

TRATAMENTO DE DOENÇAS METABÓLICAS HEREDITÁRIAS COM CHAPERONES FARMACOLÓGICOS

Os chaperones farmacológicos constituem uma das novas abordagens terapêuticas com futuro na área da Medicina genómica. Baseiam-se no uso de pequenas moléculas que ajudam as proteínas mutantes a adotar a forma adequada à correta realização da sua função.

Os chaperones apresentam grandes vantagens relativamente a outros tratamentos tradicionalmente utilizados nas doenças metabólicas.

OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA AS DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO METABOLISMO

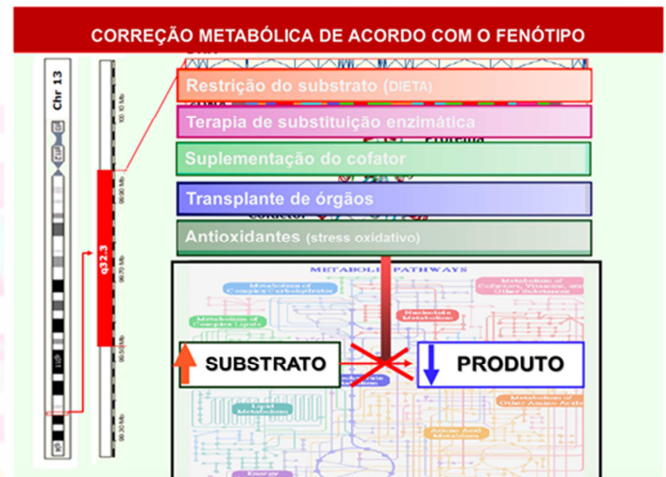
De acordo com o seu modo de ação, podem ser agrupadas em 4 tipos gerais:

- Correção metabólica
- Terapia celular
- Terapia génica
- Terapia genómica

EM QUE CONSISTE A CORREÇÃO METABÓLICA?

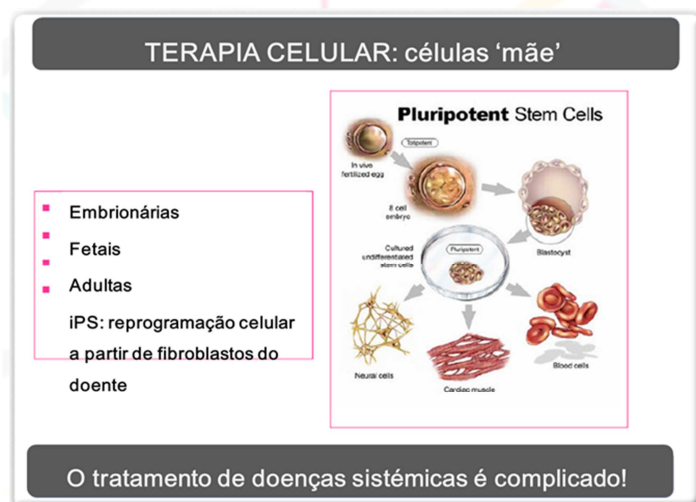
A alteração metabólica, causada pela(s) mutação(ões) de um gene com consequências patogénicas, pode ser corrigida de diversas formas:

- **Restrição do substrato** acumulado devido ao bloqueio metabólico. Pode ser acompanhada da substituição do produto não formado, que pode ser essencial. Por exemplo: dietas especiais baixas em proteínas, usadas para muitas aminoacidopatias e acidúrias orgânicas, ou dietas livres de galactose na galactosémia, ou de frutose na frutosemia hereditária.
- **Terapia de substituição enzimática** - consiste em administrar, periodicamente, uma enzima ativa a um doente com uma deficiência enzimática, com o objetivo de substituir a proteína em falta. É um tratamento muito utilizado nas doenças lisossomais de sobrecarga.
- **Suplementação do cofator** - consiste em administrar o cofator (frequentemente, um derivado vitamínico que otimiza a atividade enzimática) a um doente com deficiência numa enzima, de modo a aumentar a sua atividade enzimática. Por exemplo: defeitos do metabolismo da vitamina B12, que causam acidúrias metilmalónicas, com ou sem homocistinúria.
- **Transplante de órgãos** - utiliza-se para substituir (pelo menos em parte) a enzima deficiente do doente, cuja atividade se expressa num determinado órgão, pela enzima normal do doador. Utiliza-se, por exemplo, nos defeitos do ciclo da ureia e na tirosinemia de tipo I (fígado). O transplante de medula óssea também é utilizado nalgumas doenças lisossomais de sobrecarga.
- **Antioxidantes** - também são utilizados uma vez que tem vindo a ser demonstrada a importância que o processo de *stress* oxidativo assume em muitas doenças metabólicas, como por exemplo nas doenças do metabolismo energético mitocondrial.



O QUE É A TERAPIA CELULAR?

Baseia-se na utilização de células estaminais (células ‘mãe’). A sua utilização ainda é insipiente devido a uma série de dificuldades técnicas e de problemas éticos.



Estas células ‘mãe’ podem ser naturalmente obtidas a partir do cordão umbilical ou da medula óssea mas, atualmente, estão a fazer-se progressos na geração de células deste tipo em laboratório - as células iPS [do inglês *induced pluripotent stem cell* (células pluripotentes, reprogramadas a partir de fibroblastos dos doentes)] e na sua diferenciação em células específicas para corrigir o defeito metabólico. Esta abordagem, no entanto, ainda está em fase experimental.

E A TERAPIA GÉNICA?

A **terapia génica** consiste na incorporação de material genético externo (exógeno) ao material genético de uma célula, de modo a modificar a ação de um gene mutado

(alterado).

EM QUE CONSISTE A TERAPIA GENÓMICA?

As terapias genómicas são novas abordagens terapêuticas utilizadas na Medicina Genómica, e que se adequam à filosofia da medicina atual, muitas vezes descrita como a medicina dos 4P: preditiva, personalizada, preventiva e participativa.

Entre elas contam-se as **terapias específicas para certas mutações**, em que:

- O tratamento é específico para o tipo de mutação.
- Os doentes devem ser analisados geneticamente.
- As mutações devem ser analisadas funcionalmente.

O TIPO DE MUTAÇÃO DE UM GENE TEM CONSEQUÊNCIAS SOBRE A PROTEÍNA QUE ELE CODIFICA?

As mutações podem afetar as proteínas que codificam de **diferentes formas**.

Se, por exemplo, interferem com o *splicing* do RNA mensageiro, podem causar alterações muito graves na proteína mutada. Também as mutações em que a alteração de uma base do DNA dá origem a um codão STOP prematuro (*nonsense*), podem ter consequências muito graves, por darem origem a uma proteína truncada.

Já entre as mutações caracterizadas por alterarem uma base do DNA com consequente aparecimento de um aminoácido incorreto na proteína mutada (*missense*), a função proteica pode ser mais ou menos afetada consoante a importância do aminoácido em questão. Em muitos casos, o que se verifica é uma alteração do ‘enrolamento e pregueamento’ da proteína, o que reduz a sua estabilidade e faz com que seja rapidamente degradada e eliminada, causando assim a sua deficiência funcional.



EXISTEM TERAPIAS ESPECÍFICAS DE ACORDO COM O TIPO DE MUTAÇÃO?

Atualmente há muita investigação focada na criação de terapias específicas para cada tipo de mutação. Por exemplo, para as mutações de *splicing*, investiga-se a aplicação de **terapia antisense**; para as mutações que dão origem a proteínas truncadas, investe-se em terapias de 'stop codon readthrough' e, para as mutações *missense*, utiliza-se **terapia com chaperones farmacológicos**.

O QUE SÃO OS CHAPERONES FARMACOLÓGICOS?

São pequenas moléculas que ajudam ao pregueamento das proteínas mutantes, contribuindo para que elas assumam a sua forma específica. Funcionam para as proteínas mutantes cuja alteração aminoácida resulta num defeito de 'enrolamento e pregueamento'.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS DO TRATAMENTO COM CHAPERONES?

Tem diversas vantagens:

- São muitos os doentes que podem ser tratados com este tipo de abordagem;
- Atravessam a barreira hematoencefálica (ao contrário da terapia de substituição enzimática, ou de alguns cofatores como a BH4);
- Alcançam os diversos tecidos onde a proteína mutada é expressa;
- São facilmente administráveis, ao contrário da terapia de substituição enzimática ou da terapia génica.
- Não se manipula o material genético do indivíduo, ao contrário da terapia génica.

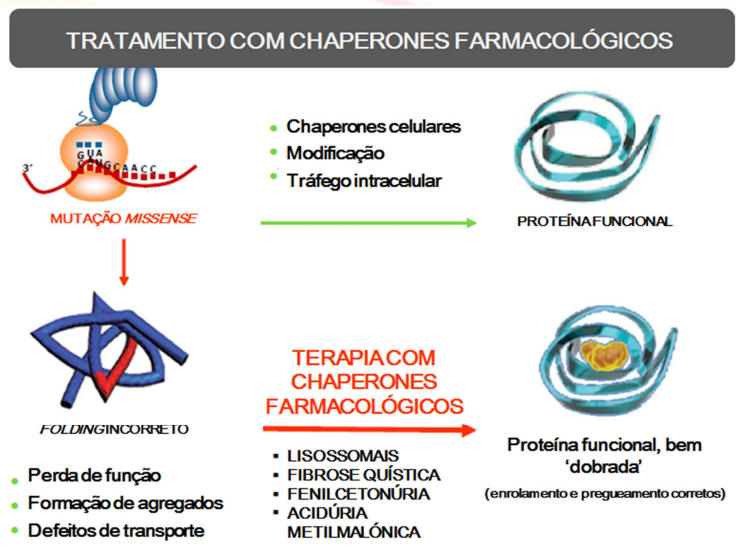
O QUE FAZEM OS CHAPERONES?

Os chaperones celulares ajudam ao correto enrolamento e pregueamento das proteínas.

Nas proteínas mutadas por alteração de um único aminoácido, os processos de enrolamento e pregueamento podem não ocorrer corretamente, facilitando a sua agregação (que, muitas vezes, pode ter um efeito tóxico), a sua degradação ou mesmo o seu tráfego intracelular.

Ao serem tratadas com chaperones farmacológicos, essas mesmas proteínas assumem uma conformação [mais] correta e podem voltar a ser funcionais.

Mesmo quando não se consegue corrigir a proteína na totalidade, uma correção parcial pode ser suficiente para que se verifique um aumento da função.



QUE DOENÇAS SÃO TRATÁVEIS COM CHAPERONES?

As doenças causadas por proteínas mutantes que:

- Apresentem um **defeito no pregueamento com perda de função** (síndrome de Marfan, PKU, doenças lisossomais de sobrecarga, etc...).
- **Não sejam suficientemente estáveis para realizar a sua função** (muitas formas de cancro).
- Resultem numa **falha no tráfego intracelular** (fibrose quística, hipercolesterolemia familiar, deficiência de alfa-1-antitripsina).
- **Formem agregados tóxicos insolúveis** (doenças neurodegenerativas: Alzheimer, diabetes de tipo II, Parkinson, etc...).

COMO SE DESCOBREM OS CHAPERONES FARMACOLÓGICOS?

Em primeiro lugar, utilizam-se fármacos já disponíveis, como no caso da PKU, em que existe um fármaco candidato que é o cofator da reação da fenilalanina hidroxilase, a tetrahydrobiopterina (BH4) e investiga-se o seu mecanismo de ação.



Noutros casos, investigam-se as bases moleculares da doença e, depois de estabelecido o alvo terapêutico, procura-se um fármaco adequado nas bibliotecas de fármacos.

As bibliotecas são repositórios de milhares de moléculas que estão disponíveis no mercado como potenciais agentes terapêuticos.

Exemplos deste tipo de abordagens são as pesquisas que estão a ser feitas para a acidúria metilmalônica e para os defeitos congênitos da glicosilação.

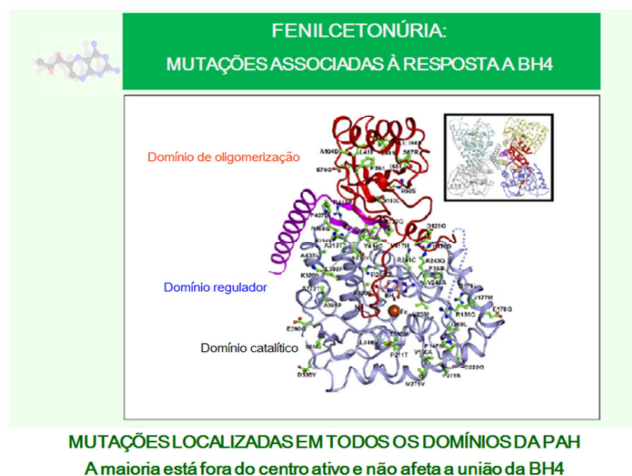
NO CASO DA PKU, TODOS OS DOENTES RESPONDEM AO TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM O COFATOR BH4?

Cerca de 30% dos doentes com PKU com determinadas mutações respondem à **administração oral de BH4 (KUVAN®)**.

Em geral, são doentes com formas leves ou moderadas de PKU, embora nalguns casos a resposta seja apenas parcial, pelo que se deve combinar esta terapêutica com a restrição de fenilalanina na dieta.

PODEMOS PREVER COM BASE NO GENÓTIPO (MUTAÇÕES) QUAIS OS DOENTES QUE VÃO RESPONDER A ESTA TERAPIA?

Inicialmente, pensava-se que as mutações que respondiam a BH4 eram aquelas que estavam localizadas no centro ativo e que afetavam a união da BH4 com a proteína PAH. Hoje, porém, sabemos que podem estar em qualquer domínio da enzima (catalítico, regulador e de tetramerização) da PAH e que a maioria até está fora do centro ativo, não afetando a ligação da PAH com a proteína. No entanto, **a resposta a BH4 depende do genótipo e do estado metabólico do doente** (em estado catabólico a resposta é menor). Como nem todos os doentes respondem a BH4, estão a ser investigados outros chaperones farmacológicos para a PKU.



QUAL É O PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE UM CHAPERONE?

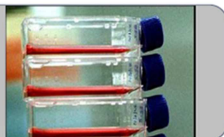
Em primeiro lugar, testa-se a terapia em células em cultura do doente e/ou em modelos celulares da doença. Depois, usam-se animais modelo para verificar a sua eficiência, ausência de toxicidade e efeitos secundários.

Finalmente, realizam-se ensaios clínicos, que consistem em testar um pequeno número de doentes (fase I) e, subsequentemente, um número muito maior (fases II e III).

EXISTEM MUITOS CHAPERONES FARMACOLÓGICOS?

PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE CHAPERONES

- ✓ Provar a terapia em células em cultura
- ✓ Modelos celulares da doença



- ✓ Testar em animais modelo: eficiência e ausência de toxicidade ou efeitos secundários



- ✓ Ensaios clínicos: testar num pequeno número de doentes voluntários (FASE I), e em números cada vez maiores (FASE II e FASE III)

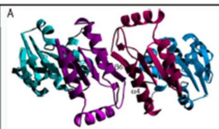
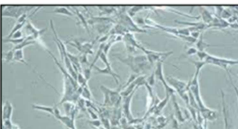
Existem bibliotecas de fármacos que cumprem estas condições.

- 10.000 compostos de elevada pureza
- Biblioteca de compostos com uma atividade potencial de chaperone químico ou farmacológico.
- São compostos pequenos.
- Selecionados por critérios de medicina química.
- Químicos semelhantes suscetíveis de modificações para desenvolver fármacos.

COMO SE REALIZA A SELEÇÃO DOS POSSÍVEIS CHAPERONES FARMACOLÓGICOS?

Como exemplo, temos o estudo de identificação de chaperones farmacológicos como potenciais agentes terapêuticos para tratar PKU, realizado pelo Dr. Angel Pey com o grupo da Dra. Aurora Martínez (Pey *et al.*, *J Clin Invest* 2008; 118:2858).

- Primeiro, deve-se dispor da proteína enzimática fenilalanina hidroxilase (PAH) purificada.
- Selecionam-se 1000 compostos potencialmente ativos da biblioteca.
- Analisa-se a sua ação sobre a proteína PAH purificada, selecionando por exemplo, 4 compostos que:
 - aumentem a estabilidade da proteína ao calor;
 - não inibam a sua atividade enzimática em concentrações baixas.
- Desses 4 compostos, selecionam-se os 2 que sejam capazes de estabilizar a estrutura do tetrâmero (4 subunidades iguais) da PAH.
- Posteriormente, administram-se pequenas concentrações destes compostos a ratinhos normais para ver se levam a um aumento da atividade PAH no fígado (neste caso não se pode analisar em fibroblastos porque a PAH só é expressa no fígado).
- Seleciona-se o composto mais ativo.
- Analisa-se a sua atividade no fígado de um ratinho mutante, portador de mutação *missense* que afete o pregueamento da PAH.

ANÁLISE DO EFEITO DOS CHAPERONES		
PROTEÍNA HUMANA PURIFICADA	MODELO CELULAR DA DOENÇA	MODELO ANIMAL
 Proteína ATR trimerica	 Fibroblastos de doentes	 Ratinho normal

Os chaperones podem aumentar a atividade residual das proteínas alvo e, em combinação com terapias convencionais, podem ser uma boa opção para melhorar a progressão clínica dos doentes

CONCLUSÕES

- Os chaperones farmacológicos representam uma opção terapêutica para as doenças metabólicas, uma vez que apresentam uma boa biodistribuição, atravessam a barreira hematoencefálica e são facilmente administráveis por via oral.
- Prevê-se que sejam muitos os doentes a poder beneficiar deste tipo de terapia. Mas apenas aqueles cujas mutações alterem a conformação podem ser sujeitos a este tipo de tratamento.
- Os chaperones farmacológicos podem ser combinados com outros tratamentos já implementados melhorando o prognóstico dos doentes.
- Os estudos com chaperones estão a avançar rapidamente, principalmente para aqueles erros inatos do metabolismo em que predominam doentes cujas mutações alteram a conformação da proteína.



Collaborators:

- Aurora Martínez, Bergen Univ.
- Ruma Banerjee, Michigan Univ.



Projeto: As Doenças Metabólicas Raras em Português, um projeto APCDG & Guia Metabólica.

Apoio económico: "Para ti, sempre: um CD de música, uma vida CDG", coordenado pela APCDG em 2014 e realizado em conjunto com famílias, amigos e profissionais CDG.

Coordenação da tradução: Vanessa Ferreira (Associação Portuguesa CDG e outras Doenças Metabólicas Raras, APCDG, Portugal), Mercedes Serrano e Maria Antónia Vilaseca (Guia Metabólica).

Tradução: MFrancisca Coutinho, Unidade de Investigação e Desenvolvimento Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Rua Alexandre Herculano, 321 4000-055 Porto, Portugal.



Passeig Sant Joan de Déu, 2 08950

Esplugues de Llobregat

Barcelona, Spain

Tel: +34 93 203 39 59

www.hsjdbcn.org /

www.guiametabolica.org

© Hospital Sant Joan de Déu. All rights reserved.