 40 minutos, a 4°C. O sedimento celular, contendo a fração proteica insolúvel, foi desprezado, tendo sido recuperado o sobrenadante contendo a fração proteica solúvel, para posterior purificação da proteína recombinante.

2.1.3. Cromatografia de Afinidade com Iões Imobilizados (IMAC)

As proteínas de fusão expressas em *E. coli* foram purificadas por IMAC, usando a resina Ni-NTA (Qiagen), na proporção de 10 mL de lisado / 500 μL de resina. Antes de ser colocada na coluna, a resina foi sujeita a três lavagens sucessivas com 1 mL de água Milli-Q, seguidas de um passo de acondicionamento (3 x 1 mL de tampão de lise contendo 10 mM de imidazol). Entre cada passo de lavagem e acondicionamento, a suspensão foi centrifugada a 360xg, durante 2 minutos, a 4°C, tendo-se desprezado o sobrenadante. A resina foi então colocada em contacto com a fração solúvel do lisado celular, durante 1 hora, a 4°C, com agitação constante. A suspensão foi posteriormente introduzida em colunas cónicas de polipropileno (0,8 x 4 cm), com 9 cm de altura (poly-prep; Bio-Rad) e a solução de passagem (*flow-through*) recolhida. A purificação das proteínas foi efetuada a 4°C, utilizando o tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (gradiente). Assim, num primeiro passo procedeu-se à lavagem da coluna pela passagem de tampão de lise contendo: (i) 20 mM de imidazol (2 x 5 mL); (ii) 50 mM de imidazol (2 x 5 mL), e (iii) 75 mM de imidazol (1 x 5 mL). A eluição das proteínas de fusão foi efetuada pela passagem de frações de 500 μL de tampão de lise contendo 250 mM de imidazol.

2.1.4. Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC)

A separação das formas oligoméricas da proteína hPAHwt foi efetuada por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Esta técnica permitiu isolar as formas tetraméricas, usadas posteriormente nos ensaios. Assim, foi utilizado o sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) AKTA Prime Plus (GE Healthcare), equipado com detetor de UV (λ de 280 nm) e um coletor de frações. A separação cromatográfica foi efetuada, a 4°C, numa coluna pré-empacotada *HiLoad 16/60 Superdex 200* (GE Healthcare) e utilizando como fase móvel o tampão SEC (NaHepes 20 mM, NaCl 200 mM pH 7,0), o qual foi bombeado a um caudal de 0,7 mL/min.

Como marcador de massas moleculares (MM) foi utilizado o *Gel filtration standard* (Bio-Rad) composto por tiroglobulina (670 kDa), gamaglobulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa); e uma mistura de proteínas, adquiridas à Sigma, de grau de pureza adequado para SEC constituída por apoferritina (443 kDa), desidrogenase alcoólica (150 kDa) e albumina (66 kDa) numa concentração de 5 mg/mL em cada.

Após separação a determinação da percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas da hPAHwt foi efetuada por deconvolução dos cromatogramas utilizando o *software* de análise cromatográfica *PeakFit* (Seasolve).

A fração tetramérica foi recolhida tendo sido posteriormente concentrada por ultracentrifugação, utilizando as membranas Amicon Ultra-15/Ultracell-30 (MWCO 30 kDa; Merck Millipore) até obtenção de uma concentração > 5 mg/mL.

2.1.5. Determinação da concentração de proteína pelo Método de Bradford

Na purificação de proteínas, é necessário recorrer a métodos rápidos e sensíveis na quantificação de proteínas. A hPAHwt foi quantificada pelo método colorimétrico de Bradford, que envolve a ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue* à proteína.⁽¹⁰⁹⁾ Foi utilizado como reagente de Bradford o *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) e uma curva de calibração constituída por albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 1, 2, 4, 8 e 10 µg/mL (Anexo VII.1). As absorvâncias foram lidas a um comprimento de onda de 595 nm no espectrofotómetro Shimadzu (modelo UV-1800). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.1.6. Análise por Eletroforese (SDS-PAGE)

A proteína em estudo foi analisada por separação eletroforética em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), segundo o método descontínuo de Laemmli.⁽¹¹⁰⁾ Para preparação do gel de separação foi utilizada uma concentração de 10% de acrilamida/bisacrilamida (30% T e 2,6% C; Bio-Rad) e o tampão constituído por 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 e 0,1% SDS. O gel de concentração foi preparado de modo a conter acrilamida/bisacrilamida a 4%, o tampão Tris-HCl (125 mM) pH 6,8 e 0,1% de SDS.

Como tampão de eletroforese foi utilizado a solução contendo Tris base 62,5 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, e o pH 8,3. As amostras foram aplicadas no sistema de separação após aquecimento durante 10 minutos a 95°C em solução de deposição (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 0,025% azul de bromofenol e 5% β-mercaptoetanol). A eletroforese foi realizada num sistema vertical *Mini-PROTEAN® Tetra handcast* (Bio-Rad). Para induzir a separação eletroforética, foi aplicada uma corrente constante de 30 mA. Após a separação eletroforética as proteínas foram visualizadas mediante a utilização do corante *BlueSafe* (Nzytech).

A massa molecular (MM) da proteína em estudo foi determinada por comparação com o perfil eletroforético do marcador de MM pré-corado *NzyColour protein marker II* (Nzytech) constituído por proteínas com massas moleculares de 11, 17, 20, 25 (verde), 35, 48, 63, 75 (rosa), 100, 135, 180 e 245 kDa.

2.2. Ensaios enzimáticos

A atividade enzimática específica da hPAHwt foi calculada pela determinação da quantidade de produto formado (L-Tyr) por unidade de tempo e em função da quantidade de proteína presente no meio reacional ($\text{nmol Tyr} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), de acordo com o método descrito por Leandro *et al.*⁽¹⁶⁾, com algumas modificações. A reação enzimática decorreu na presença de oxigénio atmosférico, à temperatura de 25°C, num volume reacional de 400 μL contendo tampão NaHepes 250 mM pH 7,0; 0,1 mg/mL de catalase, 100 μM de L-Phe e 5 μg de PAH. Após incubação de 4 minutos (pré-ativação pela L-Phe), foi adicionado sulfato amónio ferroso numa concentração final de 100 μM , permanecendo por 2 minutos adicionais a 25°C. A reação enzimática foi então iniciada através da adição do cofator natural BH_4 numa concentração final de 75 μM . Após 1 minuto de incubação, a reação foi terminada com a adição de 200 μL de uma solução de ácido acético a 2% (em etanol). De modo a remover a proteína precipitada, esta solução foi centrifugada a 12.000xg, durante 5 minutos, a 4°C, e o sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C, até posterior análise. Os ensaios enzimáticos foram todos realizados em triplicado. Nos ensaios onde não foi efetuada pré-ativação pelo substrato a reação enzimática foi iniciada por adição de L-Phe a 100 μM em simultâneo com o cofator BH_4 a 75 μM . Os derivados da 3-HQs (numa concentração final de 100 μM) foram estudados relativamente ao seu efeito sobre a atividade da hPAHwt quer isoladamente, quer através da adição em simultâneo com a L-Phe, de acordo com o esquema apresentado na Figura III.2. Para cada um dos ensaios foram utilizados controlos apropriados os quais foram obtidos substituindo o composto em estudo por DMSO a 1%. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

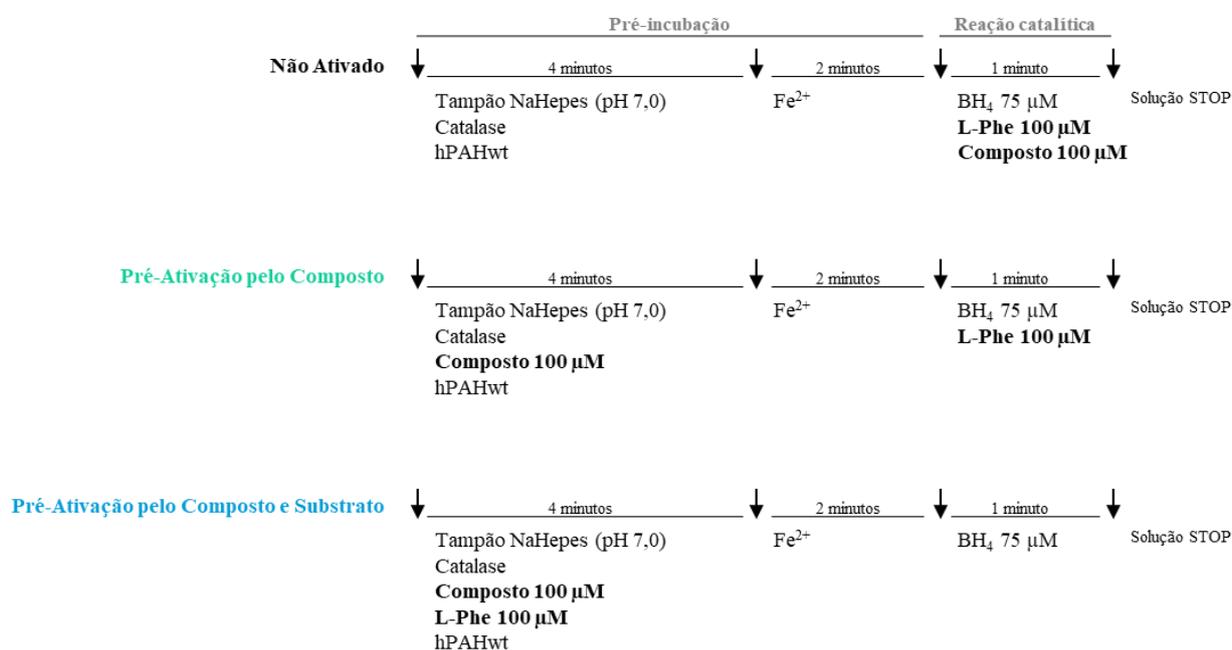


Figura III.2. Esquema da adição dos diversos componentes da reação enzimática para estudo do efeito dos derivados da 3-HQs sobre a atividade da hPAHwt.

Para quantificação da L-Tyr formada, foi utilizado um sistema de HPLC (Waters 2695) equipado com um injetor automático e um detetor de fluorescência com os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) ajustados para 274 nm e 304 nm, respetivamente. A separação foi efetuada numa coluna de fase reversa LiChroCART 60 (Merck), utilizando como fase móvel a mistura etanol/H₂O (5:95) bombeada com um caudal de 0,7 mL/min, de acordo com o método descrito por Kand'ár.⁽¹¹¹⁾ Todas as amostras foram injetadas em triplicado. Para quantificação da L-Tyr formada foi utilizada uma curva de calibração apropriada (0,5 - 100 μ M L-Tyr).

A L-Tyr formada foi ainda quantificada por fluorimetria utilizando o leitor de placas FLUOstar Omega (BMGLabtech, Alemanha) e os comprimentos de onda de λ_{exc} 260 nm e λ_{em} 310 nm, em microplacas de 96 poços. Foi ainda utilizada uma curva de calibração adequada 0,5 - 100 μ M L-Tyr).

2.3. Caraterização do perfil de estabilidade térmica

O perfil de estabilidade térmica da proteína hPAHwt recombinante foi obtido por fluorimetria diferencial de varrimento (*Differential Scanning Fluorimetry*, DSF), tendo sido realizado num termociclador *C1000 Touch* com um módulo de reação ótico CFX96 (Bio Rad). Os ensaios foram efetuados em placas de PCR de 96 poços num volume final de 50 μ L, contendo SYPRO-Orange (Invitrogen; 5000-fold comercial stock solution) numa concentração final de 2,5x, hPAHwt a 0,1 mg/mL e o tampão NaHepes 20 mM, NaCl 200 mM, pH 7. Nos ensaios em que foi testado o efeito dos compostos em estudo, estes foram adicionados numa concentração final de 100 μ M (1% DMSO).

A placa de PCR foi selada com *Optical-Quality Sealing Tape* (Bio-Rad) e centrifugada a 300 g durante 5 minutos. O ensaio de DSF foi realizado com o aumento da temperatura de 20°C a 90°C, com um tempo de retenção de 1 segundo a cada 0,2°C e a aquisição de fluorescência foi feita utilizando o canal FRET. Os ensaios controlo foram efetuados utilizando DMSO a 1% na ausência de compostos.

Os dados foram processados usando o *software* V3.0 Gestor CFX (Bio-Rad). Para determinação das temperaturas de desnaturação T_{m1} e T_{m2} recorreu-se ao programa GraphPad Prism 6 e à equação bifásica:

$$\text{Equação III.1.} \quad y = A_{min} + \frac{(A_{max1} - A_{min}) \times \text{Frac}}{1 + 10^{((x - x_{0,1}) \times h_1)}} + \frac{(A_{max2} - A_{min}) \times \text{Frac}}{1 + 10^{((x_{0,2} - x) \times h_2)}}$$

onde y é a intensidade de fluorescência (IF) medida, A_{min} representa a resposta (IF) na linha de base; A_{max1} e A_{max2} a resposta (IF) máxima da primeira e segunda transição respetivamente; h_1 e h_2 os coeficientes de Hill da primeira e segunda transição respetivamente; Frac a proporção da resposta máxima devido à transição mais potente e $x_{0,1}$ e $x_{0,2}$ representa a temperatura a metade da resposta do valor mínimo e máximo da primeira e segunda transição respetivamente e que corresponde ao valor de T_{m1} e T_{m2} .

2.4. Proteólise limitada

A resistência da forma tetramérica da hPAHwt à proteólise pela tripsina foi determinada na presença de oxigénio atmosférico, à temperatura de 25°C, em tampão NaHepes 20 mM, NaCl 200 mM e pH 7,0. Foi utilizada uma proporção de tripsina:hPAHwt de 1:200 (m:m), sendo a concentração final de proteína recombinante de 0,3 mg/mL. Entre os 0 e 60 minutos foram retiradas alíquotas da reação às quais se adicionou inibidor de tripsina (razão de 1:5 (m:m), tripsina:inibidor). As amostras foram posteriormente analisadas após separação por SDS-PAGE 12,5% em poliacrilamida.

Após coloração do gel, estes foram digitalizados e posteriormente sujeitos a análise densitométrica com recurso ao *software* de processamento gráfico *ImageJ*.⁽¹¹²⁾ Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão não linear utilizando a equação:

$$\text{Equação III.2.} \quad y = (y_0 - Patamar) \times e^{(-k \times x)} + Patamar$$

onde y_0 é o valor de y (% de proteína completa) quando x (tempo) é zero, *Patamar* é o valor de y quando x é ∞ e k é a taxa de proteólise. A partir da curva obtida foi ainda possível determinar o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$).

2.5. Ensaios de inibição da tripsina

Os compostos em estudo foram testados relativamente à sua capacidade de inibição da tripsina utilizando o substrato N-carbobenziloxi-glicil-glicil-arginil-7-amino-4-metil-cumarina (N-CBZ-Gly-Gly-Arg-AMC; Bachem) a 50 μM . A tripsina é uma protease que hidrolisa, a C-terminal, ligações peptídicas que envolvam aminoácidos básicos, como a arginina (Arg) e lisina (Lys). Assim, ao atuar sobre o substrato N-CBZ-Gly-Arg-AMC irá libertar 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) o qual é fluorescente (λ_{exc} 360 nm; λ_{em} 460 nm). Os ensaios foram realizados a 25°C, na ausência e presença dos compostos testados (100 μM em DMSO 1%) no leitor de microplacas FLUOstar Omega. A intensidade de fluorescência foi registada durante 30 minutos.

2.6. Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio *Alamar Blue*. Este é um teste de *endpoint* que monitoriza a viabilidade celular. A resazurina é um corante azul pouco fluorescente que é reduzido por células viáveis a resorufina que apresenta uma cor rosa altamente fluorescente⁽¹¹³⁾. Foi também utilizado o iodeto de propídio (IP) para os ensaios de exclusão.⁽¹¹⁴⁾ Este fluorocromo tem capacidade de ligação às cadeias do ADN, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável (exclusão).

No dia anterior ao ensaio, inocularam-se as células HEK-293T⁽¹¹⁵⁾ em placas de cultura de tecidos de 96 poços, em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina G sódica, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina, até uma concentração de 2×10^4 células por poço. Os compostos em estudo foram diluídos em meio de cultura, de modo a obter uma concentração final de 50 ou 100 μM (DMSO a 0,5 e 1% (v/v), respetivamente). Cada concentração do composto foi testada em cinco vezes numa experiência única que foi repetida

pelo menos duas vezes. Os controlos continham concentrações de DMSO equivalentes e dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1 mg/mL como controlo positivo de morte celular. As células foram incubadas a 37°C, com controlo de humidade e 5% de CO₂ (Nuair NU4750E). Após 24 horas de incubação, o meio foi substituído por IP a 0,3 mM (obtido por diluição, em meio de cultura, de uma solução *stock* a 1,5 mM em DMSO). A fluorescência (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 590 nm) foi registada no leitor de microplacas FLUOstar Omega. Seguidamente foi realizado o ensaio Alamar Blue. Assim, o meio foi substituído por meio de cultura contendo resazurina a 5 mM e as células foram incubadas durante 3 horas. Findo este tempo a fluorescência (λ_{exc} 530 nm, λ_{em} 590 nm) foi medida no leitor de microplacas FLUOstar Omega.

Nos ensaios com IP, o *uptake* do fluorocromo nas células cultivadas na presença dos compostos (Amostra) foi comparado com o *uptake* das células controlo tendo sido calculado o *uptake* relativo através da equação:

$$\text{Equação III.3.} \quad \text{Uptake de IP relativo} = \frac{\text{Intensidade Fluorescência}_{\text{Amostra}}}{\text{Intensidade Fluorescência}_{\text{Controlo}}}$$

A viabilidade celular relativa (%), determinada pelo ensaio *Alamar Blue*, foi calculada através da equação:

$$\text{Equação III.4.} \quad \text{Viabilidade celular relativa (\%)} = \frac{\text{Intensidade Fluorescência}_{\text{Amostra}}}{\text{Intensidade Fluorescência}_{\text{Controlo}}} \times 100$$

2.7. Ensaios de ressonância paramagnética eletrónica

Os ensaios de ressonância paramagnética eletrónica (EPR) foram efetuados no Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa (ITQB) pelo Prof. Miguel Teixeira e pelo Doutor João Vicente. Foi utilizado um espectrómetro Bruker EMX equipado com um criostato de hélio de fluxo contínuo da Oxford Instruments ESR-900. Os espetros foram registados a 4K, utilizando uma concentração de hPAHwt contendo ~ 100 μM Fe³⁺, na ausência ou presença de 3HQs numa concentração equimolar.

IV. Resultados e Discussão

1. Rendimento e grau de pureza da proteína recombinante produzida

A proteína recombinante hPAHwt foi produzida em *E. coli*, a 37°C, utilizando um tempo de indução de 4 horas e 500 µM de IPTG. Nestas condições, a proteína recombinante sobre-expressa foi recuperada maioritariamente na fração solúvel.

Para a realização dos ensaios com a hPAHwt é necessário utilizar uma amostra proteica com um elevado grau de pureza. Deste modo, utilizaram-se dois processos cromatográficos: um primeiro passo em que a proteína recombinante foi purificada por IMAC e um segundo passo onde se utilizou uma SEC para isolamento das formas tetraméricas biologicamente ativas.

Embora a purificação por IMAC se aplique rotineiramente no laboratório do grupo, neste trabalho foi re-avaliado o esquema de eluição (6 x 500 µL de tampão de eluição) de modo a poder agilizar o processo. Como se pode ver na Figura IV.1., as três últimas frações de eluição não apresentavam quantidade significativa de hPAHwt pelo que recolhendo apenas as três primeiras frações (volume final de 1,5 mL) foi possível obter uma amostra menos diluída e num volume possível de ser aplicado diretamente na coluna SEC utilizando o *loop* de 5 mL e para o qual é recomendada a aplicação de $\leq 2,5$ mL de amostra.

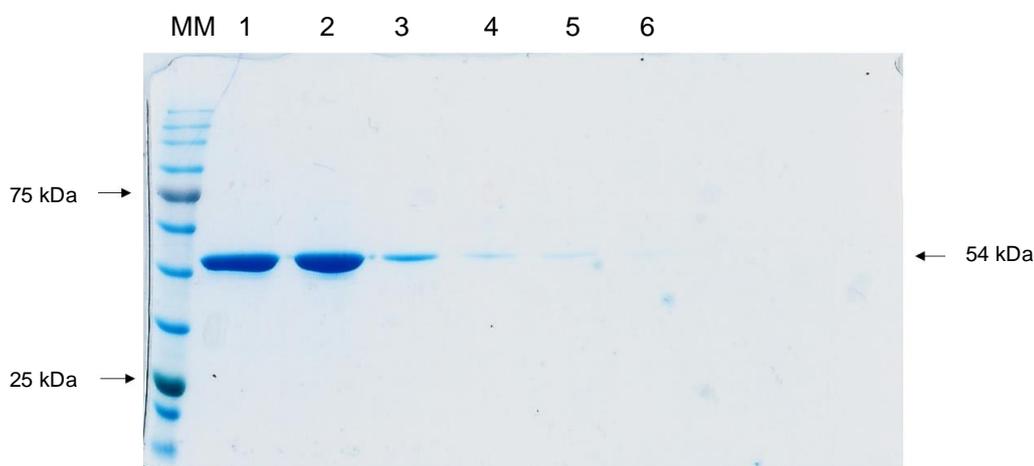


Figura IV.1. Análise por SDS-PAGE do perfil de eluição da proteína hPAHwt após purificação por IMAC utilizando 6 x 500 µL de solução tampão de lise contendo 250 mM de imidazol (1 a 6). (MM) marcador de massas moleculares pré-corado (NzyColour protein marker II). É indicada a MM da hPAHwt de fusão (54 kDa) e que corresponde à MM da hPAHwt (52 kDa) e do péptido de fusão 6xHis (2 kDa).

Assim, após esta re-avaliação, a proteína foi eluída adicionando três frações de 500 μL de tampão de lise contendo 250 mM de imidazol, após as lavagens da coluna pela passagem de tampão de lise contendo: (i) 20 mM de imidazol (2 x 5 mL); (ii) 50 mM de imidazol (2 x 5 mL), e (iii) 75 mM de imidazol (1 x 5 mL) (Figura IV.2.).

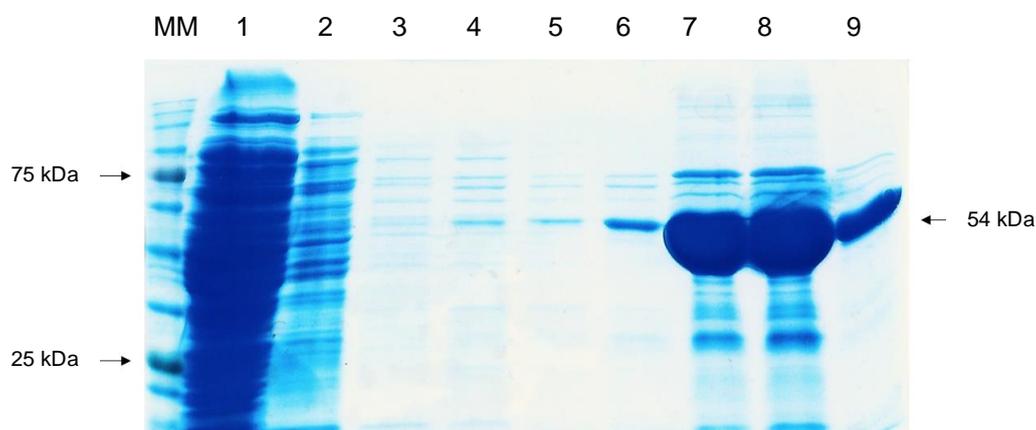


Figura IV.2. Análise por SDS-PAGE do perfil de purificação por IMAC da hPAHwt. *Flow through* (1); Lavagens com tampão de lise contendo 20 mM (2 e 3), 50 mM (4 e 5) e 75 mM (6) de imidazol. Eluição com tampão de lise contendo 250 mM de imidazol (7 a 9). Em todas a amostras foi aplicado o volume de 16 μL . (MM) Marcador de massas moleculares pré-colorado (NzyColour protein marker II).

A posterior SEC permitiu isolar as formas tetraméricas (Figura IV.3.), bem como eliminar o imidazol presente na amostra proveniente da IMAC.

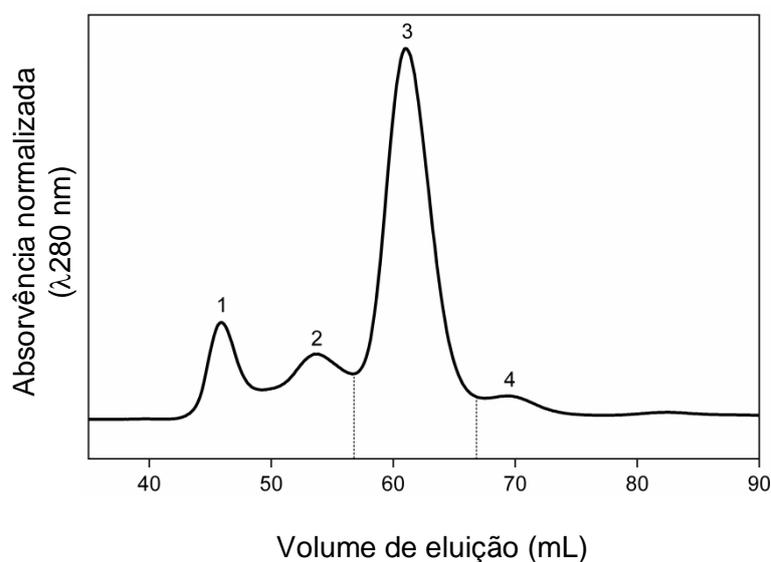


Figura IV.3. Perfil cromatográfico da proteína recombinante hPAHwt, obtido por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Os números indicam os volumes de eluição das formas agregadas (1), octâmeros/hexâmeros (2), tetrâmeros (3) e dímeros (4).

O sistema de separação cromatográfica desenvolvido permitiu-nos isolar as diferentes formas oligoméricas da hPAHwt, nomeadamente agregados de elevada massa molecular eluídos no volume morto da coluna (Figura IV.3., pico 1); octâmeros/hexâmeros (≈ 440 kDa; Figura IV.3., pico 2); tetrâmeros (≈ 220 kDa; Figura IV.3., pico 3), e dímeros (≈ 110 kDa; Figura IV.3., pico 4). Como pode ser observado pela análise da Figura IV.3., a hPAHwt foi eluída maioritariamente na sua forma tetramérica (60,4%), com uma pequena fração de dímeros (6,5%), octâmeros/hexâmeros (22,4%) e agregados (10,7%). Nas condições cromatográficas utilizadas, não foi possível detetar nenhum pico correspondente a formas monoméricas. Após a SEC, as frações correspondentes aos tetrâmetros (indicado a tracejado na Figura IV.3.) foram reunidas e concentradas por ultrafiltração até ser atingida uma concentração proteica de ≥ 5 mg/mL.

2. Efeito dos derivados 3-HQs na estrutura e função da hPAHwt

2.1. Caracterização funcional e estrutural da hPAHwt

2.1.1. Atividade enzimática

Os valores da atividade específica da hPAHwt, determinados por quantificação da L-Tyr por HPLC, são apresentados na Tabela IV.1. Uma das características da hPAHwt é a sua ativação pelo substrato. Assim, este parâmetro foi também determinado neste estudo. A hPAHwt recombinante apresentou uma atividade enzimática específica de 4430 ± 351 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹ e uma ativação pelo substrato de $3,2 \pm 0,1$ (L-Phe 1 mM). Estes dados encontram-se dentro dos valores descritos na literatura. Embora o mecanismo de ativação ainda não se encontre totalmente compreendido, sabe-se que apresenta uma elevada relevância biológica. No entanto, estudos recentes corroboram a hipótese levantada por diversos autores que apontam para a que este fenómeno seja causado pela ligação da L-Phe num sítio alostérico localizado no domínio regulador N-terminal. ⁽¹¹⁶⁾

Tabela IV.1. Análise das propriedades enzimáticas da proteína recombinante hPAHwt.

	Atividade enzimática ^(a) (nmol Tyr.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	Ativação pela L-Phe ^(b)
hPAHwt	4430 ± 351	$3,2 \pm 0,1$

Notas: (a) Ensaio enzimático realizado em condições padrão de pré-ativação (1 mM L-Phe, 75 μ M BH₄, 25°C). Os valores apresentados representam o valor médio \pm desvio padrão. (b) Atividade enzimática determinada sem pré-incubação com L-Phe nas mesmas condições padrão. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

2.1.2. Perfil de estabilidade térmica

Através da técnica de DSF é possível calcular a temperatura de desnaturação (T_m), ou seja, o valor de temperatura para o qual metade das formas existentes em solução se encontra no estado *unfolded*. Assim, o T_m é um parâmetro que nos pode indicar a resistência de uma proteína à desnaturação térmica e concomitantemente a sua estabilidade térmica.

Como pode ser observado pela análise da Figura IV.4., a curva de desnaturação térmica da forma tetramérica da hPAHwt apresenta duas transições, sendo por isso possível calcular dois T_{ms} , o T_{m1} que tem sido associado à desnaturação do domínio regulador menos estável, e um T_{m2} associado à desnaturação térmica do domínio catalítico mais estável.⁽²¹⁾⁽³⁰⁾

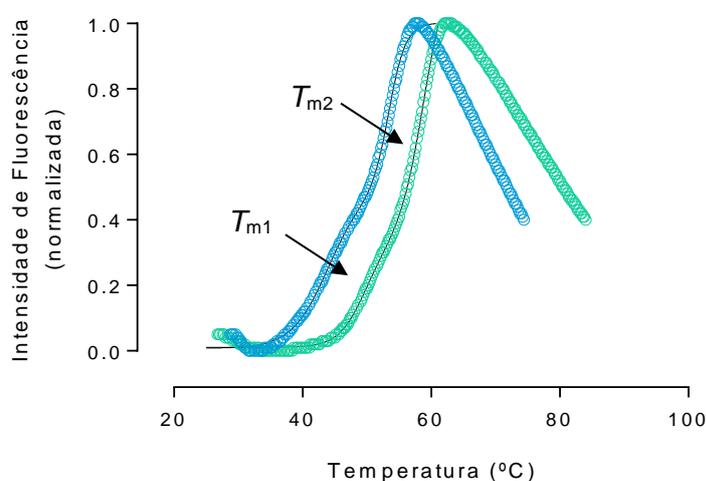


Figura IV.4 Perfil de estabilidade térmica da proteína recombinante hPAHwt obtido por fluorimetria diferencial de varrimento (DSF). Os perfis apresentados representam a hPAHwt na presença de DMSO 1% (○) e na presença de L-Phe a 1 mM (◐). O perfil bifásico da curva de desnaturação permite determinar duas transições associadas ao T_{m1} e T_{m2} (indicados).

Utilizando a equação III.1. foi possível calcular os T_{ms} da hPAHwt, na ausência e na presença de L-Phe a 1 mM, os quais são apresentados na Tabela IV.2.

Tabela IV.2. Valores das temperaturas de desnaturação (T_m) determinadas por fluorimetria diferencial de varrimento (DSF), na ausência e na presença de 1 mM L-Phe.

	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
hPAHwt	$42,2 \pm 1,4$	$54,2 \pm 0,7$
hPAHwt (L-Phe 1 mM)	$50,6 \pm 0,3$	$58,2 \pm 0,2$

Os valores obtidos encontram-se dentro dos valores descritos na literatura. Como esperado, na presença de L-Phe observou-se não só um aumento da temperatura de desnaturação do domínio

catalítico (T_{m2}) de $\approx 4^\circ\text{C}$, mas também um aumento de $\approx 8^\circ\text{C}$ no T_{m1} , o que tem sido associado à ligação do substrato ao domínio N-terminal regulador.

2.1.3. Proteólise limitada

Nos ensaios de proteólise limitada é analisado o efeito da hidrólise controlada das ligações peptídicas por uma protease com uma ação pouco específica (ex: tripsina). Estes ensaios podem ser usados com sucesso para analisar as características conformacionais das proteínas. Assim, uma proteína que apresente uma conformação mais “aberta” ou cuja cadeia polipeptídica apresente maior flexibilidade será mais susceptível à proteólise. Na Figura IV.5. é apresentado o perfil de degradação da hPAHwt pela tripsina na ausência e na presença do substrato L-Phe.

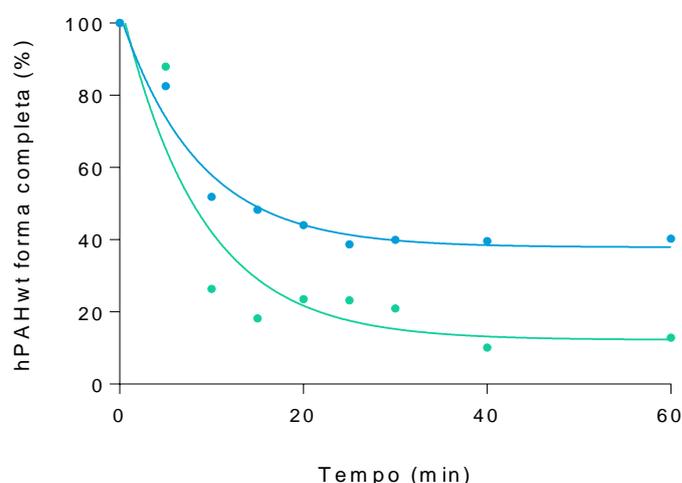


Figura IV.5. Perfil da proteólise limitada da hPAHwt pela tripsina, na presença de tampão (●) e na presença de 1 mM de L-Phe (●).

Pensa-se que a ligação da L-Phe à hPAHwt irá desencadear alterações conformacionais reversíveis no domínio regulador que são transmitidas globalmente (dímero e tetrâmero) através de várias regiões flexíveis da proteína, resultando numa estrutura mais aberta. Essa alteração conformacional resulta numa maior susceptibilidade à proteólise limitada pela tripsina, como pode ser observado na Figura IV.5, e que resulta num aumento da constante de proteólise (k) e uma diminuição de semi-vida ($t_{1/2}$) (Tabela IV.3.).

Tabela IV.3. Parâmetros indicativos da susceptibilidade da hPAHwt à ação da tripsina na ausência e na presença de 1 mM L-Phe.

	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
hPAHwt	$0,11 \pm 0,018$	6,167
hPAHwt (L-Phe 1 mM)	$0,21 \pm 0,053$	3,257

Nota: Os valores de k e $t_{1/2}$ foram obtidos por aplicação da Equação III.2 aos perfis de proteólise mostrados na Figura IV.5.

2.2. Efeito dos compostos derivados de 3HQs

Com base no conhecimento da estrutura da hPAHwt postulamos que os derivados 3-HQs poderiam ser um modelo útil para o desenho de novos moduladores da atividade e/ou estabilidade desta proteína. Na realidade as 3-hidroxiquinolinas possuem um conjunto único de propriedades que são ideais para desenvolver moduladores da hPAHwt, nomeadamente: (i) poderem complexar centros metálicos, através dos grupos álcool (-OH) e ceto (=O) nas posições 3 e 2 da quinolina, respetivamente e; (ii) serem um bioisómero da glicina, ou seja apresenta um grupo de átomos com o mesmo número e disposição de eletrões que conferem propriedades físicas/químicas e biológicas semelhantes à glicina (Figura IV.6.). Como referido anteriormente, a hPAHwt é uma enzima dependente do ferro e apresenta um átomo de ferro no domínio catalítico sendo por isso suscetível de ser quelatado pelos derivados 3-HQs.

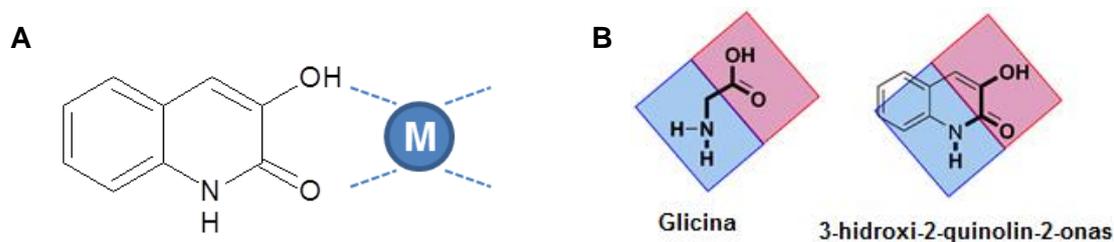
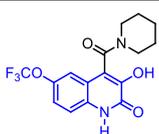
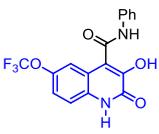
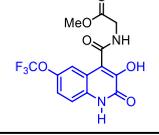
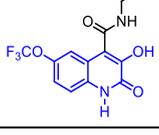
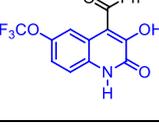
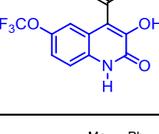
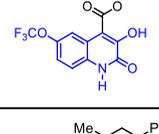
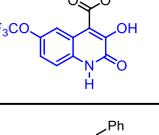
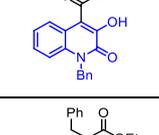
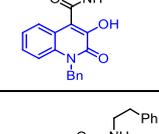
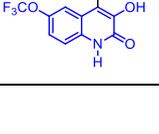


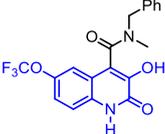
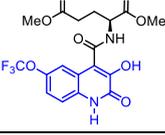
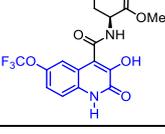
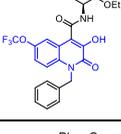
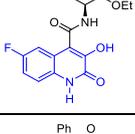
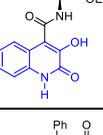
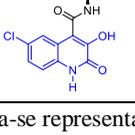
Figura IV.6. Racional para a utilização de derivados de 3-hidroxi-2-quinolin-onas (3-HQs) como moduladores da hPAHwt. Em A é apresentado o mecanismo de coordenação do núcleo 3-HQ com íões metálicos (M) como o Fe(II) ou Co(II). Em B é mostrado o bioisosterismo entre a glicina e parte da estrutura da 3-HQ.

Assim, e tendo em conta que os ensaios realizados (atividade enzimática, ativação pelo substrato, temperaturas de desnaturação térmica e proteólise limitada) demonstraram que a proteína produzida e purificada pelo sistema adotado no laboratório permite obter uma proteína funcional, procedemos ao estudo de 22 compostos, derivados da 3-HQs, produzidos pelo grupo de Química Bio-orgânica do iMed.ULisboa (Tabela IV.4.). Postulámos que a possibilidade de quelatar o Fe presente no centro ativo pelo núcleo de 3-HQ pode aumentar a estabilidade da hPAHwt, evitando o *misfolding*, a agregação e a degradação proteolítica.

Tabela IV.4. Estrutura e massa molecular dos vinte e dois compostos derivados das 3-hidroxiquinolin-2-onas (3-HQS) em estudo.

Composto	Estrutura	Massa Molecular
C1		342,26
C2		464,39

C3		356,29
C4		364,06
C5		366,36
C6		360,24
C7		378,08
C8		349,26
C9		345,27
C10		393,31
C11		421,36
C12		384,42
C13		470,51
C14		392,32

C15		392,32
C16		436,33
C17		446,03
C18		416,34
C19		554,52
C20		398,39
C21		380,40
C22		414,84

Nota: o núcleo central 3-hidroxiquinolin-2-ona encontra-se representado a azul.

Uma vez que a L-Phe é o substrato da hPAHwt, algumas moléculas foram desenhadas para incorporar o radical fenil (Ph) na posição 4 do núcleo 3-HQs (Figura IV.6.), nomeadamente os compostos **C2**, **C4**, **C7** a **C16** e **C19** a **C22**. Quatro dos 22 compostos sintetizados apresentam um radical benzilo (Bn) na posição 1, nomeadamente os compostos **C5**, **C12**, **C13** e **C19**. Em dezoito compostos foram introduzidos grupos adicionais na posição 6 nomeadamente um átomo de Cl (**C22**), um átomo de F (**C20**) e o grupo trifluorometoxi (F₃CO; **C1** a **C4**, **C6** a **C11** e **C14** a **C19**).

2.2.1. Atividade enzimática

O efeito deste conjunto de compostos sobre a atividade enzimática da hPAHwt, foi determinado através da utilização de três condições experimentais (Figura III.2.). A primeira condição do ensaio foi realizada adicionando o substrato L-Phe e o composto simultaneamente, quando se dá o início da reação, para evitar o efeito de pré-ativação (Não Ativado). A segunda condição envolveu a pré-incubação da enzima com os compostos (sem L-Phe), para estabelecer a sua capacidade de pré-ativar a enzima, mimetizando a pré-ativação pelo substrato (Pré-Ativação pelo Composto). A terceira e última condição do ensaio envolveu a pré-incubação da enzima com o substrato L-Phe e o composto (Pré-Ativação pelo Composto e Substrato), para avaliar a competição entre os dois. De salientar que a BH₄ utilizada foi preparada em ácido ascórbico a 5 mM, uma vez que o DTT utilizado habitualmente poderia alterar os compostos em estudo.

Na Figura IV.7. são apresentados os valores de atividade enzimática específica da hPAHwt na condição “Não Ativado” na ausência (controlo; 1% DMSO) e presença dos derivados 3-HQs na concentração final de 100 µM.

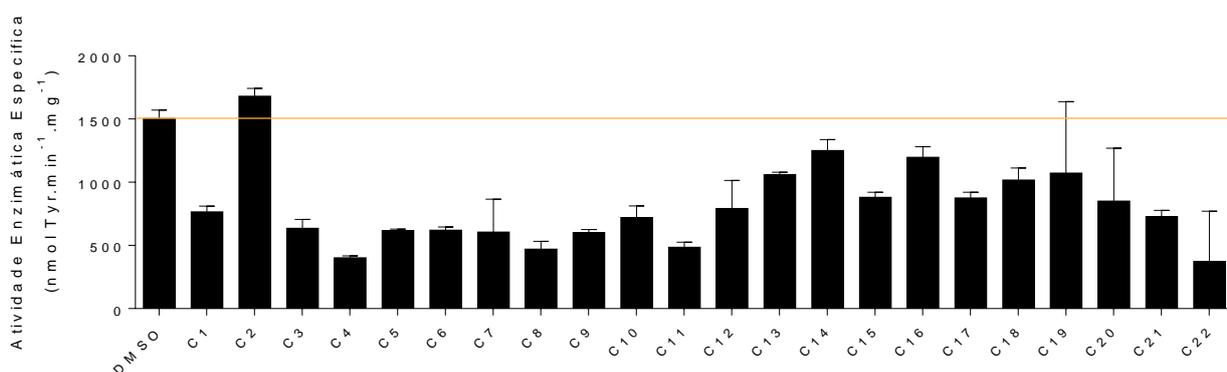


Figura IV.7. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt na condição “Não Ativado”. Os dados são apresentados como média ± SD. A linha indica o valor obtido para o ensaio controlo (DMSO a 1%). Os compostos foram testados numa concentração de 100 µM.

Uma vez que na condição de “Não Ativado” substrato e composto são adicionados em simultâneo no início da reação, de todos os compostos analisados, apenas o **C2** foi capaz de aumentar a atividade da enzima hPAHwt. Todos os outros compostos testados levaram a uma diminuição da atividade enzimática o que parece indicar um potencial efeito inibidor. No entanto, dentro deste efeito inibidor nem todos parecem mostrar a mesma potência. Os compostos **C1** e **C12** a **C20** apresentam menos de 50% de inibição (por exemplo **C1**, 49% de inibição e **C14**, 17% de inibição).

No entanto, quando a proteína é pré-incubada com o composto a resposta é diferente (Figura IV.8.). Nesta situação todos os compostos demonstram ter um efeito inibidor da atividade da hPAHwt, mesmo o **C2**, que quando adicionado no início da reação apresentava uma ligeira capacidade para aumentar a atividade da hPAHwt (Figura IV.7.).

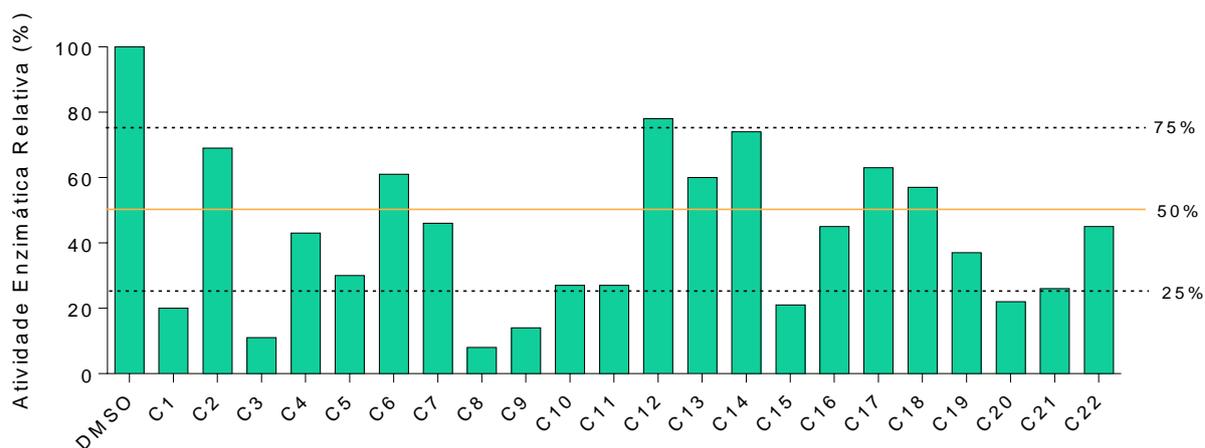


Figura IV.8. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt na condição “Pré-Ativação pelo Composto”. Os dados são apresentados como média \pm SD. As linhas indicam os limites de 25, 50 e 75% da atividade em relação ao valor obtido para o ensaio controlo onde foi utilizado DMSO a 1% como composto (■). Os compostos foram testados numa concentração de 100 μ M.

Os valores de atividades residuais obtidas foram de: menos de 25% para os compostos **C1**, **C3**, **C8**, **C9**, **C15** e **C20**; entre 25 e 50% para os compostos **C4**, **C5**, **C7**, **C10**, **C11**, **C16**, **C19**, **C21** e **C22**; entre 50 e 75% para os compostos **C2**, **C6**, **C13**, **C14**, **C17** e **C18**. Apenas para o **C12** foi obtido um valor de atividade residual acima dos 75%.

Na Figura IV.9. é apresentada uma análise comparativa entre a condição “Pré-Ativação pelo Composto” e a condição “Não Ativado”.

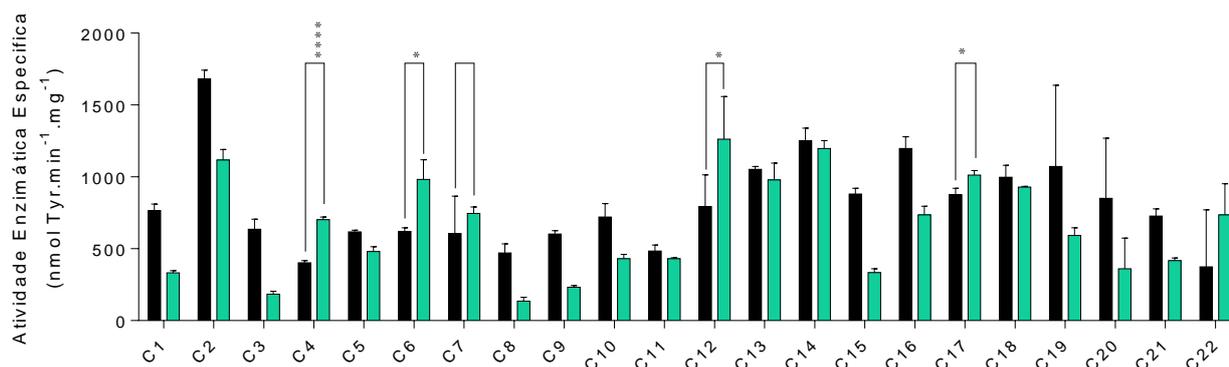


Figura IV.9. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt nas condições “Não Ativado” (■) e “Pré-Ativação pelo Composto” (■). Os dados são apresentados como média \pm SD. O significado estatístico é dado por * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ ($n=3$), para a ativação relativa entre as condições “Pré-Ativação pelo Composto” e “Não Ativado”. Os compostos foram testados numa concentração de 100 μ M.

Apenas cinco dos 22 compostos mostram capacidade de ativar a enzima na ausência de pré-ativação pelo substrato, nomeadamente os compostos **C4** (1,74 vezes), **C6** (1,58 vezes), **C7** (1,23 vezes), **C12** (1,59 vezes) e **C17** (1,15 vezes). Se tivermos em conta que a atividade da hPAHwt na ausência de composto e na condição de “Não-Ativado (Figura IV.7.; DMSO) é de 1504 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹, o composto **C12** permitiu atingir um valor de atividade enzimática de 1264 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹ (84%).

Na Figura IV.10. é apresentada uma análise comparativa entre as condições “Pré-Ativação pelo Composto” e “Pré-Ativação pelo Composto e Substrato”. Podemos assim observar que a hPAHwt quando pré-incubada pelo composto e substrato apresenta um aumento da atividade enzimática relativo à pré-incubação apenas com composto para os derivados 3-HQs **C6** (1,5 vezes), **C14** (1,7 vezes), **C16** (2,0 vezes) e **C17** (1,5 vezes). Estes resultados indicam que na presença destes compostos a hPAHwt consegue ainda responder à pré-ativação pelo seu substrato natural.

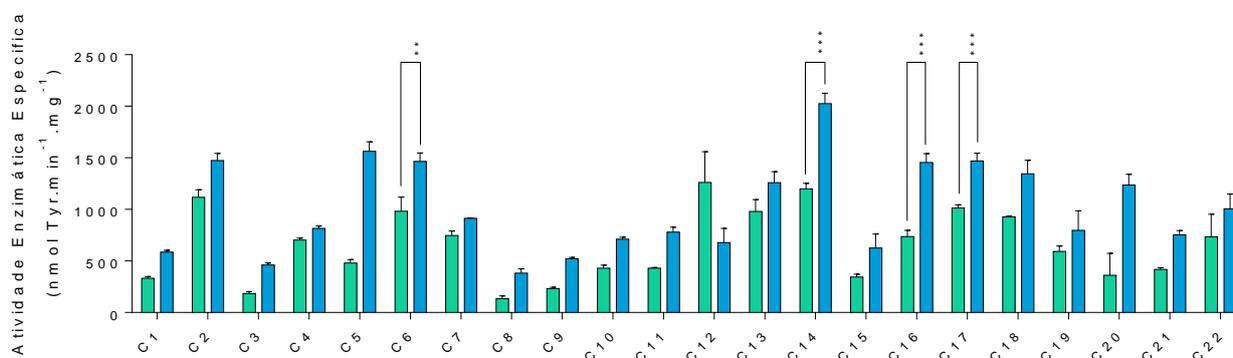


Figura IV.10. Efeito dos derivados 3-HQs na atividade biológica da hPAHwt nas condições “Pré-Ativação pelo Composto” (■) e “Pré-Ativação pelo Composto e Substrato” (■). Os dados são apresentados como média ± SD. O significado estatístico é dado por *P<0,1; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001 (n=3), para a ativação relativa entre a condição “Pré-Ativação pelo Composto” e a condição “Pré-Ativação pelo Composto e Substrato”. Os compostos foram testados numa concentração de 100 µM.

2.2.2. Perfil de estabilidade térmica

Como referido anteriormente, a enzima hPAHwt apresenta um mecanismo de *unfolding* com duas transições de desnaturação associadas ao *unfolding* do domínio regulador e do domínio catalítico. A Figura IV.11. exemplifica o perfil de desnaturação térmica obtido para a hPAHwt na presença de L-Phe (efeito estabilizador, assim como o de dois compostos com efeitos diferentes nomeadamente um derivado 3-HQ que destabiliza os dois domínios (C11) e um que estabiliza os dois domínios (C20).

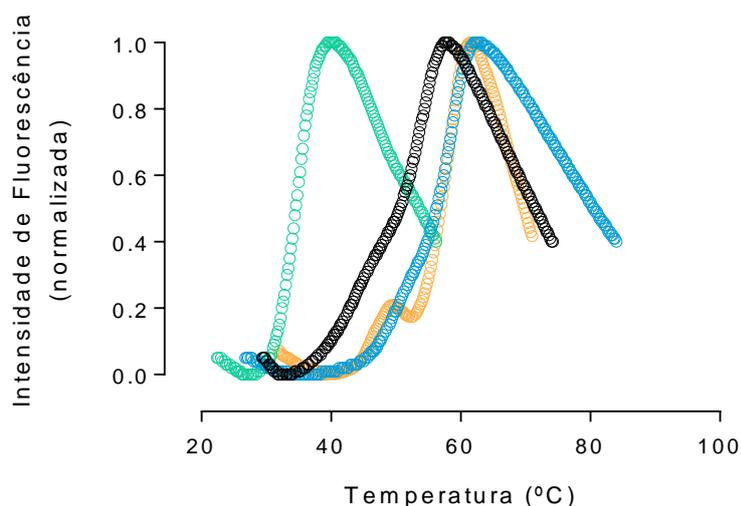


Figura IV.11. Perfil de estabilidade térmica da proteína recombinante hPAHwt obtido por fluorimetria diferencial de varrimento (DSF). Os perfis apresentados representam a hPAHwt na presença de DMSO 1% (○), na presença de L-Phe a 1 mM (○), na presença do composto C11 (○) e na presença do composto C20 (○).

Na Figura IV.12. são apresentados os valores hPAHwt de T_{m1} e T_{m2} obtidos na presença dos derivados 3-HQs estudados. Os dados obtidos indicam que o composto **C2** liga-se ao domínio regulador o que leva a um aumento de 8,3°C do T_{m1} . Da mesma forma, o composto **C6** e o **C13** aumentam o T_{m1} em 4,0°C e 8,5°C, respetivamente. O composto **C20** é um bom estabilizador da hPAHwt, tendo em conta a sua capacidade de aumentar o T_{m1} em 2,6°C e o T_{m2} em 4,2°C. Para o composto **C21** observou-se uma destabilização do domínio regulador com uma diminuição de 3,9°C do T_{m1} , mas este mostrou um efeito estabilizador do domínio catalítico com um aumento de 2,4°C do T_{m2} .

Os compostos **C10**, **C11**, **C19** e **C22** são fortes destabilizadores da hPAH. Todos estes compostos diminuem os valores dos T_{ms} do domínio regulador (T_{m1}) e catalítico (T_{m2}) da enzima, nomeadamente: **C10**, T_{m1} -3,4°C e T_{m2} -9,6°C; **C11**, T_{m1} -10,4°C e T_{m2} -18,0°C; **C19**, T_{m1} -5,6°C e T_{m2} -10,8°C; **C22**, T_{m1} -7,8°C e T_{m2} -10,5°C.

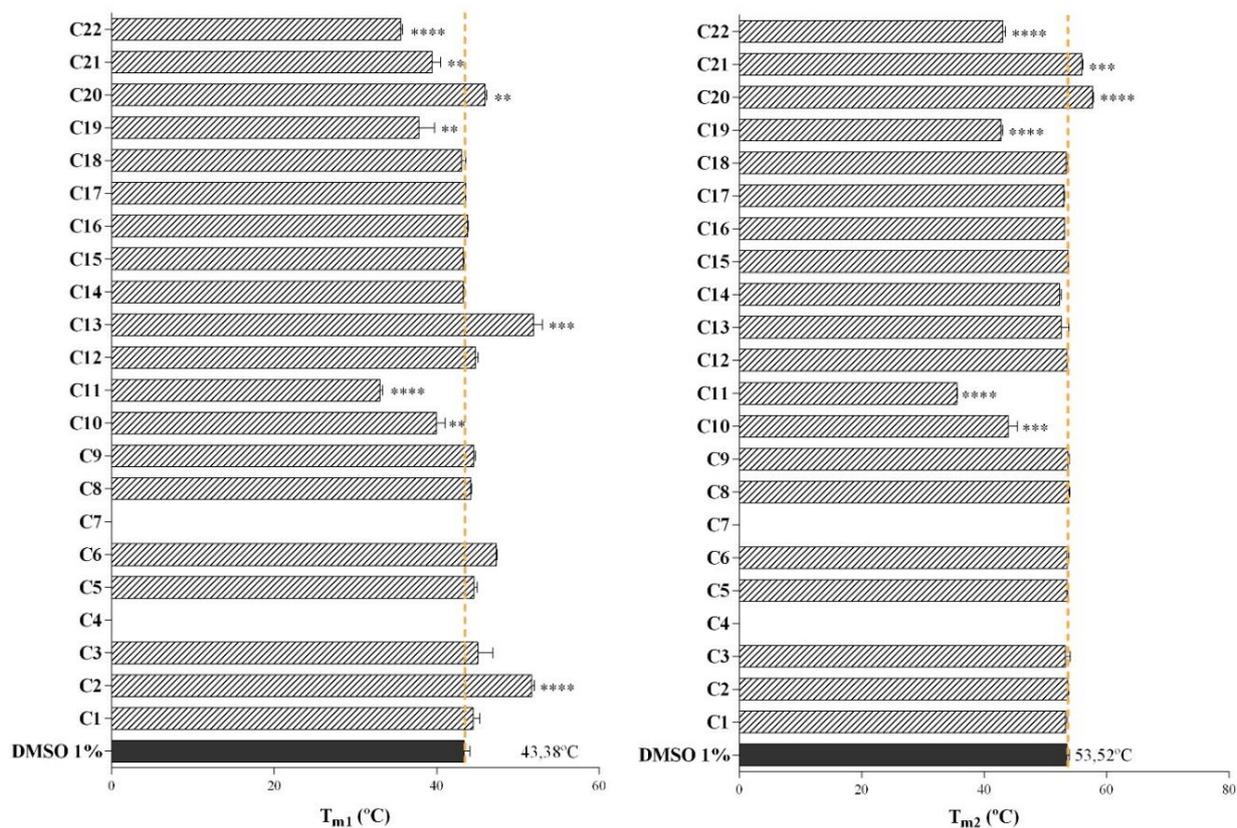


Figura IV.12. Valores das temperaturas de desnaturação térmica do domínio regulador (T_{m1}) e domínio catalítico (T_{m2}) da hPAHwt na presença dos compostos em estudo. Os dados são apresentados como média \pm SD. O significado estatístico é dado por * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ ($n=3$). Os compostos foram testados numa concentração de 100 μM . O ensaio realizado na presença de 1% de DMSO foi considerado o ensaio controlo (T_{m1} 43,4°C e T_{m2} 53,5°C).

2.2.3. Proteólise limitada

Como referido anteriormente a determinação do perfil de proteólise limitada permite conhecer as características conformacionais das proteínas. Das curvas obtidas é possível obter dois parâmetros importantes nomeadamente a constante de proteólise (k) e o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$). A Figura IV.13 exemplifica o perfil de proteólise obtido para três dos 22 compostos em estudo, nomeadamente o C6 (mais resistente), C9 (semelhante ao controlo) e C21 (menos resistente).

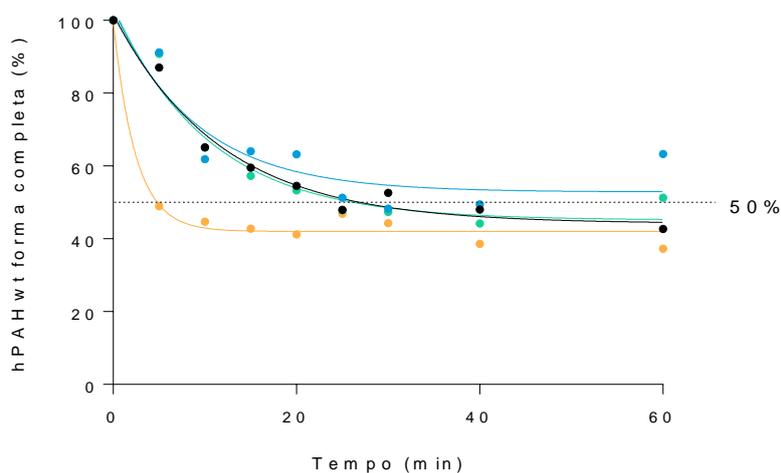


Figura IV.13. Perfil de proteólise limitada da hPAHwt pela tripsina, na presença de DMSO 1% (●), C6 (●), C9 (●) e C21 (●). Os compostos foram testados numa concentração de 100 μ M.

Pela análise da Figura IV.14., onde são apresentados os valores de tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) obtidos, é possível concluir que os compostos C6, C12, C14, C15, C16, C17, C18 e C20 aumentam o tempo de semi-vida da hPAHwt. Os compostos C10, C11, C19, C21 e C22 diminuem o tempo de semi-vida da enzima. Enquanto os compostos C2, C4, C8 e C9 não levam a grandes alterações no tempo de semi-vida da hPAHwt.

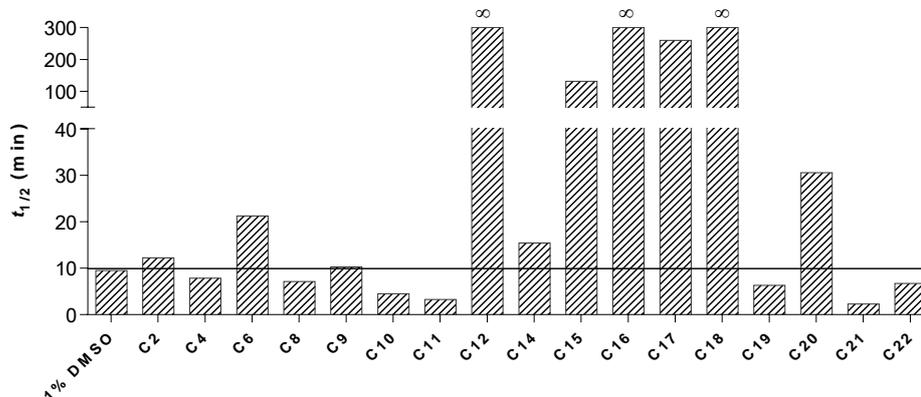


Figura IV.14. Valores de tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) obtidos por proteólise limitada pela tripsina na ausência e presença dos derivados 3-HQs em estudo (100 μ M). O ensaio realizado na presença de 1% de DMSO foi considerado o ensaio controle ($t_{1/2}$ 9,49 min).

No entanto, o aumento da resistência à proteólise só tem significado se o efeito observado não for resultado da inibição da tripsina pelos compostos em estudo. Assim, para validar os resultados apresentados na Figura IV.14. ou seja, para confirmar que a alteração da suscetibilidade da hPAHwt à proteólise pela tripsina na presença dos compostos, era devido ao efeito estabilizador e/ou protetor da enzima pelo composto e não pela sua ação de inibição da protease, avaliou-se a capacidade destes compostos de inibir a tripsina.

A Figura IV.15. exemplifica o aumento da intensidade de fluorescência (λ_{ext} 360 nm; λ_{em} 460 nm) ao longo de tempo obtido na ausência de compostos (DMSO 1%; controle) e na presença de compostos que apresentam vários graus de inibição da tripsina, nomeadamente o **C6** (moderadamente inibidor), **C9** (não inibidor), **C10** (fortemente inibidor) e **C18** (moderadamente inibidor). A tripsina ao hidrolisar a ligação peptídica que envolve a Arg (a C-terminal) do substrato utilizado na reação enzimática (N-CBZ-Gly-Gly-Arg-AMC) irá libertar 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) que é detetado aos λ referidos.

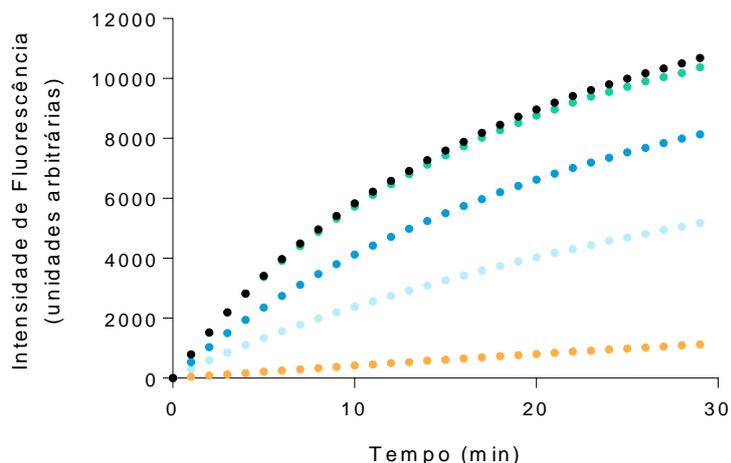


Figura IV.15. Atividade da tripsina monitorizada pelo aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo por libertação de 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) após hidrólise do substrato N-CBZ-Gly-Gly-Arg-AMC. DMSO 1% (●), composto C6 (●), composto C9 (●), composto C10 (●) e composto C18 (●).

A Figura IV.16. mostra a atividade relativa da tripsina na presença dos compostos, onde se considera como 100% o valor obtido no controlo positivo (1% DMSO e ausência de composto). Os compostos **C10**, **C11** e **C19** são os que mais inibem a tripsina, uma vez que esta apresenta uma atividade inferior a 25% do controlo. Na presença dos compostos **C4**, **C7**, **C8**, **C12**, **C13**, **C14**, **C15**, **C18** e **C21** a tripsina apresenta uma atividade de 26-50% do controlo, enquanto na presença de **C2**, **C6**, **C17**, **C20** e **C22** esta retém 50-75% de atividade na presença de DMSO a 1%. Os compostos **C9** e **C16** não afetam a atividade da tripsina (100% de atividade residual).

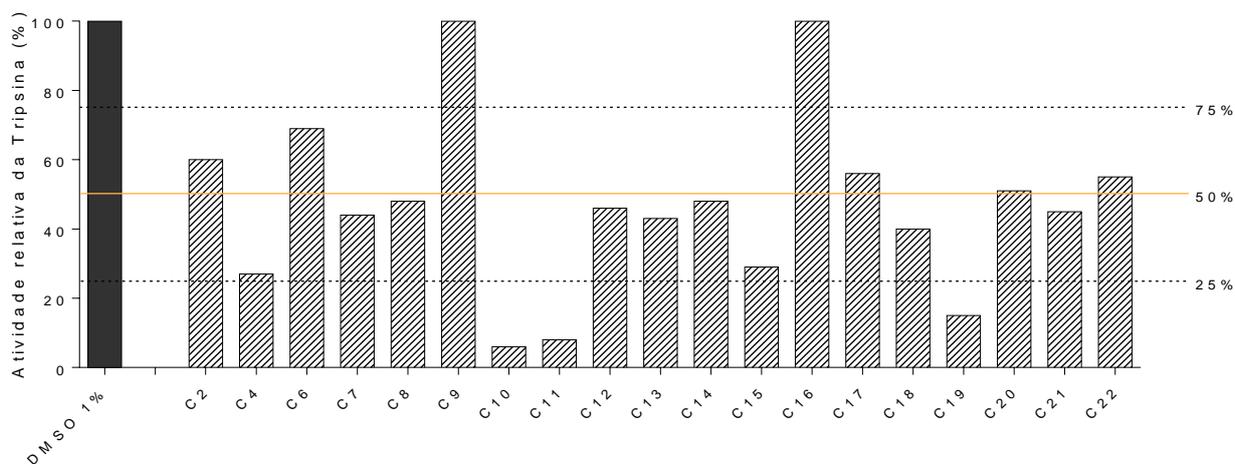


Figura IV.16. Atividade relativa da tripsina na presença dos derivados 3-HQs a 100 µM. A atividade na ausência de compostos (DMSO 1%) foi considerada como sendo 100%.

Assim, no seu conjunto os resultados obtidos indicam que os compostos **C10**, **C11**, **C19**, **C21** e **C22** aumentam a flexibilidade conformacional da hPAHwt e/ou conferem uma conformação mais aberta, um efeito semelhante ao obtido na presença de L-Phe. Dos compostos que aumentam o $t_{1/2}$ (maior resistência à proteólise) apenas o composto **C16** poderá induzir uma diminuição da flexibilidade conformacional e/ou induzir uma conformação mais fechada. Os compostos **C2**, **C4**, **C8** e **C9** não alteram a estrutura terciária da proteína ou a sua flexibilidade. Para os compostos **C6**, **C12**, **C14**, **C15**, **C17** e **C18** e **C20** não é possível retirar informação com o ensaio efetuado, uma vez que inibem a atividade da tripsina.

2.2.4. Ensaios de citotoxicidade

No desenvolvimento de novas moléculas com fins terapêuticos a avaliação da sua biocompatibilidade é um aspeto fundamental. Embora a determinação precisa da toxicidade de um composto só possa ser determinada *in vivo*, existe uma variedade de ensaios toxicológicos que podem (e devem) ser realizados em linhas celulares adequadas e que permitem obter informações muito úteis e que são amplamente aceites como primeiros indicadores. Assim, a avaliação da biocompatibilidade dos compostos em estudo, foi realizada por meio de dois ensaios diferentes, isto é, a atividade metabólica (*Alamar Blue*) e a integridade da membrana celular através do teste de iodeto de propídio.

O ensaio com o *Alamar Blue* fornece uma avaliação da atividade metabólica celular após a exposição aos compostos. Este ensaio avalia a capacidade das células em reduzir a forma oxidada do Alamar Blue (resazurina) em sais de resofurina, uma ação que é dependente do metabolismo mitocondrial. Portanto, a produção de resofurina reflete o estado funcional da cadeia respiratória. Uma redução da atividade metabólica celular geralmente é fortemente indicativa da presença de danos celulares.

Como mostra a Figura IV.17., apenas os compostos **C4**, **C12** e **C22** a 100 μ M mostraram alguma toxicidade, uma vez que na presença destes derivados 3-HQ a viabilidade celular situou-se abaixo dos 50%. O composto **C14** a 50 μ M mostrou uma viabilidade celular acima dos 85%, assim como o composto **C6** para ambas as concentrações testadas.

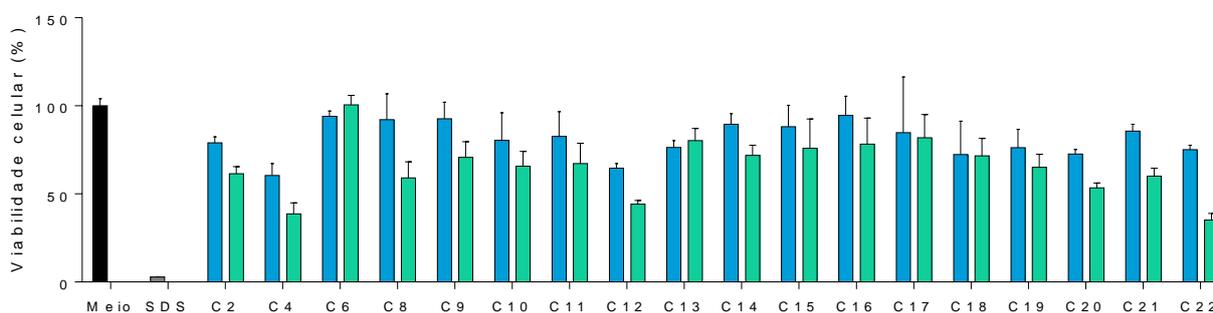


Figura IV.17. Percentagem de redução de Alamar Blue na presença dos derivados 3-HQs nas concentrações de 50 μ M (■) e 100 μ M (■) para monitorização da citotoxicidade. O valor obtido na presença de meio de cultura (controlo negativo) foi considerado 100%. O SDS foi utilizado como controlo positivo (efeito citotóxico).

O ensaio com o iodeto de propídio (PI) fornece uma avaliação da integridade da membrana celular após a exposição aos compostos. Este ensaio avalia a ligação do PI ao DNA celular, que só se verifica caso haja comprometimento da membrana celular, uma vez que este não tem capacidade de atravessar membranas citoplasmáticas saudáveis. Assim, os valores de retenção de iodeto de propídio no controlo positivo são elevados, uma vez que estas células não eram viáveis, com uma absorção favorável da membrana celular danificada (SDS 1 mg/mL). Por outro lado, no controlo negativo, as células só foram incubadas com meio fresco sendo viáveis, com membranas celulares intactas e consequentemente apresentam valores baixos de absorção de iodeto de propídio.

A Figura IV.18. mostra que as membranas celulares que estão em contacto com praticamente todos os compostos também estão intactas, uma vez que os valores do ensaio com iodeto de propídio são aproximadamente iguais ao controlo negativo, concluindo que não há ruptura das membranas celulares. Apenas os compostos **C8**, **C10** e **C11** em ambas as concentrações testadas e o composto **C20** a 50 μM mostram uma absorção de iodeto de propídio acima controlo negativo (células incubadas apenas em meio de cultura).

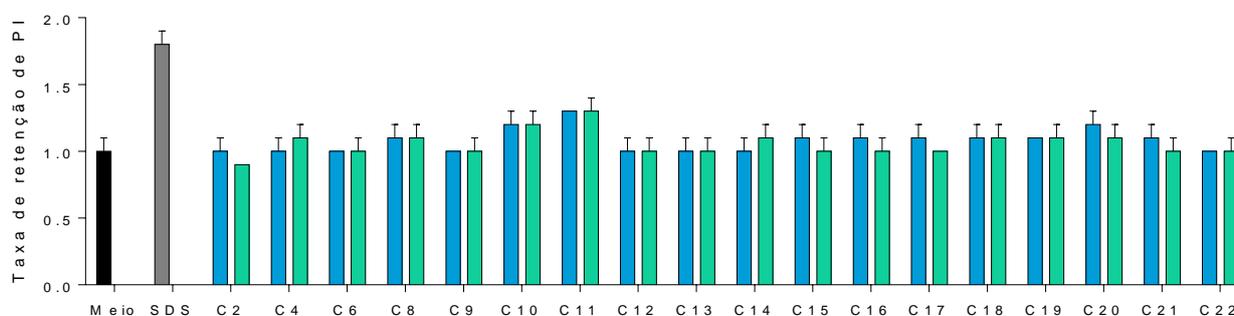


Figura IV.18. Taxa de retenção de iodeto de propídio (PI) na presença dos derivados 3-HQs nas concentrações de 50 μM (■) e 100 μM (■) para monitorização da citotoxicidade. O valor obtido na presença de meio de cultura (controlo negativo) foi considerado 1. O SDS foi utilizado como controlo positivo (efeito citotóxico).

2.2.5. Ensaios de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi utilizada para identificar os compostos que se poderão ligar diretamente ao centro férrico da hPAHwt. No seu estado nativo, a PAH humana apresenta um espectro de EPR com um sinal característico centrado a $g = 4,3$ atribuído ao centro mononuclear férrico de *high-spin* (Figura IV.19.). Este sinal pode assim ser utilizado para identificar ligandos adicionais ou moléculas que interajam com o ferro que causem alterações no espectro.

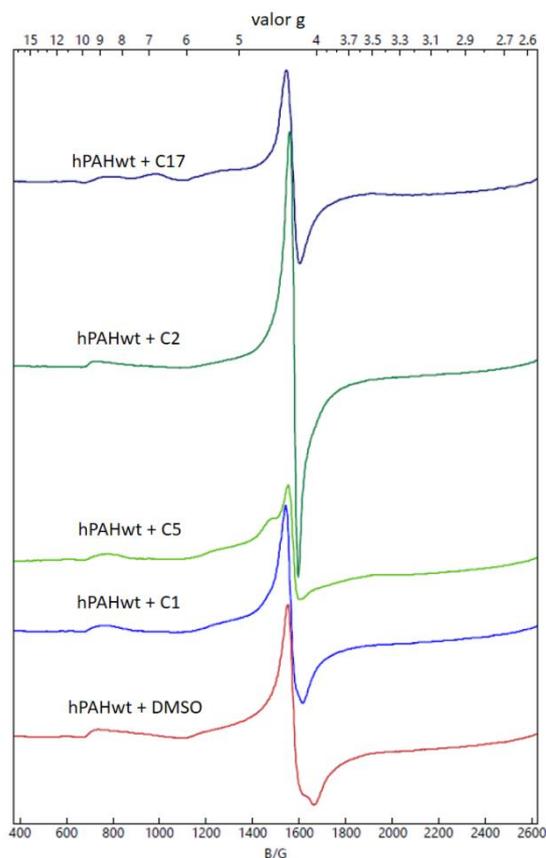


Figura IV.19. Espectro de EPR da hPAHwt, na presença dos derivados 3-HQs C1, C2, C5 e C17 (100 μ M). O DMSO a 1% foi utilizado controlo.

Dos compostos testados, observaram-se diferentes alterações no espectro da PAH humana (Figura IV.19.), nomeadamente: o composto **C17** originou uma banda adicional de baixa intensidade a $g \sim 7$; o composto **C2** resultou num aumento significativo da intensidade do sinal a $g = 4,3$; o composto **C5** resultou numa diminuição da intensidade do mesmo sinal; e o composto **C1** resultou num estreitamento da banda centrada a $g = 4,3$. Apesar de subtis, estas perturbações do espectro de EPR da hPAHwt indicam a possibilidade de uma interacção direta entre os compostos e o centro mononuclear de ferro. Estão em curso experiências adicionais com outros compostos e os controlos apropriados com soluções de cloreto de Ferro(III) incubadas com os mesmos.

3. Otimização de um método para determinação da atividade da hPAHwt por fluorescência

O método utilizado no laboratório, para a quantificação do produto formado na reação enzimática, baseia-se num método por HPLC com detecção fluorimétrica para a separação e identificação da L-Tyr formada na reação enzimática. Este método é reprodutível e apresenta a sensibilidade adequada. No entanto, é um método moroso pouco adequado à fase de rastreio de um elevado número de compostos. Assim, neste trabalho procedeu-se ainda à adaptação e otimização de um método fluorimétrico, descrito por Gersting e colaboradores ⁽¹¹⁷⁾, para determinação da atividade da hPAHwt por monitorização da intensidade de fluorescência natural da L-Tyr (λ_{exc} 274 nm; λ_{em} 304 nm) no leitor de placas de 96 poços FLUOstar OMEGA, equipado com um sistema de injeção e filtros de 260 nm (λ_{exc}) e 310 nm (λ_{em}).

Para a quantificação da produção de L-Tyr, foi efetuada uma curva de calibração constituída por L-Tyr (0 – 100 μ M) e L-Phe (1mM) em NaHepes 100 mM, pH 7,0, catalase a 1 mg/mL e sulfato amónio ferroso (10 μ M). Os ensaios foram efetuados em triplicado. Na Figura IV.20. é apresentada a curva de calibração obtida.

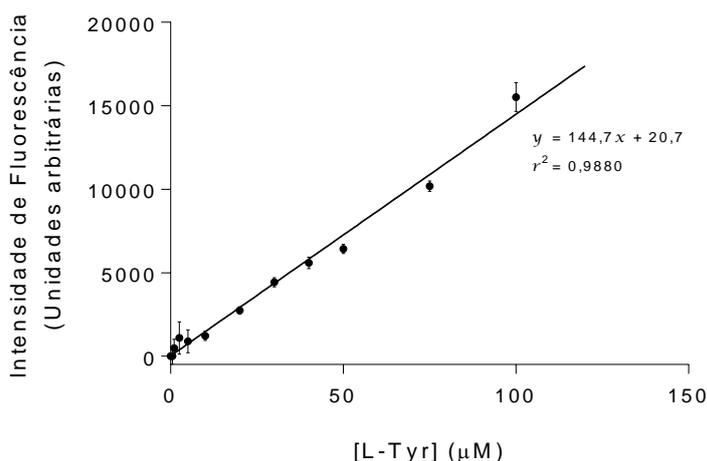


Figura IV.20. Curva de calibração da L-Tyr, obtida por leitura da sua intensidade de fluorescência natural no leitor de placas de 96 poços FLUOstar OMEGA, equipado com um sistema de injeção e filtros de 260 nm (λ_{exc}) e 310 nm (λ_{em}). Ver texto para detalhes.

Como pode ser observado pela análise da Figura IV.20., na gama de concentrações de L-Tyr testada (0,5 a 100 μ M) o coeficiente de correlação obtido, pela análise de regressão linear, foi de 0,9880. Os desvios padrões mais elevados foram obtidos para as concentrações mais baixas de L-Tyr, (0,5; 1; 2,5 e 5 μ M) e para a concentração mais elevada (100 μ M).

Para as medições de atividade enzimática, os ensaios foram realizados sem pré-incubação da hPAHwt (0,025 mg/mL) com o substrato e após pré-ativação com 1 mM de L-Phe. Foi utilizado sulfato de amónio ferroso 10 μ M e a reação foi iniciada pela adição de BH₄ a 75 μ M, estabilizado em DTT 5 mM. Para as medições de atividade enzimática sem pré-incubação com a L-Phe, a reação foi

iniciada por injeção simultânea de L-Phe a 1 mM e BH₄ a 75 μM. Utilizando a curva de calibração apresentada na Figura IV.20, a quantidade de L-Tyr formada ao longo do tempo por mg de hPAHwt utilizada encontra-se representada na Figura IV.21, para as condições de proteína não ativada e proteína pré-ativada.

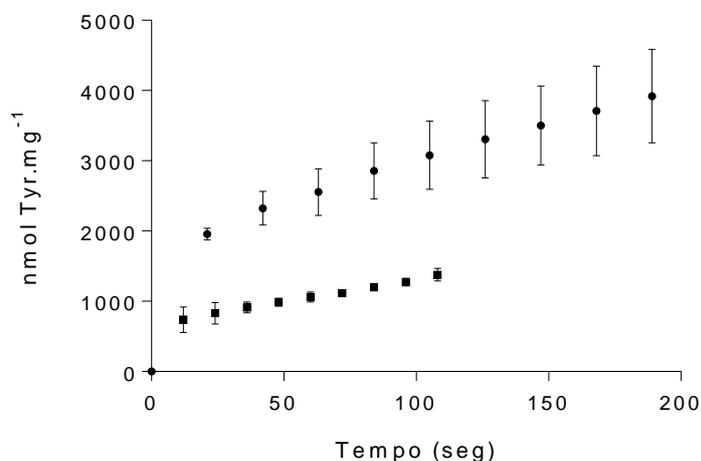


Figura IV.21. Medição em contínuo da atividade da hPAHwt sem (■) e com (●) pré-ativação pelo substrato L-Phe (1 mM) através da monitorização do aumento na intensidade de fluorescência do meio reacional pela produção de L-Tyr.

Tendo em conta os resultados apresentados é possível observar que nos primeiros segundos há um *burst* na produção de L-Tyr. Se tivermos em conta o valor da primeira leitura a atividade enzimática específica determinada para as condições de “sem pré-ativação” e “com pré-ativação” é de 3685 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹ e 5591 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹, respetivamente. O valor obtido para o ensaio com pré-ativação pelo substrato é ligeiramente superior ao que é calculado quando a L-Tyr formada é quantificada por HPLC (4430 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹; Tabela IV.1.). Este resultado pode dever-se à capacidade que este método apresenta para detetar a L-Tyr formada nos instantes iniciais da reação, ao contrário do método de *end-point* do HPLC (1 min de reação).

V. Conclusões e Perspetivas Futuras

Os grupos de Metabolismos e Genética e Química Bio-orgânica do iMed.Ulisboa da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, têm estado envolvidos no desenho e síntese de pequenas moléculas ativadoras e/ou estabilizadoras da hPAHwt que possam vir a ser utilizadas no tratamento da PKU como ativadores enzimáticos e/ou *chaperones* farmacológicos. Na realidade tendo como base os iminoboratos foi já possível obter moléculas com capacidade de ativação daquela enzima. ⁽¹¹⁶⁾

O trabalho desenvolvido nesta Tese teve como objetivo aplicar a metodologia desenvolvida a uma nova classe de moléculas sintetizadas pelo grupo de Química Bio-orgânica. Os compostos foram desenhados para interagir especificamente com a hPAHwt, usando como bloco de construção a 3-hidroquinolin-2(1H)-ona. O núcleo 3-HQ foi selecionado pela sua capacidade de coordenador o ferro proteico e porque a sua estrutura é um bioisómero de aminoácidos.

Dos 22 compostos, identificamos com sucesso dois conjuntos de derivados 3-HQs que parecem atuar segundo mecanismos diferentes. Um primeiro grupo de compostos apresentou como característica comum a capacidade de estabilizar o domínio regulador da hPAHwt (**C2** / **C6** / **C13** / **C20**; aumento do T_{m1} de 8,30°C / 3,96°C / 7,76°C / 2,60°C, respetivamente) ou o domínio catalítico (**C20** / **C21**; aumento do T_{m2} de 4,21°C / 2,20°C, respetivamente), e que por isso poderão vir a ser classificados como “chaperones farmacológicos”. Um segundo grupo de compostos que, pela sua capacidade de pré-ativar a hPAHwt (**C4** / **C6** / **C12**; 1,7 / 1,6 / 1,6 vezes, respetivamente) ou por permitir a ativação pela L-Phe (**C5** / **C6** / **C14** / **C16**, aumento de 3,2 / 1,5 / 1,7 / 2,0 vezes, respetivamente) poderão vir a ser classificados como “chaperones de atividade”. De entre os derivados sintetizados é de realçar o **C6**, uma vez que foi identificado nos dois grupos acima mencionados.

Os ensaios efetuados indicam que o efeito estabilizador e/ou ativador não parece estar associado à presença do grupo -Ph no núcleo 3-HQ. No entanto, a estrutura presente na posição 4 de **C21** e **C22** (com ausência de grupo na posição 1) parece de algum modo estar associada ao efeito estabilizador do domínio catalítico da hPAHwt. Se tivermos em conta os ensaios de citotoxicidade efetuados os resultados obtidos indicam que os compostos **C2**, **C5**, **C6**, **C13**, **C14**, **C16**, **C20** e **C21** apresentam estruturas *hit* que poderão ser posteriormente refinadas para melhorar as suas características. Estudos de *docking* molecular dos compostos *hit* irão permitir racionalizar o efeito bioquímico/biofísico observado e refinar/redesenhar a estrutura das moléculas. Adicionalmente, estas moléculas foram já enviadas para o Grupo do Professor Wyatt Yue (*Protein Science and Structural Biology Group*, Universidade Oxford) o qual irá proceder a ensaios de cristalização da hPAHwt na presença daqueles compostos, o que também nos irá permitir definir o local de ligação e o mecanismo de ação.

Neste trabalho foram dados também os primeiros passos para a utilização de um método fluorimétrico para a determinação da atividade da hPAH em placas de 96 poços. Embora, seja ainda necessário efetuar mais ensaios para padronizar o método, os resultados obtidos até à data permitem antever a sua aplicação a ensaios de rastreio de biblioteca de moléculas a serem futuramente sintetizadas.

É de realçar que uma vez identificados os compostos *lead*, estes deverão ser avaliados em formas de hPAH mutantes clinicamente relevantes. Após avaliação da citotoxicidade as moléculas selecionadas serão estudadas em células eucariotas transfetadas. O projeto contribuirá para o desenho de uma nova geração de Medicamentos Órfãos para tratamento da PKU. Uma vez que a hPAHwt partilha várias características estruturais e funcionais com os outros membros das AAAHs, nomeadamente a TYH e TH, esta aproximação apresenta um elevado potencial de aplicação ao tratamento de doenças neurológicas comuns.

VI. Bibliografia

1. Flydal, M. I. & Martinez, A. Phenylalanine hydroxylase: Function, structure, and regulation. *IUBMB Life* **65**, 341–349 (2013).
2. Leandro, J., Leandro, P. & Flatmark, T. Heterotetrameric forms of human phenylalanine hydroxylase: Co-expression of wild-type and mutant forms in a bicistronic system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1812**, 602–612 (2011).
3. Flatmark, T. & Stevens, R. C. Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chem. Rev* **99**, 2137–2160 (1999).
4. Shiman, R., Mortimore, G., Schworer, C. & Gray, D. Regulation of phenylalanine hydroxylase activity by phenylalanine in vivo, in vitro, and in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **257**, 11213–6 (1982).
5. Mitchell, J. J., Trakadis, Y. J. & Scriver, C. R. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet. Med.* **13**, 697–707 (2011).
6. Al Hafid, N. & Christodoulou, J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Transl. Pediatr.* **4**, 304–17 (2015).
7. Williams, R. A., Mamotte, C. D. S. & Burnett, J. R. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin. Biochem. Rev.* **29**, 31–41 (2008).
8. Kaufman, S. A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3160–4 (1999).
9. Matthews. Modern nutrition in health and disease. *Lippincott, W. W.* 23–60 (2006).
10. Lidsky, a S. *et al.* Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6221–5 (1985).
11. Erlandsen, H. & Stevens, R. C. The structural basis of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **68**, 103–25 (1999).
12. Hufton, S. E., Jennings, I. G. & Cotton, R. G. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem. J.* **311**, 353–366 (1995).
13. Yudkoff, M. in *Basis Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* (1999).
14. Andersen, O. a, Flatmark, T. & Hough, E. High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase in its catalytically active Fe(II) form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *J. Mol. Biol.* **314**, 279–291 (2001).
15. Erlandsen, H., Bjørge, E., Flatmark, T. & Stevens, R. C. Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* **39**, 2208–2217 (2000).
16. Martinez, a *et al.* Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation

- and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem. J.* **306** (Pt 2, 589–597 (1995).
17. Bjürgo, E. & Negra, R. M. A comparison of kinetic and regulatory properties of the tetrameric and dimeric forms of wild-type and Thr4273Pro mutant human phenylalanine hydroxylase. **1005**, 997–1005 (2001).
 18. Carluccio, C., Fraternali, F., Salvatore, F., Fornili, A. & Zagari, A. Structural features of the regulatory ACT domain of phenylalanine hydroxylase. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
 19. Farm, F. D. E. New Insights Into the Structure and Function of Human Phenylalanine Hydroxylase : (2011).
 20. Liberles, J. S., Thóroúlfsson, M. & Martínez, A. Allosteric mechanisms in ACT domain containing enzymes involved in amino acid metabolism. *Amino Acids* **28**, 1–12 (2005).
 21. Thóroúlfsson, M. *et al.* L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: A differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* **41**, 7573–7585 (2002).
 22. Erlandsen, H. *et al.* Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 995–1000 (1997).
 23. Teigen, K. *et al.* Tetrahydrobiopterin binding to aromatic amino acid hydroxylases. Ligand recognition and specificity. *J. Med. Chem.* **47**, 5962–5971 (2004).
 24. Andreas Andersen, O., Flatmark, T. & Hough, E. Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-l-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J. Mol. Biol.* **320**, 1095–1108 (2002).
 25. Andersen, O. A., Stokka, A. J., Flatmark, T. & Hough, E. 2.0 Å resolution crystal structures of the ternary complexes of human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine or L-norleucine: Substrate specificity and molecular motions related to substrate binding. *J. Mol. Biol.* **333**, 747–757 (2003).
 26. Flatmark, T., Stokka, a J. & Berge, S. V. Use of surface plasmon resonance for real-time measurements of the global conformational transition in human phenylalanine hydroxylase in response to substrate binding and catalytic activation. *Anal. Biochem.* **294**, 95–101 (2001).
 27. Fusetti, F., Erlandsen, H., Flatmark, T. & Stevens, R. C. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* **273**, 16962–16967 (1998).
 28. Richardson, S. C., Aspbury, R. A. & Fisher, M. J. The role of reversible phosphorylation in the hormonal control of phenylalanine hydroxylase in isolated rat proximal kidney tubules. *Biochem. J.* **292** (Pt 2, 419–24 (1993).
 29. Cleary, M. A. Phenylketonuria. *Paediatr. Child Health (Oxford)*. **21**, 61–64 (2011).
 30. Gersting, S. W. *et al.* Loss of Function in Phenylketonuria Is Caused by Impaired Molecular Motions and Conformational Instability. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 5–17 (2008).
 31. van Spronsen, F. J. Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nat. Rev. Endocrinol.* **6**, 509–514 (2010).

32. Blau, N., Van Spronsen, F. J. & Levy, H. L. Phenylketonuria. *Lancet* **376**, 1417–1427 (2010).
33. Targum, S. D. & Lang, W. Neurobehavioral problems associated with phenylketonuria. *Psychiatry (Edgmont)*. **7**, 29–32 (2010).
34. Vilarinho, L., Queirós, A., Leandro, P., Almeida, I. T. De & Rivera, I. Fenilcetonúria Revisitada. *Arq. Med.* *20(5-6)*161-72 161–172 (2006).
35. Kayaalp, E. *et al.* Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 1309–17 (1997).
36. Ramus, S. J., Forrest, S. M., Pitt, D. B., Saleeba, J. a & Cotton, R. G. Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J. Med. Genet.* **30**, 401–5 (1993).
37. Guldberg, P. *et al.* A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 71–79 (1998).
38. Dyer, C. A. Pathophysiology of phenylketonuria. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **5**, 104–112 (1999).
39. Joseph, B. & Dyer, C. A. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J. Neurochem.* **86**, 615–626 (2003).
40. Pietz, J. *et al.* Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J. Clin. Invest.* **103**, 1169–1178 (1999).
41. Diamond, A., Ciaramitaro, V., Donner, E., Djali, S. & Robinson, M. B. An animal model of nociception. *Pharmacol Rev* **14(5)**, 3072–3082 (1994).
42. Puglisi-Allegra, S. *et al.* Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* **11**, 1361–1364 (2000).
43. Pascucci, T., Ventura, R., Puglisi-Allegra, S. & Cabib, S. Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* **13**, 2561–2564 (2002).
44. Feillet, F. *et al.* Challenges and Pitfalls in the Management of Phenylketonuria. *Pediatrics* **126**, 333–341 (2010).
45. Martynyuk, A. E. *et al.* Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain. *Mol. Genet. Metab.* **86**, 34–42 (2005).
46. Shefer, S. *et al.* Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J. Neurosci. Res.* **61**, 549–563 (2000).
47. Hörster, F. *et al.* Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr. Res.* **59**, 544–548 (2006).
48. Wasserstein, M. P., Snyderman, S. E., Sansaricq, C. & Buchsbaum, M. S. Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **87**, 272–277 (2006).
49. Ghozlan, A., Varoquaux, O. & Abadie, V. Is monoamine oxydase-B a modifying gene and phenylethylamine a harmful compound in phenylketonuria? *Mol. Genet. Metab.* **83**, 337–340

- (2004).
50. Sitta, A. *et al.* Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **679**, 13–16 (2009).
 51. Sitta, A. *et al.* Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab. Brain Dis.* **21**, 287–296 (2006).
 52. Blau, N., Hennermann, J. B., Langenbeck, U. & Lichter-Konecki, U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 2–9 (2011).
 53. Strisciuglio, P. & Concolino, D. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites* **4**, 1007–1017 (2014).
 54. Enns, G. M. *et al.* Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: Revisiting the evidence. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 99–109 (2010).
 55. Acosta, P. B. *et al.* Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J. Am. Diet. Assoc.* **103**, 1167–1173 (2003).
 56. Arnold, G. L., Vladutiu, C. J., Kirby, R. S., Blakely, E. M. & DeLuca, J. M. Protein insufficiency and linear growth restriction in phenylketonuria. *J. Pediatr.* **141**, 243–246 (2002).
 57. Dobbelaere, D. *et al.* Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**, 1–11 (2003).
 58. Simon, E. *et al.* Evaluation of quality of life and description of the sociodemographic state in adolescent and young adult patients with phenylketonuria (PKU). *Health Qual. Life Outcomes* **6**, 25 (2008).
 59. Bélanger-Quintana, A., Burlina, A., Harding, C. O. & Muntau, A. C. Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **104**, S19–S25 (2011).
 60. Michals, K. Developments in Phenylketonuria. *Top. Clin. Nutr.* **16**, 41–hyhen (2001).
 61. Ding, Z., Georgiev, P. & Thö Ny, B. Administration-route and gender-independent long- term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **13**, 587–593 (2006).
 62. Kure, S. *et al.* Etrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. 375–378
 63. Marcel, Z. Molecular Genetics of Tetrahydrobiopterin- Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *Hum. Mutat.* **29**, 167–175 (2008).
 64. Pey, A. L., Stricher, F., Serrano, L. & Martinez, A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 1006–24 (2007).
 65. Blau, N. Sapropterin dihydrochloride for the treatment of hyperphenylalaninemias. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **9**, 1207–18 (2013).
 66. Blau, N. *et al.* Optimizing the use of sapropterin (BH4) in the management of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **96**, 158–163 (2009).

67. Sarkissian, C. N. *et al.* Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20894–20899 (2008).
68. van Spronsen, F. J. & Enns, G. M. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **99 Suppl 1**, S90-5 (2010).
69. Matalon, R. *et al.* Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: Effect on blood phenylalanine. *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 153–158 (2007).
70. Schindeler, S. *et al.* The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: An MRS and neuropsychological study. *Mol. Genet. Metab.* **91**, 48–54 (2007).
71. Vajro, P. *et al.* Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **329(5)**, 363–363 (1993).
72. Sarkissian, C. N. *et al.* A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2339–2344 (1999).
73. Kim, W. *et al.* Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Mol. Ther.* **10**, 220–224 (2004).
74. Hoskins, J. A. *et al.* Preliminary Communication ENZYMATIC CONTROL OF PHENYLALANINE INTAKE IN PHENYLKETONURIA The plant enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL) will survive in the gut for long enough to deplete the phenylalanine derived must start soon after birth . Even whe. 392–394 (1978).
75. Cells, A. USING ORAL MICROENCAPSLIATED PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE: A PRELIMINARY REPORT. **23**, 681–692 (1995).
76. Fao. Probiotics in food. *Food Nutr. Pap.* **85**, 71 (2001).
77. Turpin, W., Humblot, C., Thomas, M. & Guyot, J. P. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* **143**, 87–102 (2010).
78. Liu, J. *et al.* Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **30**, 243–57 (2002).
79. Erickson, R. H., Gum Jr., J. R., Lindstrom, M. M., McKean, D. & Kim, Y. S. Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 249–257 (1995).
80. Harding, C. O. *et al.* Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther.* **13**, 457–462 (2006).
81. Rebuffat, A., Harding, C. O., Ding, Z. & Thöny, B. Comparison of adeno-associated virus pseudotype 1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria. *Hum. Gene Ther.* **21**, 463–77 (2010).
82. Ho, G., Reichardt, J. & Christodoulou, J. In vitro read-through of phenylalanine hydroxylase (PAH) nonsense mutations using aminoglycosides: A potential therapy for phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* **36**, 955–959 (2013).
83. Eavri, R. & Lorberboum-Galski, H. A novel approach for enzyme replacement therapy: The

- use of phenylalanine hydroxylase-based fusion proteins for the treatment of phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* **282**, 23402–23409 (2007).
84. Schwarze, S. R. & Dowdy, S. F. In vivo protein transduction:... *Tips* **21**, 45–48 (2000).
 85. Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 579–596 (2005).
 86. Leandro, P. & Gomes, C. M. Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini Rev. Med. Chem.* **8**, 901–911 (2008).
 87. Muntau, A. C. & Gersting, S. W. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **33**, 649–658 (2010).
 88. Muntau, A. C., Leandro, J., Staudigl, M., Mayer, F. & Gersting, S. W. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: Pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *J. Inherit. Metab. Dis.* **37**, 505–523 (2014).
 89. Bernier, V., Lagacé, M., Bichet, D. G. & Bouvier, M. Pharmacological chaperones: Potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**, 222–228 (2004).
 90. Pey, A. L., Desviat, L. R., Gámez, A., Ugarte, M. & Pérez, B. Phenylketonuria: Genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum. Mutat.* **21**, 370–378 (2003).
 91. Erlandsen, H. *et al.* Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16903–16908 (2004).
 92. Pey, A. L. *et al.* Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J. Clin. Invest.* **118**, 2858–2867 (2008).
 93. Santos-Sierra, S. K. J. P. A. M. *et al.* Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. 1–31 (2012).
 94. Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G. & Hartl, F. U. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 17–29 (2004).
 95. Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D. & Wolynes, P. G. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **21**, 167–195 (1995).
 96. Jahn, T. R. & Radford, S. E. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.* **272**, 5962–5970 (2005).
 97. Leopold, P. E., Montal, M. & Onuchic, J. N. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8721–8725 (1992).
 98. Underhaug, J., Aubi, O. & Martinez, A. Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 2534–45 (2012).
 99. Herczenik, E. & Gebbink, M. F. B. G. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *FASEB J.* **22**, 2115–2133 (2008).
 100. Gregersen N., Bross P., J. M. M. *Protein folding and misfolding: the role of cellular protein*

quality control systems in inherited disorders. (2005).

101. Bross, P. & Gregersen, N. Protein Misfolding and Disease: Principles and Protocols. *Methods Mol. Biol.* **232**, 318 (2003).
102. King, J., Haase-Pettingell, C. & Gossard, D. Protein folding and misfolding. *Am. Sci.* **90**, 445–453 (2002).
103. Gidalevitz, T., Kikis, E. A. & Morimoto, R. I. A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 23–32 (2010).
104. Carrell, R. W. & Gooptu, B. Conformational changes and disease - Serpins, prions and Alzheimer's. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 799–809 (1998).
105. Denny, R. A., Gavrin, L. K. & Saiah, E. Recent developments in targeting protein misfolding diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 1935–44 (2013).
106. Leandro, J., Saraste, J., Leandro, P. & Flatmark, T. The G46S-hPAH mutant protein: A model to study the rescue of aggregation-prone PKU mutations by chaperones. *Mol. Genet. Metab.* **104**, S40–S44 (2011).
107. Leandro, J., Simonsen, N., Saraste, J., Leandro, P. & Flatmark, T. Phenylketonuria as a protein misfolding disease: The mutation pG46S in phenylalanine hydroxylase promotes self-association and fibril formation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1812**, 106–120 (2011).
108. Leandro, P., Rivera, I., Lechner, M. C., de Almeida, I. T. & Konecki, D. The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase. *Mol. Genet. Metab.* **69**, 204–212 (2000).
109. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **254**, 248–254 (1976).
110. U. K. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat. Publ.* **227**, 680–681 (1970).
111. Kand'ár, R. & Záková, P. Determination of phenylalanine and tyrosine in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 3926–3929 (2009).
112. Abràmoff, MD; Magalhães, PJ; Ram, S. Image processing with ImageJ Part II. *Biophotonics Int.* **11**, 36–43 (2005).
113. Ferreira, I. S. *et al.* Activity of daptomycin- and vancomycin-loaded poly-epsilon-caprolactone microparticles against mature staphylococcal biofilms. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 4351–4366 (2015).
114. Gaspar, D. P. *et al.* Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies. *Int. J. Pharm.* **497**, 199–209 (2016).
115. Ribeiro, C. J. A. *et al.* Novel squaramides with in vitro liver stage antiplasmodial activity. *Bioorganic Med. Chem.* **24**, 1786–1792 (2016).
116. Montalbano, F. *et al.* Phenylalanine iminoboronates as new phenylalanine hydroxylase modulators. *RSC Adv.* **4**, 61022–61027 (2014).

117. Gersting, S. W. *et al.* Activation of phenylalanine hydroxylase induces positive cooperativity toward the natural cofactor. *J. Biol. Chem.* **285**, 30686–30697 (2010).

VII. Anexos

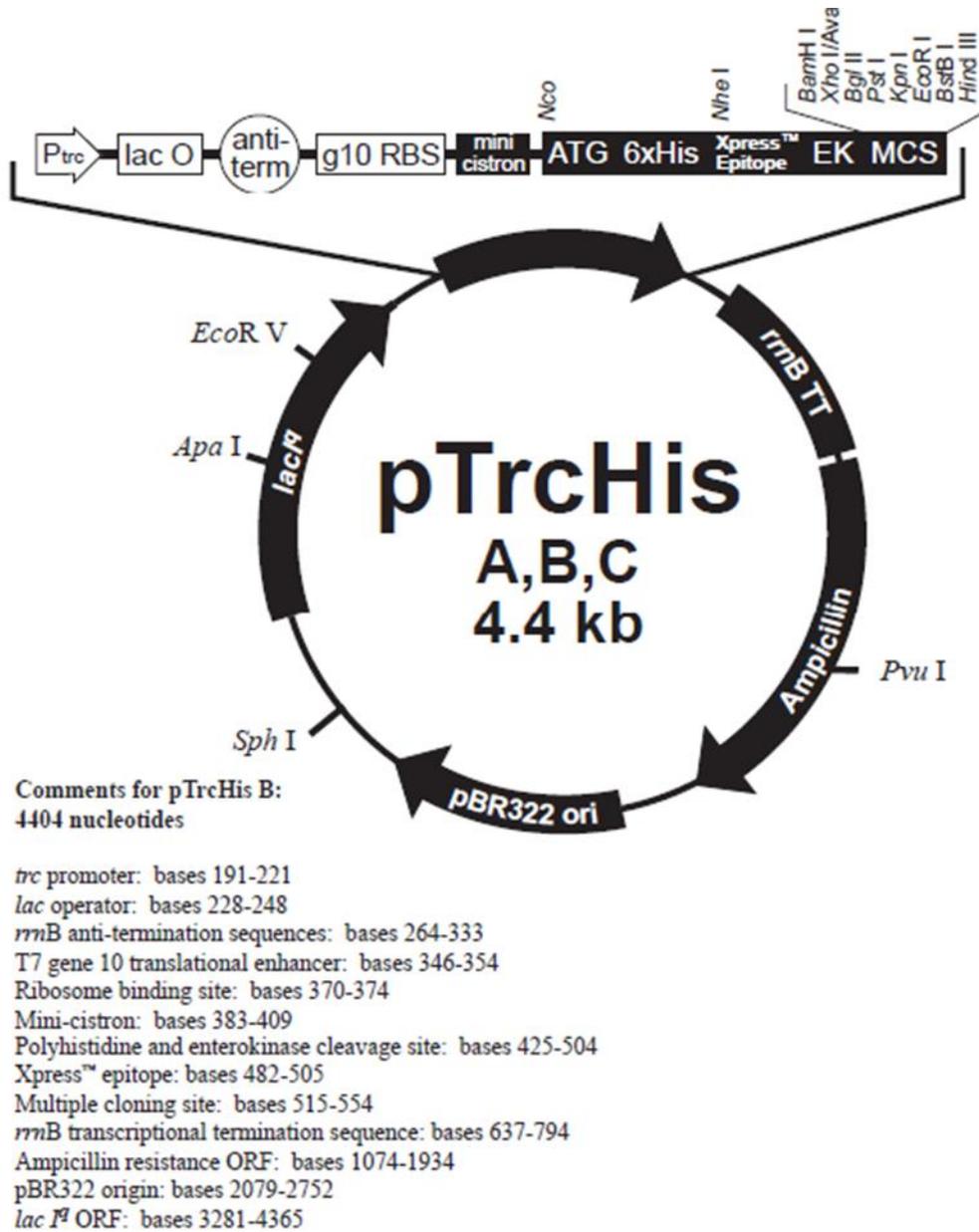


Figura VII.1. Vetor de expressão utilizado para a produção da hPAHwt.

Tabela VII.1. Curva de calibração utilizada na quantificação proteica pelo método de Bradford.

[BSA] ($\mu\text{g/mL}$)	Abs _{595nm}	Abs _{595nm} média
1	0,083	0,101
	0,100	
	0,100	
2	0,174	0,173
	0,162	
	0,183	
4	0,270	0,276
	0,280	
	0,277	
8	0,415	0,412
	0,404	
	0,418	
10	0,522	0,515
	0,524	
	0,498	

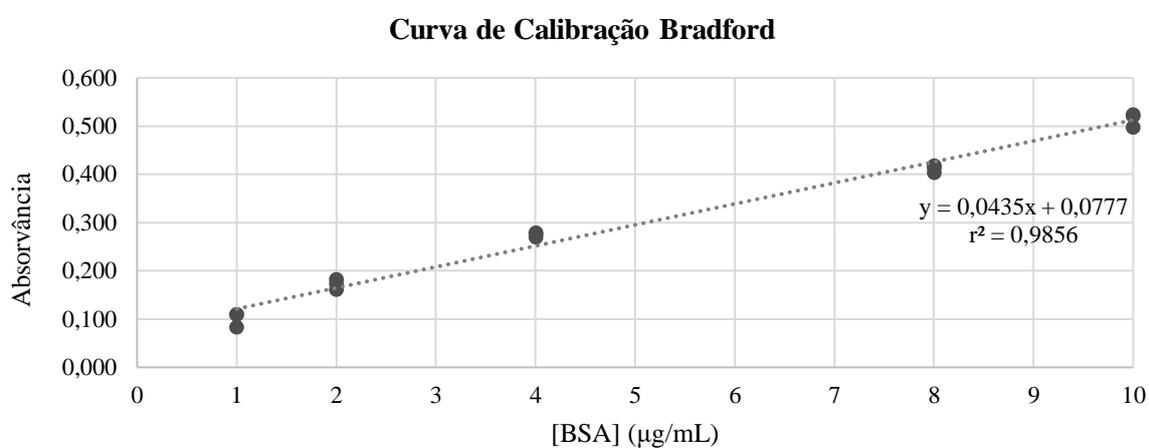


Figura VII.2. Curva de calibração utilizada na quantificação proteica pelo método de Bradford utilizando como padrões albumina de soro bovino (BSA).

Tabela VII.2. (a) Ensaio enzimático realizado em condições padrão (75 μM BH4 e 25°C), (b) Atividade enzimática determinada com pré-incubação com L-Phe e Composto (100 μM L-Phe e 100 μM Composto, 6 minutos) nas mesmas condições padrão, (c) Atividade enzimática determinada com pré-ativação pelo composto nas mesmas condições padrão (100 μM Composto, 6 minutos); os valores apresentados representam o valor médio \pm desvio padrão. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

	Atividade enzimática sem Pré-ativação ^(a) (nmol Tyr min ⁻¹ mg ⁻¹)	Atividade enzimática com Pré-ativação pela L-Phe e Composto ^(b) (nmol Tyr min ⁻¹ mg ⁻¹)	Atividade enzimática com Pré-ativação pelo Composto ^(c) (nmol Tyr min ⁻¹ mg ⁻¹)
DMSO 1%	1504 \pm 66	2590 \pm 130	1620 \pm 67
Composto 1	765 \pm 46	587 \pm 16	332 \pm 16
Composto 2	1680 \pm 62	1473 \pm 70	1118 \pm 72
Composto 3	636 \pm 70	461 \pm 19	184 \pm 20
Composto 4	403 \pm 15	815 \pm 23	703 \pm 18
Composto 5	617 \pm 12	1563 \pm 92	481 \pm 33
Composto 6	621 \pm 25	1466 \pm 81	983 \pm 136
Composto 7	606 \pm 259	913 \pm 5	746 \pm 44
Composto 8	471 \pm 62	382 \pm 41	135 \pm 27
Composto 9	603 \pm 23	521 \pm 14	233 \pm 12
Composto 10	721 \pm 92	711 \pm 20	431 \pm 29
Composto 11	485 \pm 40	781 \pm 47	430 \pm 7
Composto 12	793 \pm 221	678 \pm 137	1262 \pm 297
Composto 13	1060 \pm 19	1259 \pm 106	980 \pm 115
Composto 14	1251 \pm 87	2026 \pm 101	1198 \pm 55
Composto 15	881 \pm 40	627 \pm 134	344 \pm 27
Composto 16	1198 \pm 82	1455 \pm 86	736 \pm 60
Composto 17	875 \pm 45	1470 \pm 75	1013 \pm 32
Composto 18	1017 \pm 96	1345 \pm 131	929 \pm 5
Composto 19	1072 \pm 565	796 \pm 191	592 \pm 53
Composto 20	850 \pm 419	1237 \pm 104	361 \pm 213
Composto 21	728 \pm 49	754 \pm 40	417 \pm 18
Composto 22	374 \pm 397	1006 \pm 143	735 \pm 218

Tabela VII.3. Valores da temperatura de desnaturação (T_m) para a proteína recombinante hPAHwt, a proteína hPAHwt na presença de DMSO a 1% como controlo para os ensaios com os Compostos a 100 μ M; os valores apresentados representam o valor médio \pm desvio padrão. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

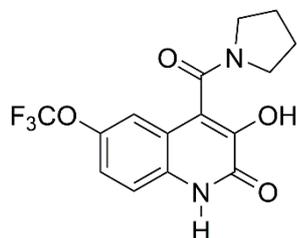
	Estabilidade Térmica ($^{\circ}$ C)	
	T_{m1}	T_{m2}
DMSO	43,4 \pm 0,7	53,5 \pm 0,4
Composto 1	44,5 \pm 0,8	53,3 \pm 0,3
Composto 2	51,7 \pm 0,4	53,6 \pm 0,2
Composto 3	45, \pm 1,9	53,2 \pm 0,8
Composto 4		
Composto 5	44,6 \pm 0,4	53,5 \pm 0,1
Composto 6	47,3 \pm 0,1	53,6 \pm 0,2
Composto 7		
Composto 8	44,2 \pm 0,1	53,8 \pm 0,1
Composto 9	44,6 \pm 0,2	53,7 \pm 0,2
Composto 10	40,0 \pm 1,0	43,9 \pm 1,4
Composto 11	33,0 \pm 0,3	35,5 \pm 0,1
Composto 12	44,8 \pm 0,3	53,5 \pm 0,1
Composto 13	51,9 \pm 1,1	52,6 \pm 1,3
Composto 14	43,3 \pm 0,1	52,3 \pm 0,3
Composto 15	43,3 \pm 0,1	53,7 \pm 0,0
Composto 16	43,8 \pm 0,1	53,1 \pm 0,0
Composto 17	43,5 \pm 0,1	53,0 \pm 0,0
Composto 18	43,1 \pm 0,5	53,4 \pm 0,2
Composto 19	37,8 \pm 1,9	42,7 \pm 0,3
Composto 20	46,0 \pm 0,2	57,7 \pm 0,2
Composto 21	39,5 \pm 1,0	55,9 \pm 0,2
Composto 22	35,6 \pm 0,2	43,0 \pm 0,4

Tabela VII.4. Valores da constante de proteólise (k) obtidos por digestão controlada da hPAHwt pela tripsina (proteólise limitada).

	k	r^2
Tampão	0,1124	0,9639
L-Phe	0,1066	0,8833
DMSO 1 %	0,08164	0,9736
Composto 2	0,07332	0,9450
Composto 4	0,1438	0,9020
Composto 6	0,1036	0,8552
Composto 8	0,4267	0,9529
Composto 9	0,08860	0,9453
Composto 10	0,1881	0,9568
Composto 11	0,2490	0,9740
Composto 12	0,02288	0,8784
Composto 13	0,04753	0,9220
Composto 14	0,07708	0,9076
Composto 15	0,02217	0,9491
Composto 16	0,008624	0,9846
Composto 17	0,06990	0,7448
Composto 18	0,004409	0,9752
Composto 19	0,1871	0,9047
Composto 20	0,05630	0,8918
Composto 21	0,4122	0,9776
Composto 22	0,1080	0,9869

Nota: os compostos foram testados na concentração final de 100 μ M.

Características dos derivados 3-HQs sintetizados:

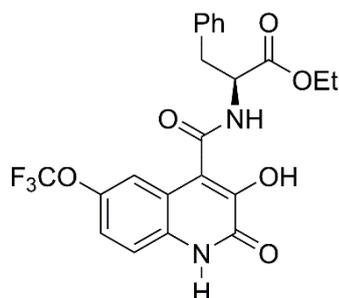


Composto 1 foi obtido com um rendimento de 74% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.41 (s, 1H), 10.30 (s, 1H), 7.49 – 7.30 (m, 2H), 7.14 (s, 1H), 3.60-3.45 (m, 2H), 3.07 (dd, $J = 10.5, 6.0$ Hz, 2H), 1.99 – 1.60 (m, 4H).

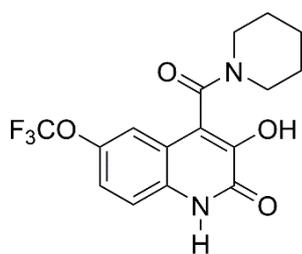
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 162.66, 158.13, 143.28, 142.59, 132.32, 121.86, 120.08, 118.71, 118.47, 117.07, 115.62, 46.24, 45.09, 25.29, 24.08.

HRMS EI⁺ m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4^+$ 343.0900; **encontrado** 343.08973.



Composto 2 foi obtido com um rendimento de 57% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.27 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 11.58 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 7.39 – 7.07 (m, 7H), 6.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.63 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.01 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.08 – 2.92 (m, 2H), 1.08 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).



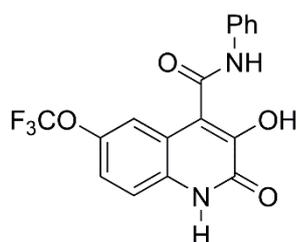
Composto 3 foi obtido com um rendimento de 90% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.45 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 7.56 – 7.27 (m, 2H), 7.07 (s, 1H), 3.85 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.49 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 3.21 (br. s, 2H), 1.58 (br. s, 5H), 1.24 (br. s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 162.59, 157.91, 143.20, 142.54, 132.38, 121.89, 120.05, 118.97, 118.90, 117.19, 115.30, 46.92, 41.61, 26.44,

25.54, 23.97.

HRMS EI⁺ m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4^+$ 357.1057; **encontrado** 357.10538.

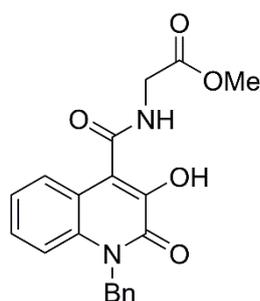


Composto 4 foi obtido com um rendimento de 90% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.49 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.47 – 7.29 (m, 5H), 7.13 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H);

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 162.47, 158.28, 143.93, 143.31, 138.82, 132.05, 128.92, 123.97, 121.87, 120.06, 119.72, 119.49, 119.14, 117.18, 115.54;

HRMS EI⁺: m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4^+$ 365,0744; **encontrado** 365,07405.



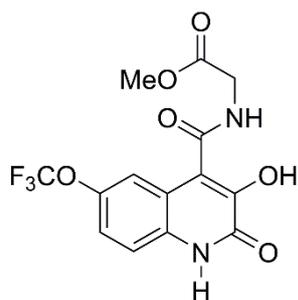
Composto 5 foi obtido com um rendimento de 79% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9.96 (s, 1H), 9.07 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.44 – 7.20 (m, 9H), 5.63 (s, 2H), 4.08 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 170.62, 165.52, 158.99, 141.49, 136.88, 133.88, 129.16, 127.70, 127.59, 126.99, 125.44, 123.31, 120.86, 119.60, 115.65, 52.34, 45.96, 25.69;

LRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 367;

Análise elementar calculada (%) para: $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5 + 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 63,99; H, 5,10; N, 7,46, **encontrado**: C, 64,35; H, 5,00; N, 7,61.

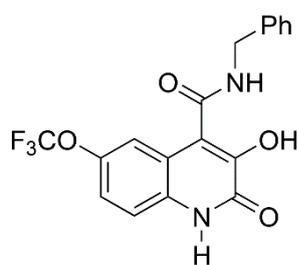


Composto 6 foi obtido com um rendimento de 88% como um sólido puro branco;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.43 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.14 – 8.90 (m, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.56 – 7.27 (m, 2H), 4.19 – 3.95 (m, 2H), 3.75 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 170.05, 164.64, 158.13, 143.51, 143.25, 131.98, 121.90, 119.95, 119.45, 118.51, 116.87, 116.28, 51.82, 40.89.

HRMS EI⁻ m/z $[\text{M}]^-$: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6^-$ 359,0496; **encontrado** 359,04977.



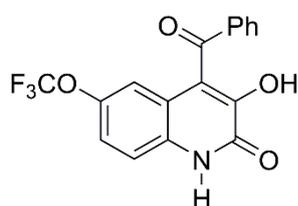
Composto 7 foi obtido com um rendimento de 86% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.43 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 9.09 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.50 – 7.18 (m, 8H), 4.51 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H);

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 163.90, 158.23, 143.54, 143.19, 139.20, 132.01, 128.28, 127.22, 126.89, 121.86, 119.96, 119.78, 119.39, 118.47, 117.04, 115.62:

LRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 379;

Análise elementar calculada (%) para $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4 + 1,50 \text{ H}_2\text{O}$: C, 53.34; H, 3.98; N, 6.91; **encontrado:** C, 53.65; H, 3.64; N, 6.96.



Composto 8 foi obtido com um rendimento de 77% como um sólido branco;

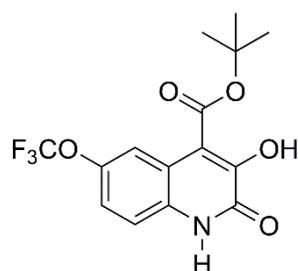
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 12.52 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 7.89 – 7.81 (m, 2H), 7.66 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 1H), 6.90 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 194.24, 157.94, 144.66, 143.24, 143.21,

143.18, 136.01, 132.46, 125.18, 121.79, 120.78, 119.20, 118.40, 115.01,

LRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 349.6; 337.9.

Análise elementar calculada (%), C, 58.46; H, 2.89; N, 4.01; **encontrado:** 59.05; H, 3.01; N, 4.63.



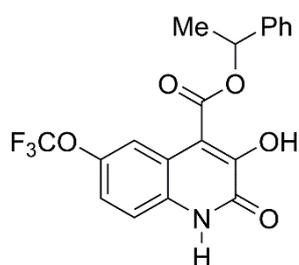
Composto 9 foi obtido com um rendimento de 86% como um sólido branco;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.49 (s, 1H), 10.57 (s, 1H), 7.40 (s, 2H), 7.24 (s, 1H), 1.56 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 164.50, 158.36, 145.38, 143.70, 132.27, 121.88, 120.59, 118.54, 117.79, 117.06, 115.01, 83.28, 28.23;

LRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 385;

Análise elementar calculada (%) $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_5$: C 59.37, H 5.24, N 14.58, **encontrado:** C 59.48, H 5.55, N 14.25.



Composto 10 foi obtido com um rendimento de 76% como um sólido puro laranja;

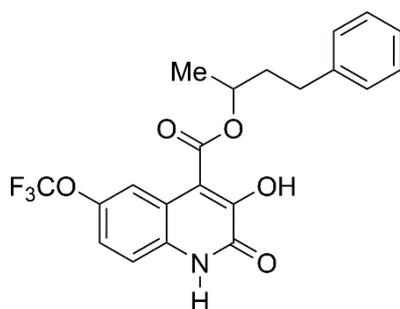
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 12.65 (s, 1H), 11.31 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.36-7.22 (m, 6H), 7.22 (s, 1H), 6.29 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H), 1.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 168.32, 158.79, 145.20, 139.88, 130.65, 128.88, 128.75, 126.42, 126.42, 122.22, 120.95, 118.82, 118.08, 117.97,

117.72, 76.29, 21.99;

LRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 394; 337.9; 289.6; 104.7.

Análise elementar calculada (%) para $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_5$: C, 58.02; H, 3.59; N, 3.56; **encontrado**: C, 57.93; H, 3.86; N, 3.58.



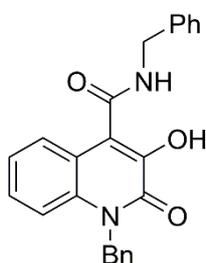
Composto 11 foi obtido com um rendimento de 77% como um sólido laranja;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 12.74 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.31 – 6.92 (m, 6H), 5.32 (dd, $J = 12.1, 6.6$ Hz, 1H), 2.82 – 2.59 (m, 2H), 2.16 - 2.12 (m, $J = 14.6, 7.3$ Hz, 1H), 2.04 – 1.90 (m, 1H), 1.44 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 168.76, 158.90, 152.97, 145.25, 140.88, 130.88, 128.63, 128.40, 126.25, 122.38, 120.87, 118.21, 117.55, 111.77, 74.59, 37.48, 31.86, 20.15;

LRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 422; 289.6; 132.7.

Análise elementar calculada (%) para $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_5$: C, 59.86; H, 4.31; N, 3.32; **encontrado**: C, 60.50; H, 4.54; N, 3.54.

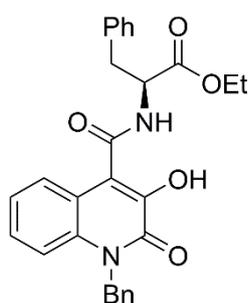


Composto 12 foi obtido com um rendimento de 76% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9.96 (s, 1H), 9.10 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.53 – 7.09 (m, 14H), 5.63 (s, 2H), 4.54 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H);

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 173.24, 164.75, 159.03, 141.46, 139.61, 136.88, 133.92, 129.14, 128.75, 127.75, 127.69, 127.55, 127.30, 127.00, 125.02, 123.34, 121.28, 119.54, 115.76, 45.95, 42.75.

HRMS EI⁺: m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3^+$ 385.1547 ; **found** 385.15437.



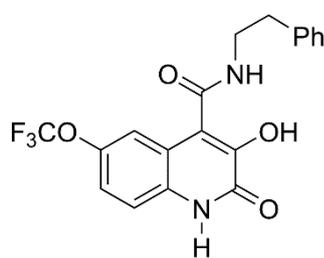
Composto 13 foi obtido com um rendimento de 70% como um sólido puro cinzento;

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.45 (s, 1H), 9.28 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.39 – 6.79 (m, 13H), 5.55 (s, 2H), 4.65 (s, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.04 (s, 2H), 1.10 (s, 3H);

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 172.93, 169.75, 164.25, 162.38, 137.98, 137.65, 129.91, 129.76, 128.97, 128.74, 127.28, 126.86, 124.98, 122.09, 121.71, 114.62, 60.45, 54.51, 46.23, 38.41, 14.51;

HRMS EI⁺: m/z [M + H]⁺ Calculado para C₂₈H₂₇N₂O₅ : 471,1914, **encontrado** 471,19091

Análise elementar calculada (%) para C₂₈H₂₆N₂O₅ + 2H₂O: C, 66.39; H, 5.97; N, 5.53 **encontrado**: C, 66.61; H, 5.16; N, 5.83.



Composto 14 foi obtido com um rendimento de 90% como um sólido puro cinzento;

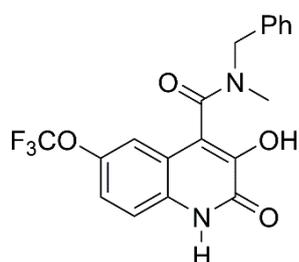
¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ 12.42 (s, 1H), 8.71 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.37 – 7.17 (m, 6H), 7.14 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 3.54 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.84 (t, J = 7.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂SO) δ 163.80, 158.35, 143.93, 143.13, 139.28, 131.85, 128.72, 128.27, 126.11, 121.87, 119.58, 119.49, 118.48,

116.88, 115.91, 35.06;

LRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ 393; 338.1; 142.9.

Análise elementar calculada (%) para C₁₉H₁₅F₃N₂O₄ + H₂O: C, 55.61; H, 4.18; N, 6.83; **encontrado**: C, 55.38; H, 3.84; N, 6.75.

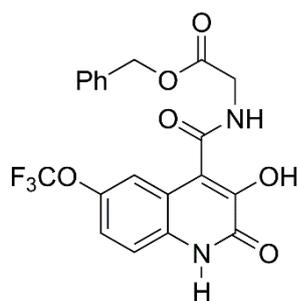


Composto 15 foi obtido com um rendimento de 89% como um sólido puro cinzento;

¹H NMR mix of rotamers (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ 12.45 (s, 0.61H), 12.45 (s, 0.39H), 10.47 (s, 0.35H), 10.45 (s, 0.65H), 7.49 – 7.04 (m, 8H), 4.77 (dd, J = 50.2, 14.8 Hz, 1.3H), 4.43 (dd, J = 35.2, 15.6 Hz, 0.70H), 2.94 (s, 1H), 2.80 (s, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, (CD₃)₂SO) δ 170.12, 164.57, 143.17, 138.15, 128.55, 127.51, 126.84, 125.20, 124.85, 122.07, 118.69, 115.34, 111.93, 111.18, 110.92, 53.86, 49.29, 34.89, 31.80;

HRMS EI⁺: m/z [M + Na]⁺ Calculado para C₁₉H₁₅F₃N₂NaO₄⁺ 415,0876; **encontrado** 415,08725.



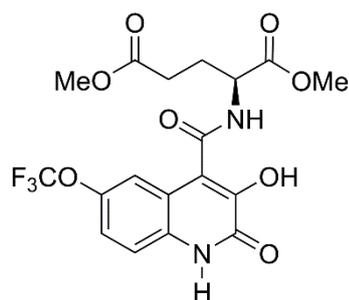
Composto 16 foi obtido com um rendimento de 57% como um sólido puro cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.45 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 9.06 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.44-7.33 (m, 7H), 5.21 (s, 2H), 4.12 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 169.57, 164.68, 158.15, 143.63, 143.28, 135.88, 131.96, 128.44, 128.12, 128.03, 121.90, 119.92, 119.45, 116.87, 116.35, 66.08, 41.00;

HRMS EI⁺ m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Na}$ 258.1101; **encontrado** 258.1074

Análise elementar calculada (%) for: $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O}$: C, 50.85; H, 4.05; N, 5.93; **encontrado**: C, 50.40; H, 3.74; N, 5.87.



Composto 17 foi obtido com um rendimento de 57% como um sólido puro cinzento;

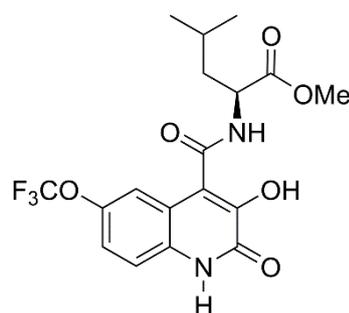
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.43 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 9.04 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.59 – 7.27 (m, 3H), 4.48 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 2.50 (2H, overlapped with solvent peaks), 2.18 – 1.81 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 172.40, 171.53, 164.04, 157.90, 143.31, 142.97, 131.74, 119.75, 119.26, 119.17, 118.27, 116.67,

115.74, 51.76, 51.25, 51.19, 29.32, 25.33;

LRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 446.8 ; 414.8; 347.8; 338.1; 142.9

Análise elementar calculada (%) para: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_8 + \text{H}_2\text{O}$: C, 44.82; H, 4.39; N, 5.81; O, 33.17; **encontrado**: C, 44.44; H, 3.99; N, 6.05.



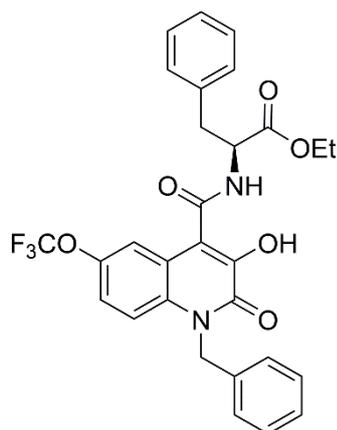
Composto 18 foi obtido com um rendimento de 70% como um sólido cinzento;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.40 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 7.38 (s, 3H), 4.47 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 1.83 – 1.44 (m, 3H), 0.91 (s, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 174.05, 169.40, 164.33, 163.13, 143.10, 127.95, 124.94, 122.12, 115.95, 115.18, 113.39, 103.91, 51.59, 50.13, 24.54;

LRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 439; 416.9; 338.1; 142.9.

Análise elementar calculada (%) para: $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6 + 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 50.83; H, 4.74; N, 6.59; **encontrado**: C, 49.46; H, 4.10; N, 6.25.

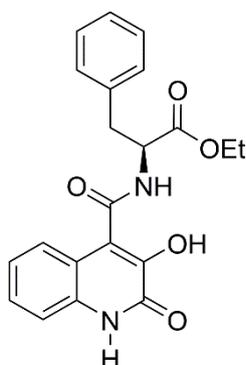


Composto 19 foi obtido com um rendimento de 80% como um sólido cinzento;

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.32 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.07 (m, 12H), 5.63 (q, *J* = 16.2 Hz, 2H), 4.67 (dd, *J* = 14.7, 7.5 Hz, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.06 (ddd, *J* = 23.1, 13.9, 7.5 Hz, 2H), 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR: (75 MHz, (CD₃)₂SO) δ 174.05, 169.40, 164.33, 163.13, 143.10, 127.95, 124.94, 122.12, 115.95, 115.18, 113.39, 103.91, 51.59, 50.13, 24.54;

HRMS EI⁺ *m/z* [M + Na]⁺: Calculado para C₂₉H₂₆F₃N₂NaO₆⁺ 555,1737; **encontrado** 555,17270.



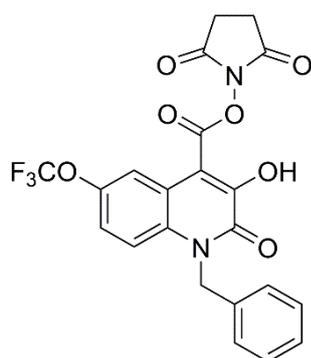
Composto 20 foi obtido com um rendimento de 90% como um sólido cinzento;

¹H NMR (300 MHz (CD₃)₂SO) δ 12.03 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 7.60 – 6.82 (m, 33H), 4.86 – 4.50 (m, 3H), 4.09 (q *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.04 (ddd, *J* = 22.8, 13.9, 7.6 Hz, 1H), 1.15 (t, *J* = 7.0 Hz, 11H).

¹³C NMR: (75 MHz, (CD₃)₂SO) δ 174.05, 169.40, 164.33, 163.13, 143.10, 127.95, 124.94, 122.12, 115.95, 115.18, 113.39, 103.91, 51.59, 50.13, 24.54;

LRMS (ESI): *m/z* [M+ Na]⁺ 403.1

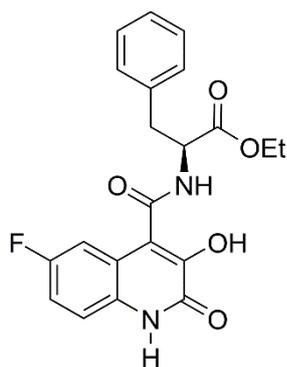
Análise elementar calculada (%) para: C₂₁H₂₀N₂O₅ + 0.5H₂O: C, 61.10; H, 5.76; N, 6.79; **encontrado:** C, 60.87; H, 5.56; N, 6.65.



Composto 21 foi obtido com um rendimento de 97% como um sólido cinzento;

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ 7.93 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 9.3, 1.8 Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 2H), 7.26 (t, *J* = 5.8 Hz, 3H), 5.64 (s, 2H), 2.93 (s, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂SO) δ 173.37, 161.56, 158.92, 146.88, 143.72, 136.69, 133.07, 129.23, 127.74, 126.90, 123.10, 121.01120.81 (d, *J* = 255.6 Hz, 119.95, 118.99, 117.08, 112.17, 46.13, 25.65).



Composto 22 foi obtido com um rendimento de 84% como um sólido cinzento;

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ 12.09 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 7.67 – 7.16 (m, 36H), 7.08 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 4.65 (dd, J = 14.1, 7.7 Hz, 2H), 4.10 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.04 (ddd, J = 22.8, 13.8, 7.5 Hz, 1H), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 3H)

¹³C NMR: (75 MHz, (CD₃)₂SO) **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO) δ 172.00, 169.59, 164.21 (d, J = 248 Hz), 159.61, 156.42, 137.69, 130.03, 129.69, 128.69, 127.65, 127.01, 120.31, 119.43, 108.29, 106.24, 61.03, 54.43, 37.17, 14.57.

LRMS (ESI): *m/z* [M+ H]⁺ 399.3

Análise elementar calculada (%) para: C₂₁H₁₉FN₂O₅ + 0.7H₂O: C, 61.37; H, 5.00; N, 6.82; **encontrado:** C, 61.06; H, 5.09; N, 7.21.