

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Ciências
ULisboa

**Novas abordagens para o tratamento da fenilcetonúria:
avaliação em modelos celulares de formulações da
fenilcetonúria hidroxilase humana**

Kátia Cristina Morais Soares Gomes

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:
Prof^ª Doutora Ana Paula Leandro
Prof^º Doutor Francisco Pinto

AGRADECIMENTOS

Depois de chegar ao fim é altura para reflexões que serão importantes neste momento de agradecimentos. De início gostaria de agradecer à professora Maria João da Silva, não só por ter me feito chegar ao laboratório e a este grupo fantástico que tive o prazer de fazer parte, mas também por ter sido uma excelente professora e assim ter despertado em mim o desejo pelo trabalho de investigação.

Na sequência gostaria de agradecer à primeira pessoa que me foi apresentada no grupo, minha querida orientadora, professora Ana Paula Leandro, pela incansável, dedicada e excelente orientação que me prestou durante todo o período de estágio. Foi mesmo impecável a ensinar-me a mim e a todas as suas alunas tudo sobre o laboratório, além de nos apresentar a pessoas igualmente impecáveis que também disponibilizaram a ajudar-nos em tudo. Serei sempre grata ao apoio, às conversas, à compreensão e à disponibilidade dispensada.

Seguidamente gostaria de agradecer ao João Leandro, ao Paulo Lino e à Hanna que foram as pessoas que na ausência da professora Paula me orientaram, sempre me ajudando em tudo o que precisasse. Quero muito agradecer as experiências partilhadas e os ensaios que tive o prazer de desenvolver ao vosso lado. Sem a vossa ajuda com certeza não seria possível. Vocês são realmente merecedores da minha gratidão.

À Raquel, minha companheira de laboratório, pelos momentos passados juntas, pelas dúvidas em comum, frustrações, ansiedades, gargalhadas e também pelas asneiras. Foi pena termos que nos separar depois, mas valeu e muito a boa temporada que partilhámos. Obrigada pelo apoio principalmente durante a época da minha escrita.

Às minhas companheiras de almoço, dona Lourdes e Ana, pelas conversas e momentos de relaxamento durante o nosso período de descanso. Obrigada também por estarem sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso no laboratório, pela simpatia e acolhimento.

Finalmente, mas não menos importante queria agradecer ao pilar da minha vida, minha família e amigos. À minha amada mãe a quem esta dissertação é dedicada, por ser a razão da minha existência e minha motivação em tudo. Obrigada por sempre fazeres o possível e o impossível por mim. Ao Danila, meu companheiro, amigo fiel, por todos os momentos vividos juntos desde o início desta caminhada, por estar sempre presente, mesmo quando ausente, para me ouvir, ajudar e incentivar. Sou muito grata por sempre acreditares em mim e por teres-me feito acreditar também que seria capaz. A todos os meus amigos, que sempre me encorajaram e que me apoiaram no que fosse preciso, em especial à Sandra e ao Samuel por estarem sempre presentes e à Ornela pelo apoio fundamental que me prestou na fase final deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A Fenilcetonúria (PKU; OMIM 261000) é o erro hereditário mais comum do metabolismo dos aminoácidos afetando, na população Caucasiana, cerca de 1 em cada 10.000 recém-nascidos. Esta doença genética tem como base mutações no gene que codifica para a fenilalanina hidroxilase humana (hPAH; EC 1.14.16.1), uma enzima que catalisa a hidroxilação da fenilalanina (L-Phe) em tirosina (L-Tyr) na presença do cofator tetra-hidrobiopterina (BH₄) e do oxigénio molecular (O₂). De modo a evitar danos cerebrais irreversíveis deve ser instaurada uma dieta pobre no aminoácido essencial L-Phe o mais cedo possível após o nascimento. Até muito recentemente a terapia dietética era a única abordagem disponível para o tratamento dos doentes PKU. Uma vez que a PKU pode ser considerada uma doença conformacional por *loss of function* nos últimos anos surgiu uma alternativa terapêutica que envolve administração do cofator enzimático BH₄ como chaperone farmacológico. No entanto, estas duas abordagens terapêuticas estão longe de abranger todo o espectro fenotípico da doença, em especial o fenótipo de PKU clássica, mais grave.

Os grupos *Metabolism and Genetics* (Met&Gen) e *Nanostructured Systems for Overcoming Biological Barriers* (Nano2B) do *Research Institute for Medicines* (iMed.Ulisboa), têm estado envolvidos no desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica designada por terapia enzimática de reposição (ERT). Neste âmbito foi já possível obter uma forma estável da hPAH e desenvolver um sistema de nanopartículas (NP) de quitosano (CS) adequado para a encapsulação da forma selvagem da hPAH (hPAHwt). Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a eficácia das formulações obtidas por ensaios de *uptake* em células apropriadas nomeadamente, células HEK-293T (*human embryonic kidney 293T cells*). Uma vez que estas células não expressam hPAH a aquisição de capacidade hidroxilante da L-Phe no lisado celular poderá confirmar o sucesso das formulações desenvolvidas.

Assim, a proteína hPAHwt foi produzida num sistema de expressão procariota e a sua forma tetramérica biologicamente ativa foi isolada utilizando técnicas de cromatografia de afinidade e de exclusão molecular. A proteína recombinante produzida foi caracterizada a nível da sua atividade enzimática e estabilidade térmica (T_m) por fluorimetria diferencial de varrimento (DSF). De entre as formulações previamente otimizadas no laboratório, foi selecionada a formulação de NP-CS e cinco outras formulações onde foram utilizados diferentes agentes modificadores. Estes, por questões de confidencialidade, foram designados por 1, 2, 3, 4 e 5 por (NP-CSA_{gm1}, NP-CSA_{gm2}, NP-CSA_{gm3}, NP-CSA_{gm4} e NP-CSA_{gm5}). Para preparação das NPs com os agentes modificadores 1, 2 e 3 foram ainda ensaiadas cargas baixas (A_{gm_{cb}}) e altas (A_{gm_{ca}}). Após caracterização das NPs e do perfil de libertação das formulações em estudo foram então efetuados os ensaios em células.

Após nanoencapsulação da hPAHwt nos diferentes sistemas, a avaliação da atividade catalítica e do T_m permitiu confirmar que esta mantinha a sua funcionalidade ($74,3 \pm 5,7\%$ de atividade relativa) e estabilidade. A caracterização das NPs indicaram que estas apresentavam propriedades adequadas à sua utilização no que respeita ao tamanho de partícula (221 ± 24 nm), potencial zeta ($+26,1 \pm 2,4$ mV) e eficiência de encapsulação (EE; $78,6 \pm 2,8\%$). Os ensaios de libertação efetuados demonstraram que todas as formulações, exceto a NP-CSA_{gm2_{ca}}, mantinham constantes o valor de proteína no sobrenadante dos ensaios. Assim, de entre as nove formulações foram selecionadas quatro (NP-CS, NP-CSA_{gm3_{ca}}, NP-CSA_{gm4} e NP-CSA_{gm5}) para os ensaios com células HEK-293T. Uma vez que não foi possível detetar hPAHwt na fração solúvel do lisado celular estendemos os nossos ensaios às células HepG2 (*human hepatocellular carcinoma cell line*, ATCC HB-8065). De entre as formulações testadas duas apresentaram capacidade de serem internalizadas pelas células HepG2 nomeadamente a NP-CS e

a NP-CSA_{gm5} uma vez que o teor de hPAHwt detetado no sobrenadante do lisado, após 6 h de incubação a 37 °C, foi de 26,2% e 8,2%, respetivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho são extremamente promissores e abrem a porta a novos estudos que poderão ter como objetivo a modificação da superfície das NPs para melhorar o seu *uptake* celular.

PALAVRAS CHAVE: Fenilcetonúria; Fenilalanina hidroxilase; Terapia enzimática de reposição; Nanoencapsulação.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU; OMIM 261000) is the most frequent inborn error of amino acid metabolism with an estimated incidence of 1:10,000 newborns, in the Caucasian population. This genetic disease is the result of mutations in the gene encoding the human phenylalanine hydroxylase (hPAH; EC 1.14.16.1). This enzyme is responsible for the hydroxylation of L-phenylalanine (L-Phe) into L-tyrosine (L-Tyr) in the presence of the tetra-hydrobiopterin cofactor (BH₄) and the molecular dioxygen (O₂). In order to avoid irreversible neurological damages a diet restricted in L-Phe should be implemented as soon as possible after birth. Till very recently this diet was the only available approach to PKU treatment. As PKU is now classified as a conformational disorder with loss of function, in the last years an alternative therapeutic approach was developed involving BH₄ administration as a pharmacological chaperone. However, these therapeutic approaches are far from including the full phenotypic spectra of the disease and in particular the most severe classical form.

The groups of Metabolism and Genetics (Met&Gen) and Nanostructured Systems for Overcoming Biological Barriers (Nano2B), from the Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), have been involved in the development of an enzyme reposition therapy (ERT) as a new approach to PKU treatment. In this scope the groups already obtained a stable form of hPAH and developed a chitosan (CS) nanoparticulate (NP) system allowing an efficient encapsulation of the wild-type hPAH (hPAHwt). As such, this work aimed at verify the efficacy of the designed formulations by performing uptake assays in appropriate cells namely HEK-293T cells (human embryonic kidney 293T cells). Since, hPAH is not expressed in these cells acquisition of a L-Phe hydroxylating capacity by the cellular lysate should confirm the success of the developed formulations.

To this end, the hPAHwt was produced in a prokaryotic expression system and the biological active tetrameric form was purified using two chromatographic techniques namely affinity chromatography and size exclusion chromatography. The obtained recombinant protein was characterized concerning its catalytic activity and thermal stability (T_m) using differential scanning fluorimetry (DSF). Among the formulations previously optimized in our laboratory, we selected for further cellular studies the NP-CS and five additional formulations prepared using modifying agents. These agents were named 1, 2, 3, 4 and 5 (NP-CSA_{gm1}, NP-CSA_{gm2}, NP-CSA_{gm3}, NP-CSA_{gm4} and NP-CSA_{gm5}) due to confidentiality issues. When using the modifying agents 1, 2 and 3 a low (A_{gm_{cb}}) and a high (A_{gm_{ca}}) loading were also tested. After characterization of NPs and their release profile cellular studies were then performed.

Upon hPAHwt nanoencapsulation using the nine different systems, evaluation of the specific enzymatic activity and T_m allowed to confirm that the protein maintained functionality ($74.3 \pm 5.7\%$ of relative enzyme activity) and stability. The NPs physicochemical characterization showed that the formulations presented adequate properties to be further used in the cellular assays in respect to NP size (221 ± 24 nm), zeta potential ($+26.1 \pm 2.4$ mV) and encapsulation efficiency (EE; $78.6 \pm 2.8\%$). The release assays indicated that all but one (NP-CSA_{gm2_{ca}}) of the tested formulations allowed to maintain a constant value of the protein in the supernatant of the assays. Therefore, among these nine formulations four (NP-CS, NP-CSA_{gm3_{ca}}, NP-CSA_{gm4} e NP-CSA_{gm5}) were selected for further HEK-293T cellular assays. Since, no hPAHwt protein was detected in the soluble fraction of the cellular lysate additional assays were performed using HepG2 cells (human hepatocellular carcinoma cell line, ATCC HB-8065). Among the four formulations studied, two showed to present the capacity to be internalized by the HepG2 cells namely NP-CS and NP-CSA_{gm5} as the content of the hPAHwt protein detected in the supernatant of the cellular lysate, after 6 h incubation at 37 °C, was 26.2% and 8.2%, respectively.

The results obtained in this work are very promising and pave the way to additional studies aiming to modify the NP surface in order to improve their cellular uptake.

KEY WORDS: Phenylketonuria; Phenylalanine hydroxylase; Enzyme reposition therapy; Nanoencapsulation.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	xi
Abreviaturas	xii
I. Introdução	1
1. Fenilcetonúria	1
1.1 Via Metabólica	1
1.2 Incidência	2
1.3 Classificação	3
1.4 Patogenicidade	3
2. O gene e as mutações associadas	5
3. A proteína PAH	6
3.1 Características Bioquímicas	6
3.2 Características Estruturais	7
3.2.1 Domínio Regulador	8
3.2.2 Domínio Catalítico	8
3.2.3 Domínio de Oligomerização	9
4. Abordagens Terapêuticas	10
4.1 Terapêuticas em utilização	10
4.1.1 Dieta	10
4.1.2 Tetrahidrobiopterina (BH ₄ / Kuvan)	11
4.1.3 LNAA	12
4.2 Terapêuticas em desenvolvimento	12
4.2.1 Terapia Enzimática	12
4.2.1.1 PEG-PAL	12
4.2.2 Probióticos	13
4.2.3 Terapia Génica	14
4.2.4 PAH-tag	15
4.2.5 Chaperones Farmacológicos	15
II. Objetivos	17
III. Materiais e Métodos	18
1. Materiais	18

1.1 Reagentes	18
1.2 Células, estirpe de bactérias e vetores de expressão	18
2. Métodos	19
2.1 Expressão da proteína recombinante	19
2.2 Processos cromatográficos para purificação das formas tetraméricas da proteína recombinante	19
2.2.1 <i>Cromatografia de afinidade com iões imobilizados (IMAC)</i>	19
2.2.2 <i>Cromatografia de exclusão molecular (SEC)</i>	20
2.3 Quantificação proteica	20
2.4 Análise por eletroforese (SDS-PAGE).....	20
2.5 Determinação da atividade enzimática.....	21
2.6 Caracterização do perfil de estabilidade térmica	21
2.7 Preparação das Nanopartículas (NPs)	21
2.8 Caracterização das NPs	22
2.8.1 <i>Tamanho de partícula e potencial zeta</i>	22
2.8.2 <i>Eficiência de encapsulação</i>	22
2.9 Ensaio de libertação	23
2.10 Cultura de células de mamíferos na presença de NPs	23
2.11 Detecção proteica por análise de <i>Western Blot</i>	23
IV. Resultados e Discussão	25
1. Rendimento e grau de pureza da proteína recombinante produzida.....	25
2. Caracterização funcional e estrutural da hPAHwt.....	26
3. Caracterização das NPs	28
3.1 Eficiência de encapsulação	28
3.1.1 <i>Tamanho das NPs e potencial zeta</i>	28
4. Propriedades funcionais e estruturais da proteína hPAHwt encapsulada.....	29
4.1 Ensaio de libertação	30
5. Ensaio em células.....	36
5.1 Otimização das condições de ensaio e utilização das células HEK-293T	37
5.2 Ensaio em células HepG2	40
V. Conclusões gerais e perspetivas.....	42
VI. Bibliografia	44
VII. Anexos	54

Índice de Figuras

- Figura I.1** - Esquema representativo do metabolismo da fenilalanina (L-Phe). A L-Phe presente no organismo humano é maioritariamente proveniente da ingestão dietética. Na presença de oxigénio molecular (O_2) ocorre a hidroxilação da L-Phe em L-Tyr pela fenilalanina hidroxilase (PAH), na presença da tetra-hidrobiopterina (BH_4), o seu cofator natural. Esta via metabólica conduz posteriormente à formação de CO_2 e H_2O . Por descarboxilação ou transaminação, há produção de vários metabolitos que são excretados na urina, constituindo a via alternativa ao catabolismo da L-Phe2
- Figura I.2** - Potenciais mecanismos responsáveis pela deficiência neurocognitiva observada nos doentes hiperfenilalaninémicos (23). (BBB) barreira hemato encefálica; (LAT1) transportador de aminoácidos L do tipo I; (LNAA) aminácidos neutros de maior massa molecular4
- Figura I.3** - 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 aminoácidos5
- Figura I.4** - Reação catalisada pela PAH. A reação de hidroxilação catalisada pela PAH necessita do cofator BH_4 o qual é oxidado a dihidrobiopterina quinonóide ($q-BH_2$). A enzima dihidropteridina redutase (DHPR), na presença de NADH, é responsável pela regeneração da $q-BH_2$ a BH_47
- Figura I.5** - 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.....9
- Figura I.6.** Reação catalisada pela fenilalanina amónia liase (PAL). Esta enzima ao degradar a L-Phe dá origem a ácido trans-cinâmico e amónia9
- Figura IV.1** - Análise por SDS-PAGE do perfil de eluição da proteína hPAHwt após purificação por IMAC utilizando 6x 500 μ l de solução tampão de lise contendo 250 mM de imidazol - (1 a 6). (M) marcador de massas moleculares pré-corado (*NzyColour protein marker II*; Nzytech).25
- Figura IV.2** - Perfil cromatográfico da proteína recombinante hPAHwt, obtido por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Os números indicam os volumes de eluição das formas agregadas (1) (44-46 mL), octâmeros/hexâmeros (2) (55-57 mL), tetrâmeros (3) (58-68 mL) e dímeros (4) (70-71 mL).26
- Figura IV.3** - Perfil de estabilidade térmica da proteína recombinante hPAHwt obtido por Fluorimetria diferencial de varrimento (DSF). O perfil bifásico da curva de desnaturação permite determinar duas transições associadas ao T_{m1} e T_{m2} (indicados). (O) Valores adquiridos no ensaio; (—) ajustamento da curva (equação bifásica) aos pontos experimentais.....27
- Figura IV.4** - Eficiência de encapsulação da proteína hPAHwt nas diferentes formulações testadas. A quantidade de proteína recuperada no sobrenadante, após centrifugação das nanopartículas, foi determinada pelo método do BCA 28

Figura IV.5 - Tamanho médio (A) e potencial Zeta (B) das diferentes formulações testadas após encapsulação da hPAHwt.....	29
Figura IV.6 - Atividade enzimática da hPAHwt após nanoencapsulação (diferentes formulações). A atividade específica da proteína não encapsulada ($4430 \pm 351 \text{ nmol Tyr.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) foi considerada como sendo 100% (indicado a tracejado). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.....	29
Figura IV.7 - Avaliação da estabilidade térmica da hPAHwt após nanoencapsulação (diferentes formulações) por determinação do T_{m1} e T_{m2} , associados à desnaturação dos domínios regulador e catalítico, respetivamente. A zona sombreada indica o valor de $\pm 2^\circ\text{C}$ relativamente ao T_{m1} ($47,0^\circ\text{C}$; linha a tracejado) e T_{m2} ($54,3^\circ\text{C}$; linha a tracejado) da hPAHwt não encapsulada (hPAHwt)	30
Figura IV.8 - Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CS, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio.....	31
Figura IV.9 - Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação NP-CSAgm1 carga baixa (●) e carga alta (●) ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio	32
Figura IV.10 - Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSAgm2 carga baixa (●) e carga alta (●), ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio	33
Figura IV.11 - Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSAgm3 carga baixa (●) e carga alta (●), ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio	34
Figura IV.12 - Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSAgm4, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio.....	35
Figura IV.13 - Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSAgm4, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio.....	36
Figura IV.14 - Análise por <i>Western blotting</i> da quantidade relativa da hPAHwt presente nas diferentes frações após adição de células HEK-293T às formulação NP-CS-hPAHwt e posterior incubação durante 1 h a 37°C . Frações estudadas: “sobrenadante do meio de cultura” (1), após tripsinização (2), lavagem das células co tampão PBS (3), “lisado total” (4), “sobrenadante do lisado” (5) e “sedimento do lisado” (6). (Cont) corresponde à aplicação de 100 ng de hPAHwt utilizado como controlo da transferência e da revelação.	38

Figura IV.15 - Avaliação por *Western blotting* da quantidade relativa da hPAHwt presente nas diferentes frações após cultura com células HEK-293T a diferentes tempos (37°C) com hPAHwt-*naked* (A) e NP-CS-hPAHwt (B). Frações estudadas: “sobrenadante do meio de cultura” (■), “lisado total” (■), “sedimento do lisado” (■) e “sobrenadante do lisado” (■)39

Figura IV.16 - Avaliação por *Western blotting* da quantidade relativa da hPAHwt presente nas diferentes frações após cultura com células HepG2 a diferentes tempos (37 °C) com hPAHwt-*naked* (A), NP-CS-hPAHwt (B), NP-CSA_{gm3_{ca}}-hPAHwt (C), NP-CSA_{gm4}-hPAHwt (D) e NP-CSA_{gm5}-hPAHwt (E). Frações estudadas: “sobrenadante do meio de cultura” (■), “lisado total” (■), “sedimento do lisado” (■) e “sobrenadante do lisado” (■).....41

Figura VII.1 - Representação esquemática do vetor de expressão procariota pTrcHisB (Invitrogen)...
.....54

Índice de Tabelas

Tabela IV.1 - Análise da atividade enzimática e estabilidade térmica para a proteína recombinante hPAHwt.....	27
--	----

ABREVIATURAS

BCA	ácido bicinconínico
BH₄	6(R)-L- <i>eritro</i> -5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina
BSA	albumina bovina sérica
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CS	quitosano
DLS	dispersão dinâmica de luz
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSF	fluorimetria diferencial de varrimento
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERT	terapia enzimática de reposição
HEK-293T	<i>human embryonic kidney epithelial cell line</i>
HepG2	<i>human hepatocellular carcinoma cell line</i>
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HPA	hiperfenilalaninemia
hPAH	fenilalanina hidroxilase humana
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
IMAC	cromatografia de afinidade com iões imobilizados
IPTG	isopropil-1-tio-β-D-galactosídeo
LB	meio de cultura Luria-Bertani
L-Phe	L-fenilalanina
L-Tyr	L-tirosina
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (estado reduzido)
NPs	nanopartículas

NP-CS-Agm	nanopartícula de quitosano e agente modificador
ON	<i>Over Night</i>
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAL	fenilalanina amónia liase
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PKU	fenilcetonúria
PMSF	fluoreto de fenil-metilsulfonilo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEC	cromatografia de exclusão molecular
TBS	solução salina tamponada com Tris
<i>Tm</i>	temperatura de <i>melting</i>
TPP	tripolifosfato de sódio
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
WT	selvagem

I. INTRODUÇÃO

1. Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600) é uma doença genética, autossômica recessiva, caracterizada por mutações do gene *PAH* que codifica a fenilalanina hidroxilase humana (hPAH; EC 1.14.16.1) (1), originando uma deficiente atividade desta enzima. Uma vez que a hPAH é responsável pela conversão do aminoácido L-fenilalanina (L-Phe) em L-tirosina (L-Tyr), por *para*-hidroxilação da cadeia lateral aromática da L-Phe (2,3), esta doença afeta o metabolismo dos aminoácidos sendo mesmo reconhecida como a doença genética do metabolismo dos aminoácidos mais comum, com uma incidência média de 1:10.000 recém-nascidos na população Caucasiana. A deficiente atividade da hPAH tem como consequência um aumento nos níveis sanguíneos de L-Phe (hiperfenilalaninemia; HPA) e uma diminuição nos níveis de L-Tyr, que na ausência de tratamento origina um grave atraso psicomotor. De modo a poder dar início ao tratamento adequado, o mais cedo possível e evitar danos cerebrais irreversíveis o diagnóstico deverá ser efetuado logo após o nascimento e deste modo a PKU faz parte dos programas de rastreio neonatal na maior parte dos países (3).

Uma vez que, a fenilalanina é um aminoácido essencial (não sintetizado no organismo humano), a restrição da ingestão deste aminoácido na dieta de doentes com PKU surgiu como um grande avanço no tratamento desta patologia, diminuindo os níveis de fenilalanina no plasma e consequentemente melhorando o seu fenótipo clínico (4).

1.1. Via Metabólica

A reação de hidroxilação da L-Phe, dependente de BH_4 , é considerada o passo inicial e limitante da velocidade na via de catabolismo da L-Phe proveniente da dieta, onde há produção de metabolitos que “alimentam” o ciclo do ácido cítrico (5,6).

Como referido anteriormente, a L-Phe é considerado um aminoácido essencial, uma vez que o organismo não o consegue sintetizar (7), sendo que a PAH apresenta um papel crucial na manutenção da homeostase da L-Phe (8). Sendo assim, as principais fontes de obtenção da fenilalanina são a ingestão deste aminoácido através da dieta e a sua recuperação a partir das reservas endógenas de aminoácidos. Por outro lado, na célula a L-Phe pode ser consumida quer através da sua utilização para a síntese de proteínas, quer através de vias metabólicas. Estas podem conduzir à sua catabolização total, com produção de CO_2 , ou à formação de outros metabolitos (Figura 1) (5).

A via de catabolismo da L-Phe ocorre principalmente no fígado, onde é, num primeiro passo, hidroxilada a L-Tyr pela PAH. Este aminoácido, através de vários passos metabólicos é convertido em fumarato, o qual entra no ciclo de Krebs sendo por isso completamente catabolizado em CO_2 e H_2O . Numa via alternativa a L-Phe sofre uma reação de transaminação formando fenilpiruvato o qual, por sua vez, irá originar diversos metabolitos como o fenilactato, fenilacetato e o-hidroxifenilacetato, que são excretados na urina. Alternativamente a L-Phe pode também ser descarboxilada a feniletilamina, e posteriormente originando fenilacetilglutamato. No entanto, é de realçar que estas vias alternativas apenas se tornam relevantes quando a célula não tem capacidade para hidroxilar, na posição *para*, o anel de benzeno da L-Phe originando L-Tyr (9).

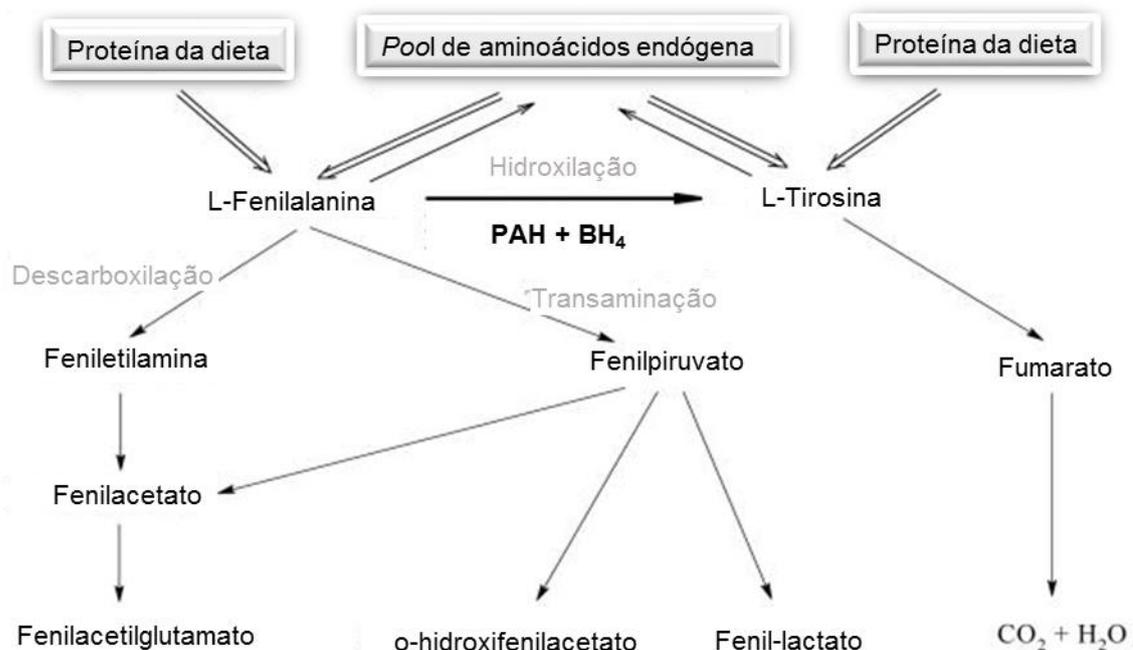


Figura I.1 - Esquema representativo do metabolismo da fenilalanina (L-Phe). A L-Phe presente no organismo humano é maioritariamente proveniente da ingestão dietética. Na presença de oxigénio molecular (O_2) ocorre a hidroxilação da L-Phe em L-Tyr pela fenilalanina hidroxilase (PAH), na presença da tetrahydrobiopterina (BH_4), o seu cofator natural. Esta via metabólica conduz posteriormente à formação de CO_2 e H_2O . Por descarboxilação ou transaminação, há produção de vários metabolitos que são excretados na urina, constituindo a via alternativa ao catabolismo da L-Phe (10).

A síntese de L-Tyr no organismo humano depende da disponibilidade de L-Phe presente no mesmo. Assim sendo, embora a L-Tyr seja considerado um aminoácido não essencial, quando existe um bloqueio na síntese de L-Tyr, por deficiente atividade da hPAH, a L-Tyr converte-se num aminoácido essencial tornando indispensável o seu aporte através da dieta (11).

Atendendo aos pontos anteriormente mencionados pode-se considerar então que a conversão de L-Phe em L-Tyr apresenta dois aspetos a serem realçados: o primeiro refere-se ao aminoácido não essencial que é produzido (L-Tyr) e o segundo é que a velocidade da oxidação completa da L-Phe em CO_2 e H_2O é limitada pela reação de hidroxilação desencadeada pela PAH (3).

1.2. Incidência

Numa perspetiva mundial observa-se que a variação da incidência da PKU é significativa em diferentes populações humanas. Esta doença metabólica hereditária é prevalente na Europa e nos Estados Unidos em que atinge cerca de 1 em cada 15.000 recém-nascidos, segundo o *Institute of Child Health and Human Development* (12). A maior incidência é observada na Turquia (1:2.600); é relativamente comum em algumas regiões da China e rara no continente africano (1,12). Países como a Finlândia e Japão também apresentam taxas de incidência baixas, com menos de um caso de PKU em 100.000 recém-nascidos.

Esta diferença nas taxas de incidência deve-se 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 (3). Em Portugal a incidência é de cerca de 1:11.000 recém-nascidos (13).

1.3. Classificação

Os distúrbios causados pela deficiência ou perda de atividade da hPAH incluem segundo a classificação de Kayaalp três tipos: a PKU (i), a hiperfenilalaninemia não-PKU (HPA não-PKU) (ii) e a PKU variante (iii), todas resultantes da intolerância à ingestão de L-Phe (14). Enquanto que uma criança portadora de HPA não-PKU apresenta menor risco de ter um desenvolvimento cognitivo prejudicado quando não for submetida a um tratamento adequado; no caso da PKU sem tratamento, ou seja, na ausência da restrição dietética de L-Phe, a criança pode desenvolver uma deficiência intelectual irreversível, uma vez que nesta condição apresenta uma deficiência completa ou quase completa da atividade da hPAH (5). Ainda de acordo com Kayaalp e colaboradores: (5,14) (i) a PKU é, de entre os três tipos, considerada a forma mais grave, tendo em conta que se associa a um elevado risco de comprometimento do desenvolvimento cognitivo; nesta forma as concentrações plasmáticas de L-Phe, no diagnóstico, são normalmente superiores a 1000 $\mu\text{mol/L}$ e os doentes apresentam uma tolerância dietética à L-Phe inferior a 500 mg/dia (quantidade de L-Phe da dieta que é tolerada pelo doente de modo a manter os níveis circulantes de L-Phe dentro de valores não-patogénicos); (ii) a HPA não-PKU encontra-se associada a concentrações plasmáticas de L-Phe, no diagnóstico, consistentemente acima do normal (isto é $> 120 \mu\text{mol/L}$), porém se o indivíduo tiver uma dieta normal, as concentrações de L-Phe permanecem inferiores a 1000 $\mu\text{mol/L}$; (iii) a PKU variante refere-se aos indivíduos que não se encaixam nas classes anteriores, quer em relação aos valores de L-Phe na altura do diagnóstico, quer na tolerância dietética à L-Phe.

Posteriormente, Guldberg e colaboradores, em 1998, a fim de classificarem e subdividirem a deficiência em hPAH, descreveram quatro classes (5,15): (i) a PKU clássica, onde é considerado que há uma perda completa ou quase completa da atividade da hPAH; nesta classe os indivíduos portadores apresentam uma tolerância à L-Phe proveniente da dieta de 250-350 mg/dia, de modo a conseguir manter um nível plasmático seguro de L-Phe ($\approx 300 \mu\text{mol/L}$; 5 mg/dL); não havendo restrição dietética de L-Phe, 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 400-600 mg/dia de L-Phe da dieta e; (iv) a Hiperfenilalaninemia Suave (MHP) caracterizada por concentrações de L-Phe no plasma inferior a 600 $\mu\text{mol/L}$ (10 mg/dL), quando os doentes se encontram submetidos a uma dieta normal.

1.4. Patogenicidade

Como referido anteriormente, na ausência de tratamento os doentes PKU poderão sofrer um grave atraso psico-motor com especial relevância para alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e da função cognitiva. Embora atualmente seja do conhecimento geral que tanto doentes PKU tratados como não tratados apresentam uma hipomielinização e desmielinização (14,16), ainda não se encontra elucidado o mecanismo segundo o qual as altas concentrações de L-Phe originam o défice intelectual. Estudos recentes indicam que estas alterações estão diretamente relacionadas com o conteúdo de substância branca do SNC e o seu teor em mielina. No entanto, encontra-se ainda por esclarecer se os níveis elevados de L-Phe ou alguns dos metabolitos das vias alternativas são responsáveis pela perda de capacidade de produção de mielina que ocorre nos oligodendrócitos (16). Se os oligodendrócitos perdem a capacidade de produzir mielina (hipomielinização) ou se os axónios perderem a mielina (desmielinização) poderá ocorrer desenvolvimento das alterações neuropsicológicas, uma vez que a mielina possui um papel crucial na condução do impulso nervoso (17).

Por outro lado, os fenómenos desencadeados na fisiopatologia da PKU (resumidos na Figura 2) que são responsáveis pelo estabelecimento de uma deficiência cognitiva, podem estar associados a uma

diminuição nos níveis de neurotransmissores, incluindo a dopamina e a serotonina (16,18–20). A teoria da “tirosina/dopamina” prevê que pelo fato da L-Tyr ser precursor da dopamina, o desenvolvimento cognitivo do indivíduo fica afetado. Num estudo desenvolvido por Diamond et al., em modelos experimentais de ratos PKU verificou-se que os baixos níveis de L-Tyr no SNC deviam-se provavelmente aos níveis sanguíneos elevados de L-Phe. Este aminoácido iria competir com a L-Tyr para o seu transporte ao longo da barreira hemato encefálica (BBB). É de realçar que o transporte da L-Phe através da BBB é mediado pelo transportador de aminoácidos L do tipo I (LAT1), que também é responsável pelo transporte dos aminoácidos neutros de maior massa molecular (*Large Neutral Amino Acids*; LNAA) onde estão incluídos a L-Tyr (precursor da dopamina e noradrenalina), o L-triptofano (L-Trp; precursor da serotonina), a L-leucina (L-Leu), a L-isoleucina (L-Ile), a L-metionina (L-Met) e a L-valina (L-Val) (21). Estes resultados indicam que os níveis de L-Tyr no SNC influenciam de forma direta a síntese de dopamina nos neurónios dopaminérgicos do córtex pré-frontal, o que significa que níveis baixos de L-Tyr no cérebro provocam uma diminuição dos níveis de dopamina resultando em deficiência cognitiva(17,18,22).

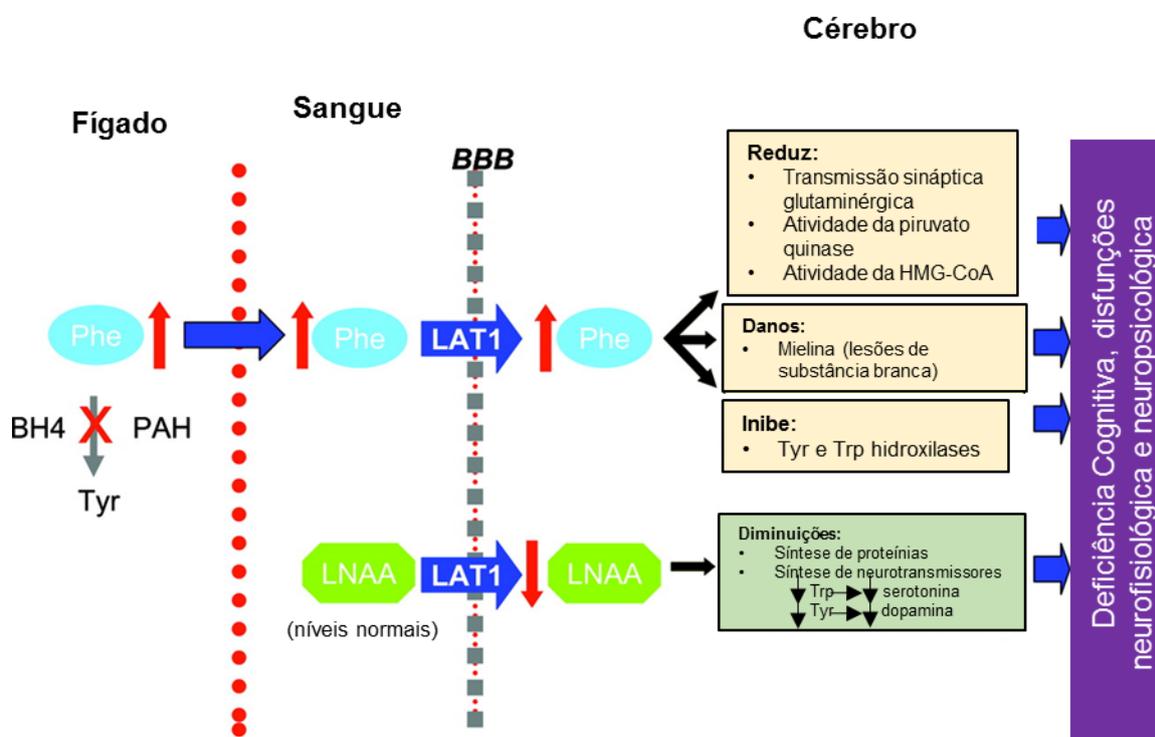


Figura I.2 - Potenciais mecanismos responsáveis pela deficiência neurocognitiva observada nos doentes hiperfenilalaninémicos (23). (BBB) barreira hemato encefálica; (LAT1) transportador de aminoácidos L do tipo I; (LNAA) aminoácidos neutros de maior massa molecular.

A teoria da “mielina/dopamina” tem como base a observação, referida anteriormente, da diminuição de mielinização em zonas específicas no cérebro de doentes PKU (24,25). Segundo esta teoria a sobre-expressão de enzimas que participam na via biossintética da dopamina, e em particular a tirosina hidroxilase (TH), é condicionada pelas interações que ocorrem entre a mielina e os axónios posteriormente responsáveis pela transdução de sinais que regulam positivamente a expressão de genes acima referida. No entanto, é de realçar que apesar de já se ter estabelecido a contribuição da mielina na maturação axonal e na condução do potencial de ação, ainda não são conhecidos os mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento da função axonal através de sinais provenientes da mielina (17).

Assim, tendo em consideração que a TH é responsável pelo primeiro passo da via de síntese da dopamina, é postulado que a hipomielinização observada nos doentes PKU conduzirá deste modo a uma sub-expressão da TH e consequentemente a níveis baixos de dopamina no SNC.

Adicionalmente, o comprometimento da função cognitiva poderá estar relacionado também com mecanismos alternativos e que incluem alterações na transmissão sináptica glutamínica, inibição moderada da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) na via biossintética do colesterol, inibição da piruvato quinase no metabolismo da glicose e função reduzida da monoamina oxidase B como resultado de genes modificados (26–30). Recentemente, danos no DNA e o *stress* oxidativo também têm sido implicado na patogênese da PKU (31,32).

2. O gene e as mutações associadas

A Figura 3 representa a localização do gene da *PAH* humana, que se situa no cromossoma 12q23.2, possui cerca de 171 kb e contém 13 exões, sendo o comprimento total do transcrito (mRNA) de $\approx 2,4$ kb (33,34).

Uma mutação no *locus* *PAH* por norma origina um aumento dos níveis sanguíneos de L-Phe (hiperfenilalaninemia; HPA), que pode resultar em PKU. No entanto, a HPA pode também resultar de mutações em *loci* responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas na síntese e regeneração do cofator BH₄. Estas alterações dão origem à denominada PKU maligna (35).

Entre as mais de 600 mutações já identificadas como afetando o gene *PAH*, podem ser encontradas (5,36): (i) grandes e pequenas deleções (13%); (ii) inserções (2%); (iii) mutações que afetam o *splicing* e que ocorrem nas junções de processamento alternativo em qualquer um dos intrões intervinientes (11%); (iv) mutações pontuais do tipo *missense* (62%) ou *nonsense* (5%) e; (v) polimorfismos silenciosos (6%).

Devido à grande variação alélica presente no gene da *PAH* a maior parte dos doentes PKU são classificados como heterozigotos compostos, ou seja apresentam uma mutação diferente em cada um dos alelos (1,37).

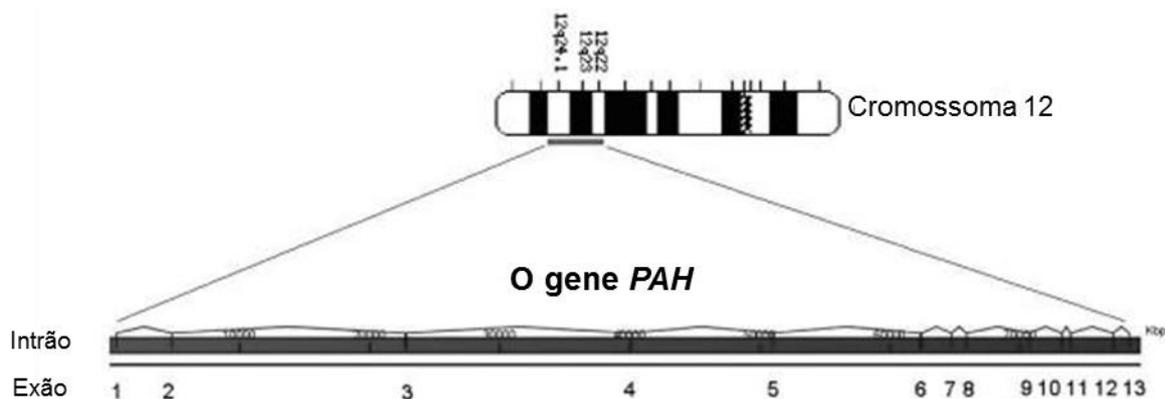


Figura I.3 - Representação da estrutura do gene *PAH* que se encontra localizado no braço longo do cromossoma 12 e que contém 13 exões que codificam para um polipéptido de 452 aminoácidos (3).

O fenótipo HPA do doente é determinado pela posição e natureza da mutação, uma vez que é esta alteração que por sua vez determina o efeito sobre a atividade da *PAH*. Assim, a perda de atividade parcial ou total da *PAH* está relacionada ao fenótipo da PKU clássica e moderada, enquanto a PKU

suave e a HPA não-PKU são resultantes de outras mutações que apenas inibem moderadamente a atividade da enzima (37).

A avaliação da repercussão de uma mutação específica na enzima expressa pode ser realizada de diferentes formas, entre elas, ensaios enzimáticos *in vitro*, estudos isotópicos *in vivo* ou ainda por análise *in vitro* da expressão do gene (14).

Numa grande parte dos indivíduos afetados é possível estabelecer uma boa correlação entre a severidade das mutações e as taxas de hidroxilação da L-Phe. Apesar disso, é de esperar a ocorrência de exceções, uma vez que a capacidade de hidroxilação da hPAH depende também da disponibilidade do seu cofator, BH₄ (14). É também possível o estabelecimento de correlações entre a severidade das mutações PAH e o quociente de inteligência (QI) dos indivíduos portadores, embora o QI seja uma das características humanas mais complexas que existem (38).

Embora a PKU seja uma doença genética, autossômica recessiva, o diagnóstico pré-natal raramente é solicitado uma vez que quando tratados adequadamente estes doentes poderão ter um desenvolvimento psico-motor normal. No entanto, é de realçar que, se solicitado, este diagnóstico pode ser efetuado quando a família já se encontra genotipada. Nesta situação são pesquisadas as mutações no gene PAH, previamente identificadas no caso índice e seus familiares (1).

3. A proteína PAH

Como referido anteriormente, em mamíferos a reação catalisada pela PAH é dependente do cofator BH₄, que assume o papel de co-substrato na reação de hidroxilação da L-Phe a L-Tyr. Por se tratar de um aminoácido essencial, a L-Phe não pode ser totalmente catabolizada, embora seja necessária a sua remoção uma vez que, quando em excesso poderá apresentar um efeito neurotóxico. Sendo assim, a hPAH é responsável tanto por preservar como por remover a L-Phe, apresentando um papel essencial na regulação deste aminoácido no organismo humano. Para que esta dupla função seja conseguida, a hPAH apresenta uma estrutura específica e vários mecanismos de regulação (2).

Embora, presentemente seja já vasto o conhecimento sobre o mecanismo catalítico da hPAH e as relações estrutura-função, tal não é observado para a relação estrutura-regulação onde ainda pouco se sabe (39–42). Para este conhecimento tem contribuído o estudo de proteínas PAH presentes em algumas bactérias e eucariotas não mamíferos (43,44).

3.1. Características Bioquímicas

A hPAH (EC 1.14.16.1) juntamente com a TYH (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) que apresentam como cofator BH₄ (41). Além disso, requerem ferro (na forma ferrosa) não-hémico e oxigénio molecular como substrato adicional (2,41).

A especificidade para o substrato e as propriedades reguladoras são os pontos que distinguem as três enzimas desta família, que em solução formam homotetrâmeros com massas moleculares aproximadamente entre 204 e 217 kDa. Além da região N-terminal com propriedades reguladoras, há em cada monómero, uma região central que possui propriedades catalíticas e uma região C-terminal responsável pela oligomerização (tetramerização) (45,46).

A hPAH, assim como as outras AAAHs, catalisa a hidroxilação do respetivo substrato incorporando no anel aromático um átomo de oxigénio (Figura 4). Também ocorre, numa reação final, a redução do segundo átomo de oxigénio a água, mediante a utilização de dois eletrões doados pela BH₄(2). Assim, na via principal, quando a L-Phe é hidroxilada a L-Tyr, o cofator BH₄ é oxidado a

dihidropteridina quinóide (qBH₂) que, por sua vez, é reduzida pela dihidropteridina redutase (DHPR) numa reação dependente de NADH, sendo a fenilalanina hidroxilase ativada novamente (47).

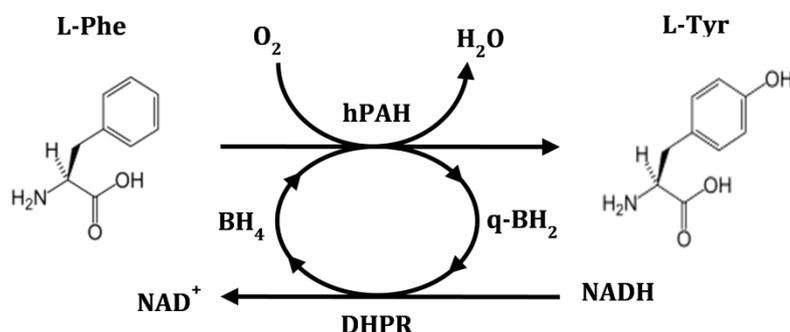


Figura I.4 - Reação catalisada pela PAH. A reação de hidroxilação catalisada pela PAH necessita do cofator BH₄ o qual é oxidado a dihidrobiopterina quinonóide (q-BH₂). A enzima dihidropteridina redutase (DHPR), na presença de NADH, é responsável pela regeneração da q-BH₂ a BH₄. Adaptado de (48).

Através da ação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) e de uma proteína quinase dependente de Ca⁺/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.

A fosforilação da Ser16 induz alterações conformacionais que permitem o melhor acesso do substrato ao centro ativo. Os níveis celulares de substrato e cofator têm a capacidade de controlar a fosforilação da hPAH. Níveis altos de L-Phe aumentam a velocidade de fosforilação pela PKA enquanto que um elevado teor de BH₄ inibe a fosforilação (46,49).

Através de vários mecanismos é possível estabelecer uma boa regulação das concentrações de L-Phe conduzindo à manutenção do equilíbrio dos níveis considerados suficientes para a manutenção da biossíntese de proteínas e uma minimização nos níveis sanguíneos de L-Phe quando estes se apresentam elevados (3).

3.2. Características Estruturais

Em solução, a hPAH apresenta-se num equilíbrio entre homotetrâmeros e homodímeros, o qual é dependente do pH e da concentração de L-Phe. Em termos de propriedades enzimáticas, e quando comparada com a forma dimérica, o tetrâmero apresenta maior atividade, maior afinidade para o substrato, maior resposta à ativação pelo substrato e maior índice de cooperatividade (50,51). Adicionalmente o tetrâmero apresenta uma resposta ao aumento da concentração de L-Phe do tipo sigmoidal enquanto o dímero apresenta uma cinética do tipo Michaelis-Menten.

Cada um dos monómeros da hPAH é constituído por uma cadeia polipeptídica de 452 aminoácidos (\approx 52 kDa) e apresentando três domínios estruturais e funcionais: um domínio regulador N-terminal (RD; primeiros 117 aminoácidos); um domínio catalítico (CD; resíduos 118-410) que dispõe de locais de ligação para o ferro, substrato e cofator e, um domínio de tetramerização/oligomerização (OD; resíduos 411-452), todos representados na Figura 5 (52).

3.2.1. Domínio Regulador

Estruturalmente o domínio regulador N-terminal (resíduos 1-117) é do tipo *sandwich* α/β onde é possível identificar um módulo estrutural, também presente em várias outras proteínas designado por domínio ACT. Este domínio é constituído pelo motivo $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Ser36–Leu109), 4 folhas β antiparalelas flanqueadas por duas α -hélices curtas que podem dimerizar dando origem a locais de ligação a aminoácidos na interface do dímero (53). A possibilidade de existência de um local adicional de ligação da L-Phe à hPAH no seu RD e que fosse responsável pelo fenómeno de ativação da proteína pelo próprio substrato tem sido fonte de controvérsia. Tendo como base a existência de um sítio regulador, foi observado que este apresenta dois motivos: GAL (resíduos 46–48 na hPAH) e (I/L) ESRP (resíduos 65–69), envolvidos na ligação de L-Phe numa preferata desidratase bacteriana, o que mostra que os domínios reguladores isolados da PAH realmente formam um dímero e ligam-se à L-Phe (54).

Na hPAH, a região de ligação (Arg111–Thr117), permite uma ligação flexível entre o RD e o CD. Esta região é também responsável por estabelecer diversos contatos com o CD da subunidade adjacente dentro do dímero (2).

A topologia característica do domínio ACT, encontrado no RD, é responsável pela flexibilidade apresentada por este domínio conferindo-lhe uma menor estabilidade, como é geralmente observado em ensaios de desnaturação térmica. Nestes ensaios o domínio R apresenta uma temperatura de *unfolding* mais baixa do que a apresentada pelo CD mais compacto (55).

3.2.2. Domínio Catalítico

O domínio catalítico (resíduos 118-410) é composto por 13 hélices α e por 6 folhas β . O centro ativo forma uma região aberta, com acessibilidade ao solvente e a ligandos exógenos, devido à sua localização numa espécie de “bolsa” com 13 Å de profundidade e 10 Å de largura. Existe também próximo ao centro ativo um canal de 16 Å de comprimento e 8 Å de largura, pelo qual se presume que o substrato seja transportado até ao centro ativo (56).

No domínio catalítico da hPAH encontram-se os locais de ligação tanto para o ferro como para o cofator e o substrato, sendo que o ferro se liga a duas histidinas (His285 e His295) e a um glutamato (Glu330) (2).

O cofator BH_4 liga-se no centro ativo, próximo do ferro, onde mantém interações com a Phe254. Hufton *et al.* sugeriram que o responsável pela ligação da BH_4 fosse um motivo de 27 aminoácidos (His263 a His289), altamente conservado nas AAAs (46,57). De acordo com as estruturas obtidas de formas binárias da hPAH (ligadas a análogos da L-Phe), o cofator deverá ligar-se na segunda esfera de coordenação do ferro, por um mecanismo de *induced fit* e com interação com o oxigénio do carbonilo (O_4) do Glu286, localizado a 3,67–4,18 Å do ferro (58–60).

Na estrutura dos complexos ternários da hPAH duplamente truncada (complexada com a BH_4 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 ferro no centro ativo. 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. Com base nestes complexos foram identificadas regiões de torção (*hinge bending regions*) que parecem fazer parte das alterações conformacionais propostas para ligação do substrato à enzima (61,62).

3.2.3. Domínio de Oligomerização

O domínio de oligomerização é formado por dois motivos, um de dimerização (resíduos 411-427) e outro de tetramerização (resíduos 428-452). O motivo de dimerização é composto por duas cadeias β que permanecem juntas por um *loop*. Para a manutenção do dímero contribuem as interações de van der Waals e duas ligações de hidrogénio que se estabelecem entre os dois *loops*. Os últimos 24 aminoácidos do domínio C-terminal (resíduos 428-452) constituem o motivo de tetramerização, que consiste numa hélice α de 40 Å (56).

Na estrutura da hPAH é possível observar uma distorção na simetria do homotetrâmero devido ao fato do tetrâmero ser constituído por dois dímeros com conformações diferentes. Caso haja sobreposição de dois monómeros num dos dímeros, torna-se capaz a observação da identidade entre o domínio catalítico e o domínio de tetramerização, quando analisados separadamente. Embora sejam idênticos, estes dois domínios adotam orientações relativas diferentes (63).

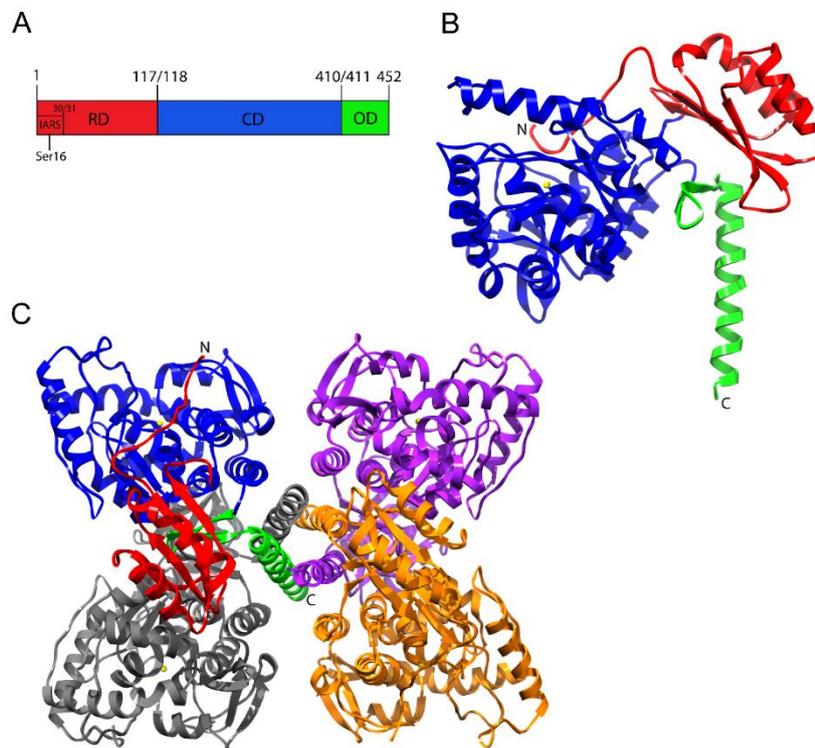


Figura I.5 - Representação da estrutura e organização dos domínios da PAH humana (hPAH). (A) Estrutura do domínio funcional da hPAH: domínio regulador (RD), domínio catalítico (CD) e domínio de oligomerização (OD). (B e C) Modelos do monómero (B) e tetrâmero (C) da hPAH obtidos pela combinação da estrutura 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. Figura adaptada de (64).

4. Abordagens terapêuticas

O tratamento da PKU tem como objetivo reduzir os níveis de L-Phe circulantes no organismo, por meio de uma dieta pobre deste aminoácido, de modo a evitar o desenvolvimento das alterações neurológicas e psicológicas características da doença. A restrição de L-Phe na dieta deve ser iniciada de forma precoce. Na realidade, encontram-se descritos doentes, com apenas um mês, onde são observadas alterações neurológicas. A dieta após iniciada deve ser continuada durante toda a infância, pois é nesta fase da vida que há maior desenvolvimento neurológico (3).

O tratamento dietético, apesar de ser muito eficaz na prevenção da deficiência mental, possui algumas lacunas (23,65). A principal falha a apontar são as deficiências nutricionais associadas à dieta muito restrita a que os doentes são submetidos, apesar de existirem fórmulas médicas que têm sido desenvolvidas ao longo dos anos, a fim de melhorarem a qualidade nutricional e a palatabilidade das mesmas. Têm sido descritos casos de doentes com deficiências nutricionais específicas, tais como cálcio, ferro, selênio, zinco ou deficiências de vitamina D e B12, além de atraso no crescimento (66–68). A dieta a que os doentes PKU estão sujeitos apresenta não só problemas nutricionais, como também se torna um peso económico e social sobre o doente e os seus familiares (69). Adicionalmente, doentes com PKU, mesmo com tratamento precoce e contínuo, parecem não atingir completamente o seu potencial de desenvolvimento neurológico. Na realidade mesmo que os doentes PKU apresentem um QI normal, este não atinge os valores comparáveis a irmãos ou colegas não doentes (65,70,71).

Com base no referido anteriormente, torna-se evidente que é importante o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da PKU. Estas têm como objetivo principal diminuir os níveis sanguíneos de L-Phe. Além de um melhor neuro-desenvolvimento precoce e evolução neurológica a longo prazo, as novas terapias alternativas também objetivam um crescimento corporal normal, com ausência de deficiências nutricionais e o bem-estar psicossocial do paciente, que se tornou um ponto-chave nos propósitos do tratamento da PKU (72).

Em situações muito particulares de doentes PKU, o transplante parcial do fígado permitiu corrigir o fenótipo metabólico PKU. No entanto, devido aos riscos associados a este tipo de cirurgia e à imunossupressão requerida ao longo da vida, o transplante hepático não é uma prática rotineira nestes casos (73).

4.1. Terapêuticas em utilização

4.1.1. Dieta

Dieta restrita em L-Phe é definida como uma dieta baixa em alimentos naturais ricos em proteínas (23). Vários alimentos como ovos, leite, queijo, carnes, aves, peixes, feijões secos e legumes que são ricos em proteínas são excluídos da dieta (74).

Após o nascimento e diagnóstico, o tratamento usado como dieta restrita em L-Phe baseia-se no aporte de pequenas quantidades de L-Phe provenientes do leite materno ou através de fórmulas infantis comerciais. Quando se trata de crianças mais velhas, calcula-se a ingestão diária de proteína, atribuindo-se um determinado número de gramas ou unidades de proteína que a criança deve ingerir por dia, dependendo das concentrações plasmáticas longitudinais de L-Phe (3).

É de salientar que a redução na quantidade de L-Phe proveniente da dieta deverá ser ponderada de modo a atingir um nível que possibilite o crescimento e desenvolvimento normais, sem que haja ao mesmo tempo valores muito elevados nas concentrações sanguíneas de L-Phe. As fórmulas médicas disponíveis para o tratamento da PKU são normalmente ricas em L-Tyr devendo apresentar uma quantidade mínima ou serem mesmo isentas de L-Phe e, juntamente com o leite materno, são consideradas as principais fontes de fornecimento de quantidades adequadas do aminoácido essencial

L-Phe. À medida que a criança cresce o leite materno ou as fórmulas infantis comercializadas vão sendo substituídas por frutas, vegetais e alimentos à base de amido. Estas orientações devem ser completadas com recomendações dietéticas feitas por um nutricionista, geralmente baseadas no cálculo da ingestão diária de L-Phe permitida tendo em conta as concentrações sanguíneas de L-Phe que o indivíduo apresenta (74).

É importante haver uma monitorização frequente dos doentes sujeitos a este tipo de tratamento, uma vez que é necessário ter em mente, os fatores que podem estar a afetar os níveis de L-Phe, que normalmente variam de indivíduo para indivíduo. Entre estes fatores temos o tipo de mutação, crescimento, grau da doença e ingestão de L-Phe superior às necessidades diárias do doente (74).

Em conclusão, a dieta restrita em L-Phe apresenta vantagens claras e já descritas, como por exemplo, a prevenção no aumento das concentrações sanguíneas de L-Phe, que por sua vez melhora o desempenho neurológico e psicológico, evitando o desenvolvimento de alterações psico-motoras. No entanto, existem desafios inerentes ao tratamento dietético que devem ser levados em conta: risco de desequilíbrios de nutrientes dietéticos essenciais, o cumprimento da dieta e a exigência de apoio social (3).

4.1.2. Tetrahydrobiopterina (BH₄) / Cloridrato de sapropterina

Por ser cofator natural da hPAH, a tetrahydrobiopterina (BH₄) quando ausente, origina não só a hiperfenilalaninémia, devido à disfunção da PAH, como também promove a disfunção da tirosina e triptofano hidroxilases que são os principais responsáveis pelas manifestações neurológicas graves provenientes dos défices de neurotransmissores, nos diferentes síndromes que envolvem a deficiência em BH₄ (75).

Em 1999 Kure e colaboradores identificaram mutações PKU associadas a um fenótipo sensível à BH₄. Esses doentes mostraram ser sensíveis à administração de doses farmacológicas exógenas de BH₄, as quais contribuíram para um aumento da atividade da hPAH e conseqüente redução da L-Phe circulante, uma medida terapêuticamente relevante (76,77).

O dicloridrato de sapropterina (Kuvan, Biomarin Pharma) é uma forma sintética da BH₄ ativa para administração por via oral que recebeu designação “Órfã” 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 (78).

O Kuvan, em doses farmacológicas, atua como um chaperone farmacológico, permitindo o *folding* das variantes proteicas contribuindo assim para um aumento da estabilidade da PAH (79). Porém, nem todos os doentes com deficiência em PAH respondem à BH₄ e entre aqueles que o fazem, existe uma vasta gama de extensão da resposta. Por esta razão, antes da instauração desta terapêutica deve ser efetuada uma avaliação por via oral, para averiguar se o doente é responsivo ou não ao tratamento com BH₄. Existem diferentes protocolos desenvolvidos para esta avaliação. No entanto, nos centros europeus são geralmente aplicados testes mais curtos, conforme os propostos por Blau e colaboradores (80). Esta avaliação consiste na administração de uma solução de 20 mg/kg/dia de BH₄, acompanhada de monitorização dos níveis sanguíneos de L-Phe às 0, 8, 16 e 24 horas, durante dois dias consecutivos. Ao iniciar estes ensaios recomenda-se que os níveis basais de L-Phe sejam superiores a 400 µmol/L e que os níveis sanguíneos de L-Phe sejam cuidadosamente monitorizados durante os dias anteriores, para que não haja resultados falsos-positivos ou -negativos. É considerado um resultado positivo (doente BH₄-responsivo) quando há um decréscimo de pelo menos 30% nos níveis sanguíneos de L-Phe, em relação ao valor basal. A resposta é negativa quando há uma redução de menos de 20% do basal. Se a redução for entre 20% e 30% deve-se aplicar um protocolo mais prolongado (1 a 3 semanas) e que inclua medições da concentração sanguínea de L-Phe diárias, a fim de estabelecer a capacidade de resposta da BH₄ (72).

O uso da BH₄ durante a gravidez é também uma opção válida para alcançar os níveis sanguíneos desejados de L-Phe durante a gravidez de modo a evitar danos ao feto (PKU maternal) (72).

Em suma, pode-se considerar que o tratamento com sapropterina proporciona não só reduções significativas e estáveis das concentrações séricas de L-Phe, mas também o aumento da tolerância dietética de L-Phe, nos doentes PKU que respondem a este tratamento. Apesar da monitorização contínua das concentrações sanguíneas de L-Phe requerida no tratamento com sapropterina, o sucesso do mesmo é inegável, já que permite um abrandamento na dieta altamente restritiva (81).

4.1.3. LNAA

Como referido anteriormente, os LNAA (incluindo a L-Phe) possuem uma característica em comum, que é o fato de utilizarem o mesmo transportador (LAT1) para atravessarem a BBB. Este fato faz com que haja uma competição entre eles ao longo da barreira hematoencefálica. Assim sendo, quando se aumenta a concentração de LNAA no sangue, há uma diminuição da entrada de L-Phe para o cérebro. Existe um mecanismo similar ao longo do trato gastrointestinal, em que a L-Phe é menos absorvida no intestino, quando existe uma grande suplementação de LNAA (1). Na realidade, em ensaios efetuados em doentes PKU, aos quais foi administrado LNAA durante duas semanas, verificou-se uma redução significativa na concentração de L-Phe no sangue (LNAA competem com o transporte de Phe no trato gastrointestinal). Estes dados sugerem que a adição dos LNAA na dieta de doentes PKU pode reduzir os níveis sanguíneos de L-Phe (82).

A suplementação oral com LNAA contribui também para uma melhoria do funcionamento neuropsicológico de doentes PKU, tendo em conta que diminui as concentrações de L-Phe no cérebro. Dependendo da composição do suplemento, da dosagem, da via de administração e da duração do período de suplementação, assim serão os resultados conseguidos com o tratamento (83,84).

Apesar das vantagens que a suplementação com LNAA apresenta, a eficácia da mesma na redução dos níveis séricos de L-Phe ainda é limitada e necessita de estudos adicionais. Os ensaios efetuados até à data promoveram a avaliação dos LNAA apenas para tempos curtos e com número limitado de doentes utilizando doses variáveis (250-1000 mg de LNAA/kg/dia) e diferentes formulações(85).

Ainda não se sabe o quão vantajoso os LNAA são em relação às preparações de aminoácidos atuais e parece improvável que os LNAA sejam prescritos como tratamento único, sem restrições de L-Phe, pelo menos durante a infância ou em mulheres grávidas com PKU. No entanto, pode ser uma abordagem útil para adultos, na medida em que melhora a clínica dos indivíduos incapazes de seguir a dieta restrita em L-Phe, além de melhorar as funções executivas dos mesmos (1,84,86).

4.2. Terapêuticas em desenvolvimento

4.2.1. Terapia Enzimática

4.2.1.1. PEG-PAL

Existem algumas variantes da PKU, como por exemplo, a hiperfenilalaninemia não-PKU e as formas mais graves da PKU clássica, que tendem a não responder ao tratamento com BH₄. Esta ausência de resposta à BH₄ deve-se possivelmente à inexistência de atividade residual de hPAH suficiente para ser recuperada. Ao contrário do tratamento com BH₄, a resposta a uma terapia enzimática não dependerá do genótipo do doente PKU, apresentando assim uma vantagem para os indivíduos que não respondem ao tratamento com BH₄ (3).

A terapia enzimática para PKU apresenta-se como uma opção terapêutica para redução dos níveis séricos de L-Phe, através da introdução de enzimas metabolizadoras daquele aminoácido, sendo assim capazes de alterar o fenótipo metabólico da PKU, independentemente do genótipo (84). Esta terapia pode ser feita tanto por reposição enzimática com a PAH como por substituição com a fenilalanina amónia liase (PAL; E.C.4.3.1.5) (87). Na Figura 6 é possível observar que a PAL catalisa a desaminação da L-Phe em amónia livre e ácido trans-cinâmico. Além disso, pode atuar como um substituto da hPAH que se encontra deficitária, uma vez que converte o excesso de L-Phe sistémica nos produtos acima referidos (84,88).

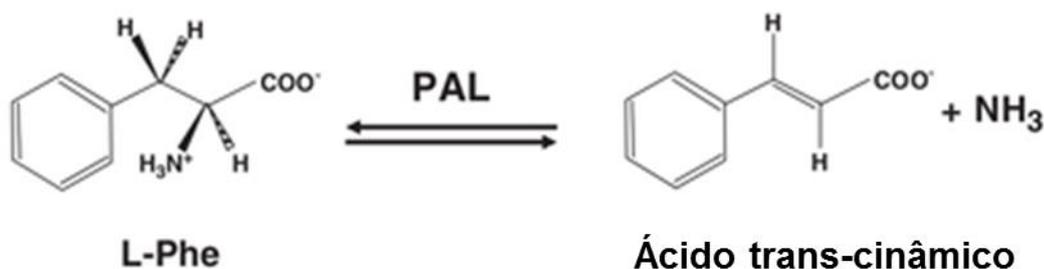


Figura I.6. Reação catalisada pela fenilalanina amónia liase (PAL). Esta enzima ao degradar a L-Phe dá origem a ácido trans-cinâmico e amónia (72).

Os primeiros estudos envolvendo a PAL foram efetuados no início dos anos 90. Foram já ensaiadas apresentações orais e implantação subcutânea de biorreatores contendo PAL, mas ambas as aproximações não mostraram resultados satisfatórios (89–91). Em contrapartida no modelo animal da PKU clássica (ratos *Pah*^{Enu2}) injeções subcutâneas da enzima PAL eram eficazes na correção completa das concentrações sanguíneas de L-Phe e, com injeções semanais da enzima, era possível manter este efeito por até um ano (92). Para melhorar a estabilidade da enzima esta foi peguilada com polietileno glicol (PEG-PAL). Esta formulação encontra-se já em ensaios clínicos de Fase III em humanos (injeção subcutânea em dose única). Durante estes ensaios clínicos observou-se uma redução nos níveis sanguíneos de L-Phe quando foi usada a dose mais elevada testada. No entanto, a administração de PEG-PAL tem aumentado a resposta imunitária aquando de administrações repetidas (1).

4.2.2. Probióticos

Por definição os probióticos são "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (93). O *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* (LAB) são os microrganismos mais comumente usados como probióticos (94).

Devido ao fato das doenças metabólicas serem potenciais causadoras de acumulação de metabolitos a níveis tóxicos, o que potencialmente resulta num dano para o organismo, têm sido efetuados estudos utilizando probióticos geneticamente modificados e que expressam enzimas metabólicas (6).

A PKU é um exemplo de doença metabólica que pode beneficiar com a utilização de probióticos para a entrega da enzima PAL no intestino (6). Por já ter sido expressa em organismos geneticamente modificados, a PAL foi administrada oralmente em microrganismos em modelos de ratos *Pah*^{Enu2}. O primeiro estudo realizado (1999), mostrou que a administração oral de PAL expressa em *E. coli* geneticamente modificada em ratos *Pah*^{Enu2} levou a uma redução de 31% nos níveis plasmáticos de L-Phe após uma hora, com posterior redução de 44%, observada após duas horas (87,95–98). Apesar do

observado, sabe-se que a *E. coli* manipulada pode ter consequências nefastas, uma vez que, em seres humanos, a interação com o seu equivalente *wild type* pode torná-la patogénica ou então alterar a composição da microbiota do lúmen (6). No entanto, a *E. coli* coloniza preferencialmente o intestino grosso e a maioria dos aminoácidos provenientes da dieta, incluindo a L-Phe, são absorvidos na região distal do intestino delgado (99).

Resultados obtidos num outro estudo mostraram uma diminuição significativa nos níveis de L-Phe num grupo de ratos portadores de hiperfenilalaninemia tratados com PAL expressa em *L. lactis* (formulação oral), em relação ao grupo controlo, após nove dias de tratamento. É de salientar que a *L. lactis*, exerce os seus efeitos benéficos, principalmente no intestino delgado. Posteriormente a PAL expressa em *L. lactis* foi administrada oralmente a ratos com hiperfenilalaninemia (95). Por terem sido utilizados animais que não representam um modelo de PKU ortólogo humano, a redução significativa de L-Phe obtida nos ratos tratados neste estudo terão que ser confirmados em modelos ortólogos de PKU humana, como os ratos *Pah^{enu2}* (6,95).

Apesar da exigência de mais estudos para a avaliação da segurança e eficácia dos probióticos geneticamente modificados, estes parecem ser úteis como terapia alternativa para a PKU, permitindo o abrandamento da dieta restrita em L-Phe (6).

4.2.3. Terapia Génica

Ao longo das duas últimas décadas, diferentes grupos de investigação têm focado os seus estudos na terapia génica como tratamento para a PKU, resultando em progressos importantes nomeadamente na utilização de vetores derivados de adenovírus direcionados para o fígado (100).

O rAAV é um vetor recombinante associado ao adenovírus que mostrou produzir uma resposta imune menor do que os vetores utilizados nos ensaios iniciais, para além de desencadear menos efeitos colaterais, o que permite o sucesso do tratamento a longo prazo. Na realidade, em modelos de ratos *Pah^{Enu2}*, foi possível observar uma correção da hiperfenilalaninemia durante o período de um ano com a terapia génica direcionada para o fígado (72,100,101). Contudo, uma correção definitiva da atividade da hPAH não é possível, pois o genoma do vetor não se integra no DNA dos hepatócitos, sendo que haverá sempre eliminação de genomas do vetor episomal AAV devido à regeneração dos hepatócitos (84).

Através de estudos, também realizados em modelos de ratos Enu, foi possível demonstrar que a terapia génica pode ter como alvo tecidos não-hepáticos, como por exemplo o músculo esquelético (102). Por não sofrer divisão celular contínua, o músculo apresenta-se como um órgão alvo de interesse para a terapia génica e, além disso é mais facilmente acessível (72).

Outra abordagem existente na terapia génica é a utilização de antibióticos aminoglicosídeos para a leitura sequencial *in vitro* de mutações *nonsense* da PAH. A utilização destes antibióticos, tais como a gentamicina e G-418, tem como objetivo promover a leitura sequencial de codões STOP que são inseridos precocemente através da presença de uma mutação *nonsense* (aproximadamente 10% dos doentes PKU), resultando assim na produção da proteína (84,103).

A eficácia dos aminoglicosídeos foi avaliada apenas num sistema de expressão *in vitro* em duas linhas celulares de mamífero (COS-7 e 293 HEX), pelo que não se conseguiu determinar ainda se o nível de leitura no fígado é suficiente para restaurar a tolerância à L-Phe. É de realçar que nenhum dos modelos de ratos *Pah^{Enu2}* e *Pah^{Enu1}* (PKU moderada) é portador de uma mutação *nonsense* pelo que os ensaios nos modelos animais disponíveis não podem ser efetuados (84).

4.2.4. PAH-tag

Como já foi visto anteriormente, novas abordagens para o tratamento da PKU têm sido sugeridas nos últimos anos, incluindo a terapia gênica e a terapia de substituição enzimática, utilizando a enzima PAL derivada de levedura, que se converte num metabolito inócuo à Phe. Por permanecerem ainda fora da prática clínica, estas novas ideias, apesar de serem promissoras, deixam a confiança limitada à dieta restrita em Phe, que é o único tratamento utilizado para a PKU atualmente (87,100,104,105).

Para além das abordagens já referidas, outras igualmente recentes e promissoras têm surgido no mundo da investigação. Uma delas assenta na utilização dos mecanismos de *delivery* de proteínas quando estas se encontram associadas a pequenos péptidos (proteínas de fusão) conhecidos como domínios de transdução proteica. Estes pequenos péptidos facilitam a entrada das proteínas de fusão através das membranas de uma grande variedade de células eucarióticas (105).

Os domínios de transdução proteica são considerados ferramentas promissoras para *delivery* de proteínas, embora não se conheça ainda o verdadeiro mecanismo de ação pelo qual ocorre o processo de internalização. Isto deve-se ao fato do processo de internalização não envolver nem endocitose mediada por recetor (dependente de clatrina) nem a fagocitose (105).

Entre os vários domínios de transdução proteica que existem, o mais estudado até a data é o TAT (transativador da transcrição do vírus HIV). Foi já comprovado que as proteínas de fusão com TAT são eficientemente entregues em células em cultura, tecido intacto e tecidos vivos (quando injetados em ratos). Adicionalmente, as proteínas entregues por este péptido mantêm a sua atividade após a internalização (105–107).

Com base em estudos sobre a farmacocinética da proteína de fusão TAT β -galactosidase, observou-se que o fígado é o órgão-alvo principal para *delivery* desta proteína de fusão. No caso da hPAH, o órgão alvo é o fígado o que implica que a hPAH humana pode ser fundida com TAT para construção de uma proteína de fusão direcionada para o fígado e potencialmente candidata para o tratamento tanto da PKU, como de outras doenças metabólicas raras (105).

4.2.5. Chaperones Farmacológicos

Os chaperones farmacológicos têm como função induzir a estabilidade conformacional de proteínas alvo *misfolded* por meio de interações específicas e reversíveis a estas mesmas proteínas, aumentando, deste modo a disponibilidade de espécies de proteínas funcionais na célula (108,109).

Por norma, as pequenas moléculas que atuam como chaperones farmacológicos deverão obedecer aos seguintes critérios (110): (i) a proteína alvo deve ter uma mutação que a desestabilize, mas não que a inative; (ii) por se ligarem com alta afinidade, os chaperones farmacológicos podem ser usados em baixas concentrações; (iii) os inibidores específicos funcionam melhor do que os estabilizadores não específicos; (iv) os chaperones farmacológicos são eficazes se uma pequena quantidade de proteína poder fazer uma grande diferença (*threshold*).

Por definição os ligandos naturais de uma proteína também podem atuar como chaperones farmacológicos quando se ligam à proteína alvo. Estes ligandos naturais incluem cofatores, agonistas e antagonistas, inibidores competitivos e ligandos de proteínas (108,111). Um caso típico é a utilização da BH₄ (cofator da hPAH) como chaperone farmacológico para estabilização de variantes *misfolded* da hPAH (110,112–114). A resposta de BH₄ foi analisada no modelo de ratos *Pah^{enu1}* (PKU moderada) onde foi verificado que a perda da função da hPAH foi consequência da perda da própria proteína, e isto é, consequência de *misfolding*, agregação e degradação rápida da enzima. Também se observou que a BH₄ promove uma estabilização conformacional capaz de atenuar esta tríade, levando ao aumento dos níveis intracelulares de uma forma de hPAH funcional, capaz de resgatar o fenótipo bioquímico e a função da enzima *in vivo* (110).

A identificação de derivados de BH₄ ou de novas moléculas que também estabilizem a hPAH surge como objetivo para o desenvolvimento de novos chaperones farmacológicos com propriedades farmacêuticas mais favoráveis no que diz respeito à síntese, biodisponibilidade e estabilidade (110).

Através de uma abordagem integrada de descoberta de fármacos utilizando num primeiro passo uma triagem virtual estrutural conseguiu-se identificar, a partir de uma biblioteca química, 84 moléculas candidatas com potencial para se ligarem ao sítio ativo da hPAH. De entre aquelas moléculas, duas (benzil hidantoína e 6-amino-5-benzilamino-uracilo) apresentaram capacidade para estabilização da hPAH, aumentando substancialmente a oxidação da L-Phe *in vivo* e reduzindo consequentemente as concentrações séricas de Phe nos ratos *Pah^{enu1}* (115).

II. OBJETIVOS

A PKU é um dos exemplos mais conhecidos de doenças metabólicas hereditárias. Os níveis elevados de L-Phe, considerados neste caso como o agente tóxico, são responsáveis pelo aparecimento de danos cerebrais irreversíveis. Apesar disso, é de realçar que a PKU foi a primeira doença metabólica hereditária em que foi instaurado o rastreio neo-natal e onde foi possível efetuar o tratamento através da instauração de uma restrição dietética apropriada.

As doenças hereditárias do metabolismo, como a PKU, surgem como resultado de mutações em genes que codificam enzimas chave das principais vias metabólicas. Estas alterações resultam em défices enzimáticos uma vez que podem originar proteínas com capacidade catalítica diminuída ou mesmo a ausência da sua expressão. Neste sentido, uma das abordagens mais promissoras para o tratamento deste tipo de patologia reside na reposição das enzimas deficitárias (terapia enzimática de reposição; ERT). No entanto, embora apresentem um elevado potencial como agentes terapêuticos, uma vez que apresentam uma elevada especificidade e uma elevada ação em baixas concentrações, devido à natureza complexa e à instabilidade estrutural que apresentam as proteínas têm tido uma aplicação muito limitada no tratamento de doenças humanas.

Atualmente a dieta restrita em proteína ainda é considerada a abordagem terapêutica mais eficaz para a maioria dos doentes PKU. No entanto, e como referido anteriormente, esta aproximação dietética é, na maioria dos casos, altamente restritiva podendo conduzir a deficiências nutricionais, não aderência com conseqüente agravamento das alterações neurológicas, e um fator de exclusão social para o doente e sua família.

Os grupos *Metabolism and Genetics* (Met&Gen) e *Nanostructured Systems for Overcoming Biological Barriers* (Nano2B) do *Research Institute for Medicines* (iMed.Ulisboa), têm vindo a dirigir os seus esforços no sentido do desenvolvimento de uma nova alternativa para o tratamento da PKU utilizando ERT por administração da hPAHwt. Uma vez que foi já possível obter uma forma estável da hPAHwt a qual foi encapsulada em nanopartículas (NPs) de quitosano (CS) propomos dar continuidade a este estudo.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia das formulações de NPs desenvolvidas através da realização de ensaios de *uptake* em células apropriadas nomeadamente células HEK-293T.

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 que o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) foi adquirido à Sigma-Aldrich.

Para a determinação da atividade enzimática, além do tampão Na-Hepes utilizou-se o substrato L-Phe (Sigma), a catalase (Roche), o sulfato de amônio ferroso e o ditioneitol (DTT), estes últimos adquiridos à Merck; a tetrahidrobiopterina (BH₄) foi adquirida à Sigma-Aldrich.

O quitosano (CS) de baixa massa molecular (50-190 kDa), com um grau de desacetilação de 91.8% e o tripolifosfato de sódio (TPP) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Os agentes modificadores das NPs, designados por agentes 1, 2, 3, 4 e 5 por questões de confidencialidade, foram adquiridos à Soliance (agentes 1, 2 e 3), Roquette Corporate (agente 4) e Sigma-Aldrich (agente 5).

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*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139 (ara-leu)*7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*) e o sistema de expressão procariota pTrcHisB, ambos provenientes da Invitrogen. O sistema de expressão procariota pTrcHis encontra-se previamente validado no laboratório. O cDNA hPAH (GenBank U49897) também se encontrava já clonado no local *Bam*HI do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vetor de expressão procariota pTrcHisB (Invitrogen) (116). Este vetor apresenta a montante do MCS (Figura em Anexo): (i) o promotor *trc* (*P_{trc}*), 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, utilizaram-se duas linhas celulares, as células HEK-293T (*human embryonic kidney epithelial cell line*, ATCC CRL-11268) e células HepG2 (*human hepatocellular carcinoma cell line*, ATCC HB-8065).

2. Métodos

2.1. Expressão da Proteína Recombinante

Para proceder à expressão das proteínas hPAH na forma selvagem (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 (O.N.), a 37°C, após espalhamento em meio LB sólido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,17 M, pH 7, agar 1,5%) contendo Amp (LB/Amp), sempre numa concentração de 50 µg/mL. Dos transformantes obtidos, foi selecionada uma colónia bem isolada, para inocular 5 mL de meio LB líquido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,17 M, pH 7) contendo Amp.

Após incubação com agitação durante a noite, a 37°C, a suspensão bacteriana foi diluída para 1 L (1:200) no mesmo meio de cultura, tendo sido colocada em agitação constante (\approx 200 rpm; agitador orbital Selecta Rotabit 3000974) até apresentar uma absorvância a 600 nm de \approx 0,6 ($A_{600\text{ nm}}$). Neste momento, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG, sendo também adicionado 0,1 mM de sulfato de amónio ferroso. Após um período de incubação de 4 horas, a 37°C, o sedimento bacteriano foi obtido por centrifugação a 3220xg (*Eppendorf centrifuge 5810 R*), durante 15 minutos a 4°C. O sedimento celular foi armazenado a -20 °C por períodos nunca superiores a três meses, até posterior utilização.

Para se proceder à lise celular, o sedimento obtido foi ressuspenso em tampão de lise (50 mM fosfato de potássio, pH 7,8, 300 mM NaCl; 10% de glicerol) contendo lisozima (1 mg/mL) e PMSF (1 mM) na proporção de 1 L cultura/10 mL de tampão de lise. Após incubação, durante 30 minutos, a 4°C, as células foram lisadas num sonicador VibraCell (*Sonics Materials*), através da aplicação de 3 ciclos (*duty free cycle* de 50%) de 60 segundos cada. Entre cada ciclo o lisado celular foi mantido a 4°C, durante 20 segundos, para permitir o arrefecimento da amostra. A suspensão obtida foi centrifugada a 12800xg, durante 40 minutos, a 4°C, para separar os resíduos membranares da fração citoplasmática solúvel. Ao sobrenadante obtido (fração solúvel) foi adicionado imidazol e β -mercaptoetanol numa concentração final de 10 mM em cada.

2.2. Processos cromatográficos para purificação das formas tetraméricas da proteína recombinante

2.2.1. 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 (3x 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 contato com o 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 imidazol (2x 5 mL); (ii) 50 mM imidazol (2x 5 mL) e; (iii) 75 mM de imidazol (1x 5 mL). A eluição das proteínas de fusão foi efetuada pela passagem de seis frações de 500 µL de tampão de lise contendo 250 mM de imidazol.

2.2.2. Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC)

A separação das formas oligoméricas da proteína hPAHwt foi efetuada por 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 um detetor de UV (λ 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 (Na-Hepes 20 mM, pH 7,0, 200 mM NaCl) o qual foi bombeado a um caudal de 0,7 mL/min.

Como marcador de massas moleculares (MW) 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 (MWCO de 50 kDa; Millipore) até obtenção de uma concentração de \approx 9 mg/mL.

2.3. Quantificação Proteica

A concentração das proteínas recombinantes foi determinada colorimetricamente por dois métodos de quantificação proteica, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como solução padrão. Um dos métodos utilizados foi o método de Bradford (117), onde foi utilizado o reagente de Bradford (Bio-Rad Protein assay; Bio-Rad). As leituras de absorvência foram efetuadas a um λ de 595 nm num espectrofotómetro Shimadzu (modelo UV1800). No método do ácido bicinconínico (BCA) (118), o reagente utilizado foi o BCA (Sigma) e as leituras foram efetuadas a um λ de 562 nm num espectrofotómetro Shimadzu. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.4. Análise por Eletroforese (SDS-PAGE)

Quando necessário, a proteína em estudo foi analisada por separação eletroforética em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) segundo o método descontínuo de Laemmli (119). Foi utilizada uma concentração de 10% de acrilamida/bisacrilamida (30% T e 2,6% C; Bio-Rad) no gel de separação e um tampão constituído por 0,375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS. O gel de concentração foi preparado de modo a conter acril/bisacrilamida a 4% e o tampão constituído por 0,125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS. O tampão de eletroforese utilizado foi constituído por Tris base 62,5 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; 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 da proteína em estudo foi determinada por comparação com o perfil eletroforético do marcador de massa molecular 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. O grau de pureza e a avaliação da proteína hPAHwt nos ensaios de libertação foi determinado por digitalização dos géis obtidos seguidos de análise densitométrica com recurso ao *software* de processamento gráfico *ImageJ* (120).

2.5. Determinação da Atividade Enzimática

A avaliação da atividade enzimática específica da hPAHwt foi efetuada por quantificação da tirosina formada 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 Martinez *et al.* (50), com algumas modificações. Brevemente, a reação enzimática decorreu na presença de oxigénio atmosférico, à temperatura de 25°C, num volume reacional de 200 μL contendo tampão Na-Hepes 100 mM; pH 7,0; 0,1 mg/mL de catalase; 1 mM de L-Phe e 5 μg de hPAHwt (tetrâmeros), de acordo com Leandro *et al.*, (116). Após a pré-ativação pelo substrato (durante 4 minutos) foi adicionado sulfato de amónio ferroso (100 μM), tendo a mistura reacional sido incubada por mais 2 minutos. Findo este tempo deu-se início à reação enzimática pela adição de 75 μM de BH_4 contendo 5 mM DTT (Merck). Ao fim de 1 minuto, a reação foi parada pela adição de 200 μL da mistura etanol/ácido acético (98:2), sendo seguidamente centrifugada a 4 °C, durante 5 minutos, a 12000xg. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C até posterior análise. Os ensaios enzimáticos foram todos realizados em triplicado.

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/ H_2O (20/80) bombeada com um caudal de 1 mL/min, de acordo com o método descrito por Kand'ár *et al.* (121).

Todas as amostras foram injetadas em duplicado. A quantificação da L-Tyr formada foi efetuada utilizando uma curva de calibração apropriada (0,5 a 100 μM em L-Tyr).

2.6. Caracterização 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*) utilizando o sistema de PCR em tempo real C1000 *Touch thermal cycler* (Bio-Rad) equipado com um módulo ótico reacional CFX96.

Os ensaios foram efetuados em placas de PCR de 96 poços num volume final de 50 μL contendo *SYPRO-Orange* (Invitrogen) numa concentração final de 2,5x e hPAHwt a 0,1 mg/mL. A intensidade de fluorescência foi medida através do canal FRET, de 25 a 70°C (patamar de 1 seg cada 0,2 °C). A partir das curvas de desnaturação obtidas foram determinados os T_m 's recorrendo ao *software* GraphPad Prism 6 v6.01, ajustando os valores obtidos experimentalmente a uma equação bifásica.

2.7. Preparação das Nanopartículas (NPs)

A preparação de NPs foi efetuada recorrendo a protocolos de gelificação iónica, previamente descritos (122,123), onde foram introduzidas algumas modificações. As soluções *stock* de CS e TPP foram preparadas em concentrações de 10 mg/mL em 1% (v/v) de ácido acético e água MilliQ, respetivamente. Adicionalmente, foram utilizadas soluções de agentes modificadores das NPs, com o intuito de verificar se as mesmas podiam melhorar as propriedades da proteína e as características de encapsulação. Os agentes modificadores utilizados foram os agentes 1, 2, 3, 4 e 5 em que a concentração

das soluções *stock* do agente 1, 2 e 3 se encontravam a 0,25 mg/mL e dos agentes 4 e 5 a 10 mg/mL. As soluções *stock* de TPP e dos restantes agentes modificadores foram diluídas em tampão SEC para as concentrações desejadas. A concentração da proteína hPAHwt nas formulações foi sempre de 250 µg/mL (concentração final). Este valor encontra-se otimizado por trabalhos prévios efetuados no laboratório (48).

Para preparação das NPs de quitosano (NP-CS) a solução de CS a 1 mg/mL foi acertada a pH 6,0 tendo havido formação imediata de NPs após a adição da solução de TPP numa proporção previamente otimizada de 5:1 (CS:TPP). Para a preparação das NPs de CS contendo a proteína (hPAHwt encapsulada), foi efetuada uma incubação prévia do TPP com os tetrâmeros da hPAHwt.

Nas formulações onde foram utilizados os agentes modificadores (Agm), estes foram incubados previamente com o TPP e a proteína hPAHwt, em concentrações apropriadas de modo a manter a relação de volume e as concentrações finais desejadas. Foram assim preparadas diferentes formulações designadas por NP-CSAgm1, NP-CSAgm2, NP-CSAgm3, NP-CSAgm4, NP-CSAgm5 onde foram utilizados os agentes modificadores 1, 2, 3, 4 e 5 respetivamente. Na preparação das NP-CSAgm4, NP-CSAgm5 foi utilizada uma proporção previamente otimizada de 2:1 (CS:Agm), enquanto para as NP-CSAgm1, NP-CSAgm2, NP-CSAgm3, foi testada a proporção CS:Agm de 200:1 (carga baixa; NP-CSAgm_{cb}) e de 66:1 (carga alta; NP-CS-Agm_{ca}).

2.8. Caracterização das NPs

2.8.1. Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho médio das NPs foi determinado através da técnica de dispersão dinâmica de luz (*dynamic light scattering*; DLS) e o potencial zeta por dispersão de luz eletroforética, utilizando o sistema *Zetasizer Nano-S* (Malvern Instruments). As amostras foram diluídas em água MilliQ previamente filtrada (filtro 0,45 µm; Millipore). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

2.8.2. Eficiência de encapsulação

A percentagem de proteína encapsulada foi calculada indiretamente através da quantificação da proteína presente no sobrenadante obtido após deposição das NPs por centrifugação a 40,000×g durante 30 minutos a 4°C. Nestes ensaios a determinação da concentração proteica foi efetuada recorrendo ao método de BCA. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada usando a seguinte equação (equação III.1):

$$EE (\%) = \frac{[hPAH]_{total} - [hPAH]_{sob}}{[hPAH]_{total}} \times 100$$

onde $[hPAH]_{total}$ representa a quantidade total de hPAHwt adicionada em cada ensaio de encapsulação e $[hPAH]_{sob}$, a quantidade de proteína presente no sobrenadante após a deposição das NPs. Nestas condições o parâmetro EE corresponde à carga em proteína das NPs.

2.9. Ensaios de estabilidade

Para efetuar os ensaios de estabilidade as formulações foram mantidas a 4°C e a tempos

específicos (0, 30', 60', 1 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 1 semana e 2 semanas) e foram retiradas alíquotas que foram centrifugadas a 40,000×g durante 30 minutos a 4°C. A proteína não encapsulada, removida após a centrifugação, foi quantificada (método do BCA). Em paralelo foi feita a análise das amostras por SDS-PAGE. Os ensaios de quantificação proteica foram efetuados em triplicado e a análise por SDS-PAGE em duplicado.

A hPAHwt não formulada (hPAHwt-*naked*), foi diluída em tampão de modo a obter a mesma concentração das formulações de NPs. Estas amostras foram congeladas e utilizadas como controlo interno sempre que era analisado uma amostra dos ensaios de estabilidade (diferentes tempos).

2.10. Cultura de células de mamíferos na presença de NPs

Para os ensaios celulares foram utilizadas as células HEK-293T (*human embryonic kidney epithelial cell line*, ATCC CRI-11268) e células HepG2 (*human hepatocellular carcinoma cell line*, ATCC HB-8065). As culturas celulares foram efetuadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 2 mM L-glutamina, a uma concentração adequada para o crescimento exponencial das células durante o tempo do ensaio.

No dia anterior ao ensaio inocularam-se as células em *T-flasks* de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura (2x10⁵ células/mL) e estas foram incubadas a 37°C, com controlo de humidade e 5% CO₂ (Nuair NU4750E). No dia seguinte, o meio de cultura foi removido tendo sido adicionado 1 mL de meio completo fresco e 500 µL de amostras a testar: hPAHwt *naked* e formulações de NPs. Após 1, 2, 4, 6 e 14h de incubação o meio de cultura (“sobrenadante do meio de cultura”) foi recolhido e preservado a 4°C, enquanto que as células foram tripsinizadas com 500 µL de TripLE Express (Dissociation reagent, Life Technologies). As células separadas por centrifugação a 4°C, 100xg (Beckman 64R), 5 min, foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 frio. O sedimento celular foi retomado em 100 µL de tampão PBS contendo 200 µM PMSF. As células foram lisadas por passagem repetida (≈ 20 vezes) numa agulha de seringa fina (25g) e este lisado celular foi designado de fração “lisado total”. Após centrifugação a 12000 rpm, durante 20 min a 4°C foi obtido um sedimento (fração insolúvel) designado por “sedimento do lisado” e um sobrenadante (fração solúvel) designado por “sobrenadante do lisado”.

O “sobrenadante do meio de cultura” e as frações “lisado total”, “sedimento do lisado” e “sobrenadante do lisado” foram preservados a 4°C até serem analisados por Western Blot após separação por SDS-PAGE.

2.11. Deteção proteica por análise de *Western Blot*

Para execução da técnica de *Western Blot*, após separação electroforética, o gel foi equilibrado durante 15 min no tampão Towbin (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol pH 8,3) (124). No processo de transferência foi utilizada uma membrana de difluoreto de polivinidileno (PVDF) Amersham Hybond-P (GE Healthcare) previamente equilibrada de acordo com as instruções do fabricante, e o sistema *semidry V20* (Sci-Plas). A transferência decorreu durante 90 minutos, tendo sido aplicada uma corrente de 30 mA (com uma voltagem nunca superior a 20 V). A monitorização da transferência foi feita pela visualização da passagem do marcador pré-corado para a membrana, através da coloração do gel transferido (BlueSafe). Quando não processadas imediatamente, as membranas foram armazenadas a 4°C.

As proteínas imobilizadas foram visualizadas por imunodeteção utilizando o anticorpo primário anti-His (Abcam) e como anticorpo secundário o Anti-Mouse IgG-HRP (Bio-Rad), ambos numa diluição de 1:5000. Assim, após efetuada a transferência, lavou-se a membrana por três vezes com

tampão TBS (140 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4), contendo 0,1% Tween-20 (TBS-T), durante 5 minutos cada. De modo a evitar hibridações inespecíficas, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio (5% leite magro em TBS/T), durante 1 hora. Findo este tempo, efetuaram-se 3 lavagens, de 5 minutos cada, com TBS/T, tendo-se então procedido à incubação, durante a noite, a 4°C, da membrana com o anticorpo primário, o qual foi diluído (1:5000) em tampão de bloqueio. Posteriormente a membrana foi lavada por 3 vezes, durante 5 minutos com TBS/T e incubada durante uma hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário, o qual tinha sido também previamente diluído (1:5000) em tampão de bloqueio. Após a incubação com o anticorpo secundário a membrana foi novamente lavada por 3 vezes, durante 5 minutos com TBS/T.

A visualização das proteínas marcadas foi feita com o sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad), utilizando os reagentes de revelação ECL Prime Western (GE Healthcare), na proporção de 0,1 mL/cm² de membrana.

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 100 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 cromatografia de afinidade com iões metálicos (IMAC) e um segundo passo onde se utilizou uma cromatografia de exclusão molecular (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 (6x 500 µL de tampão de eluição) de modo a poder agilizar o processo. Como pode ser observado na Figura IV.1, as duas últimas frações de eluição não apresentam uma quantidade significativa de hPAHwt pelo que recolhendo apenas as quatro primeiras frações (volume final 2 mL) é possível obter uma amostra menos diluída e num volume possível de ser aplicado diretamente na coluna SEC.

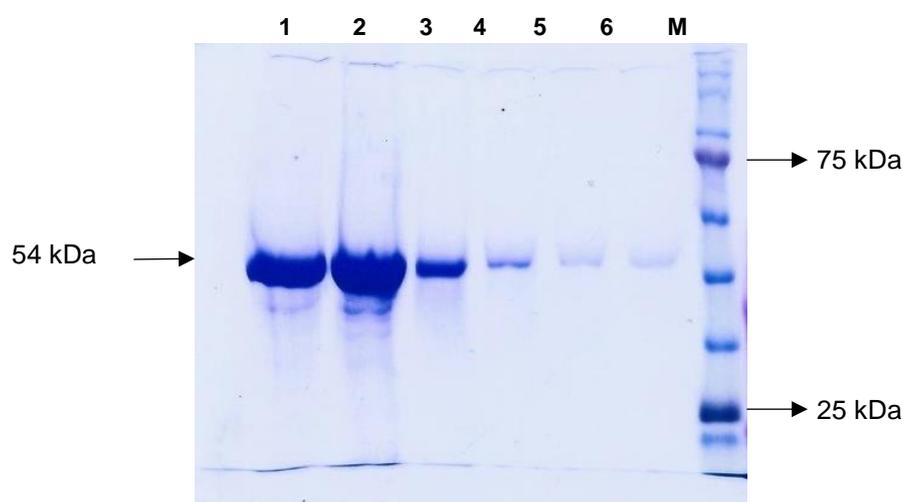


Figura IV.1 - Análise por SDS-PAGE do perfil de eluição da proteína hPAHwt após purificação por IMAC utilizando 6x 500 µl de solução tampão de lise contendo 250 mM de imidazol - (1 a 6). (M) marcador de massas moleculares pré-corado (*NzyColour protein marker II*; Nzytech).

Através da cromatografia de exclusão molecular foi possível o isolamento das formas tetraméricas, como pode ser verificado na Figura IV.2 onde é apresentado o perfil cromatográfico obtido para a proteína recombinante.

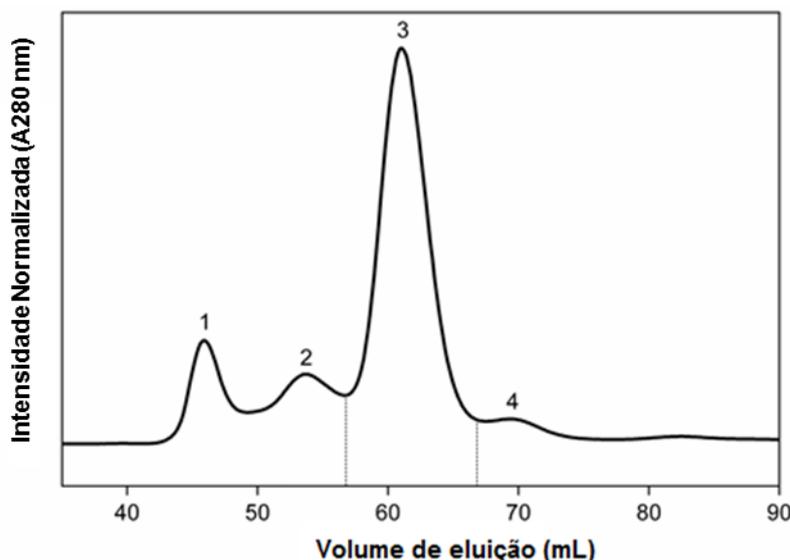


Figura IV.2 – Perfil cromatográfico da proteína recombinante hPAHwt, obtido por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Os números indicam os volumes de eluição das formas agregadas (1) (44-46 mL), octâmeros/hexâmeros (2) (55-57 mL), tetrâmeros (3) (58-68 mL) e dímeros (4) (70-71 mL).

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.2, pico 1); octâmeros/hexâmeros (≈ 440 kDa; Ve 55-57 mL; Figura IV.2, pico 2), tetrâmeros (≈ 220 kDa; Ve 58-68 mL; Figura IV.2, pico 3) e dímeros (≈ 110 kDa; Ve 70-71 mL; Figura IV.2, pico 4). Como pode ser observado na Figura IV.2, a hPAHwt foi eluída maioritariamente na sua forma tetramérica (60.4%), com uma pequena porção 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 SEC, as frações correspondentes aos tetrâmeros (indicado a tracejado na Figura IV.2) foram concentradas até atingir uma concentração proteica de 7-9 mg/mL.

2. Caracterização funcional e estrutural da hPAHwt

A atividade enzimática específica e estabilidade térmica foram determinadas segundo as condições anteriormente referidas (Material e Métodos). Os valores obtidos com estes ensaios estão apresentados na Tabela 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 valores encontram-se dentro dos valores descritos na literatura para a proteína recombinante (114,125), indicando que a hPAHwt produzida e purificada pelo sistema adotado no laboratório permite obter uma proteína funcional.

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.3, 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 (114,126).

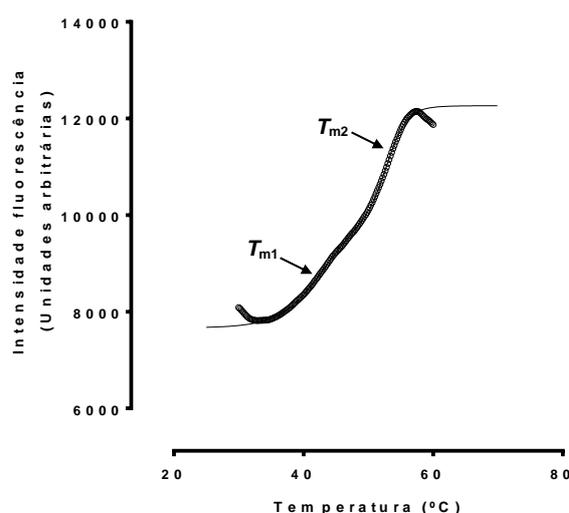


Figura IV.3 – Perfil de estabilidade térmica da proteína recombinante hPAHwt obtido por Fluorimetria diferencial de varrimento (DSF). O perfil bifásico da curva de desnaturação permite determinar duas transições associadas ao T_{m1} e T_{m2} (indicados). (O) Valores adquiridos no ensaio; (—) ajustamento da curva (equação bifásica) aos pontos experimentais. O ensaio foi efetuado em triplicado.

Utilizando uma equação bifásica os valores calculados de T_{m1} e T_{m2} , para hPAHwt foram de $47,2 \pm 0,3$ °C e $54,3 \pm 0,1$ °C, respetivamente. Estes valores encontram-se de acordo com os descritos na literatura (114,126).

Tabela IV.1 – Análise das propriedades enzimáticas e estabilidade térmica da proteína recombinante hPAHwt.

	Atividade enzimática ^(a) (nmol Tyr min ⁻¹ mg ⁻¹)	Ativação pela L-Phe ^(b)	Estabilidade Térmica ^(c) (°C)	
			T_{m1}	T_{m2}
hPAHwt	4430 ± 351	3,2 ± 0,1	47,2 ± 0,3	54,3 ± 0,1

Notas: (a) Ensaio enzimático realizado em condições padrão (1 mM L-Phe; 75 μM BH₄, 25 °C). Os valores apresentados representam o valor médio ± desvio padrão; (b) Atividade enzimática determinada com pré-incubação com L-Phe (4 min) nas mesmas condições padrão; (c) Valores da temperatura de desnaturação (T_m) para a proteína recombinante hPAHwt; os valores apresentados representam o valor médio ± desvio padrão. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

3. Caracterização das nanopartículas

3.1. Eficiência de encapsulação

A determinação da concentração de proteína hPAHwt recuperada no sobrenadante obtido após preparação das NPs permitiu-nos determinar a eficiência de encapsulação (EE). Como pode ser observado pela análise da Figura IV.4, a eficiência de encapsulação para as diferentes formulações variou entre $75,0 \pm 1,7\%$ para a NP-CSA_{gm2ca} e $83,7 \pm 0,9\%$ para a NP-CS. De um modo geral podemos constatar que a EE (carga em proteína das NPs) não variou consideravelmente para as diferentes formulações testadas, tendo sido obtido um valor médio de $78,6 \pm 2,8\%$.

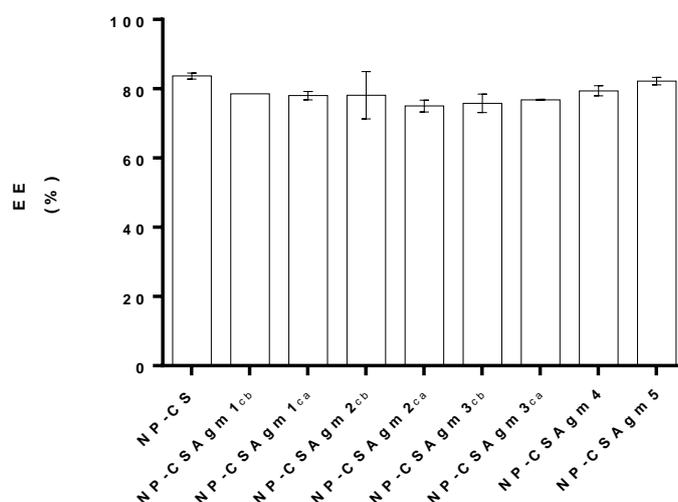


Figura IV.4 – Eficiência de encapsulação (carga em proteína das NPs) da proteína hPAHwt nas diferentes formulações testadas. A quantidade de proteína recuperada no sobrenadante, após centrifugação das NPs, foi determinada pelo método do BCA. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Os resultados obtidos sugerem que relativamente às formulações onde foram testadas cargas baixas e cargas altas de agente modificador (NP-CSA_{gm1}, NP-CSA_{gm2} e NP-CSA_{gm3}) não há uma alteração significativa na EE. No entanto é de salientar que os valores obtidos foram para a NP-CSA_{gm1} 78,5%/78,0% (carga baixa/carga alta), para a NP-CSA_{gm2} 78,1%/75,0% (carga baixa/carga alta) e para a para a NP-CSA_{gm3} 75,8%/76,8% (carga baixa/carga alta). Estes dados parecem indicar que apenas a formulação onde foi usado o agente modificador 2 são ligeiramente influenciados pela carga de agente modificador utilizada.

3.1.1. Tamanho das nanopartículas e potencial zeta

A utilização da técnica de DLS permitiu-nos determinar o tamanho das NPs após encapsulação da hPAHwt. De acordo com os valores obtidos (Figura IV.5), a média do tamanho das NPs formadas foi de $\approx 221 \pm 24$ nm com o valor mais baixo obtido para a formulação NP-CSA_{gm5} (≈ 180 nm) e um máximo para a NP-CSA_{gm2ca} e NP-CSA_{gm3ca} (≈ 245 nm). Estes valores são ligeiramente superiores aos valores obtidos para as NPs vazias e que rondaram os 180 nm (48).

Foi também determinado o potencial Zeta das NPs. Pela análise da Figura IV.5 podemos concluir que a média do valor do potencial Zeta obtido das NPs formadas foi de $\approx +26 \pm +2$ mV, com o

valor mais baixo obtido para a formulação NP-CSAgm5 ($\approx +21$ mV) e um máximo para a NP-CSAgm3_{ca} ($\approx +29$ mV). Estes valores foram também semelhantes aos obtidos para as NPs vazias (48).

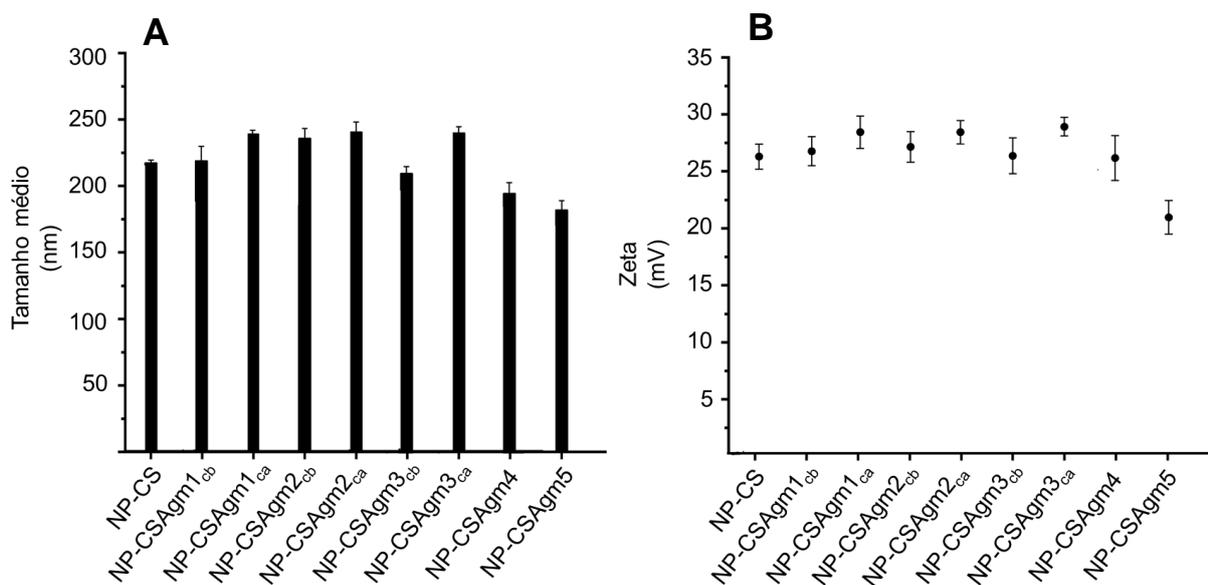


Figura IV.5 – Tamanho médio (A) e potencial Zeta (B) das diferentes formulações testadas após encapsulação da hPAHwt. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

4. Propriedades funcionais e estruturais da proteína hPAHwt encapsulada

A determinação da atividade enzimática da proteína encapsulada permitiu-nos verificar se o processo de nanoencapsulação alterava a funcionalidade da hPAHwt. Como pode ser observado pela análise da Figura IV.6, após formulação foi possível recuperar em média $74,3 \pm 5,7\%$ da atividade da hPAHwt (tendo como referência a proteína não encapsulada).

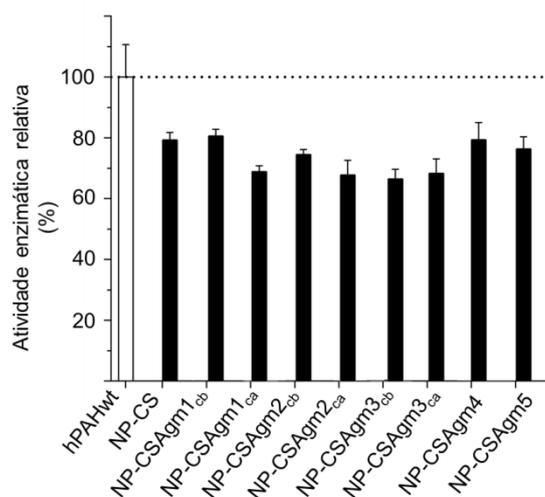


Figura IV.6 – Atividade enzimática da hPAHwt após nanoencapsulação (diferentes formulações). A atividade específica da proteína não encapsulada (4430 ± 351 nmol Tyr. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) foi considerada como sendo 100% (indicado a tracejado). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado (48).

Os valores obtidos variaram entre 68,0% (NP-CSA_{gm3}_{cb}) a 82,0% (NP-CSA_{gm1}_{cb}) de atividade enzimática relativa.

A avaliação do perfil de desnaturação térmica das proteínas pode dar indicações acerca da estabilidade proteica através da determinação do T_m . De um modo geral considera-se que variações de T_m (ΔT_m) superiores a +2 °C ou -2 °C ($|\Delta T_m| > 2$ °C) indicam uma alteração dessa mesma estabilidade. Como pode ser verificado pela análise do gráfico apresentado na Figura IV.7, apenas as formulações NP-CSA_{gm4} e NP-CSA_{gm5} conferem um aumento da estabilidade proteica, em particular do domínio regulador da hPAHwt ($\Delta T_{m1} > 2$ °C).

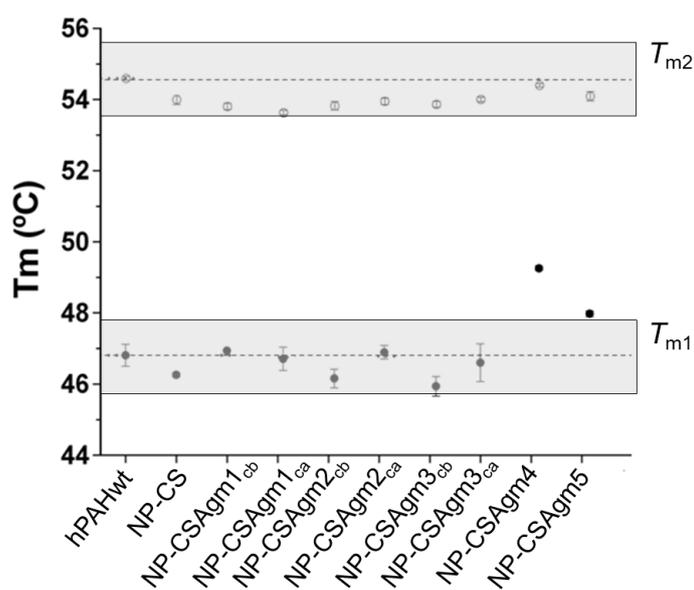


Figura IV.7 – Avaliação da estabilidade térmica da hPAHwt após nanoencapsulação (diferentes formulações) por determinação do T_{m1} e T_{m2} , associados à desnaturação dos domínios regulador e catalítico, respetivamente. A zona sombreada indica o valor de ± 2 °C relativamente ao T_{m1} (47,0 °C; linha a tracejado) e T_{m2} (54,3 °C; linha a tracejado) da hPAHwt não encapsulada (hPAHwt). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado (48).

4.1. Ensaios de estabilidade das NPs

Os ensaios de estabilidade tiveram como objetivo, após encapsulação, determinar a percentagem de proteína libertada no sobrenadante das formulações. Estes ensaios foram efetuados quer através da quantificação da proteína (método do BCA) presente no sobrenadante das formulações, quer através da sua monitorização por análise de SDS-PAGE. Assim, durante as duas semanas de ensaio alíquotas das formulações foram analisadas aos tempos 0, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 168 (1 semana) e 336 h (2 semanas). Estes ensaios foram efetuados para as formulações em estudo nomeadamente NP-CS, NP-CSA_{gm1}_{cb}, NP-CSA_{gm1}_{ca}, NP-CSA_{gm2}_{cb}, NP-CSA_{gm2}_{ca}, NP-CSA_{gm3}_{cb}, NP-CSA_{gm3}_{ca}, NP-CSA_{gm4}_{cb} e NP-CSA_{gm5}_{cb}.

O perfil de estabilidade da formulação de hPAHwt em nanopartículas simples de CS (NP-CS) é apresentado na Figura IV.8.

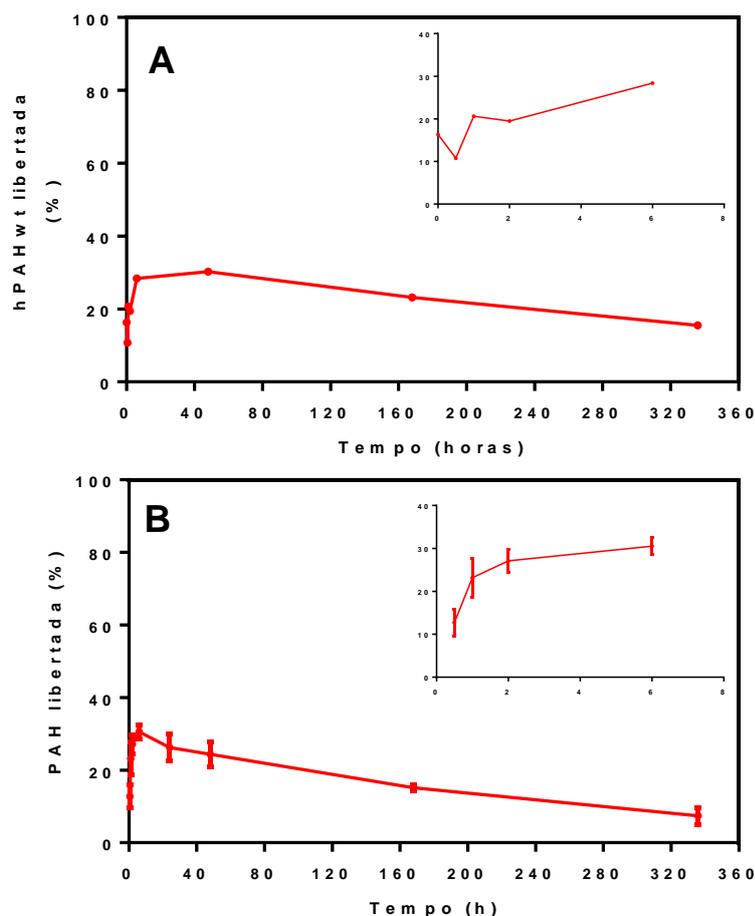


Figura IV.8 – Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CS, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Os resultados obtidos indicam que a partir do tempo 0, a quantidade de hPAHwt presente no sobrenadante após a preparação da formulação ($16,3 \pm 0,9\%$) aumenta progressivamente até às 48 h ($30,2 \pm 1,1\%$). A partir deste tempo observa-se uma diminuição da quantidade de hPAHwt recolhida no sobrenadante da formulação atingindo um valor semelhante ao inicial ($15,5 \pm 2,9\%$) ao fim das 336 h de ensaio (2 semanas de incubação). Na análise por SDS-PAGE (Figura IV.8, B) foi também possível observar um perfil semelhante de libertação, não tendo sido detetadas bandas de menor massa molecular que poderiam ter resultado de degradação proteolítica da hPAHwt.

Relativamente às NPs preparadas com o agente modificador 1 (Figura IV.9) observaram-se efeitos diferentes consoante estas foram preparadas com carga baixa ou alta de agente modificador. Na preparação com carga baixa (NP-CSA $gm1_{cb}$; Figura IV.9, traçado verde) o perfil é muito semelhante ao obtido com a preparação NP-CS (Figura IV.8), com um aumento progressivo até $28,2 \pm 1,5\%$ de hPAHwt às 2 h de ensaio, decrescendo até $9,7\%$ às 2 semanas de ensaio (336 h). Para a formulação NP-CSA $gm1_{ca}$ (Figura IV.9, traçado violeta) verificou-se que a quantidade de proteína presente no sobrenadante se manteve relativamente constante. Na realidade a análise por regressão linear indicou que o declive da reta obtida não era significativamente diferente de zero. Em semelhança ao verificado para a formulação simples também nas formulações NP-CSA $gm1_{cb}$ e NP-CSA $gm1_{ca}$ a análise por SDS-PAGE (Figura IV.9, B) não detetou bandas de menor massa molecular que poderiam ter resultado de degradação proteolítica da hPAHwt.

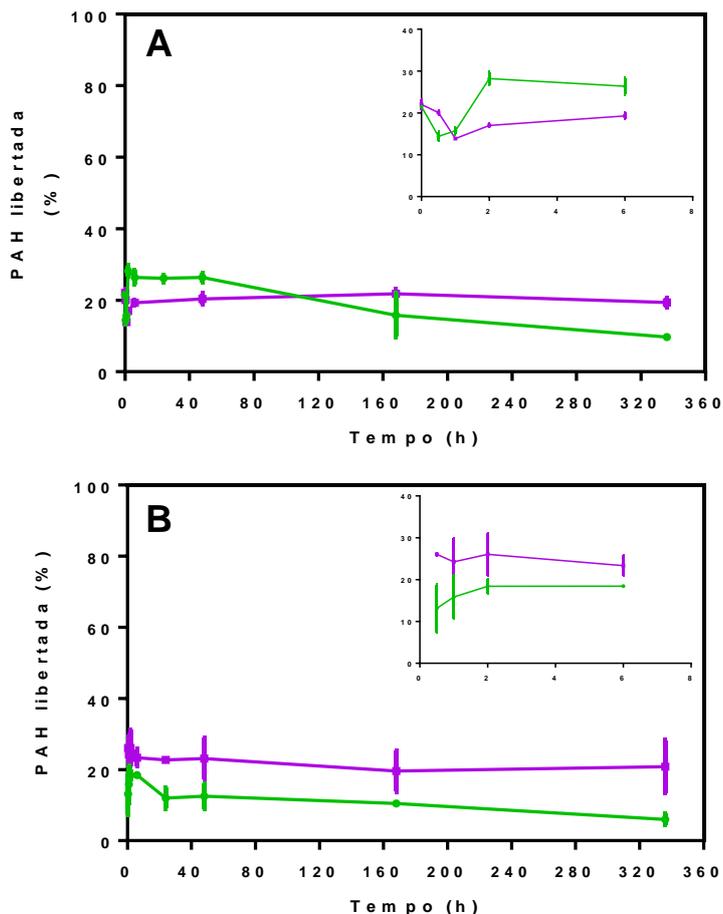


Figura IV.9 – Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação NP-CSAgm1 carga baixa (●) e carga alta (●) de agente modificador ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Os ensaios de libertação efetuados com o agente modificador 2 são apresentados na Figura IV.10. Com este agente foram obtidos resultados muito diferentes consoante foi utilizada uma carga baixa ou uma carga alta de agente modificador. Enquanto o perfil de libertação da preparação NP-CSAgm2_{cb} foi semelhante ao obtido para as formulações descritas atrás, com um valor máximo de percentagem de proteína no sobrenadante às 48 h ($35,7 \pm 0,8\%$), a utilização de uma carga alta para preparação das NPs com o agente modificador 2 (NP-CSAgm2_{ca}; Figura IV.10, traçado violeta) permitiu libertar a hPAHwt progressivamente ao longo do tempo de incubação, atingindo um valor de $71,2 \pm 0,3\%$ após 2 semanas de incubação. No entanto, é de realçar que ao fim de 2 semanas de ensaio a proteína obtida encontrava-se na sua forma *full-length*, como pode ser observado pela análise por SDS-PAGE (Figura IV.10, B, traçado violeta).

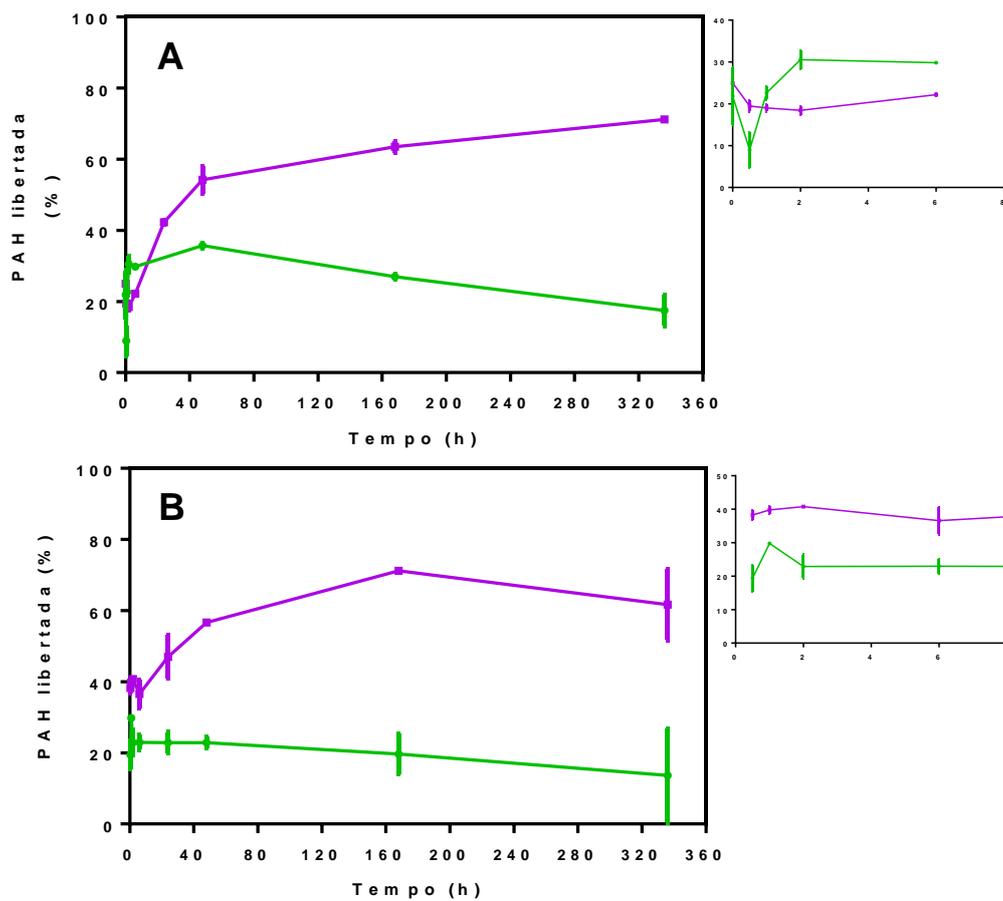


Figura IV.10 – Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSAgm2 carga baixa (●) e carga alta (●) de agente modificador, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

É de realçar que a utilização de uma carga alta de agente modificador para preparação NP-CSAgm2_{ca} à partida tinha resultado numa menor EE (75,0%) quando comparada com a EE média das preparações (78,6%) (Figura IV.5, A).

Os dados de libertação obtidos com o agente modificador 3 (Figura IV.11) sugerem que este parece ser um dos mais “controlados” uma vez que quer com carga alta quer com carga baixa de agente modificador, a quantidade de hPAHwt recuperada no sobrenadante das formulações é relativamente semelhante. De facto, a aplicação de testes de correlação indicou que quer para as NP-CSAgm3_{cb} quer para as NP-CSAgm3_{ca} o declive da reta obtida não era significativamente diferente de zero. Na realidade, após formulação (t₀) os valores obtidos foram de 24,2 ± 2,6% (NP-CSAgm3_{cb}) e 23,2 ± 0,2% (CSAgm3_{ca}), valores que passaram para 18,1 ± 2,2% (NP-CSAgm3_{cb}) e 16,6 ± 2,7% (CSAgm3_{ca}) no fim do ensaio (2 semanas de incubação).

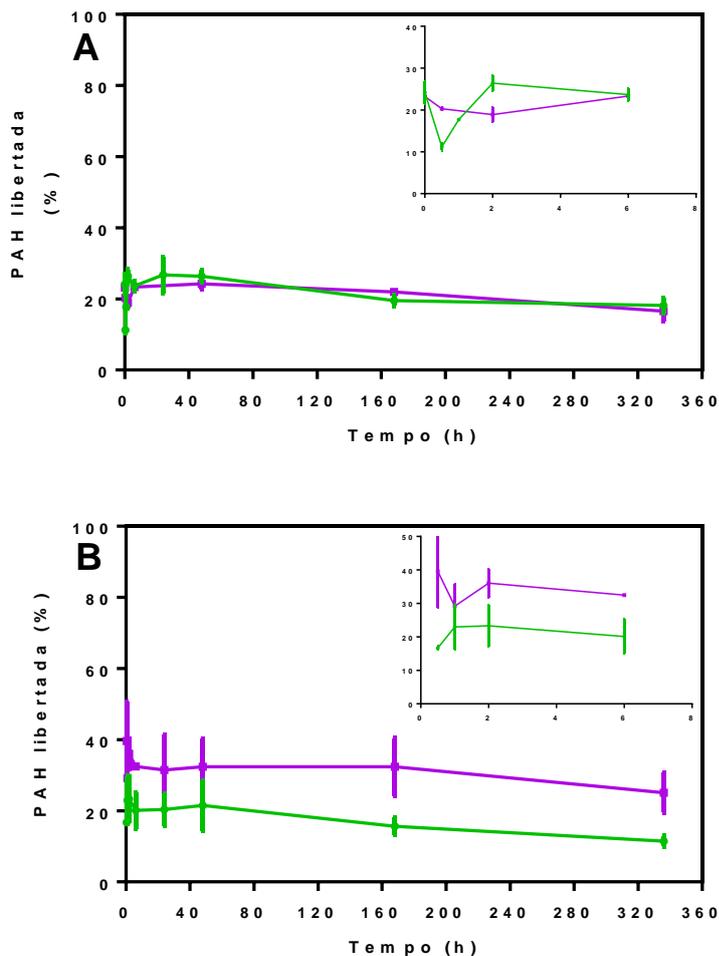


Figura IV.11 – Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSAgm3 carga baixa (●) e carga alta (●) de agente modificador, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Em semelhança com o obtido com as NP-CSAgm2_{ca} também a utilização do agente modificador 4 (NP-CSAgm4) permitiu uma libertação constante ao longo do tempo de incubação (Figura IV.12). No entanto, com o agente modificador 4 a quantidade de hPAHwt recuperada no sobrenadante ao fim de 2 semanas foi de apenas $29,1 \pm 3,6\%$, quando comparado com o valor de $71,2 \pm 0,3\%$ obtido com NP-CSAgm2_{ca}. Na realidade quando foram aplicados os testes de regressão linear o declive obtido para as curvas apresentadas na Figura IV.12 não mostrou ser significativamente diferente de zero.

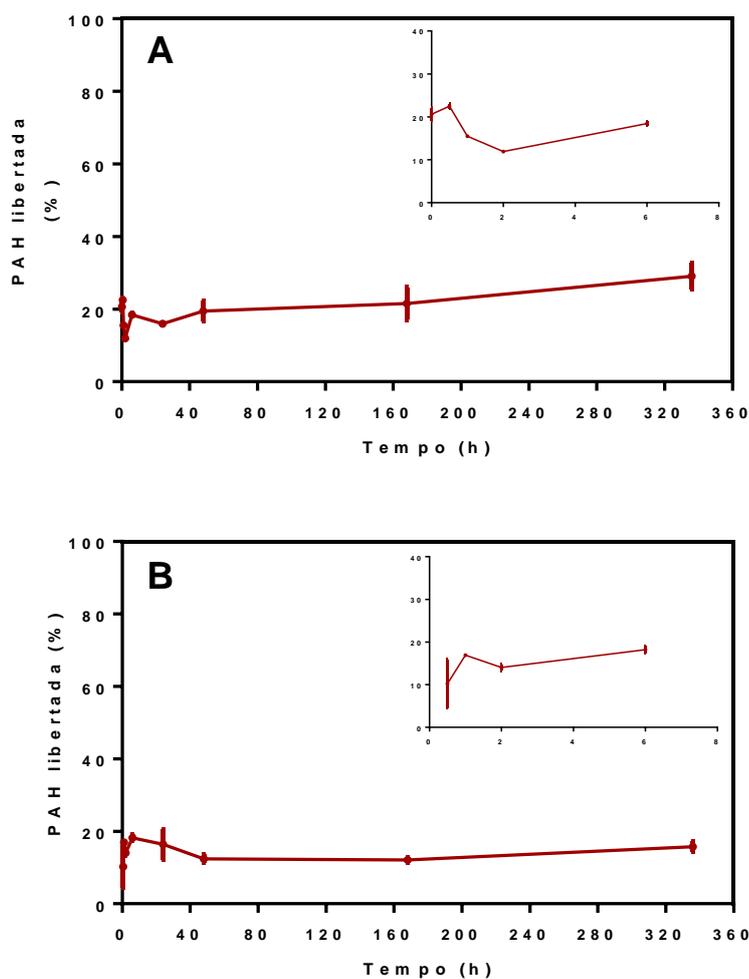


Figura IV.12 – Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSAgm4, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

As NP-CSAgm5 (Figura IV.13) mostraram ter um comportamento muito semelhante ao obtido com as NP-CSAgm4, com um valor de $25,8 \pm 0,5\%$ obtido após duas semanas de ensaio ($29,1 \pm 3,6\%$ para as NP-CSAgm4; Figura IV.13, A). Também para esta formulação a análise por regressão linear mostrou que o declive da reta obtido não era significativamente diferente de zero.

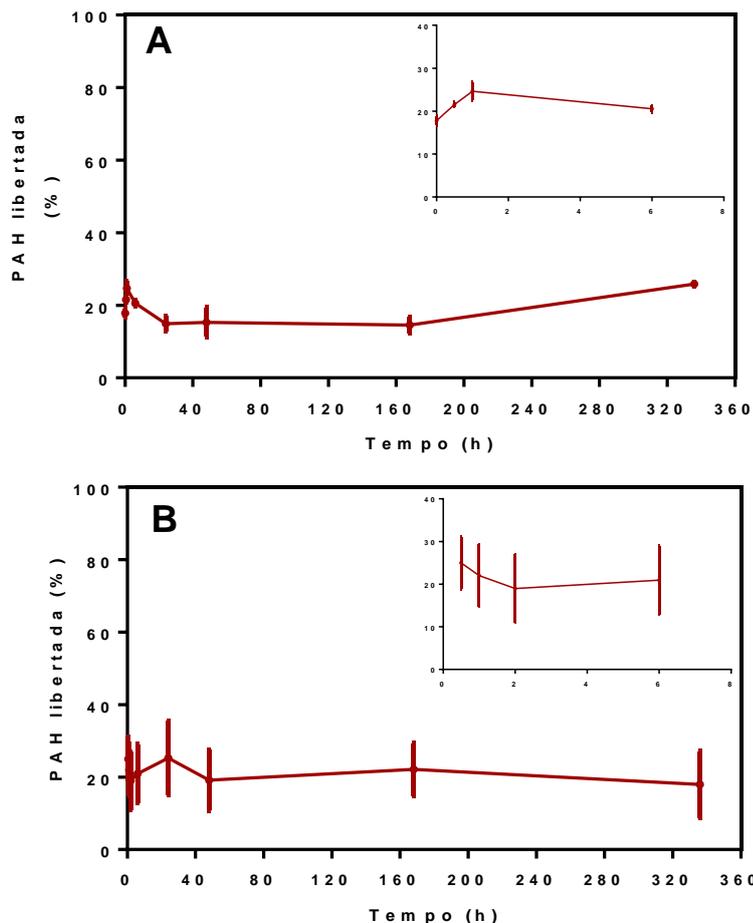


Figura IV.13 – Avaliação da percentagem de hPAHwt presente no sobrenadante da formulação de NP-CSA_{gm5}, ao longo do tempo de incubação. (A) Quantificação pelo método do BCA e (B) análise por SDS-PAGE. Em cada gráfico encontram-se também representados os valores obtidos para as primeiras 6 h de ensaio. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

5. Ensaio em células

Das diversas formulações desenvolvidas e previamente testadas em relação à funcionalidade e estabilidade da proteína encapsulada e ao seu perfil de libertação, foram selecionadas para os ensaios com células HEK-293T as preparações NP-CS, NP-CSA_{gm3ca}, NP-CSA_{gm4} e NPA_{gm5}. A utilização das células HEK-293T deve-se ao fato de estas não expressarem a proteína alvo (hPAHwt). Assim, constituiriam o modelo celular ideal para avaliar se, após *uptake* das NPs, a célula ganhava capacidade de hidroxilação da L-Phe em L-Tyr. No entanto, nos primeiros ensaios efetuados não foi possível obter atividade enzimática associada à presença da hPAHwt nas células e assim foi necessário proceder num primeiro passo à otimização do modelo de estudo.

5.1 Otimização das condições de ensaio e utilização de células HEK-293T

Para otimização do modelo de estudo foram avaliadas diferentes condições de ensaio. Para os ensaios em modelos celulares as amostras estudadas incluíram sempre: (i) NPs vazias (sem hPAHwt encapsulada); (ii) NPs com proteína encapsulada numa concentração final de 250 µg/mL; (iii) hPAHwt não encapsulada (hPAHwt-*naked*) e; (iv) o tampão de formulação. Nestes ensaios foi sempre mantido constante o volume de formulação utilizado (500 µL). Assim, para otimização dos estudos de *uptake* celular foi testado o tempo de incubação e o volume de meio a utilizar.

No ensaio preliminar efetuado com 24 h de incubação a 37 °C e um volume de meio de 5 mL não foi possível detetar atividade enzimática. Adicionalmente, a análise por *Western blotting* (WB) não permitiu detetar proteína nas diferentes frações testadas, nomeadamente “sobrenadante do meio de cultura”, “lisado total”, “sedimento do lisado” e “sobrenadante do lisado” (ver Material e Métodos). Tendo em conta o perfil de estabilidade térmica da hPAHwt questionou-se se o tempo (24 h) que a proteína esteve exposta a uma temperatura de 37 °C não teria contribuído para a sua degradação. No entanto, a redução do tempo de incubação para 1 h também não permitiu a visualização da hPAHwt em nenhuma das frações analisadas (“sobrenadante do meio de cultura”, “lisado total”, “sedimento do lisado” e “sobrenadante do lisado”).

Para esclarecer o que poderia ter ocorrido à proteína nos dois ensaios anteriores, realizou-se um terceiro ensaio onde as amostras foram apenas incubadas com 2 mL de meio de cultura na ausência de células, mantendo-se a incubação de 1 h/37 °C. Neste ensaio utilizou-se em paralelo meio mínimo e meio completo para tentar perceber se algum componente do meio de cultura contribuía para a degradação da hPAHwt. Nestas condições foi possível detetar a proteína alvo, independentemente do meio de cultura utilizado, o que mostrou que a proteína não sofre degradação nestas condições (1 h, 37°C). Este resultado levantou a hipótese de a hPAHwt não ser detetada nos ensaios com células por ter sofrido deposição no passo de centrifugação das células, uma vez que, de um modo geral, a centrifugação de formulações de NPs leva à obtenção de um sedimento de NPs muito difícil de ressuspender. Assim, às amostras em estudo (500 µL) foram adicionados 100 µL de células previamente lavadas com PBS (não provenientes de cultura com NPs). Com este ensaio (Figura IV.14) pretendíamos verificar se era possível ressuspender as NPs (com hPAHwt encapsulada) A visualização da proteína nas frações correspondentes ao “lisado total” e “sedimento do lisado” permitiu concluir que a centrifugação não deposita as NPs-hPAHwt no sedimento celular. No entanto, no decorrer desta experiência foi obtido um dado interessante, uma vez que a presença da hPAHwt-*naked* nas frações referidas parece sugerir que a proteína tem tendência a agregar ou associar-se às membranas celulares.

Finalmente, e reunindo as experiências efetuadas, decidiu-se ainda testar se poderia ser utilizado 1 mL de meio de cultura (500 µL de formulação, 1 h, 37°C). Nestas condições a proteína foi detetada (análise por WB) apenas no “sobrenadante da cultura”.

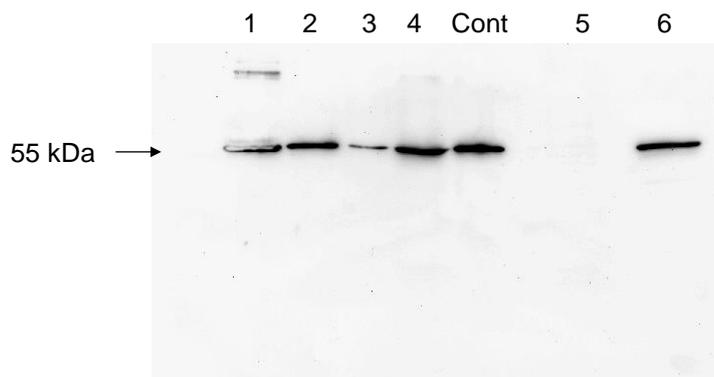


Figura IV.14 – Análise por *Western blotting* da quantidade relativa da hPAHwt presente nas diferentes frações após adição de células HEK-293T à formulação NP-CS-hPAHwt e posterior incubação durante 1 h a 37 °C. Frações estudadas: “sobrenadante do meio de cultura” (1), após tripsinização (2), lavagem das células com tampão PBS (3), “lisado total” (4), “sobrenadante do lisado” (5) e “sedimento do lisado” (6). (Cont) corresponde à aplicação de 100 ng de hPAHwt utilizado como controlo da transferência e da revelação.

Após a otimização das condições de ensaio, com definição do volume de meio de cultura e de formulação a serem utilizados, foram realizados ensaios com diferentes tempos de incubação. A Figura IV.15 representa a quantidade de hPAHwt detetada por WB, após as células HEK-293T serem incubadas com hPAHwt-*naked* (Figura IV.15, A) e NP-CS-hPAHwt (Figura IV.15, B). Embora as NPs preparadas (NP-CS) não sejam eficazes em promover o seu *uptake* celular (não é identificada proteína no sobrenadante do lisado celular, Figura IV.15) é interessante observar que quando encapsulada a hPAHwt parece estar protegida da degradação uma vez que apenas às 13 h se observa um decréscimo da quantidade de proteína recuperada no “sobrenadante da cultura” (43%) enquanto que, quando é utilizada a hPAHwt-*naked* ao fim de 4 h apenas é detetado 16% da proteína. Por outro lado, a presença da hPAHwt-*naked* não só no “sobrenadante da cultura”, mas também no “lisado total” e no “sedimento do lisado”, parece confirmar a hipótese levantada anteriormente de que a proteína por não se encontrar protegida pela NP tem tendência a expor os seus resíduos hidrofóbicos e assim interagir com a fração membranar presente no lisado celular.

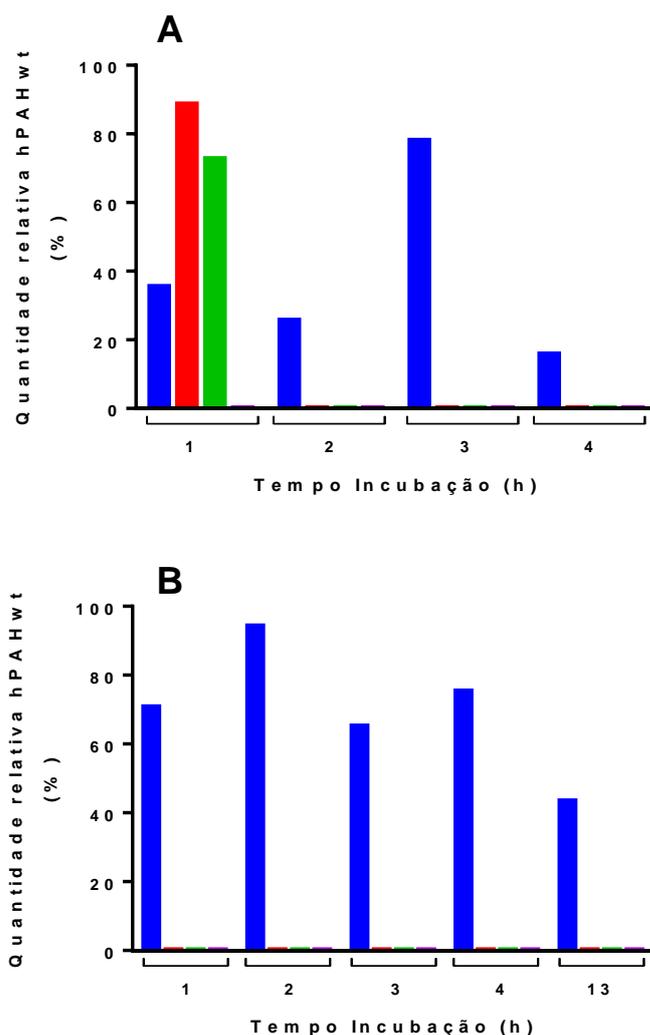


Figura IV.15 – Avaliação por *Western blotting* da quantidade relativa da hPAHwt presente nas diferentes frações após cultura com células HEK-293T a diferentes tempos (37°C) com hPAHwt-*naked* (A) e NP-CS-hPAHwt (B). Frações estudadas: “sobrenadante do meio de cultura” (■), “lisado total” (■), “sedimento do lisado” (■) e “sobrenadante do lisado” (■).

Os dados obtidos levaram-nos a formular duas hipóteses: (i) as NPs desenvolvidas não têm capacidade de “entrar” nas células HEK-293T ou (ii) as células HEK-293T não permitem a “entrada” das NPs.

A utilização das células HEK-293T como hospedeiras para a expressão heteróloga de proteínas de membrana é comum devido principalmente à maquinaria de modificação pós-tradução que possuem e que é necessária para o *foldings* correto e/ou atividade biológica ótima de proteínas alvo. Para além disso, apresentam outras características como a elevada eficiência de transfecção que possibilita a obtenção de melhores rendimentos de proteína expressa, em relação a outras células de mamíferos (127–129).

A ausência de PAH no “sobrenadante do lisado”, observada neste estudo, pode ser justificada por diferentes fatores, como por exemplo, uma necessidade de otimização das condições de cultura celular, mais especificamente a temperatura de incubação. As células de mamíferos, como as HEK-293T, normalmente são cultivadas a 37°C. No entanto, sabe-se que ajustes na temperatura após transfecção podem aumentar a expressão de proteínas recombinantes, como observado no estudo

realizado por Lin *et al.* (130), em que foi verificado que a diminuição da temperatura de 37 para 33°C, 24 horas após a transfecção aumentou a expressão da proteína recombinante (130).

Outro aspeto a ter em conta diz respeito ao fato da maioria das NPs ser conhecida por entrar nas células através do processo de endocitose, ao longo do período de incubação. Após serem endocitadas, as NPs são normalmente encontradas em organitos associados à membrana e ocasionalmente são encontradas livres no citoplasma (131). No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo subjacente ao seu *trafficking* no interior das células e o modo como podem “entrar” em organitos específicos (132).

Assim, a ausência de *uptake* das NPs pelas células HEK-293T (quer esteja encapsulada ou não) parece indicar que estas poderão não ser o modelo mais adequado para estes estudos. Para esclarecer as hipóteses levantadas estendemos então os nossos ensaios às células HepG2 (derivadas de linhagem pura de carcinoma hepático humano).

5.2 Ensaios em células HepG2

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios com as células HEK-293T, foi decidido então testar algumas das formulações anteriores, nomeadamente as NPs modificadas que mostraram resultados mais interessantes nos ensaios de estabilidade (NP-CS, NP-CSA_{gm3ca}, NP-CSA_{gm4} e NP-CSA_{gm5}), numa outra linhagem celular, as células HepG2.

Os resultados obtidos com os ensaios das diferentes formulações em células HepG2 são apresentados na Figura IV.16. Curiosamente, o comportamento da hPAH-*naked* (Figura IV.16, A) é semelhante ao obtido com as células HEK-293T (Figura IV.15, A), não sendo observada a presença de proteína no “sobrenadante do lisado”.

Já em relação à hPAHwt nanoencapsulada foi possível detetar a proteína alvo na fração correspondente ao “sobrenadante do lisado” em todas as formulações. Assim, e em ordem decrescente os valores obtidos foram para as formulações: (i) NP-CS, 26,2% após 6 h de incubação e 1,5% após 14 h de incubação (Figura IV.16, B); (ii) NP-CSA_{gm5}, 8,2% após 6 h e 1,4% após 14 h de incubação (Figura IV.16, E); (iii) NP-CSA_{gm3ca}, 3,8% após 14 h de incubação (Figura IV.16, C) e (iv) NP-CSA_{gm4}, 1,4% após 14 h de incubação (Figura IV.16, D).

Estes resultados, e em particular os obtidos com a formulação NP-CS, confirmam que as células HEK-293T não parecem constituir o modelo apropriado para os estudos propostos, uma vez que parecem ser “resistentes” à “entrada” de NPs. As células HepG2 parecem apresentar uma internalização mais eficiente da proteína recombinante, internalização esta que tende a ocorrer após 6 h de incubação.

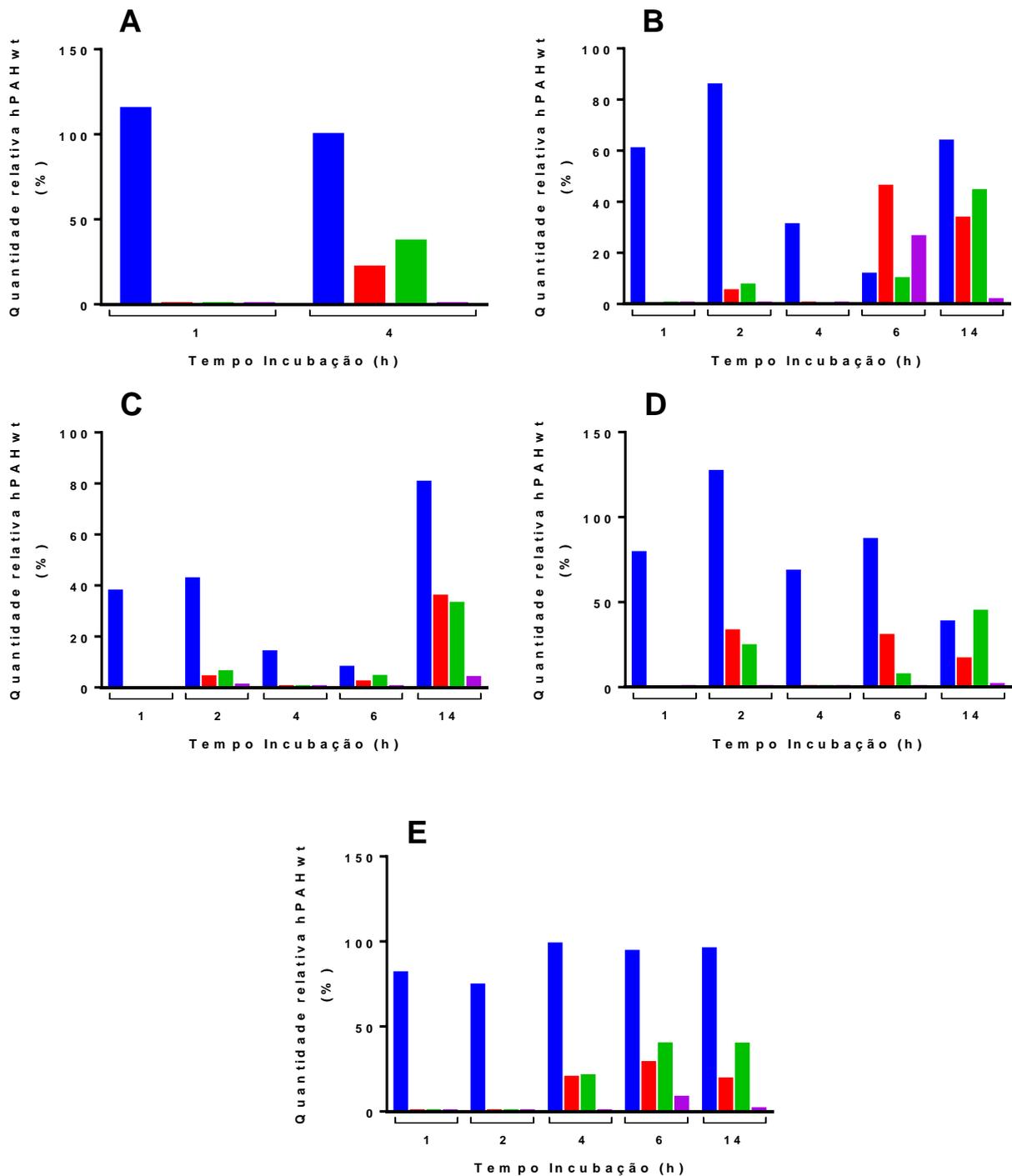


Figura IV.16 – Avaliação por *Western blotting* da quantidade relativa da hPAHwt presente nas diferentes frações após cultura com células HepG2 a diferentes tempos (37 °C) com hPAHwt-naked (A), NP-CS-hPAHwt (B), NP-CSAgm3_{ca}-hPAHwt (C), NP-CSAgm4-hPAHwt (D) e NP-CSAgm5-hPAHwt (E). Frações estudadas: “sobrenadante do meio de cultura” (■), “lisado total” (■), “sedimento do lisado” (■) e “sobrenadante do lisado” (■).

V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O projeto desenvolvido nesta dissertação de Mestrado tinha como objetivo demonstrar a eficácia das formulações em desenvolvimento, no grupo de *Metabolism and Genetics* (Met&Gen) e *Nanostructured Systems for Overcoming Biological Barriers* (Nano2B) do iMed.Ulisboa, por ensaios em células apropriadas nomeadamente, células HEK-293T. Uma vez que a hPAH é expressa maioritariamente no fígado, as células HEK-293T não apresentam padrão de expressão da proteína alvo podendo revelar-se um excelente modelo celular para avaliar a capacidade de hidroxilação da L-Phe em L-Tyr após cultura na presença das formulações de hPAHwt.

Todas as nanoformulações testadas tiveram como base o quitosano. Este é um polissacarídeo que vem sendo muito utilizado em aplicações farmacêuticas e biomédicas por apresentar características vantajosas na sua utilização, entre elas a ausência de toxicidade, a sua biocompatibilidade e pelo fato de ser um polímero biodegradável (133,134). O CS é composto por unidades repetidas dos monossacáridos β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-D-glucose (glucosamina) e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-D-glucose (N-acetilglucosamina). A sua principal utilização é como matéria-prima para a construção de NPs, já que por ser livre de grupos amina pode ser facilmente modificado e conjugado com ligandos de alvos-específicos. Além disso este polímero tem a capacidade de formar complexos com fármacos carregados negativamente (135–138).

Uma vez que, se pretendia avaliar o *uptake* celular (células HEK-293T) da proteína nanoencapsulada, foi avaliado o perfil de estabilidade nas diferentes formulações. À exceção da formulação NP-CSAgm2_{ca}, todas as restantes formulações mostraram ter a capacidade de controlar a libertação da proteína para o meio exterior pelo que se tornam alvos apropriados para o estudo em células. De entre estas, foi então selecionada a formulação simples de NP-CS e as formulações onde foram utilizados agentes modificadores pertencentes a classes diferentes nomeadamente a NP-CSAgm3_{ca}, NP-CSAgm4 e NP-CSAgm5.

Os ensaios efetuados com células HEK-293T demonstraram que estas não representam o melhor modelo de trabalho, uma vez que parecem ser “resistentes” à entrada das NPs. Estes resultados levaram à alteração do modelo celular de estudo. Assim, foram utilizadas como células alvo as células HepG2.

A utilização de células HepG2 permitiu concluir que de entre as formulações testadas duas apresentam capacidade de *uptake* nomeadamente a NP-CS e NP-CSAgm5, uma vez que, após 6 h de incubação, o teor de hPAHwt detetado no sobrenadante do lisado celular (e que corresponde à fração citoplasmática das células) foi de 26,2% e 8,2%, respetivamente. Estes resultados são extremamente promissores e abrem porta a novos estudos que poderão ter como objetivo a modificação das NPs. Adicionalmente torna-se agora imperativo determinar a capacidade de hidroxilação da L-Phe em L-Tyr (atividade catalítica da hPAH) no sobrenadante do lisado celular, uma vez que apenas este ensaio nos poderá indicar se a proteína internalizada mantém a sua funcionalidade (atividade biológica). Estes ensaios deverão ter em conta a atividade basal das células HepG2 uma vez que estas expressam constitutivamente a hPAHwt.

As células de hepatoma são conhecidas por expressar à sua superfície os recetores de asialoglicoproteína (ASGP). Estes têm uma alta taxa de absorção de macromoléculas e permitem a entrega de fármacos específicos à célula (139). O ASGP é uma lectina (carbohidrato) que possibilita a endocitose de elementos direcionados para o fígado (140–142). Os ASGP presentes na superfície das células interagem principalmente com os resíduos de galactose das macromoléculas galactosiladas que, como veículos de fármacos, têm tido um papel importante na entrega de fármacos e na transfecção de genes em células HepG2. (143–148). Assim, e tendo em conta os dados obtidos em termos de internalização das nossas formulações em células HepG2, somos tentados a sugerir que pode haver uma

relação entre a internalização observada e os referidos recetores ASGP, na medida em que podem ter sido um dos responsáveis pelo *uptake* das NPs e consequente deteção da proteína.

Sendo assim, o nosso trabalho poderá trazer alguma luz aos mecanismos de interação entre as NPs e as células HepG2 (*in vitro*) para que seja possível, futuramente, a sua utilização *in vivo*, já que todas as formulações testadas nas células apresentaram algum potencial para entrega do fármaco que tem como alvo preferencial o hepatócito.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Cleary MA. Phenylketonuria. *Paediatr Child Health*. 2015;25(3):108–12.
2. Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: Function, structure, and regulation. *IUBMB Life*. 2013;65(4):341–9.
3. Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev*. 2008;29(1):31–41.
4. van Spronsen FJ. Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(9):509–14.
5. Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med*. 2011;13(8):697–707.
6. Al Hafid N, Christodoulou J. Phenylketonuria: a review of a current and future treatments. *Transl Pediatr*. 2015;4(4):304–17.
7. Young VR, Pellett PL. Protein intake and requirements with reference to diet and health. *Am J Clin Nutr*. 198;45(5 Suppl):1323–43.
8. 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*. 1982;257(19):11213–6.
9. Kaufman S. A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):3160–4.
10. Scriver CR KS. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. Title. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler K VB, editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York; 2001. p. 1667–724.
11. Matthews. Proteins and amino acids. In: Lippincott W& W, editor. *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. 2006. p. 23–60.
12. Targum SD, Lang W. Neurobehavioral problems associated with phenylketonuria. *Psychiatry (Edgmont)* [Internet]. 2010;7(12):29–32.
13. Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, De Almeida IT, Rivera I. Fenilcetonúria revisitada. *Arq Med*. 2006;20(5–6):161–72.
14. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet*. 1997;61(6):1309–17.
15. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, 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*. 1998;63(1):71–9.

16. Dyer CA. Pathophysiology of phenylketonuria. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 1999;5(2):104–12.
17. Joseph B, Dyer CA. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem.* 2003;86(3):615–26.
18. Diamond A, Ciaramitaro V, Donner E, Djali S, Robinson MB. An animal model of early-treated PKU. *J Neurosci.* 1994;14(5 Pt 2):3072–82.
19. Puglisi-Allegra S, Cabib S, Pascucci T, Ventura R, Cali F, Romano V. Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport.* 2000;11(6):1361–4.
20. Pascucci T, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Cabib S. Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport.* 2002;13(18):2561–4.
21. Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 1999;103(8):1169–78.
22. Tam SY, Roth RH. Mesoprefrontal dopaminergic neurons: Can tyrosine availability influence their functions? *Biochem Pharmacol.* 1997;53(4):441–53.
23. Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, Trefz FK, Demirkol M, Giovannini M, et al. Challenges and Pitfalls in the Management of Phenylketonuria. *Pediatrics.* 2010;126(2):333–41.
24. Malamud N. Neuropathology of phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1966 Apr;25(2):254–68.
25. Dyer CA, Kendler A, Philibotte T, Gardiner P, Cruz J, Levy HL. Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Jul;55(7):795–814.
26. Martynyuk AE, Glushakov A V., Sumners C, Laipis PJ, Dennis DM, Seubert CN. Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain. *Mol Genet Metab.* 2005;86(SUPPL.):34–42.
27. Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D, Daikhin E, Kendler A, Nguyen LB, 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.* 2000;61(5):549–63.
28. Hörster F, Schwab MA, Sauer SW, Pietz J, Hoffmann GF, Okun JG, et al. Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res.* 2006;59(4 PART 1):544–8.
29. Wasserstein MP, Snyderman SE, Sansaricq C, Buchsbaum MS. Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2006;87(3 SPEC. ISS.):272–7.
30. Ghozlan A, Varoquaux O, Abadie V. Is monoamine oxydase-B a modifying gene and phenylethylamine a harmful compound in phenylketonuria? *Mol Genet Metab.* 2004;83(4):337–40.

31. Sitta A, Manfredini V, Biasi L, Treméa R, Schwartz IVD, Wajner M, et al. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2009;679(1–2):13–6.
32. Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, et al. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis*. 2006;21(4):287–96.
33. Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-konecki U, C SL. Structural Characterization of the 5' Regions of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Biochemistry*. 1992;31(35):8363–8.
34. Lidsky a S, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(18):6221–5.
35. Regier DS, Greene CL. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *GeneReviews*(®). University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2016 Oct 21].
36. PAH: Phenylalanine hydroxylase locus knowledgebase. Disponível em: <http://www.pahdb.mcgill.ca>. Acesso a 16 de Julho de 2016.
37. Blau N, Van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010;376(9750):1417–27.
38. Ramus SJ, Forrest SM, Pitt DB, Saleeba J a, Cotton RG. Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J Med Genet*. 1993;30(5):401–5.
39. Fitzpatrick PF. The aromatic amino acid hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 2000;74:235–94.
40. Olsson E, Teigen K, Martinez A, Jensen VR. The Aromatic Amino Acid Hydroxylase Mechanism: A Perspective From Computational Chemistry. In 2010. p. 437–500.
41. Flatmark T, Stevens RC. Structural insight into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease-related mutant forms. *Chem Rev*. 1999;99:2137–60.
42. Fitzpatrick PF. Allosteric regulation of phenylalanine hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*. 2012;519(2):194–201.
43. Arias-barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernández C, Galán B, García JL, et al. The Pathway : a Central Catabolic Pathway Involved in the Pseudomonas putida The Homogentisate Homogentisate Pathway : a Central Catabolic Pathway Involved in the Degradation of L -Phenylalanine , L -Tyrosine , and 3-Hydroxyphenylacetate in Pseudomonas pu. *J Bacteriol*. 2004;186(15):5062–77.
44. Fisher AL, Page KE, Lithgow GJ, Nash L. The Caenorhabditis elegans K10C2.4 gene encodes a member of the fumarylacetoacetate hydrolase family: a Caenorhabditis elegans model of type I tyrosinemia. *J Biol Chem*. 2008;283(14):9127–35.
45. Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 1999;68(2):103–25.
46. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J*. 1995;311 (Pt 2:353–66).

47. Yudkoff M. Phenylalanine Metabolism: Phenylketonuria. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
48. Lino PR. Towards a new approach to phenylketonuria treatment: stabilization of phenylalanine hydroxylase using nanobiomaterials. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa; 2015.
49. Richardson SC, Aspbury RA, Fisher MJ. The role of reversible phosphorylation in the hormonal control of phenylalanine hydroxylase in isolated rat proximal kidney tubules. *Biochem J*. 1993;292 (Pt 2:419–24).
50. Martinez a, Knappskog PM, Olafsdottir S, Døskeland a P, Eiken HG, Svebak RM, 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*. 1995;306 (Pt 2:589–97).
51. Bjørge E, Negra RM. A comparison of kinetic and regulatory properties of the tetrameric and dimeric forms of wild-type and Thr4273Pro mutant human phenylalanine hydroxylase. 2001;1005:997–1005.
52. Carluccio C, Fraternali F, Salvatore F, Fornili A, Zagari A. Structural features of the regulatory ACT domain of phenylalanine hydroxylase. *PLoS One*. 2013;8(11):1–13.
53. Liberles JS, Thórólfsson M, Martínez A. Allosteric mechanisms in ACT domain containing enzymes involved in amino acid metabolism. *Amino Acids*. 2005;28(1):1–12.
54. Gjetting T, Petersen M, Guldberg P, Güttler F. Missense mutations in the N-terminal domain of human phenylalanine hydroxylase interfere with binding of regulatory phenylalanine. *Am J Hum Genet*. 2001;68(6):1353–60.
55. Thórólfsson M, Ibarra-Molero B, Fojan P, Petersen SB, Sanchez-Ruiz JM, Martínez A. L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: A differential scanning calorimetry study. *Biochemistry*. 2002;41(24):7573–85.
56. Erlandsen H, Fusetti F, Martinez a, Hough E, Flatmark T, Stevens RC. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol*. 1997;4(12):995–1000.
57. Teigen K, Dao KK, McKinney JA, Gorren ACF, Mayer B, Frøystein NÅ, et al. Tetrahydrobiopterin binding to aromatic amino acid hydroxylases. Ligand recognition and specificity. *J Med Chem*. 2004;47(24):5962–71.
58. 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*. 2001;314(2):279–91.
59. 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*. 2002;320(5):1095–108.

60. Erlandsen H, Bjórigo E, Flatmark T, Stevens RC. Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry*. 2000;39(9):2208–17.
61. Andersen OA, Stokka AJ, 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*. 2003;333(4):747–57.
62. 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*. 2001;294(2):95–101.
63. Fusetti F. Structure of Tetrameric Human Phenylalanine Hydroxylase and Its Implications for Phenylketonuria. *J Biol Chem*. 1998;273(27):16962–7.
64. Leandro J. New insights into the structure and function of human phenylalanine hydroxylase: interallelic complementation, protein misfolding and mechanism of catalytic activation. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa; 2011.
65. Enns GM, Koch R, Brumm V, Blakely E, Suter R, Jurecki E. Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: Revisiting the evidence. *Mol Genet Metab*. 2010;101(2–3):99–109.
66. Acosta PB, Yannicelli S, Singh R, Mofidi S, Steiner R, Devincintis E, et al. Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J Am Diet Assoc*. 2003;103(9):1167–73.
67. Arnold GL, Vladutiu CJ, Kirby RS, Blakely EM, DeLuca JM. Protein insufficiency and linear growth restriction in phenylketonuria. *J Pediatr*. 2002;141(2):243–6.
68. Dobbelaere D, Michaud L, Debrabander A, Vanderbecken S, Gottrand F, Turck D, et al. Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26(1):1–11.
69. Simon E, Schwarz M, Roos J, Dragano N, Geraedts M, Siegrist J, 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*. 2008;6:25.
70. Waisbren SE, Noel K, Fahrback K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, et al. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: A systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab*. 2007;92(1–2):63–70.
71. Gassió R, Artuch R, Vilaseca MA, Fusté E, Boix C, Sans A, et al. Cognitive functions in classic phenylketonuria and mild hyperphenylalaninaemia: experience in a paediatric population. *Dev Med Child Neurol*. 2005 Jul;47(7):443–8.
72. Bélanger-Quintana A, Burlina A, Harding CO, Muntau AC. Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2011;104(SUPPL.):S19–25.
73. Vajro P, Strisciuglio P, Houssin D, Huault G, Laurent J, Alvarez F, et al. Correction of Phenylketonuria after Liver Transplantation in a Child with Cirrhosis. *N Engl J Med*. 1993 Jul 29;329(5):363–363.

74. Michals-Matalon K. Developments in phenylketonuria. *Topics Clin Nutr* 2001;16:41-50.
75. Blau N. PKU and BH4. *Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*. SPS Publications (2006); 2006.
76. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr*. 1999 Sep;135(3):375–8.
77. Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat*. 2008 Jan;29(1):167–75.
78. Burnett JR. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/phenoptin), an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. *IDrugs*. 2007;10(11):805–13.
79. Pey AL, 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*. 2007;81(5):1006–24.
80. Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. Optimizing the use of sapropterin (BH4) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2009;96(4):158–63.
81. Blau N. Sapropterin dihydrochloride for the treatment of hyperphenylalaninemias. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(9):1207–18.
82. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Burlina AB, Burlina AP, Braga C, et al. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: Effect on blood phenylalanine. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(2):153–8.
83. Schindeler S, Ghosh-Jerath S, Thompson S, Rocca A, Joy P, Kemp A, et al. The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: An MRS and neuropsychological study. *Mol Genet Metab*. 2007;91(1):48–54.
84. Strisciuglio P, Concolino D. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*. 2014;4(4):1007–17.
85. Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab*. 2011;104(SUPPL.):2–9.
86. Leuzzi V, Pansini M, Sechi E, Chiarotti F, Carducci C, Levi G, et al. Executive function impairment in early-treated PKU subjects with normal mental development. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27(2):115–25.
87. Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):2339–44.
88. Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens RC, Gamez A, Michols-Matalon K, et al. Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Mol Ther*. 2004;10(2):220–4.
89. Hoskins JA, Jack G, Wade HE, Peiris RJ, Wright EC, Starr DJ, et al. Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. *Lancet (London, England)*. 1980;1(8165):392–4.

90. Safos S. Enzyme Replacement Therapy in ENU2 Phenylketonuric Mice Using Oral Microencapsulated Phenylalanine Ammonia-Lyase: A Preliminary Report. *Artif Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 1995 Jan 11;23(6):681–92.
91. Henry HL, Norman AW. Phenylalanine Depletion for the Management of Phenylketonuria : 1978;(May):76–8.
92. Sarkissian CN, Gámez A, Wang L, Charbonneau M, Fitzpatrick P, Lemontt JF, 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.* 2008;105(52):20894–9.
93. Fao. Probiotics in food. *Food Nutr Pap.* 2001;85:71.
94. Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 2010;143(3):87–102.
95. Liu J, Jia X, Zhang J, Xiang H, Hu W, Zhou Y. Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2002 Jul;30(4):243–57.
96. Baedeker M, Schulz GE. Overexpression of a designed 2.2 kb gene of eukaryotic phenylalanine ammonia-lyase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1999;457(1):57–60.
97. Faulkner JDB, Anson JG, Tuite MF, Minton NP. High-level expression of the phenylalanine ammonia lyase-encoding gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* using a bifunctional expression system. *Gene.* 1994;143(1):13–20.
98. Jia SR, Cui JD, Li Y, Sun AY. Production of l-phenylalanine from trans-cinnamic acids by high-level expression of phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli*. *Biochem Eng J.* 2008;42(3):193–7.
99. Erickson RH, Gum JR, Lindstrom MM, Mckean D, Kim YS. Regional Expression and Dietary Regulation of Rat Small Intestinal Peptide and Amino Acid Transporter mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Nov;216(1):249–57.
100. Ding Z, Georgiev P, Thöny 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.* 2006;13(7):587–93.
101. Harding CO, Gillingham MB, Hamman K, Clark H, Goebel-Daghighi E, Bird A, et al. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther.* 2006 Mar 1;13(5):457–62.
102. Rebuffat A, Harding CO, 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.* 2010;21(4):463–77.
103. 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.* 2013;36(6):955–9.
104. Chen L, Woo SLC. Complete and persistent phenotypic correction of phenylketonuria in mice by site-specific genome integration of murine phenylalanine hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(43):15581–6.

105. 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.* 2007;282(32):23402–9.
106. Steven R. Schwarze, Alan Ho AV-A, Dowdy* SF. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* (80-). 1999;285:1569–72.
107. Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(4 SPEC.ISS.):579–96.
108. Leandro P, Gomes CM. Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini Rev Med Chem.* 2008;8(9):901–11.
109. Muntau AC, Gersting SW. 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.* 2010;33(6):649–58.
110. Muntau AC, Leandro J, Staudigl M, Mayer F, Gersting SW. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: Pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(4):505–23.
111. Bernier V, Lagac?? M, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones: Potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(5):222–8.
112. Pey AL, Desviat LR, Gámez A, Ugarte M, Pérez B. Phenylketonuria: Genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat.* 2003;21(4):370–8.
113. Erlandsen H, Pey AL, Gámez A, Pérez B, Desviat LR, Aguado C, 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.* 2004;101(48):16903–8.
114. Gersting SW, Kemter KF, Staudigl M, Messing DD, Danecka MK, Lagler FB, et al. Loss of Function in Phenylketonuria Is Caused by Impaired Molecular Motions and Conformational Instability. *Am J Hum Genet.* 2008;83(1):5–17.
115. Santos-sierra S, Kirchmair J, Perna AM, Reiß D, Kemter K, R schinger W, et al. Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. *Hum Mol Genet.* 2012;21(8):1877–87.
116. Leandro P, Rivera I, Lechner MC, de Almeida IT, Konecki D. The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase. *Mol Genet Metab.* 2000;69(3):204–12.
117. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
118. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76–85.
119. Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature.* 1970;227.
120. Abr moff MD, Magalh es PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ Part II. *Biophotonics Int.* 2005;11(7):36–43.

121. 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.* 2009;877(30):3926–9.
122. Figueiredo L, Cadete A, Gonçalves LMD, Corvo ML, Almeida AJ. Intranasal immunisation of mice against *Streptococcus equi* using positively charged nanoparticulate carrier systems. *Vaccine.* 2012;30(46):6551–8.
123. Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res.* 1997 Oct;14(10):1431–6.
124. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350–4.
125. 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.* 2011;1812(5):602–12.
126. Thórolfsson M, Ibarra-Molero B, Fojan P, Petersen SB, Sanchez-Ruiz JM, Martínez A. L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry.* 2002;41(24):7573–85.
127. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22(11):1393–8.
128. Backliwal G, Hildinger M, Chenuet S, Wulhfard S, De Jesus M, Wurm FM. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(15).
129. Bollin F, Dechavanne V, Chevalet L. Design of experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expr Purif.* 2011;78(1):61–8.
130. Lin CY, Huang Z, Wen W, Wu A, Wang C, Niu L. Enhancing protein expression in HEK-293 cells by lowering culture temperature. *PLoS One.* 2015;10(4):1–19.
131. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small.* 2010;6(1):12–21.
132. Chu Z, Huang Y, Tao Q, Li Q. Cellular uptake, evolution, and excretion of silica nanoparticles in human cells. *Nanoscale.* 2011;3(8):3291–9.
133. Bodnar M, Hartmann JF, Borbely J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2005;6(5):2521–7.
134. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res.* 1998 Sep;15(9):1326–31.
135. Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Nov 5;52(2):145–50.
136. Şenel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(10):1467–80.

137. Kim K, Kwon S, Park JH, Chung H, Jeong SY, Kwon IC, et al. Physicochemical characterizations of self-assembled nanoparticles of glycol chitosan-deoxycholic acid conjugates. *Biomacromolecules*. 6(2):1154–8.
138. Liang H, Yang T, Huang C, Chen M, Sung H. Preparation of nanoparticles composed of poly (g-glutamic acid) -poly (lactide) block copolymers and evaluation of their uptake by HepG2 cells. *J Control Release*. 2005;105:213–25.
139. Schwartz AL, Fridovich SE, Lodish HF. Kinetics of internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line. *JBiolChem*. 1982;257(8):4230–7.
140. Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem*. 1982;51(2):531–54.
141. Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*. 1990;29(43):10009–18.
142. D'Souza AA, Devarajan P V. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - Strategies and applications. *J Control Release*. 2015;203:126–39.
143. Fabio K, Gaucheron J, Di Giorgio C, Vierling P. Novel galactosylated polyamine bolaamphiphiles for gene delivery. *Bioconjug Chem*. 2003;14(2):358–67.
144. Hashida M, Akamatsu K, Nishikawa M, Yamashita F, Yoshikawa H, Takakura Y. Design of polymeric prodrugs of PGE1 for cell-specific hepatic targeting. *Pharmazie*. 2000 Mar;55(3):202–5.
145. Hashida M, Akamatsu K, Nishikawa M, Yamashita F, Takakura Y. Design of polymeric prodrugs of prostaglandin E(1) having galactose residue for hepatocyte targeting. *J Control Release*. 1999 Nov 1;62(1–2):253–62.
146. Cho CS, Cho KY, Park IK, Kim SH, Sasagawa T, Uchiyama M, et al. Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene. *J Control Release*. 2001;77(1–2):7–15.
147. Ohya Y, Oue H, Nagatomi K, Ouchi T. Design of macromolecular prodrug of cisplatin using dextran with branched galactose units as targeting moieties to hepatoma cells. *Biomacromolecules*. 2001;2(3):927–33.
148. Cho CS, Kobayashi A, Takei R, Ishihara T, Maruyama A, Akaike T. Receptor-mediated cell modulator delivery to hepatocyte using nanoparticles coated with carbohydrate-carrying polymers. *Biomaterials*. 2001;22(1):45–51.
149. ThermoFisher Scientific Invitrogen life technologies. pTrcHis vector map. ThermoFisher Sci Invit life Technol [Internet]. 2016;1.

VII. ANEXOS

1. Vetor utilizado para a expressão da hPAHwt

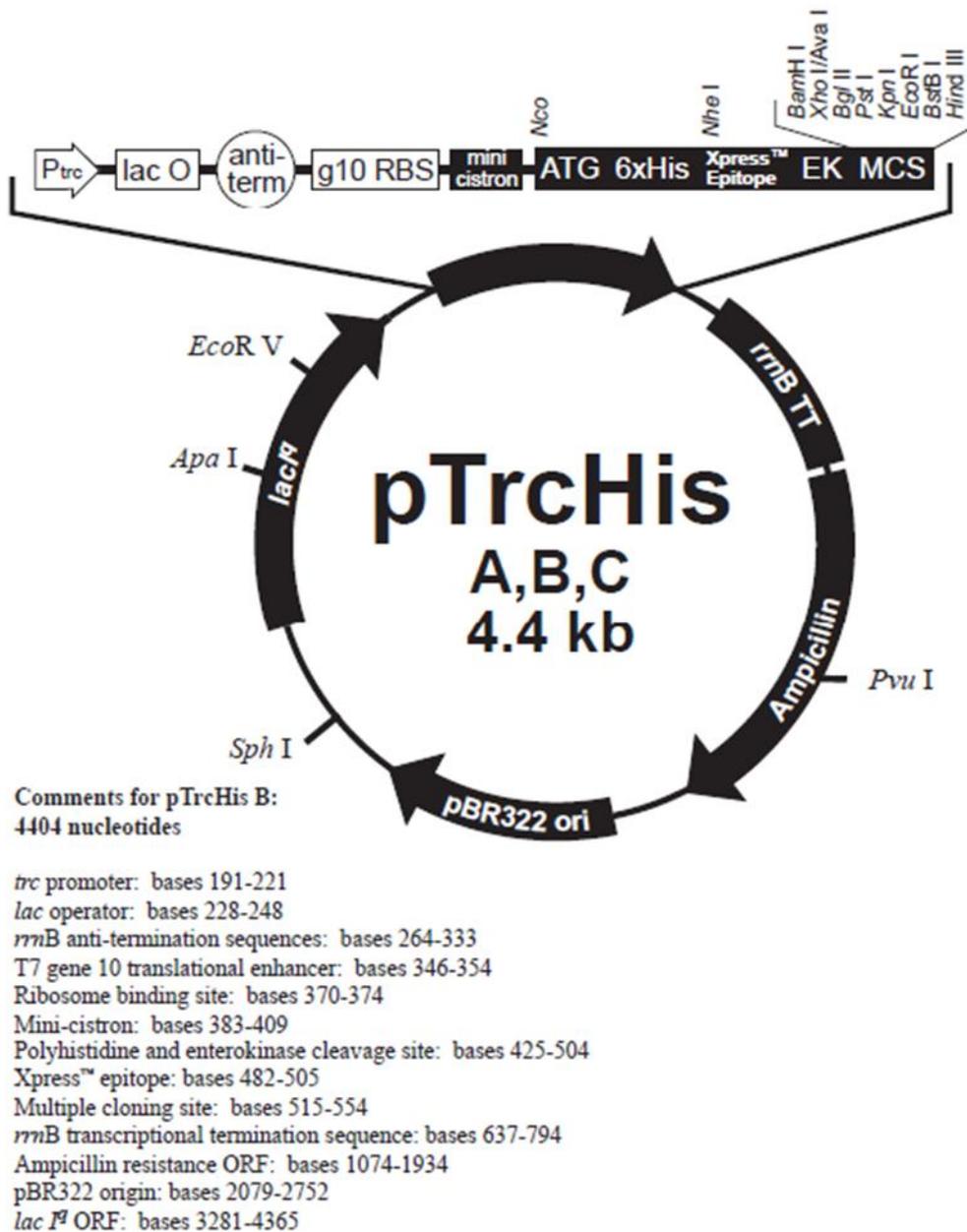


Figura VII.1 – Representação esquemática do vetor de expressão procariota pTrcHisB (Invitrogen). Retirado de (149)