

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- BIOQUÍMICA

MODELO DE NIEMANN- PICK TIPO C INDUZIDO POR U18666A: EFEITO SOBRE
VÁRIOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM ASTRÓCITOS DE RATOS DE CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS RECÉM- NASCIDOS

DANIELA COPETTI SANTOS

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- BIOQUÍMICA

MODELO DE NIEMANN- PICK TIPO C INDUZIDO POR U18666A: EFEITO SOBRE
VÁRIOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM ASTRÓCITOS DE RATOS DE CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS RECÉM- NASCIDOS

DANIELA COPETTI SANTOS

Orientadora: Dra. Janice Carneiro Coelho

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

PORTO ALEGRE

2015

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever essa tese é enumerar e lembrar das pessoas que estiveram ao meu lado em todos esses anos de estudo e pesquisa, todas me dando incentivo e apoio nos momentos mais difíceis. Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante todo esse percurso.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Gilberto e Doralina, que me apoiaram em todos os momentos, diante de todas as dificuldades e me incentivaram a seguir a trajetória acadêmica.

A minha filha, Nathalia, minha eterna princesa, agradeço o estímulo, o carinho, por entender a minha ausência em todos os momentos que não pude estar presente, e principalmente pela sua existência há 21 anos dando força e sentido a minha vida.

Aos meus irmãos, as minhas cunhadas, aos meus sobrinhos e sobrinhas pelos momentos que estiveram ao meu lado e por acreditarem na minha capacidade.

Aos meus afilhados, Antônia, Felipe e Juliana, por me darem a oportunidade de ter momentos tão especiais e alegres em minha vida.

Preciso homenagear, ainda, os amigos queridos que de uma forma ou de outra contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar esse percurso. Prefiro não nominá-los aqui, pois poderia estar esquecendo de alguns.

À Carla, minha amiga que soube me ouvir, dedicando alguns momentos de sua vida para me orientar em alguns aspectos que foram fundamentais para a concretização desse sonho.

Agradeço as minhas colegas de trabalho da Escola de Saúde Pública: Andrea Pautasso, Alessandra Rocha, Denise Agliozzo, Roberta Ferraz, Thaís Cornely e Viviane Menezes que foram sempre solícitas e não mediram esforços para que eu pudesse finalizar esse momento em minha vida. Ao meu colega Alexandre Gamba sempre incansável e me apoiando nos momentos em que eu mais precisava.

À minha querida colega, amiga e a quem ensinou o caminho que eu deveria trilhar até chegar ao doutorado, Fernanda Timm.

Meu agradecimento e minha homenagem especial a Janice Carneiro Coelho, professora e orientadora, agradeço por sua cumplicidade e responsabilidade direta na construção desta Tese.

Um agradecimento especial merece ser feito aos meus colegas do Laboratório de Doenças Lisossômicas de Depósito, com quem tive o prazer de conviver, trocar ideias e que foram fundamentais no desenvolvimento dessa etapa.

Agradeço a Coordenação do Programa de Pós Graduação, aos meus professores e aos funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo acolhimento, atenção e principalmente pelo ambiente acadêmico aberto ao pensamento crítico e ao debate de ideias.

À CAPES pela oportunidade e pela bolsa concedida durante o doutorado.

SUMÁRIO	Página
Agradecimentos.....	III
Apresentação.....	VII
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
Lista de Abreviaturas.....	X
I INTRODUÇÃO.....	12
1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO (EIM).....	13
1.1.2. As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs).....	14
1.2. O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O COLESTEROL.....	15
1.3. DOENÇA DE NIEMANN PICK.....	17
1.3.1 Doença de Niemann Pick tipo C.....	19
1.4. ENZIMAS LISOSSOMAIS E A DNPC.....	21
1.4.1. Esfingomielinase Ácida.....	21
1.4.2. β - Glicosidase (GBA).....	23
1.4.3. β -Galactosidase (GLB).....	24
1.5 ENZIMA Na^+/K^+ -ATPase E O COLESTEROL.....	25
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E AS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	27
1.7 FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS E A DNPC.....	28
1.8(+)-5-METIL-10,11-DI-HIDRO-5H-DIBENZENO[A-B]CICLOHEPTANO-5-10AMINO (MK-801).....	29

1.9 3-β- [2- (DIETILAMINO) ETOXI] ANDROST-5-EN-17-ONA (U18666A).....	30
2. OBJETIVOS.....	32
3. CAPITULO I.....	35
Artigo: Effect of U18666A on beta-glucosidase, sphingomyelinase and beta-galactosidase activities in astrocytes of young rats	
4. CAPITULO II.....	44
Artigo: Niemann Pick C disease in astrocytes of rats effect in vitro administration of U18666A on oxidative stress and Na ⁺ /K ⁺ ATPase	
5. CAPITULO III.....	74
Artigo: Endosomal accumulation of lipids in U18666A- induced NPC leads to hyperphosphorylation of GFAP and VIMENTIN in culture of astrocytes.	
6.DISSCUSSÃO.....	96
7.CONCLUSÕES.....	111
8.PERSPECTIVAS.....	115
9. BIBLIOGRAFIA.....	117

APRESENTAÇÃO

Esta Tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: *Introdução*, *Objetivos*, *Capítulos* (I, II e III – referentes a artigos científicos), *Discussão*, *Conclusões*, *Perspectivas*, *Bibliografias*.

A seção *Introdução*, apresenta o embasamento teórico que levou a formular as propostas da Tese, as quais estão na seção *Objetivos*.

A seção *Capítulos* contém os artigos científicos aceitos para publicação ou submetidos, os quais estão apresentados de acordo com os objetivos específicos. Esta seção também apresenta os materiais, os métodos e as referências bibliográficas específicas de cada artigo e está dividida em *Capítulos I, II e III*.

A seção *Discussão* contém uma interpretação dos resultados obtidos nos diferentes artigos científicos. A seção *Conclusões* aborda as conclusões gerais obtidas na Tese. A seção *Perspectivas* apresenta as possibilidades de desenvolvimento de projetos futuros a partir dos resultados obtidos, dando continuidade a esta linha de pesquisa.

A seção *Bibliografia* lista as referências citadas na *Introdução* e *Discussão* da Tese. E por fim, a seção *Anexos* apresenta a carta de aprovação e submissões dos artigos científicos elaborados nesta Tese e apresentações na seção *Capítulos*.

RESUMO

A doença de Niemann – Pick tipo C (DNPC) é uma desordem genética lisossomal neurodegenerativa causada pelo acúmulo de lipídios, principalmente colesterol, esfingomielina e glicosfingolipídios no espaço perinuclear. U18666A é um agente inibidor no transporte de colesterol, que vem sendo utilizado em diversos modelos tanto *in vivo* quanto *in vitro* para mimificar DNPC, principalmente em fibroblastos. Diversas doenças neurodegenerativas estão associadas ao estresse oxidativo e acredita-se que radicais livres, produtos de lipoperoxidação e alterações na fluidez da membrana possam inibir a enzima Na^+ , K^+ -ATPase, levando a célula a um “déficit” energético. A deficiência de algumas proteínas como a GFAP parecem tornar os astrócitos menos eficientes em lidar com estados de injúrias no SNC, além de algumas pesquisas mostrarem um decréscimo na fosforilação de vimentina em fibroblastos humanos com NPC. MK-801 é um receptor não competitivo de NMDA (N-metil D-aspartato), sendo considerado um neurotransmissor primário do cérebro. O objetivo desse estudo foi observar os efeitos da droga U18666A, que causam o acúmulo de colesterol no citoplasma de astrócitos de ratos jovens e a partir daí verificar a atividade de algumas hidrolases lisossomais, parâmetros do estresse oxidativo, metabolismo energético e a hiperfosforilação de filamentos intermediários (GFAP e vimentina) em astrócitos de ratos jovens. Através da coloração de Filippin e microscopia de fluorescência e através da utilização do CellM software, foi feita a visualização e quantificação do colesterol. A melhor dose de U18666A que permitiu o acúmulo de colesterol foi de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ em um período de incubação de 48 horas. Astrócitos de ratos incubados com a droga (DNPC) mostraram um significativo aumento de colesterol em relação aquelas culturas sem a droga. A medida da atividade da esfingomielinase e enzimas beta-glicosidase em astrócitos de ratos com NPC foi significativamente menor do que astrócitos controle, o que é consistente com a atividade da DNPC humana. Verificando as alterações sofridas em nível de enzimas antioxidantes e estresse oxidativo observamos que U18666A leva a um aumento nos grupos TBARS e Carbonil, porém a uma diminuição nos grupos tióis medidos por ensaios sulfidril. Além disso, ocorre um decréscimo na atividade de CAT e SOD e aumenta a produção de NO, ao analisarmos a atividade de Na^+ , K^+ ATPase verifica-se um efeito inibitório na atividade dessa enzima. Os presentes resultados mostram que o acúmulo de colesterol nas culturas de células, induz o estresse oxidativo, o que indica que é potencialmente tóxico e confirma os resultados observados em outras doenças neurodegenerativas. Por fim, ao utilizarmos 4 grupos diferentes, fazendo uso ou não da droga e do MK-801 verificou-se que com o acúmulo de colesterol nas células ocorre uma hiperfosforilação dos Filamentos Intermediários, tanto de GFAP quanto de vimentina, porém o MK-801, sendo um antagonista de NMDA e agindo sobre os receptores de glutamato demonstram inibirem a excitotoxicidade provocada pelo U18666A. Além dos parâmetros que foram testados em nosso trabalho, como estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e metabolismo energético, fazendo uso da droga para mimificar NPC, outros parâmetros bioquímicos das células, os quais ainda não foram testados em nossos estudos, podem ser testados com este modelo animal, contribuindo assim para uma melhor compreensão da doença. Podemos fazer uso ainda de substâncias que diminuam a excitotoxicidade causada pelo aumento do colesterol, observados na NPC, a exemplo do antagonista do receptor NMDA, MK-801, podendo se tornar ferramentas viáveis para auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas relacionadas a excitotoxicidade glutamatérgica.

ABSTRACT

The Niemann - Pick type C (NPC) is a disorder genetic neurodegenerative caused by lysosomal accumulation of lipids, especially cholesterol, sphingomyelin and glycosphingolipids in the perinuclear space. U18666A is an inhibitory agent in cholesterol transport, which has been used in several models both in vivo and in vitro to mimificar NPC, especially in fibroblasts. Various neurodegenerative diseases are associated with oxidative stress and it is believed that the free radicals, lipid peroxidation products and changes in membrane fluidity may inhibit the enzyme Na^+ , K^+ -ATPase, causing the cell suffering a deficit of energy. The deficiency of certain proteins as GFAP seem to make astrocytes less efficient in dealing with states of injury in the CNS, and some research shows a decrease in phosphorylation of vimentin in human fibroblasts with NPC. MK-801 is a noncompetitive NMDA receptor, being considered a primary neurotransmitter. The objective of this study was to observe the effects of U18666A drug, causing the accumulation of cholesterol in the cytoplasm of young rat astrocytes and thus verify the activity of some lysosomal hydrolases, oxidative stress parameters, energy metabolism and hyperphosphorylation of intermediate filaments (vimentin and GFAP) in astrocytes of young rat. Through Filipin staining and fluorescence microscopy and by using the software CellIM was made visualization and quantitation of cholesterol. The best dose U18666A which allowed the accumulation of cholesterol was 0.25 mg / mL in a 48 hour period of incubation. Rat astrocytes (NPC) incubated with the drug showed a significant increase in total cholesterol relative to the cultures without drug. The measure of activity of sphingomyelinase and beta-glucosidase enzymes in rat astrocytes NPC was significantly lower than control astrocytes, which is consistent with the activity of the human NPC. Noting the changes suffered in the level of antioxidant enzymes and oxidative stress U18666A observed that leads to an increase in TBARS and carbonyl groups, but a decrease in the thiol groups as measured by sulfhydryl tests. Moreover, there is a decrease in SOD and CAT activity and increases the production of NO, by analyzing the activity of the Na^+ , K^+ -ATPase there is an inhibitory effect on this enzyme. The present results show that the accumulation of cholesterol in cell cultures induces oxidative stress, which indicates that it is potentially toxic, confirming the results observed in other neurodegenerative diseases. Finally, we used four different groups, with or without the use of the drug MK-801, and found that the accumulation of cholesterol in cells leads to hyperphosphorylation FI both GFAP and vimentin, however, MK-801, an NMDA antagonist acts on the glutamate receptor, and inhibit excitotoxicity caused by U18666A. Besides the parameters that were tested in our study, as oxidative stress, antioxidant enzymes and energy metabolism, causing the drug to mimificar NPC other biochemical parameters of the cells, which were not tested in our study may be tested with this model animal, thus contributing to a better understanding of the disease. We can still make use of substances that reduce the excitotoxicidade caused by increased cholesterol, observed in NPC, such as the NMDA receptor antagonist, MK-801, which can become viable tools to aid in the treatment of neurodegenerative diseases related to excitotoxicidade glutamatergic.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASM- Enfingomielinase Ácida

BHE- Barreira Hemato-Encefálica

CAT- Catalase

DLDs- Doenças Lisossômicas de Depósito

EIM- Erros Inatos do Metabolismo

DNPA- Doença de Niemann Pick tipo A

DNPB- Doença de Niemann Pick tipo B

DNPC- Doença de Niemann Pick tipo C

ERO- Espécies Reativas de Oxigênio

FI- Filamentos Intermediários

FXFD- Família de pequenas proteínas de membrana contendo domínio regulador no transporte de íons.

GBA- β - Glicosidase

GFAP- Proteína Glial Fibrilar Ácida

GLB- β - Galactosidase

GM1, GM2, GM3- Gangliosídeos dos tipos 1, 2 e 3.

HDL- Lipoproteínas de Alta Densidade

L- Lisossoma tardio

LDL- Lipoproteínas de Baixa Densidade

LE- Lisossomos Endossomais

Na⁺/K⁺- ATPase – Bomba de Sódio/Potássio ATPase

NMDA- N-metil D-Aspartato

NO- Óxido Nítrico

³²P- Fósforo 32

RE- Retículo Endoplasmático

RL- Radicais Livres

SAP- Saposinas

SCAP- Proteína Ativadora da Clivagem de SREBP

SH- Grupo Tiol

SNC- Sistema Nervoso Central

SOD- Superóxido Dismutase

TBARS- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

U18666A- 3-β- [2- (dietilamino) etoxi] androst-5-en-17-ona

VIM- Vimentina

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os dinâmicos padrões do metabolismo representam contínuas movimentações através de produtos intermediários, mas a falência de um único passo afeta o fluxo, causando acúmulo de substrato ou deficiência de um produto levando a um Erro Inato do Metabolismo (EIM) (Dherai, 2012). Os EIM são ocasionados, portanto, por uma falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo (Sainz, et al., 2002; Araujo, 2004).

Tais defeitos no metabolismo são considerados a causa dos EIM, em que a ausência de um produto esperado, acúmulo de substrato da etapa anterior interrompida ou o surgimento de uma rota metabólica alternativa podem levar ao comprometimento dos processos celulares (Araujo, 2004).

Quando os EIM são mencionados, o que pensamos é que são extremamente raros e que ocorrem em pequenos segmentos da população. Apesar de serem individualmente raros, sua frequência conjunta é alta, aproximadamente 1:1000 nascidos vivos, resultando ao redor de 20% das mortes por doenças genéticas e ao redor de 38% de doenças neurológicas hereditárias ou doenças de depósito (Dherai, 2012). Segundo Martins et al. (2006), são descritas mais de 500 doenças classificadas como EIM. Soliz et al., (2007) ainda relatam que os mesmos ocorrem em todos os grupos étnicos e existem em todos os continentes.

Em grande parte são doenças que afetam todo o organismo e podem se manifestar em qualquer faixa etária, fazendo com que médicos de diferentes especialidades devam

atentar aos sinais e sintomas de um erro metabólico em qualquer paciente que porventura, possa ser encaminhado aos seus cuidados (Martins, 1999; Araujo, 2004).

Várias são as maneiras pelas quais os EIM podem ser classificados. Saudubray et al (2012) categorizaram os EIM em três grandes grupos, conforme suas características fisiopatológicas:

- a) Grupo I- EIM que culminam em intoxicação: Esse grupo envolve distúrbios do metabolismo intermediário que levam à intoxicação aguda ou progressiva do acúmulo de compostos tóxicos, secundário no comprometimento das vias de metabolização de pequenas moléculas.
- b) Grupo II- EIM envolvendo metabolismo energético: Esse grupo envolve distúrbios cuja clínica é decorrente de alterações de produção e consumo energéticos. Em sua maioria, são provenientes de distúrbios do fígado, miocárdio, músculo, cérebro entre outros tecidos.
- c) Grupo III – EIM envolvendo moléculas complexas: Esse grupo inclui doenças que alteram a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas.

1.1.2 AS DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO (DLDs)

Os lisossomos são responsáveis pela reciclagem dos constituintes celulares que contenham catabólitos enzimáticos operando em meio ácido (Valayannopoulos et al., 2011). Estão presentes em todas as células, porém são mais abundantes nas fagocitárias, como os macrófagos e leucócitos. As enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomos são segregadas no retículo endoplasmático rugoso e transportados para o Aparelho de Golgi, onde são empacotadas nas vesículas. As macromoléculas a serem digeridas são

introduzidas por meio da fagocitose, a fim de serem degradadas. Os catabólitos originados da digestão intralisossomal difundem-se através da membrana e entram no citosol onde são utilizados pelo metabolismo celular. As enzimas lisossômicas degradam diversos substratos, como os glicosaminoglicanos, esfingolípídios, glicolípídios e glicoproteínas (Junqueira e Carneiro, 2004).

As doenças de depósito lisossômico (DLDs), também conhecidas como desordens de acúmulo lisossomal compreendem um grupo de mais de 60 EIM causados por alterações na atividade, modificações pós-traducionais e no tráfego de hidrolases lisossomais, bem como em proteínas de membrana e de transporte, resultando na expansão do espaço endossomal/lisossomal nas células (Lachman et al., 2004; Heard et al., 2010).

As DLDs afetam vários tecidos e órgãos ocasionando fenótipos complexos, com variações nas manifestações neurológicas, digestivas e esqueléticas (Parenti, 2009). De maneira geral, as doenças relacionadas ao sistema nervoso central apresentam um caráter progressivo promovendo alta debilidade cognitiva ao paciente.

1.2. O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O COLESTEROL

O Sistema Nervoso Central (SNC) é um sistema que contém grande quantidade de colesterol comparado aos demais. Em humanos, o cérebro compreende cerca de 2% do peso corporal, mas estima-se que 25% do colesterol livre no corpo seja encontrado no SNC (Dietschy e Turley, 2001). Esse sistema é composto de células nervosas, os neurônios e vários tipos de células especializadas, as células gliais que são os astrócitos, oligodendrócitos e microglias (Fields e Stevens-Graham, 2002).

Os astrócitos estão intimamente associados com sinapses neuronais e têm sido associados a uma grande quantidade de funções: funções do tecido conjuntivo, participação na formação da barreira hemato-encefálica, participação em eventos de reparação e reciclagem no SNC (Siegel et al., 1999). Pesquisas sugerem que neurônios maduros *in vivo* dependem de colesterol derivados de astrócitos (Nieweg et al., 2009).

As células adquirem colesterol via lipoproteínas contendo colesterol através de endocitose mediada por receptores (Brown e Goldstein, 1986).

Quase todo colesterol do cérebro é sintetizado *in situ* e, como não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) a partir da circulação periférica, seu excesso é convertido a 24-S-hidroxicolesterol. Este facilmente atravessa a BHE e permite a liberação diária de cerca de 6-7 mg de colesterol a partir do cérebro (Dietschy e Turley, 2001). Astrócitos produzem colesterol e apolipoproteína E (APOE) que em conjunto com os fosfolípidos, geram lipoproteínas que são semelhantes em tamanho as lipoproteínas de alta densidade (HDL) do plasma (Boyles et al., 1985). No SNC, os lípidios são transportados por essas lipoproteínas e essas partículas que circulam no líquido são ricas em apolipoproteínas E, principal proteína constitutiva do HDL (Lipoproteína de Alta Densidade) cerebral (Dietschy and Turley, 2001). Transportadores de colesterol, incluindo Transportador Cassete de ATP-A1 (ABCA1), Transportador Cassete de ATP-G1 (ABCG1) e Transportador Cassete de ATP-G4 (ABCG4) desempenham papéis cruciais na regulação lipídica do SNC (Reinshagen et al., 2009). Cabe lembrar que a camada dupla de fosfolípidos que compõe a membrana neuronal regula a fluidez, influencia o número e a afinidade dos receptores nela ligados e modula os processos de transdução de sinais. Os fosfolípidos são os principais componentes da membrana neuronal e servem como

substrato para a síntese de mediadores intra e extra-celulares, aumentando assim, sua relevância para a neurotransmissão (Gattaz, 2000).

Funções neuronais essenciais dependem da disponibilidade de colesterol. Essencialmente todo o colesterol no SNC está na forma não esterificada (Bjorkhem e Meaney, 2004). O colesterol é essencial para manutenção de uma membrana plasmática íntacta, o que é necessário para manter o ambiente de íons necessários para a geração e propagação de potenciais de ação (Pfrieger, 2003a). A disponibilidade de colesterol está envolvida na morfogênese do SNC durante o desenvolvimento (Engelking et al., 2006). As membranas mielínicas são ricas em colesterol assim como em outros lipídios (Saher et al., 2005). A baixa quantidade de mielina leva à disfunção neuronal, como é evidenciado pela desmielinação em desordens neurológicas severas, como na esclerose múltipla (Genain et al., 1999).

O interesse sobre o metabolismo do colesterol no SNC, surgiu quando se observou que o colesterol está envolvido na doença de Alzheimer. Defeitos na biossíntese de colesterol também têm sido descritos em várias doenças neurodegenerativas, entre elas a doença de Huntington, uma desordem neurodegenerativa autossômica progressiva (Corder et al., 1993).

1.3. DOENÇA DE NIEMANN PICK

A Doença de Niemann- Pick (NPD) é uma doença genética autossômica recessiva (MIM: 607608) que resulta num metabolismo celular lipídico anormal, descrita pela primeira vez nos finais dos anos 20 por Albert Niemann e Ludwig Pick. Tal como outras DLDs, é uma doença rara e mundialmente dispersa (Cho, et al., 2009; Rodriguez- Pascau,

et al., 2009). A NPD é um grupo de esfingolipidoses, uma das subdivisões das DLDs, caracterizadas pelo acúmulo de lipídios no baço, fígado, pulmões, medula óssea e cérebro. Elas podem resultar de uma mutação no gene SMPD1 (*sphingomyelin phosphodiesterase 1*) que codifica a enzima ASM (*acid sphingomyelinase enzyme*), dando origem aos tipos A e B da doença, ou de uma mutação nos genes Npc1 ou Npc2, dando origem ao tipo C da doença.

Os pacientes com tipo A (DNPA) e B (DNPB) da doença de Niemann- Pick têm uma deficiência na atividade da enzima esfingomielinase ácida (ASM), enzima esta responsável pela hidrólise de esfingomielina nos lisossomas (Ledesma et al., 2011). O espectro clínico desta desordem é variável. No tipo A, em que a enzima ASM encontra-se praticamente inexistente, a criança morre por volta dos 2-3 anos de idade (Ledesma, et al., 2011). No tipo B, em que a enzima ASM é produzida de uma forma deficiente, as primeiras manifestações clínicas poderão ocorrer apenas na adolescência ou no jovem adulto, levando a uma morte prematura (Thurberg et al., 2012).

Os tratamentos para DNP são limitados, sendo a maioria deles constituídos por cuidados de apoio. Os transplantes de órgãos têm sido tentados com relativo sucesso. As perspectivas futuras incluem terapia de reposição enzimática e terapia gênica. Transplante de medula óssea tem sido realizado como tratamento de suporte para DNPB, além de cuidados nutricionais, medicação, fisioterapia e acompanhamento por especialistas, medidas estas que podem ajudar na qualidade de vida do paciente (McGovern e Schuchman, 2009).

1.3.1 DOENÇA DE NIEMANN- PICK TIPO C

A doença de Niemann Pick tipo C (DNPC) é uma desordem progressiva, hereditária, autossômica recessiva de acúmulo lisossomal causada por acúmulo de colesterol não esterificado e outros lipídios acumulados em endossomos/ lisossomos tardios (LE/L) de todas as células e tecidos, principalmente em células hepáticas e nervosas.

As manifestações clínicas são heterogêneas ocasionando, na maioria das vezes, disfunção hepática e severa neurodegeneração (Carstea et al., 1997; Millard et al., 2005; Vande e Peack, 2011). Ataxia progressiva, hepatoesplenomegalia variável, paralisia ocular vertical, caracterizam o fenótipo clássico (Patterson et al., 2007; Imric et al., 2007). Essa desordem ocorre em aproximadamente 1 em 120.000 indivíduos (Vanier, 2010). Sua manifestação ocorre geralmente entre a metade da infância e adolescência. A morte ocorre geralmente até a terceira década de vida.

A causa da doença de DNPC é diferente daquela da DNPA e DNPB que são causadas por defeitos no gene da esfingomielinase ácida lisossomal (Ledesma et al., 2011). A DNPC é causada por mutações nos genes codificadores da proteína Niemann- Pick C1 (NPC1- 18q11-12) ou NPC2 (14q24.3), que levam à disfunção e acúmulo de colesterol não-esterificado, esfingomielina, fosfolipídios e glicolipídios no baço e fígado. Conforme Liscum e Sturley (2004), os glicolipídios encontram-se muito elevados no cérebro e observa-se deficiência parcial da esfingomielinase em fibroblastos como consequência secundária ao sequestro lisossômico do colesterol, incluindo acúmulo de gangliosídeos GM2 e GM3 em espaço intracelular (Vanier et al., 1999; Walkley et al., 2004). Fibroblastos em cultura apresentam uma deficiência na síntese de ésteres de colesterol não-esterificado nos compartimentos intra-vesiculares.

Aproximadamente 95% dos casos de DNPC são ligados a mutações no gene NPC1 e 4% dos casos estão ligados a mutações no gene NPC2 (Vanier, 2010). Muitas das mutações NPC1 são mutações pontuais missense, e mais de 200 diferentes mutações NPC1 tem sido vistas em pacientes (Vanier, 2010).

A proteína NPC1 nativa é uma glicoproteína bastante grande, com 1252 aminoácidos de membrana que está localizada em endossomos tardios. Ela apresenta 13 domínios transmembrana e interage transitoriamente com lisossomos e com a rede trans-Golgi. Ela possui um domínio de esterol e mostra homologia com os domínios da HMG-CoA redutase e SCAP (proteína ativadora de clivagem de SREBP), a qual é ágil para regular positivamente a síntese de colesterol e absorção). Dois domínios podem desempenhar um papel de interações proteína- proteína: um “loop” rico em cisteína com um motivo dedo- anel onde estão aproximadamente 1/3 das mutações descritas e um domínio altamente conservado com um motivo zíper de leucina, localizado na cauda N-terminal onde há um local de ligação de colesterol (Storch e Xu, 2009; Vanier, 2010).

Ao contrário da proteína NPC1, a proteína NPC2 é pequena, com apenas 132 aminoácidos, tendo um peptídeo sinal adicional de 19 aminoácidos. Essa pequena glicoproteína lisossomal é solúvel, secretada e recapturada. Ela é transportada para os lisossomos através de um receptor de manose-6-fosfato que se liga ao colesterol (Storch e Xu, 2009). A mutação p.S120P é observada em pacientes com início juvenil e forma neurológica progressiva e tem sido fundamental para elucidar o significado funcional do sítio de colesterol na ligação da proteína NPC2 (Infante et al., 2008).

Acredita-se que as proteínas NPC1 e NPC2 ambas ligam-se ao colesterol. NPC1 liga-se ao colesterol com alta afinidade numa proporção molar de 1:1 e NPC2 rapidamente transfere colesterol, mas não glicoesfingolipídios, ceramida, fosfolipídios ou ácidos graxos

entre lipossomas fosfolipídios ou membranas *in vitro* (Wang et al., 2010). Estudos recentes indicam que o papel das proteínas NPC1 e NPC2 no transporte de colesterol é restrito à exportação lisossomal. Os dados atuais sugerem que o movimento retrógrado do colesterol a partir da membrana plasmática para o RE não requer NPC1 e que a implicação destas proteínas no processamento celular de colesterol endógeno ainda é tema de discussão (Vanier, 2010).

1.4. ENZIMAS LISSOSSOMAS E A DNPC

1.4.1 ESFINGOMIELINASE ÁCIDA

A esfingomielinase ácida (ASM) é uma fosfodiesterase da família das metalofosfatases que se distribuem de forma ubíqua em todos os tecidos dos mamíferos (Sakuragawa, 1982; Yamanaka e Sukuzi, 1982; Quintern et al., 1987).

Na estrutura da ASM, entre o aminoácido 1 ao aminoácido 46, localiza-se a região de sinalização de peptídeo e, do aminoácido 89 até o 165 existe um domínio que apresenta uma elevada homologia com a sequência de saposinas (SAP) (Ponting, 1994). As SAP são proteínas ativadoras que são necessárias como cofatores para atuação de algumas hidrolases de esfingolipídios. O domínio SAP da ASM é essencial para a atividade catalítica da enzima, e acredita-se que também possa formar uma estrutura terciária compacta que estabilizaria a proteína contra as condições agressivas dos lisossomos. A região terminal da ASM não contém nenhum domínio funcional reconhecível, porém estudos demonstram que é crucial para a estrutura e conformação da proteína e, por sua vez, está envolvido na função enzimática e sua secreção (Lee et al, 2007).

Em toda a sua estrutura existem seis lugares de N-glicosilação, seis pontes dissulfeto e múltiplos lugares de fosforilação (Lasmann et al., 2003). A localização de ASM não se limita exclusivamente ao interior dos lisossomos.

A ASM possui um papel importante na regulação do metabolismo dos esfingolipídios mediante a hidrólise de esfingomiéline e é uma enzima chave na produção de ceramida que intervém nos mais diversos processos celulares, sendo assim de grande importância. A ASM tem um papel como mediador bioquímico de diversos estímulos, quando as células são expostas a certos estímulos apoptóticos, a ASM se transloca do lisossomo para a membrana plasmática, rica em esfingomiéline, gerando domínios de membrana ricos em ceramida (rafts). Estes microdomínios funcionam como plataformas de sinalização que permitem o agrupamento de receptores e a transmissão do estímulo apoptótico (Gulbins, 2003). A ASM também é essencial para a organização e funcionamento das membranas celulares neuronais, onde há o acúmulo de esfingolipídios, se relacionando assim com a fluidez da membrana (Galvan et al., 2008).

Recentemente, Bianco et al., (2009) descobriram uma nova função para ASM: a liberação de micropartículas provenientes da membrana plasmática. As micropartículas são microvesículas que transportam moléculas que contribuem na comunicação intercelular.

A atividade da ASM encontra-se normal em tecidos e leucócitos de pacientes com DNPC. Em culturas de fibroblastos pode-se encontrar uma deficiência parcial da enzima como consequência secundária do acúmulo de colesterol. Tendo em vista que a interação entre os lipídios não é igual, lipídios que interagem e/ou empacotam mais eficazmente têm tendência a separar-se naturalmente para formarem espontaneamente domínios na membrana. Os domínios formados pelo colesterol e pela esfingomiéline têm sido um dos

assuntos mais controversos e estudados nos últimos anos (Nakashima et al., 1986; Simons et al., 2004; Lingwood et al., 2009).

Muitos artigos apresentam resultados mostrando que o colesterol interage melhor com a esfingomielina do que com qualquer outro fosfolípido (Ohvo-Rekila et al., 2002). A velocidade de desorção do colesterol em bicamadas contendo esfingomielina é mais baixa do que a velocidade da desorção contendo qualquer outro tipo de fosfolípido. Em misturas binárias contendo esfingomielina e outros fosfolípidos, o colesterol anula preferencialmente a transição de fase de esfingomielina, indicando a interação preferencial com as moléculas deste lipídio (Simons et al., 2004).

1.4.2. β -GLICOSIDASE (GBA)

Os lisossomos contêm cerca de 40 enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases. Estas enzimas são todas hidrolases ácidas, enzimas que clivam ligações através da adição de água. Muitos dos produtos de digestão lisossomal retornam para o citosol. Portanto, os lisossomos são envolvidos em reciclagem desses compostos (Alberts et al., 2010; Lieberman et al., 2013).

Devido à ampla variedade de ligações glicosídicas que ocorrem naturalmente, nos mais diversos seres vivos, desde plantas, bactérias, incluindo os seres humanos existe uma diversidade de enzimas, denominadas glicosidases, cuja função é a clivagem destas ligações. Esta diversidade é, presumivelmente, consequência da natureza diversa de seus substratos, e também das diferentes soluções evolucionárias para o problema da construção de sítios ativos capazes de hidrolisar ligações glicosídicas (Whiters, 2001). Especificamente

as GBAs formam um grupo altamente heterogêneo de enzimas hidrolíticas (Bhatia et al., 2002).

A deficiência ou superexpressão da GBA está associada a diversas desordens metabólicas. A principal condição humana associada a deficiência desta enzima é a doença de Gaucher. As mutações afetam a GBA lisossomal humana, uma enzima associada a membrana, e a tornam incapaz de degradar seu substrato glicocerebrosídeo, em ceramida e glicose (Grabowski et al. 1990). Glicocerebrosídeos podem também se acumular no exterior dos lisossomos em outros tipos de células, levando a quebra ou produção de outros complexos glicolipídios (ex: glicosfingolipídios) que são particularmente encontrados no baço. Perda da homeostasia do cálcio relacionada ao acúmulo de glicocerebrosídeo nos neurônios contribui para as manifestações neurológicas da doença.

A atividade da GBA poderá apresentar-se normal ou levemente diminuída em pacientes com DNPC em fibroblastos, mas principalmente em leucócitos (Lo et al., 2010).

1.4.3. β -GALACTOSIDASE (GLB)

A GLB, é uma enzima hidrolítica que catalisa a hidrólise do β -glicosídeo em monossacarídeos. A atividade não-redundante da GLB lisossomal garante a correta degradação de glicoconjugados β -galactosil em lisossomos e contribui para a manutenção da homeostase celular. Esta enzima cliva com alta afinidade o sialo-glicoconjugado G_{M1} , extremamente abundante em membranas neurais. Do G_{M1} , a galactose é removida produzindo G_{M2} , e de G_{M2} o resíduo de N-acetilgalactosamina é separado para formar G_{M3} ,

pela ação da GLB e da β -N-acetilhexosaminidase, respectivamente (Tettamanti 2004; Dorland, 2006).

Esta enzima é uma glicoproteína sintetizada em uma forma precursora com peso molecular de 88 KDa que, após processamento, dá origem a uma enzima madura com 64 KDa, contendo de 7,5 a 9% de carboidratos em sua estrutura (Frost et al., 1978).

Defeitos genéticos que afetam a função da GBA em humanos, além de causarem um acúmulo anormal e progressivo de G_{M1} em células de inúmeros tecidos, também produzem um efeito devastador no SNC, resultando na doença neurodegenerativa de acúmulo de G_{M1} , a gangliosidose G_{M1} ou a doença de Morquio tipo B (Okada e O'Brien, 1968; Suzuki et al., 2001).

Não há na literatura, trabalhos que associem um aumento ou diminuição da atividade da β -galactosidase na DNPC.

1.5. ENZIMA Na^+/K^+ -ATPASE E O COLESTEROL

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma enzima transmembrana que catalisa o transporte ativo de sódio e potássio através da membrana celular. Esse transporte é de grande importância visto que mais de um terço de ATP consumido é utilizado para bombear tais íons. A Na^+ , K^+ -ATPase está presente em praticamente todas as células, incluindo o cérebro (Aperia, 2007). Ela consome cerca de 40- 60% do ATP cerebral para manter o gradiente eletroquímico necessário à excitabilidade neuronal, regulação do volume celular, balanço osmótico e para o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na^+ ; como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (Erecinska e Silver, 1994; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003).

Sua organização estrutural consiste de uma subunidade alfa (α) e de uma beta (β). Em humanos, identificou-se 4 isoformas da subunidade α (α_1 - α_4) e três isoformas de subunidade β (β_1 - β_3). Frequentemente, encontram-se associadas à Na^+ , K^+ -ATPase, proteínas de membrana FXFD (Família de pequenas proteínas de membrana contendo domínio regulador no transporte de íons), também referidas como subunidade gama (γ) as quais influenciam na atividade deste complexo enzimático (Reinhard et al., 2012).

Dados da literatura sugerem que a expressão e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase é modulada por múltiplos mecanismos, em resposta às necessidades celulares (Therien e Blostein, 2000). Nesse contexto, a atividade dessa enzima pode ser inibida por radicais livres, produtos de lipoperoxidação e alterações na fluidez da membrana (Dencher et al., 2007). Acredita-se que a Na^+ , K^+ -ATPase mantém resíduos em microdomínios de membrana especializados chamado caveolas e interagem com caveolina-1 (Wang et al., 2004). Além do envolvimento na biogênese da caveola, caveolina é envolvida no tráfego de colesterol da membrana plasmática (Uittenbogaard et al., (2002). Reciprocamente, o colesterol da membrana plasmática controla a mobilidade e o tráfego de caveolina-1 (Park et al., 2009; Haycr et al., 2010). Curiosamente verifica-se que a ação de Na^+ , K^+ -ATPase interage diretamente com caveolina-1 (Cai et al., 2006). Além disso, essa interação não regula somente o tráfego e mobilidade de caveolina-1, mas também tem um importante envolvimento na manutenção do colesterol na membrana plasmática e na regulação intracelular no tráfego de colesterol (Chen et al., 2009). Considerando a importância da Na^+ , K^+ -ATPase para o funcionamento normal do organismo e do SNC, e seu papel fundamental na manutenção do gradiente elétrico da membrana celular, a inibição dessa enzima tem sido associada a fisiopatologia de diversas doenças, como a isquemia cerebral

(Wyse et al., 2000), epilepsia (Grisar, 1984), desordens neurodegenerativas (Yu, 2003), crises convulsivas (Renkawek et al., 1992), doenças de Alzheimer (Hattori et al., 1998).

1.6. ESTRESSE OXIDATIVO E AS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Nos últimos anos, diversos estudos em modelos animais e em pacientes vêm demonstrando a participação do estresse oxidativo na fisiopatologia de alguns EIM intermediário, incluindo as acidemias orgânicas, as doenças peroxissomais, os defeitos de oxidação mitocondrial de ácidos graxos e as aminoacidopatias (Vargas et al., 2004; Wajner et al., 2004; Barschak et al., 2006; Schuck et al., 2009; Sgaravatti et al., 2009; Ribas et al., 2010; Tonin et al., 2010). Acredita-se que o acúmulo dos metabólitos tóxicos e/ou alterações no estado antioxidante nestas desordens possa levar a um desequilíbrio redox, contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas, principalmente o neurológico, apesar de o mecanismo responsável pelo estresse oxidativo nos EIM ainda não estar completamente esclarecido.

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) são normalmente encontradas em organismos vivos em baixas concentrações, de forma equilibrada (Dröge, 2002). Quando há uma diminuição nas defesas antioxidantes e/ou um aumento na concentração intracelular de espécies reativas, ocorre o estado denominado de estresse oxidativo, onde os RL (Radicais Livres) começam a produzir danos às macromoléculas biológicas como lipídios, acarretando na alteração da permeabilidade de membranas celulares, proteínas, desencadeando a oxidação destas, e lesões no DNA, promovendo dessa forma, dano tecidual e até mesmo morte celular (Bechman e Ames, 1998; Ramos- Vasconcelos et al., 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Uma série de estudos confirmam que o aumento do estresse oxidativo tem sido um dos fatores que contribuem para a patofisiologia do SNC.

O estresse oxidativo, o qual é decorrente de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os radicais livres, pode estar relacionado a inúmeras doenças, tais como: aterosclerose, câncer, doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas crônicas.

Um número crescente de situações patológicas envolvendo o SNC, incluindo doenças neurodegenerativas, convulsões, isquemia/reperfusão e demência, têm sido associadas ao estresse oxidativo (Halliwell, 2006a).

1.7. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS E A DNPC

FIs (Filamentos intermediários) são os maiores constituintes do citoesqueleto celular e sofrem ativamente montagem e desmontagem via ciclo fosforilação/defosforilação (Klymkowsky, 1995).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é o principal FI de astrócitos maduros, e por esse motivo é considerada um marcador dessas células. A vimentina (vim) é o FI expresso em células mesenquimais, além de ser encontrada nos astrócitos imaturos (Alberts et al., 2008). É importante, ressaltar que células sem FI de vimentina são incapazes de transportar LDL colesterol derivado de lipoproteínas de baixa densidade dos seus lisossomos para o RE (retículo endoplasmático) por esterificação (Sarria et al., 1992), um fenótipo que é semelhante ao observado nas células com DNPC.

O papel estrutural da GFAP em astrócitos é conhecido há bastante tempo. Porém, nos últimos anos, ela tem se mostrado importante em diversas funções astrocíticas como regeneração após processos patológicos, plasticidade sináptica, gliose reativa, manutenção

da forma, migração celular e como alvo de vias de transdução de sinais. Além disso, a GFAP participa de um sofisticado sistema de comunicação entre os astrócitos e neurônios (Middeldorp e Hol, 2011).

Várias doenças apresentam aumento na expressão de GFAP, como a doença de Alzheimer, encefalomielite, esclerose múltipla (Eng e Ghimikar, 1994) e doença de Alexander (Middeldorp e Hol, 2011). Por outro lado, estudos com animais knockout para a GFAP têm mostrado que falta dessa proteína parece tornar os astrócitos menos eficientes em lidar com estados agudos de injúrias no SNC (Pekny e Pekna, 2004).

Já foi observado um decréscimo na fosforilação de vimentina solúvel e um aumento na vimentina insolúvel em fibroblastos humanos com DNPC (Walter et al., 2009), provavelmente desequilibrando o ciclo de vimentina.

1.8(+)-5-METIL-10,11-DI-HIDRO-5H-DIBENZENO[A-B]CICLOHEPTANO-5-10-AMINO (MK-801)

Dizocilpina também conhecido como (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-cicloheptano-5-10-amino ou MK-801, é um antagonista não competitivo do N-Metil-D-aspartato (NMDA) que é um receptor de glutamato, sendo este, um dos neurotransmissores primários do cérebro. Pesquisas recentes têm relatado a toxicidade do glutamato sobre células neuronais (excitotoxicidade) e que o uso do antagonista do receptor NMDA (como o MK-801) teriam um efeito neuroprotetor em diversas situações, por diminuírem a ativação dos receptores glutamatérgicos (Luby et al., 1959; Korpi et al., 1987).

Os antagonistas do receptor NMDA, incluindo o MK-801, têm sido extensivamente estudados para utilização no tratamento de doenças com componentes de excitotoxicidade,

tais como acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática, e doenças neurodegenerativas, como a Doença de Huntington, Doença de Alzheimer, e Esclerose Lateral Amiotrófica. O MK-801 tem sido efetivo na proteção dos neurônios em culturas de células e na neurodegeneração excitotóxica de modelos animais (Mukhin et al., 1997; Ayala e Tapia, 2005; Kocaeli et al., 2005).

1.9 3-B- [2- (DIETILAMINO) ETOXI] ANDROST-5-EN-17-ONA (U18666A)

A amina hidrófoba mais específica e eficaz utilizada para criar um fenótipo de DNPC é a 3-β- [2- (diethylamino) ethoxy] androst-5-en-17-one (U18666A), que contém uma estrutura de anel hidrofóbico associado com uma estrutura lateral ramificada e um grupo amino que inibe o transporte de colesterol intracelular. Descrito há 30 anos, ela inibe a enzima desmosterol redutase (Cenedella e Bierkamper, 1979), responsável pela redução do desmosterol na biossíntese do colesterol, e também bloqueia o transporte de colesterol-LDL a partir de lisossomos para o retículo endoplasmático (Eisele et al., 1997).

O U18666A reduz a quantidade de colesterol que atinge o retículo endoplasmático e impede o movimento de colesterol entre os compartimentos lisossomais e a membrana plasmática, e da membrana plasmática para outros compartimentos intracelulares (Lange e Steck, 1994). Ele pode também atuar sobre a atividade ou a síntese de outras proteínas ou lípidos que facilitam o movimento do colesterol e alteram a distribuição celular da proteína NPC1.

Em 1973, Jurgelski et al., utilizaram pela primeira vez o U18666A para mimetizar o fenótipo de DNPC em fibroblastos de gambás. Os resultados confirmaram os encontrados (acúmulo de colesterol) em pacientes com DNPC. Após esse trabalho, outros foram

realizados. Em 1978 Bierkamper e Cenedella, conseguiram comprovar em fibroblastos de ratos recém-nascidos, o mesmo acúmulo de colesterol que era encontrado em fibroblastos de pacientes com DNPC. Estudos de Lange et al., (2002), realizados em fibroblastos humanos mostraram que o bloqueio no transporte de colesterol por U18666A e o aumento dos níveis de colesterol no citoplasma celular foram semelhantes aos realizados em fibroblastos de seres humanos com a doença. Camundongos knockout para DNPC (NPC^{-/-}), após utilização de U18666A, também demonstraram um aumento de colesterol citoplasmático, compatível com aquele encontrado em fibroblastos de humanos com a doença (Sáez et al., 2013).

A utilização deste composto para imitar a DNPC em astrócitos de ratos ou camundongos selvagens, não knockout, ainda não foi relatada, bem como o efeito da acumulação de colesterol em astrócitos, produzida por U18666A sobre a atividade de hidrolases lisossomais, estresse oxidativo e citoesqueleto celular.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O propósito desse estudo foi observar se a droga U18666A induzia o acúmulo de colesterol no citoplasma dos astrócitos de ratos jovens, mimetizando a DNPC. Em caso afirmativo, observar o efeito deste acúmulo de colesterol sobre a atividade de algumas hidrolases lisossomais, sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e do metabolismo energético e sobre a hiperfosforilação de filamentos intermediários, no intuito de verificar alterações bioquímicas que possam contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentados por indivíduos com DNPC.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo I:

Administrar a droga U18666A em culturas de astrócitos de ratos jovens comparando com culturas onde não foi adicionada a droga e observar:

- 1) A curva dose-resposta com a droga U18666A para estabelecer a melhor dose e tempo de incubação,
- 2) O padrão de fluorescência perinuclear de colesterol quanto ao número de pixels,
- 3) A quantidade de colesterol citoplasmático,
- 4) A medida da atividade das enzimas esfingomielinase, β -glicosidase e β -galactosidase

Capítulo II:

Analisar os efeitos desencadeados pelo aumento de colesterol em astrócitos de ratos jovens, após a administração da droga U18666A, observando:

- 1) A atividade da Na^+/K^+ -ATPASE,
- 2) A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT,
- 3) A medida de TBARS,
- 4) O conteúdo de sulfidrilas e de carbonilas,
- 3) Os níveis de óxido nítrico.

Capítulo III:

Verificar os prováveis efeitos ocasionados sobre o citoesqueleto celular após o aumento do colesterol, provocados pela administração da droga U18666A in vitro, em astrócitos de ratos jovens, observando:

- 1) A fosforilação de filamentos intermediários;
- 2) A citotoxicidade de U18666A sobre a GFAP e a vimentina;
- 3) Os efeitos inibitórios de MK-801 sobre a fosforilação de GFAP e vimentina;
- 4) A ação do MK-801 em relação ao U18666A e a fosforilação dos filamentos intermediários.

3. CAPÍTULO 1

Artigo: *Effect of U18666A on beta-glucosidase, sphingomyelinase and beta-galactosidase activities in astrocytes of young rats* **Status:** *Publicado no Journal Membrane Biology*

Effect of U18666a on Beta-Glucosidase, Sphingomyelinase, and Beta-Galactosidase Activities in Astrocytes of Young Rats

Daniela Copetti Santos · Cristina da Silva Garcia · Carla Vieira de Andrade ·
Vanessa Vitcoski Daitx · Vitória da Costa Moraes · Francieli Rohden ·
Janice Carneiro Coelho

Received: 2 September 2014 / Accepted: 21 November 2014 / Published online: 17 February 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Niemann-Pick type C disease (NPC) is a neurodegenerative genetic disorder caused by accumulation of lipids, especially cholesterol, in the perinuclear space. U18666A is a cholesterol transport-inhibiting agent, being used to mimic NPC, mainly in fibroblasts. The objective of this study was to observe the effect of the drug U18666A, which causes the accumulation of cholesterol in the cytoplasm of astrocytes from newborn rats, on some lysosomal hydrolase activities. Filipin staining and fluorescence microscopy, through CellM software, were used for visualization and quantification of cholesterol. The dose of U18666A that provided the greatest accumulation of cholesterol was that of 0.25 µg/mL in incubation for 48 h. Primary rat astrocytes incubated with the drug (NPC) showed a significantly higher amount of cholesterol than those without U18666A (controls). The measurement of activity of enzymes sphingomyelinase and beta-glucosidase in astrocytes of rats with NPC was significantly lower than that of control astrocytes, which is consistent with the disease in humans. The activity of the enzyme beta-galactosidase showed no significant difference between

both groups. We concluded that U18666A appears to be an excellent intracellular cholesterol transport-inhibiting agent affecting some metabolic pathways in astrocytes of young rats, which mimics NPC in these animals. Just like the change in the activity of lysosomal enzymes has been demonstrated, other biochemical parameters of the cell can be tested with this animal model, thus contributing to a better understanding of the disease.

Keywords Niemann-Pick type C disease · Astrocytes · U18666A · Cholesterol · Lysosomal enzymes

Introduction

Niemann-Pick type C disease (NPC) is a rare lysosomal storage disorder, estimated to be in 1 case per 150,000 live births (Meikle et al. 1997).

The disease was described as having a sub acute nervous system involvement, with moderate/slower course and a mild visceral storage; however, later work led to a reclassification of NPC as a cellular lipid trafficking disorder, involving more specifically endocytosed cholesterol (Pentchev et al. 1994). In NPC disease, cells fail to esterify exogenously added cholesterol. This disorder is characterized by unique abnormalities of intracellular transport of endocytosed cholesterol with accumulation of unesterified cholesterol in endosomal/lysosomal compartment and the Golgi complex (Ikonen and Holtta-Vuori 2004; Vanier 2010). Besides cholesterol sequestration, NPC cells can also accumulate other lipids: sphingomyelin, phospholipids, and glycosphingolipids accumulated in the liver and spleen (Patterson et al. 2001), and glucosylceramide, lactosylceramide, and gangliosides GM2 and GM3 accumulated in the brain of affected individuals (Zervas et al.

D. C. Santos (✉) · C. da Silva Garcia ·
C. V. de Andrade · V. V. Daitx · V. da Costa Moraes ·
F. Rohden · J. C. Coelho

Lysosomal Storage Diseases Laboratory, Biochemistry
Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: daniela-santos@saude.rs.gov.br

J. C. Coelho
e-mail: janice.coelho@ufrgs.br

J. C. Coelho
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro
Barcelos, 2600 anexo, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

2001). NPC is related to a progressive neurodegenerative phenotype and in most cases is fatal (Patterson et al. 2001).

This disease has an autosomal recessive inheritance and is caused by mutations in genes, NPC1 (in 95 % of the cases) and NPC2 (in approximately 4 % of the cases) (Vanier 2010) located on chromosome 18. Mutations in NPC1 and NPC2 genes cause severe imbalance of intracellular lipid transport, leading to accumulation of unesterified cholesterol in perinuclear lysosomes (Liscum and Sturley 2004). The NPC1 and NPC2 proteins both bind cholesterol. NPC1 binds cholesterol with high affinity in a 1:1 molar ratio and NPC2 rapidly transfers cholesterol, but not glycosphingolipids, ceramide, phospholipids, or fatty acids, between phospholipid liposomes or membranes *in vitro* (Wang et al. 2010).

NPC clinical manifestations are heterogeneous: hepatosplenomegaly, prolonged neonatal jaundice, respiratory impairment, and secondary progressive neurological disorder. Clinical manifestations start from infancy to childhood, but occur most frequently during late childhood (Vanier 2010).

Similar NPC phenotype can be induced through numerous approaches and various drugs like steroids and hydrophobic amines which have been considered to cause a cholesterol traffic imbalance similar to NPC (Lange et al. 2000; Lloyd-Evans et al. 2008). Other proteins, like CFTR (White et al. 2004), GULP (Kiss et al. 2006), Rab11 (Holttä-Vuori et al. 2002), PMD (Simons et al. 2002), CREB (Lemberg et al. 2008), MLN64 (Zhang et al. 2002), and VPS4 (Bishop and Woodman 2000), not structurally related to either NPC1 or NPC2, also produced a storage of cholesterol creating a NPC-like phenotype. On the other hand, other works demonstrated that Rab proteins 7, 8, and 9 correct the cholesterol deposition in NPC human fibroblasts (Linder et al. 2007).

The most effective and specific hydrophobic amine used to create a NPC-like phenotype is 3- β -[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one (U18666A), which contains a hydrophobic ring structure associated with a branched lateral structure and an amino group that inhibits the transport of intracellular cholesterol. Described 30 years ago, it inhibits the enzyme desmosterol reductase (Cenedella and Bierkamper 1979) responsible for reduction of desmosterol to cholesterol in cholesterol biosynthesis, and it also blocks the transport of LDL-cholesterol from lysosomes to the endoplasmic reticulum (Eisele et al. 1997). U18666A lowers the amount of cholesterol that reaches the endoplasmic reticulum and prevents the movement of cholesterol between lysosomal compartments and the plasma membrane, and from the plasma membrane to other intracellular compartments (Lange and Steck 1994). It can also act on the activity or synthesis of other

proteins or lipids that facilitate cholesterol movement and change the cellular distribution of NPC1 protein.

The compound U18666A has been used to mimic NPC phenotype, because the cholesterol accumulated in the intracellular space in cells treated with U18666A is similar to the one observed in cells of patients with NPC (Vanier 2010; Wang et al. 2010; Neufeld et al. 1999; Lange et al. 2002). These studies on the blockade in cholesterol transport by U18666A and increased levels of cholesterol in cell cytoplasm were conducted on fibroblasts from humans (Lange et al. 2002), skunks (Jurgelski et al. 1973), newborn rats (Bierkamper and Cenedella 1978), and NPC^{-/-} mice (Sáez et al. 2013). The use of this compound to mimic NPC in astrocytes from wild rats, not knockout rat or mice, has not yet been reported, as well as the effect of cholesterol accumulation in astrocytes produced by U18666A on lysosomal hydrolase activities.

Therefore, the purpose of this study was to observe the effect of the drug U18666A, which causes the accumulation of cholesterol in the cytoplasm of astrocytes from newborn rats, in order to show this accumulation of cholesterol in the cytoplasm and the effect of this drug on the some lysosomal hydrolase activities.

Materials and Methods

Animals

Wistar rats (0–3 days) from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS had free access to water and a 20 % (w/w) protein commercial chow. They were kept in a room with a 12:12 h light/dark cycle and temperature of 22 ± 1 °C. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication n°85-2, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Cortical Astrocyte Culture

The rats were euthanized by decapitation and the cerebral cortex was removed. It was homogenized with CMF-BSS buffer and placed in a 24 well-plate in DMEN—Dulbecco’s Modified Eagle Medium (GIBCO®), supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (SBF) (Invitrogen). After the cells reached confluence in culture, the medium was changed 4 h after the total incubation time was completed, every four days.

The “multiwell” plates used for the development of cultures were previously incubated with a substrate of poly-L-lysine (Sigma).

Experiments to Obtain the Time Curve with the use of the Drug U18666A

In these experiments, the cultures were incubated with U18666A at doses of 0.1; 0.25; 0.5; 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in periods of 24, 48, and 72 h, in order to determine the optimal dose and time of incubation of the drug in astrocytes so that cholesterol accumulation is apparent.

Filipin Staining

The technique of Kruth et al. (1986) was used for the observation of the amount of cholesterol accumulated after addition of the drug. 450 μL of medium DMEN supplemented with 5 % of lipoprotein deficient serum (LPDS) was added to each well of the culture plate, according to the time set for the dose curve above. 0.73 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ of low-density lipoprotein (LDL) was added and subsequently the plates were again incubated for another 24 h in CO_2 incubator at 37 °C. After this period, in the dark, the cells were washed twice with 300 μL of pre-warmed PBS and the medium removed. Then the cells were fixed for 45 min with 300 μL of phosphate buffered formalin 10 % and pH 7.2 in dark room. The fixative was removed and the cells washed with PBS buffer and 0.9 % saline. Filipin staining (0.01 % in PBS) (Sigma) was used for 45 min for the staining of coverslips. Then the cells were washed with 0.9 % saline. For microscopic analysis, a 358 nm excitation and 461 nm emission filter was used, for an exhibition of 64 ms.

Quantification of Fluorescence of Filipin Staining

All slides were examined and photographed by NIS-Element AR 3.10 in Nikon fluorescence microscope (Nikon Instruments, Melville, NY). The quantification of the fluorescence of the images was analyzed for the number of pixels, using CellM Olympus software.

Cholesterol Dosage

Astrocyte intracellular cholesterol was determined by fluorometric technique using the commercial kit Amplex Red Cholesterol (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Thus, a four-point standard curve, and a H_2O_2 positive control were used, as well as the samples that were pipetted into a black 96-well fluorometric plate and flat bottom (OptiPlateTM-96F, Perkin Elmer).

Fifty microliters of reaction solution W2 (300 μL Amplex Red Reagent + 2 U/mL cholesterol oxidase + 0.2 U/mL cholesterol esterase) was added to the curve and samples in all wells. The plate was kept for 30 min at

37 °C, in shaking incubator and dry heat. Afterwards, fluorescence was measured in plate reader (Spectramax M5-Molecular Devices) at 544 nm excitation and 590 nm emission. The value obtained was corrected by measuring protein levels (Lowry et al. 1951) found in the astrocytes tested and expressed in μg of cholesterol/mg protein.

Measurement of Acid Sphingomyelinase Activity (ASM)

A technique adapted from Pentchev et al. (1980) was used for measuring ASM activity. Thus, ^{14}C -10 $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{L}$ sphingomyelin radioactive substrate was used. After incubation of the sample in substrate during 4 h while stirring at 37 °C in dry incubator (Marconi MA-127), some procedures were performed and titration of radioactivity was carried out in β Perkin Elmer's scintillation system (Liquid Scintillation Analyzer TriCarb[®] 2800 TR). The results were expressed in nmol/h/mg of protein.

Measurement of Beta-Galactosidase (GLB) Enzyme Activity

Miniaturized technique of Goldim et al. (2012) adapted from Suzuki and Suzuki (1970) was used for measuring the activity of beta-galactosidase (GLB): 10–20 μL of the sample diluted in 10 μL of NaCl 0.2 M elution buffer was placed in a fluorometric plate, and 20 μL of the substrate 4-methylumbelliferyl β -D-galactoside 1.33 mM. After incubation at 37 °C for 1 h, fluorescence was read in plate reader (SpectraMax M5-Molecular Devices) at 365 nm excitation and 450 nm emission. The results were expressed in nmol/h/mg of protein.

Measurement of Beta-Glucosidase (GLB) Enzyme Activity

The enzymatic activity of β -glucosidase was measured according to Goldim et al. (2012) adapted from Petters et al. (1976). 5 μL of the sample diluted in 12.5 μL of phosphate citrate buffer 0.54 M, pH 5.5 were placed in a fluorometric plate. Then 25 μL of the substrate 4-methylumbelliferyl β -D-glycoside 10 mmol/L (substrate) with 50 mmol/L of sodium taurocholate in distilled water. After incubation at 37 °C for 1 h, fluorescence was read in a plate reader (SpectraMax M5-Molecular Devices) at 365 nm excitation and 450 nm emission. The results were expressed in nmol/h/mg of protein.

Statistical Analysis

Data were compared by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test when F value was

significant ($p < 0.05$). All analyzes were performed using the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) in a compatible PC-computer.

Results

Determination of U18666A Dose for the Experimental Model

According to Fig. 1, we can see that the dose of 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of U18666A in astrocytes from rats was the most appropriate regarding the increase in cholesterol compared to astrocytes from rats not treated with the referred substance.

In Fig. 1, it can also be seen that incubation of drug during 48 h was more appropriate to ensure this significant increase in cholesterol level.

Filipin staining in astrocytes indicating increase in cholesterol can be visualized in Fig. 2.

Presence of Cholesterol in Astrocytes from Rats with and Without Addition of U18666A

Control cells did showed no fluorescence in the cytoplasm, indicating no accumulation of cholesterol (Fig. 2a). In turn, cells to which U18666A (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added for 48 h showed an increased amount of cholesterol in the cytoplasmic space, which is indicated by the intense perinuclear fluorescence (Fig. 2b). After quantification by fluorescence using CellM software, the differences were confirmed by one-way ANOVA where it was found that the amount of cholesterol in control cells was significantly lower than that in the astrocytes with the drug ($p < 0.001$).

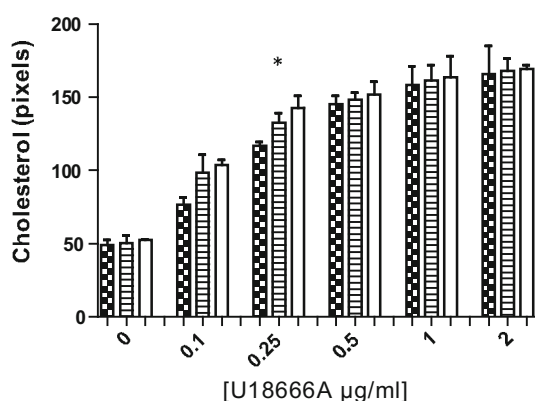


Fig. 1 Cholesterol concentration depending on the dose and time of incubation of U18666A in astrocytes from rats. (▨) 24 h; (■) 48 h; (▩) 72 h of incubation. Cholesterol was measured using CellM Olympus software and was expressed as pixels of fluorescence. Data are expressed as mean \pm standard deviation. (*) statistically significant difference from the group not treated with the drug (control) and the group with U18666A 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.0001$)

Amount of Intracellular Cholesterol in Astrocytes From Rats With and Without the Addition of U18666A

In an assay for quantification of intralysosomal unesterified cholesterol accumulation using Amplex Red kit, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between control samples and the astrocytes incubated with U18666A (Fig. 3). The cholesterol level of astrocytes that received the drug (54.2 μg of cholesterol/mg of protein) was two times higher than that in control astrocytes (25.7 μg of cholesterol/mg of protein).

A significant correlation was obtained when we compared the Filipin quantitation method of cholesterol determination using CellM software and the measurement of cholesterol using the Amplex Red kit (controls: $r = 0.9973$, $p < 0.04$ and astrocytes incubated with U18666A: $r = 0.99$, $p < 0.0051$).

Measurement of the Activity of Lysosomal Hydrolases in Astrocytes From Rats that Underwent Treatment with U18666A in the NPC Model

Sphingomyelinase (ASM)

When ASM enzyme activity in astrocytes (Fig. 4) was compared between the control samples and the samples that mimic NPC, a significant difference was observed ($p < 0.0209$), that is, astrocytes in contact with the drug showed an enzymatic activity (42.50 ± 3.21) significantly lower than that of control cells (65.68 ± 7.83).

β -Glucosidase (GBA)

The activity of enzyme GBA in control astrocytes was significantly greater (701.8 ± 78.24) than that of NPC astrocytes (366.9 ± 120.2) ($p < 0.0369$). These results can be seen in Fig. 5.

β -Galactosidase (GLB)

According to the analysis of enzyme GLB activity in astrocytes from control samples and samples positive for the accumulation of cholesterol, no significant difference ($p > 0.1035$) was observed between these groups (137.1 ± 18.0 ; 187.5 ± 15.70 , respectively), although according to Fig. 6, the enzymatic activity in NPC astrocytes may seem greater than that of the controls.

Discussion

Cholesterol is an essential component of the Central Nervous System, and growing evidence suggests an

Fig. 2 Astrocytes from rats incubated without (a) and with (b) U18666A 0.25 µg/mL for 48 h. Astrocytes are visualized after Filipin staining technique

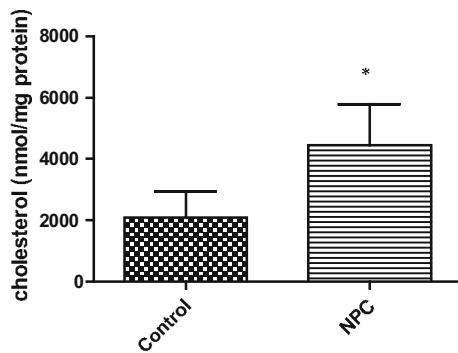
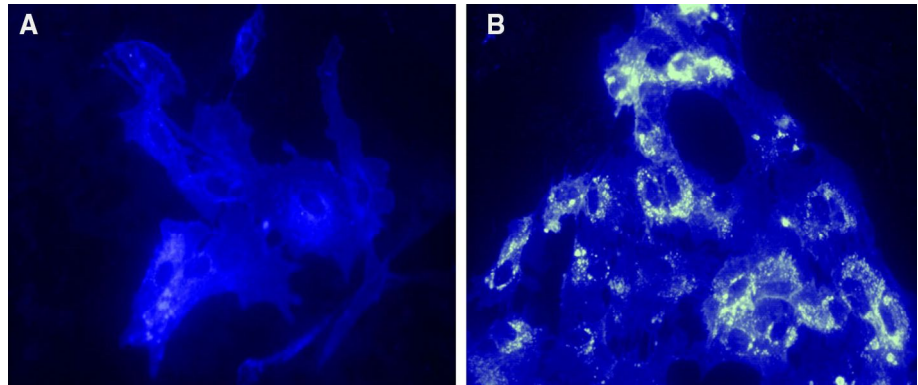


Fig. 3 Amount of intracellular cholesterol (µg/mg of protein) in astrocytes measured with a laboratory KitAmplex[®] Red Cholesterol. Astrocytes from rats were incubated without (control) and with U18666A 0.25 µg/mL for 48 h. Data are expressed as mean ± standard deviation. (*) statistically significant difference from control group ($p < 0.05$)

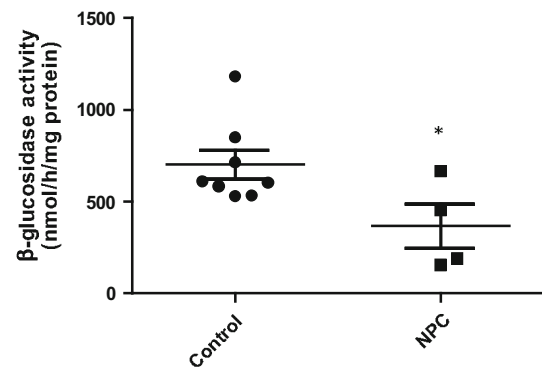


Fig. 5 Activity of enzyme GBA (nmol/h/mg of protein) in astrocytes from rats incubated without (control) and with U18666A 0.25 µg/mL for 48 h. Data are expressed as mean ± standard deviation. (*) statistically significant difference from the control group ($p < 0.03$)

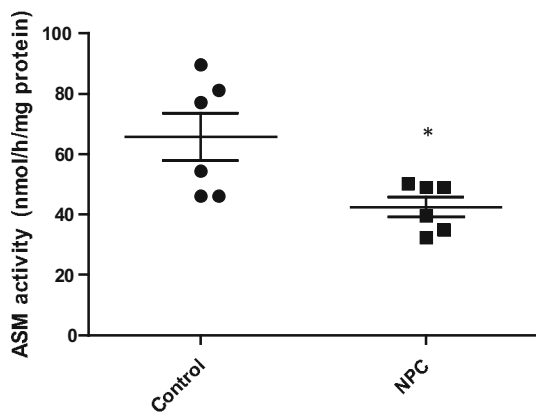


Fig. 4 Activity of enzyme ASM (nmol/h/mg of protein) in astrocytes from rats incubated without (control) and with U18666A 0.25 µg/mL for 48 h. Data are expressed as mean ± standard deviation. (*) statistically significant difference from the control group ($p < 0.02$)

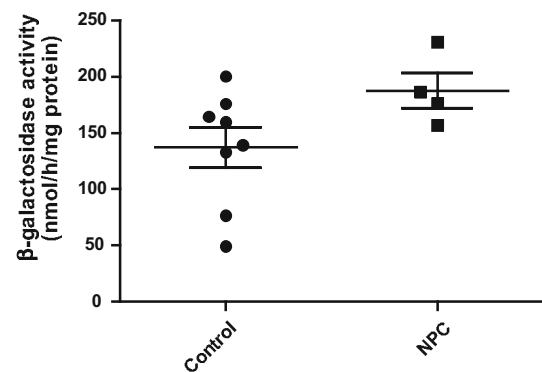


Fig. 6 Activity of enzyme GLB (nmol/h/mg of protein) in astrocytes from rats incubated without (control) and with U18666A 0.25 µg/mL for 48 h. Data are expressed as mean ± standard deviation

association between dysfunction in the brain cholesterol metabolism and the onset of neurodegenerative disorders (Dietschy and Turley 2004). Some studies suggest that

in vivo, cholesterol in the Central Nervous System is derived from astrocytes and then sent to mature neurons (Nieweg et al. 2009).

The main purpose of this study was to establish a Niemann-Pick type C, disease with drug U18666A, in cultured astrocytes from neonatal rats (in vitro study), and thereafter

perform biochemical analyzes such as checking the activity of the main lysosomal enzymes associated to this disorder.

The accumulation of cholesterol was induced in cultured astrocytes from rats aged 0–3 days through the addition of U18666A. This drug is widely used to mimic NPC disease in animal models, though in other cells (Liscum and Faust 1989, Lange et al. 1998; Underwood et al. 1996) and in the increase of cholesterol levels in NPC^{-/-} mice (Sáez et al. 2013).

In the present study, we demonstrated that the quantification of fluorescence of the cholesterol levels observed in Filipin staining in the studied groups through the number of pixels in the image (CellM software), was a practical and not subjective method. This technique showed that there is a significant difference between the intralysosomal unesterified cholesterol accumulation in control cells and those containing the drug. These analyzes were one at different times and doses, and we obtained the appropriate dose and time (0.25 µg/mL in a 48-h period). After this period and with a higher dose, there is no marked accumulation of cholesterol in these cells. Moreover, according to Cheung et al. (2004), higher doses of U18666A increase the probability that the cells will suffer apoptosis. These authors used dose and incubation time similar to the ones in the present study, and there was no problem of cell death.

In the assay for quantification of intracellular cholesterol using the kit Amplex[®] Red Cholesterol (Molecular Probe), in astrocytes, it was demonstrated that astrocytes treated with U18666A had greater accumulation of intralysosomal unesterified cholesterol than control cells (not treated with the drug). The average cholesterol levels observed in control cells was 25.7 µg of cholesterol/mg of protein, corresponding to slightly less than twice the cholesterol levels accumulated in the cells incubated with U18666A (54.2 µg of cholesterol/mg of protein). This kit, Amplex[®] Red Cholesterol (Molecular Probe) was used by Tängemo et al. (2011) to quantify free cholesterol and intralysosomal unesterified cholesterol contained in fibroblasts of NPC patients with great results.

The cholesterol levels calculated with CellM software corresponded to the cholesterol levels observed in quantification using the kit Amplex[®] Red Cholesterol (Molecular Probe), which demonstrates that the use of an appropriate software to quantify fluorescence of Filipin test provides safe quantification of cholesterol levels, which suggests the test has the potential to support diagnosis of NPC disease based on cultured cells.

Lysosomal Storage Diseases, which include NPC, are understood as a consequence of mutations that resulted in reduced synthesis of the lysosomal enzymes, leading to accumulation of lipids within this cell organelle. In our study, we measured the activity of some lysosomal enzymes associated with degradation of lipids:

sphingomyelinase, β-glucosidase, and β-galactosidase. The activities of these enzymes are changed in human NPC (Vanier et al. 1991).

We noticed that the activity of ASM in cells with higher cholesterol accumulation was reduced. These results were compatible with those where reduced ASM activity was observed in culture of fibroblasts of patients with NPC (Vanier et al. 1991; Pentchev et al. 1987; Vanier et al. 1988). The activity of enzyme GBA in astrocytes from rats was compared between control samples and samples positive for NPC, and a significant difference was found between the two groups. Samples of NPC astrocytes showed a decrease in GBA levels. This had also been observed in previous studies in fibroblasts from patients with NPC (Vanier et al. 1980; Besley and Moss 1983).

Regarding the activity of enzyme, GLB no significant difference was observed between the groups. However, in Fig. 6, we noticed that astrocytes from rats with NPC appear to have higher enzyme activity than control samples. No significant increase in the activity of GLB was described by Wenger et al. (1974) in fibroblasts from patients with Niemann-Pick type C disease.

By analyzing the changes occurred in lysosomal enzymes in our animal model and comparing them with studies carried out by other authors in fibroblasts from humans with Niemann-Pick type C disease, we once again confirm that our model is of great relevance and reliability for future research with cell cultures of astrocytes.

We concluded that U18666A appears to be an excellent inhibitor of the cholesterol transport in astrocytes of young rats and is able to mimic Niemann-Pick type C disease in these animals. This drug also alters the activity of three important enzymes in the degradation of lipids metabolism. Just like the change in the activity of lysosomal enzymes has been demonstrated, other biochemical parameters of the cell can be tested with this animal model, thus contributing to a better understanding of the disease.

References

- Besley GT, Moss SE (1983) Studies on sphingomyelinase and beta-glucosidase activities in Niemann-Pick disease variants. Phosphodiesterase activities measured with natural and artificial substrates. *Biochim Biophys Acta* 752:54–64
- Bierkamper GG, Cenedella RJ (1978) Induction of chronic epileptic form activity in the rat by an inhibitor of cholesterol synthesis, U18666A. *Brain Res* 150:343–351
- Bishop N, Woodman P (2000) ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol Biol Cell* 11:227–239
- Cenedella RJ, Bierkamper GG (1979) Mechanism of cataract production by 3-beta(2-diethyl-aminoethoxy)androst-5-en-17-one hydrochloride, U18666A: an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Exp Eye Res* 28:673–688

- Cheung NS, Koh CHV, Bay BH, Qi RZ, Choy MS, Li QT, Wong KP, Whiterman M (2004) Chronic exposure to U18666A induces apoptosis in cultured murine cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 315:408–417
- Dietschy JM, Turley SD (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45:1375–1397
- Eisele B, Budzinski R, Muller P, Maier R, Mark M (1997) Effects of a novel 2,3-oxi-dosqualenecyclase inhibitor on cholesterol biosynthesis and lipid metabolism in vivo. *J Lipid Res* 38:564–575
- Goldim M, CdaS Garcia, de Castilhos CD, Daitx VV, Mezzalira J, Breier AC, Cé J, Mello A, Andrade CV, Sartori N, Coelho JC (2012) Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene* 508:197–198
- Holtta-Vuori M, Tanhuanpaa K, Mobius W, Somerharju P, Ikonen E (2002) Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* 13:3107–3122
- Ikonen E, Holtta-Vuori M (2004) Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol* 15:445–454
- Jurgelski W Jr, Hudson PM, Vogel FS (1973) Induction of a chronic somatosensory epilepsy in the opossum (*Didelphis virginiana* Kerr) with an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Brain Res* 64:466–471
- Kiss RS, Ma Z, Nakada-Tsukui K, Brugnera E, Vassiliou G, McBride HM, Ravichandran KS, Marcel YL (2006) The lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) adapter protein GULP mediates trafficking of the LRP ligand prosaposin, leading to sphingolipid and free cholesterol accumulation in late endosomes and impaired efflux. *J Biol Chem* 281:12081–12092
- Kruth HS, Comly ME, Butler JD (1986) Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous fibroblasts. *J Biol Chem* 261:16769–16774
- Lange Y, Steck TL (1994) Mechanism of red blood cell acanthocytosis and echinocytosis in vivo. *J Membrane Biol* 77:153–159
- Lange Y, Ye J, Steck TL (1998) Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:18915–18922
- Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck T (2000) Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles. *J Biol Chem* 275:17468–17475
- Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck TL (2002) Dynamics of lysosomal cholesterol in Niemann-Pick type C and normal human fibroblasts. *J Lipid Res* 43:198–204
- Lemberg T, Parktina JR, Chai M, Schütz G, Engblom D (2008) CREB has a context dependent role in activity-regulated transcription and maintains neuronal cholesterol homeostasis. *FASEB J* 22:2872–2879
- Linder MD, Uronen RL, Holtta-Vuori M, van der Sluijs P, Peränen J, Ikonen E (2007) Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell* 18:47–56
- Liscum L, Faust JR (1989) The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in CHO cells cultured with 3- β -[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem* 264:11796–11806
- Liscum L, Sturley SL (2004) Intracellular trafficking of Niemann-Pick C proteins 1 and 2: obligate components of subcellular lipid transport. *Biochim Biophys Acta* 1685:22–27
- Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Platt FM (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* 14:1247–1255
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Meikle PJ, Brooks DA, Ravenscroft EM, Yan M, Williams RE, Jaumzems AE, Chataway TK, Karageorgos LE, Davey RC, Boulter CD, Carlsson SR, Hopwood JJ (1997) Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* 43:1325–1335
- Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea AD, Incardona JP, Strauss JF 3rd, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1999) The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem* 274:9627–9635
- Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW (2009) Marked Differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 109:125–134
- Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, Morris JA, Carstea ED, Neufeld EB, Blanchette-Mackie JE, Pentchev PG (2001) Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 3611–3634
- Pentchev PG, Boothe AD, Gal AE, Omodeo-Sale F, Fouks J, Brady RO (1980) A lysosomal storage disorder in mice characterized by the accumulation of several sphingolipids. In: 2nd International Symposium on Enzyme Therapy in Genetic Diseases. Edited by Desnick R. J., Allan R. Liss, Incorporated Scientific, Medical and Scholarly Publications, New York, 225–230
- Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Tokoro T, Butler J, Sokol J, Filling-Katz M, Quirk JM, Marshall DC, Patel S, Vanier MT, Brady RO (1987) Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts. *FASEB J* 1:40–45
- Pentchev PG, Brady RO, Blanchette-Mackie EJ, Vanier MT, Carstea ED, Parker CC, Goldin E, Roff CF (1994) The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1225:235–243
- Peters SP, Coyle P, Glew RH (1976) Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys* 175:569–571
- Sáez JP, Orellana JA, Vega-Riveros N, Figueroa VA, Hernández DE, Castro JF, Klein AD, Jiang JX, Zanolungo S, Sáez JC (2013) Disruption in connexin-based communication is associated with intracellular Ca^{2+} signal alterations in astrocytes from Niemann-Pick type C mice. *PLoS One* 15:1–12
- Simons M, Kramer EM, Macchi P, Rathke-Harlieb S, Trotter J, Nave KA, Schulz JB (2002) Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 157:327–336
- Suzuki K, Suzuki Y (1970) Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 66:302–309
- Tängerno C, Weber D, Theiss S, Mengel E, Runz H (2011) Niemann-Pick Type C disease: characterizing lipid levels in patients with variant lysosomal cholesterol storage. *J Lipid Res* 52:813–825
- Underwood KW, Andemariam B, McWilliams GL, Liscum L (1996) Quantitative analyses of hydrophobic amine inhibition of intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 37:1556–1568
- Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5:16
- Vanier MT, Revol A, Fichet M (1980) Sphingomyelinase activities of various human tissues in control subjects and in Niemann-Pick disease: development and evaluation of a microprocedure. *Clin Chim Acta* 106:257–267

- Vanier MT, Wenger DA, Comly ME, Rousson R, Brady RO, Pentchev PG (1988) Niemann- Pick disease group C: clinical variability and diagnosis based on defective cholesterol esterification. A collaborative study on 70 patients. *Clin Genet* 33:331–348
- Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R, Gazzah N, Juge MC, Pentchev PG, Revol A, Louisot P (1991) Type C Niemann- Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL- derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta* 1096:328–337
- Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi- Mosleh L, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2010) Identification of Surface Residues on Niemann-Pick C2 Essential for Hydrophobic Handoff of Cholesterol to NPC1 in Lysosomes. *Cell Metab* 12:166–173
- Wenger DA, Sattler M, Clark C, McKelvey H (1974) An improved method for the identification of patients and carriers of Krabbe's disease. *Clin Chim Acta* 56:199–206
- White NM, Corey DA, Kelley TJ (2004) Mechanistic similarities between cultured cell models of cystic fibrosis and Niemann-Pick type C. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:538–543
- Zervas M, Somers KL, Thrall MA, Walkley SU (2001) Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Curr Biol* 11:1283–1287
- Zhang M, Liu P, Dwyer NK, Christenson LK, Fujimoto T, Martinez F, Comly M, Hanover JA, Blanchette-Mackie EJ, Strauss JF 3rd (2002) MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol Chem* 277:33300–33310

4. CAPÍTULO II

Artigo: *Niemann Pick C disease in astrocyts of rats effect in vitro administration of U18666A on oxidative stress and Na⁺/K⁺ATPase.* **Status:** Submetido para publicação na revista Lipids

ARTIGO

NIEMANN- PICK TYPE C DISEASE IN RAT ASTROCYTES CULTURE: EFFECT IN VITRO OF ADMINISTRATION OF U18666A ON OXIDATIVE STRESS AND Na⁺/K⁺-ATPase.

Daniela CopettiSantos^a, VitoriaMoracs^a, Dácio Franco Weiler^a, Alexandre Silva de Mello^h, Fernanda de Souza Machado^b, Jéssica Pereira Marinho^b, Cassiana Sicbert^c, Janaina Kolling^c, Cláudia Funchal^b, Angela TS Wyse^c, Janice Carneiro Coelho^c.

a. Postgraduate Program, Biochemistry Department, Lysosomal Storage Diseases Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

a. Postgraduate Program, Biosciences and Rehabilitation, Centro Universitário Metodista (IPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

b. Postgraduate Program, Biochemistry Department, Metabolic Diseases and Neuroprotection Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract:

The objective of this study was to verify the effect of the drug U18666A on some oxidative stress parameters in astrocytes of Wistar rats (0 to 3 days old). In these experiments, the cultures were incubated with U18666A at a dose of 0.25 µg/mL for 48 hours, dose and period considered ideal to mimic Niemann-Pick type C disease. First, the drug's influence on astrocyte cultures on Na⁺, K⁺ ATPase was tested and an inhibitory effect on this enzyme activity was observed. Furthermore, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl, sulfhydryl, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and nitric oxide (NO) formation were measured in the astrocytes from Wistar rats. U18666A was capable of enhancing TBARS, but not able to alter the carbonyl assay. In addition, U18666A caused a reduction of protein thiol groups measured by the sulfhydryl assay. Moreover, U18666A decreased CAT and SOD activity, but enhanced NO production.

The present findings showed that U18666A besides promote cholesterol accumulation in astrocytes, induces oxidative stress, compatible with other neurodegenerative diseases.

Keywords: Niemann-Pick type C disease, astrocytes, U18666A, oxidative stress.

1. Introduction

Niemann-Pick type C disease (NPC) is a progressive, hereditary, autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by accumulation of non-sterified cholesterol and other lipids in late endosomes/lysosomes of all cells and tissues, mainly liver and nervous cells. The clinical manifestations are heterogeneous and most times cause liver dysfunction and acute neurodegeneration (Carstea et al., 1997; Millard et al., 2005; Vance and Peake, 2011). Progressive ataxia, variable hepatosplenomegaly, and vertical ocular paralysis characterize the classic phenotype (Patterson et al., 2007; Imric et al., 2007). This disorder appears in approximately 1 out of every 120,000 individuals (Vanier, 2010) and usually manifests itself between the middle of childhood and adolescence. Patients usually die until the third decade of life.

Similar phenotypes can be induced in several ways and with several drugs such as steroids and hydrophobic amines, among which specifically 3- β -[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one (U18666A). This drug has been used to mimic the NPC phenotype, thus causing cholesterol accumulation in the intracellular spaces of treated cells, similar to human fibroblasts with NPC (Vanier, 2010; Wang et al., 2010; Neufeuldt et al., 1999; Lange et al., 2002).

Reactive Oxygen Species (ROS) are usually found at low concentrations in a balanced manner in living organisms (Dröge, 2002). When antioxidant defenses decrease and/or intracellular concentration of reactive species increase, the so-called oxidative stress occurs, in which the FR begin damaging the biologic macromolecules such as lipids (which changes cell membrane permeability), proteins (initiating their oxidation), and DNA

damage (which promotes tissue damage and even cell death) (Halliwell and Gutteridge, 2007; Ramos-Vasconcelos et al., 2000; Bechman and Ames, 1998). A series of studies confirm that the increase in oxidative stress has been one of the contributing factors to central nervous system (CNS) pathophysiology and that the enzyme Na^+ , K^+ -ATPase plays a crucial role in the regular functioning of the organism and of the CNS and in maintaining the cell membrane's electric gradient. The inhibition of this enzyme has been associated with the physiopathology of several diseases such as brain ischemia (Wyse et al., 2000), epilepsy (Grisar, 1984), neurodegenerative disorders (Yu, 2003), convulsive crises (Renkawek et al., 1992), and Alzheimer's disease (Hattori et al., 1998).

Na^+ , K^+ -ATPase is a transmembrane enzyme that catalyzes the active sodium and potassium transport through the cell membrane. This transport is highly important since one third of the ATP consumed is used to pump these ions. Na^+ , K^+ -ATPase is present in virtually all cells, even in the brain (Aperia, 2007). It consumes about 40-60% of the brain's ATP to maintain the electrochemical gradient required for neuronal excitability, cellular volume regulation, osmotic balance, and transport of molecules linked to the co-transport of Na^+ such as glucose, amino acids, and neurotransmitters (Erecinska and Silver, 1994; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). It is believed that Na^+ , K^+ -ATPase residues remain in specialized membrane microdomains called caveolae and interact with caveolin-1 (Wang et al., 2004).

This study aims to study the *in vitro* effects of administering U18666A on some oxidative stress parameters and the energy metabolism in young-rat astrocyte cultures in order to investigate biochemical changes that may contribute to understand the mechanisms responsible for the brain damage shown by NPC patients.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats (0 to 3 days old) from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS had free access to water and were fed a 20% (w/w) protein commercial chow. They were kept in a room with a 12/12 h light/dark cycle and temperature of 22 ± 1 °C. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no. 85-2, revised in 1985) were followed in all experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. In this study we used a 18 animals per group for each experiment.

2.2. Cortical Astrocyte Culture

The rats were euthanized by decapitation and the cerebral cortex was removed. It was homogenized with CMF-BSS buffer and placed in a 24-well plate in DMEN – Dulbecco’s Modified Eagle Medium (GIBCO®), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen). After the cells reached confluence in culture, the medium was changed 4 h after the total incubation time was completed, every four days, reaching a full confluence on the 15th day.

The multiwell plates used for the development of cultures were previously incubated with a poly-l-lysine substrate (Sigma).

After 15 days the cultures were incubated with U18666A at a dose of 0.25 µg/mL for 48 h, dose and period considered ideal to mimic NPC.

2.3. Oxidative Stress Measurements

2.3.1. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Measurement:

For the TBARS assay, trichloroacetic acid (10% w/v) was added to the homogenate to precipitate proteins and to acidify samples (Buege and Aust, 1978). This mixture was then centrifuged at 1,000 g for 3 min. The protein-free sample was extracted and TBA (0.67% w/v) was added to the reaction medium. Tubes were placed in a water bath (100 °C) for 30 min. Absorbance was read at 535 nm in a spectrophotometer (T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments, Alma Park, Lutterworth, UK). Commercially available malondialdehyde was used as the standard. Results were expressed as nmol/mg protein.

2.3.2. Carbonyl Assay:

The carbonyl assay was used to determine oxidative damage to proteins. Homogenates were incubated in the dark with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) in 2.5 M HCl for 1 h at room temperature. Samples were mixed every 15 min. Next, 20% (w/v) TCA was added to the tubes, which were then left in ice for 10 min and centrifuged for 5 min at 1,000 g to collect the protein precipitates. Another wash was performed with 10% TCA. The pellet was washed 3 times with ethanol:ethyl acetate (1:1) (v/v). The final precipitates were dissolved in 6 M guanidine hydrochloride, and the solutions were allowed to stand for 10 min at 37 °C and were then read at 360 nm (Reznick and Packer, 1994). The results were expressed as nmol/mg protein.

2.3.3. Sulfhydryl Assay:

This assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is determined spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery, 2001). In short, 0.1mM DTNB was added to 120µL of the samples. This was followed by a 30min incubation at

room temperature in a dark room and absorbance was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as mmol/mg protein.

2.4. Determination of Antioxidant Enzyme Activities:

Superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as USOD/mg protein, was based on the decrease in the rate of autocatalytic adrenochrome formation at 480 nm [18]. Catalase (CAT) activity was determined by following the decrease in hydrogen peroxide (H_2O_2) absorbance at 240 nm and expressed as CAT/mg protein (Acbi H, 1984).

2.4.1. Nitric Oxide Production:

Nitric oxide was determined by measuring the stable product nitrite using the colorimetric assay described by Hevel and Marletta (1994). In short, the Griess reagent was prepared by mixing equal volumes of 1% sulfanilamide in 0.5 N HCl and 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine in deionized water. The reagent was added directly to the homogenates and incubated under reduced light at room temperature for 30 min. Samples were analyzed at 550 nm on a microplate spectrophotometer. Controls and blanks were run simultaneously. Nitrite concentrations were calculated using a standard curve prepared with sodium nitrite (0–80 mM). Results were expressed as nmol/mg protein.

2.5. Na^+ , K^+ -ATPase activity assay

The reaction mixture for the Na^+ , K^+ -ATPase assay contained 5.0 mM $MgCl_2$, 80.0 mM $NaCl$, 20.0 mM KCl , and 40.0 mM $Tris-HCl$, pH 7.4, for a final volume of 200 μ L. The reaction was initiated by adding ATP for a final concentration of 3.0 mM. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM Ouabain. Na^+ , K^+ -

ATPase activity was calculated from the difference between the two assays, according to the method of Wyse et al. (2000). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). The enzyme's specific activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein.

2.6. Protein Determination

Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.7. Statistical Analysis

Data from the experiments were analyzed statistically by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. All analyses were carried out using the software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (version 17.0, International Business Machines Corporation, New York, NY, USA).

3. Results

3.1. Oxidative Stress Measurements

The techniques used for the analyses of TBARS, sulfhydryl and carbonyl were used to assess the damage to lipids and proteins, respectively. Figure 1 shows the effect of U18666A regarding TBARS. It was observed that the drug led to a significant increase in TBARS in the astrocytes isolated from the cortex of young rats when the culture was exposed to 0.25 $\mu\text{g/mL}$ after 48 h with the drug ($p < 0.0170$; $t = 3.004$). On the other hand, sulfhydryl levels significantly decreased in contact with the drug (Figure 2; $p < 0.0001$; $t =$

5.786), while carbonyl levels proved to be higher when in contact with the drug (Figure 3; $p < 0,0403$; $t = 2,749$).

3.2. Determination of Enzyme Antioxidant Activities:

The effect of the drug U18666A on nitric oxide and the activity of the enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) was also investigated.

When nitric oxide production in astrocytes (Figure 4) was compared between the control samples and the samples that mimic NPC, a significant difference ($p < 0.0008$; $t = 4.755$) was found, showing an increase in nitric oxide when in contact with the drug. The drug caused a significant reduction in SOD activity (Figure 5; $p < 0.0119$, $t = 3.241$) and CAT activity (Figure 6; $p < 0.0045$, $t = 3.902$).

3.3. Na⁺, K⁺-ATPase

Initially, the influence of U18666A on the specific activity of Na⁺, K⁺-ATPase in rat astrocytes was investigated (Figure 7). Statistical analyses revealed that the drug significantly inhibited Na⁺, K⁺-ATPase in young-rat astrocytes ($p < 0.0021$, $t = 4.277$) when compared to the controls.

4. Discussion

Niemann-Pick type C disease is a rare, chronic, progressive disease characterized by a disorder in the intracellular lipid transport (Iturriaga et al., 2006; Patterson et al., 2001; Vanier et al., 2010). It mainly involves the storage of non-sterified cholesterol and glycosphingolipids in intracellular lysosomes of several tissues, mainly the liver, spleen, and brain (Héron et al., 2012; Patterson et al., 2010; Pineda et al., 2010).

The brain is characterized by having a high metabolic rate and low levels of antioxidants, and it is therefore very vulnerable to reactive species. Given that the brain has a reduced antioxidant capacity, that makes the ROS protection levels and inflammatory processes are relatively low (Leonard, 2012). As a result, it is important to consider that there are basically three reactions that are relevant to cell damage. The first relates to lipid peroxidation of membranes, the second would be the very oxidative changes in proteins and, finally, the reaction involving injuries that can occur at the DNA level (Oliveira and Schoffen, 2010) including that of mitochondrial complex. This could lead to the depletion of energy and serve as a source of reactive species causing the oxidative damage and impaired cell function in various target sites (Milusheva et al., 2010).

The present study investigated whether oxidative stress and the energy metabolism is involved with *in vitro* effects caused by the drug U18666A in young-rat astrocyte cultures.

Treating primary cortical neuron cultures with U18666A causes secondary apoptosis due to the increase in ROS (Cenedella, 2009). Oxidative stress has been observed in different NPC cellular models (Zampieri et al., 2009) as well as in the brains of rats with NPC (Smith et al., 2009).

One important target of biologic studies regarding oxidative stress is nitric oxide (NO). It plays a regulatory role and, under normal conditions, is produced endogenously by several cells (Wei et al., 2003), among which neurons (Prast and Philippu, 2001). NO is one of the main inter/intracellular messengers inside and between neurons in the peripheral nervous system and the CNS (Duncan and Heales, 2005). In the nervous system, NO influences the release of neurotransmitters and synaptic processes (Contestabile, 2000) and seems to be involved, as an intracellular mediator, in neurotoxin-induced cell death

(Dawson et al., 1991). Several neurotoxic models show that NO induces the death of dopaminergic neuron cultures and that this cell-death process involves the increase in oxidative stress (Dehmer et al., 2000; Matthews et al., 1997; Van Muiswinkel et al., 1998), often promoting pathogenic mechanisms involved in neurodegenerative processes (Zhang et al., 2006). The exact mechanism through which NO contributes to certain neurodegenerative diseases is not fully understood.

Antioxidant enzymes such as CAT and SOD represent the first barrier against reactive species and are essential for cell survival (Halliwell, 2001; Remacle, 1992). Thiols (SH) play a key antioxidant role in cellular protection and extracellular roles against oxidative stress (Aksenov and Markesbery, 2001). The techniques used in the present study showed a significant decrease in CAT, inhibition of SOD activity, and an increase in NO production in the cerebral cortex of young rats in contact with U18666A. Such changes lead to a harmful increase in lipids in the cerebral cortex (Medeiros et al., 2012). These results confirm what had been reported by Funchal et al. (2010) in rats' cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum when in contact with other drugs that also cause lipid peroxidation.

Lipid peroxidation is characterized by an increase in the production of reactive thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as a consequence of the attack of ROS against cell membranes, causing a loss of selectivity in ion exchange and release of organelle contents, such as lysosomal hydrolytic enzymes, and the formation of cytotoxic products, culminating with cell death (Ferreria and Matsubara, 1997). Since the cell membrane and intracellular matrix are vital structures for the cell, it is not surprising to find that the ROS-induced lesion influences the extension of disease processes (Bulkley, 1983).

It was observed that the cultures that received U18666A showed an increase in TBARS levels in astrocytes, which indicates the drug induces lipid peroxidation.

Exposing astrocytes to U18666A *in vitro* significantly reduced the sulfhydryl groups, thus reducing the non-enzymatic antioxidant defenses. Previous *in vitro* studies with organochalcogenol also show this reduction in SH groups in rats' cerebral cortex (Penz et al., 2009).

In relation to the carbonyl groups of proteins, a biochemical marker of oxidative damage, a significant increase was observed in astrocytes where the drug was placed. These data are in agreement with studies by Ribas et al (2012), who observed the same results in plasma of patients NPC1.

Furthermore, studies show that, in the Parkinsonian brain, many catalytic subunits of complex I show high levels of carbonyl modifications indicative of protein oxidation (Bueler, 2009). The carbonyl groups are produced in the side chains of the protein when certain amino acids (especially proline, arginine, lysine and threonine) are oxidized (Dalledone et al, 2003). These changes in the protein structure may affect the function of receptors, enzymes and transport proteins, resulting in partial or complete loss of functionality of the protein (Halliwell and Gutteridge, 2007). Considering that the protein and lipid oxidation can result in cellular dysfunction, it is conceivable that the lipid and oxidative damage observed in untreated patients NPC1 may be involved, at least in part, to tissue damage encountered in these patients. Carbonyl groups content is the most common parameter used as a biomarker of severe oxidative damage to proteins and is considered an early and stable marker of protein oxidation (Levine et al, 1990), both *in vitro* and *in vivo* (Stadtman and Berlett, 1997).

Evidence both in experimental and clinical studies has suggested the involvement of oxidative stress and ROS in the development of Lysosomal Storage Diseases (LSDs).

A decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity has been observed as a response to treatment with U18666A. Previous studies in mice showed a decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity in neuronal and liver structures (Cornelius, 1995; 2001), which match the present results. Changes in Na⁺, K⁺-ATPase, in the presence of non-lethal cell damage, activates the neuronal injury apoptosis cascade probably by changing the homeostasis of the ion K⁺ (Wang et al., 2003).

These data highlight an increase in lipid peroxidation and production of reactive oxygen species and, consequently, lead to a decrease in enzymatic antioxidant stressors.

Changes in these parameters show an important involvement in the pathophysiology of the NPC disease, as well as in other diseases previously analyzed, and may be the target of research for other neurodegenerations. The results hereby presented enable concluding that U18666A, by storing cholesterol in young-rat astrocyte cultures, impacted parameters similar to those found in NPC in humans and in other animals both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, U18666A is shown to be a good agent to mimic NPC in astrocyte cultures for biochemical studies of this disease.

References:

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126.

Aksenov MY, Markesbery WR (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302: 14114- 14115.

- Aperia A (2007) New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target *Journal of Internal Medicine* 261(44):52-45.
- Baek BS, Kwon HJ, Lee KH, Yoo MA, Kim KW, Ikeno Y, Yu BP, Chung Hy (1999) Regional difference of ROS generation, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activity in rat brain and their dietary modulation. *Arch Pharm Res* 22(4):361-6.
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78(72): 547-581.
- Bondy SC (1997) Free-radical-mediated toxic injury to the nervous system In: *Free Radical Toxicology*, Ed. K. pp 221-248.
- Bucge JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310.
- Cai Z, Taddei A, and Sheppard DN (2006). Differential sensitivity of the cystic fibrosis (CF)- associated mutants G551D and G1349D to potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl channel *J. Biol. Chem* 281:1970-1977.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF, Ohno K, Ziegler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277:228–231.
- Cenedella RJ (2009) Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol

- metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids* 44(6):477-87.
- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{+} - stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem* 157: 375- 380.
- Chen YL, Analytis JG, Chu JH, Liu ZK, Mo SK, Qi XL., Zhang HJ, Lu DH, Dai X, Fang SC, Zhang R, Fisher R, Hussain Z, Shen X (2009) Experimental Realization of a Three-Dimensional Topological Insulator, Bi_2Te_3 . *Science* (325): 178-181.
- Cornelius F (1995) Phosphorylation/dephosphorylation of reconstituted shark Na,K-ATPase: one phosphorylation site per protomer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1235:197–204.
- Cornelius F, Mahmoud YA, Christien HR (2001) Modulation of Na,K-ATPase by associated small transmembrane regulatory proteins and by lipids. *J. Bioenerg Biomembran* 33:415-423.
- Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F (2007) Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:291-8.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* Jan; 82(1):47-95.
- Ercinska M & Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol* 43:31-71.
- Grisar T (1984) Glial and neuronal Na-K- pump in epilepsy. *Ann Neurol* 16:128-134.
- Halliwell B, Gutteridge J (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine.* Nova York: Oxford University Press I, p. 851.
- Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Yoritaka A, Kondo T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y (1998).

- Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol.* 44(6): 935-941.
- Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A (2010) Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* 191(3):615-629.
- Hevel JM, Marletta MA (1994) Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol* 233:250–258
- Héron B, Valayannopoulos V, Barutcau J, Chabrol B, Ogier H, Latour P, Dobbelaere D, Eyer D, Labarthe F, Maurey H, Cuisset JM, de Villemeur TB, Sedel F, Vanier MT (2012) Miglustat therapy in the French cohort of paediatric patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7:36.
- Imrie J, dasgupta S, Besley GT, Harris C, Heptinstall L, Knight S, Vanier MT, Fensom AH, Ward C, Jacklin E, Whitehouse C, Wraith JE (2007) The natural history of Niemann-Pick disease type C in the UK. *J Inher Metab Dis* 30(1):51-59.
- Iturriaga C, Pineda M, Fernandez-Valero EM, Vanier MT, Coll MJ (2006) Niemann-Pick C disease in Spain: clinical spectrum and development disability scale. *J. Neurol. Sci* 249:1-6.
- Jorgensen PL, Hakansson KO & Karlsh SJD (2003) Structure and mechanism of: Functional sites and their interactions. *Ann. Rev. Physiol* 65:817- 849.
- Kaplan JH (2002) Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annual Review Biochemistry* 71: 511-35.
- Lange Y, Ye J, Rigney M, and Steck TL (2002) Dynamics of lysosomal cholesterol in

- Niemann – Pick C and normal human fibroblasts. *J. Lipid Res* 43:198-204.
- Lowry OH and Bessey O (1946) A., *J. Biol. Chem* 183:633.
- Millard EE, Gale SE, Dudley N, Zhang J, Schaffer JE, Ory DS (2005) The sterol-sensing domain of the Niemann-Pick C1 (NPC1) protein regulates trafficking of low density lipoprotein cholesterol. *J BiolChem* 280:28581–28590.
- Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JF, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1999) The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J BiolChem* 274:9627–9635.
- Park S, Kim HT, Yun S, Kim IS, Lee J, Lee IS, Park KI (2009) Growth factor- expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice. *Exp. Mol Med.* 41(7): 487-500.
- Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE (2007) Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol* 6:765–72.
- Patterson MC (2001) Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, p. 3611-3633.
- Pinca M, Perez-Poyato MS, O'Callaghan M, Vilascca MA, Pocovi M, Domingo R, Portal LR, Pérez AV, Temudo T, Gaspar A, Peñas JJ, Roldán S, Fumero LM, de la Barca OB, Silva MT, Macías-Vidal J, Coll MJ (2010) Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Mol*

GenetMetab99:358-366.

Ramos- Vasconcelos GR, Alves ALH, Hermes- Lima M (2000) Radicais Livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. In: O que é Vida: Para Entender a Biologia do Século XXI, p. 209-231 (capítulo 9). Editado por C.N. El- Hani CN e AAP Videira. Editora RclumeDumará, Rio de Janeiro, p. 209-331.

Renkawek K, De Jong WW., Merck KB, Frenken CW, Van Workum FP, Bosman GJ (1992) alpha B- crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt- Jakob disease. *ActaNeuropathol*, 83:324-327.

Reznick AZ, Packer L (1994) Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:357-363.

Schoner W, Scheiner-Bobis G (2007). Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol*293(2):C509-36.

Smith AJ, Smith RA, Stone TW (2009) 5-Hydroxyanthranilic acid, a tryptophan metabolite, generates oxidative stress and neuronal death via p38 activation in cultured cerebellar granule neurons. *Neurotox Res* 15(4):303-10.

Therien AG & Blostein R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279:C541-C566.

Uittenbogaard A, Everson WV, Matveev SV, and Smarth EJ (2002) Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin- annexin II lipid- protein complex. *J. Biol. Chem.* 277:4925-4931.

Vance JE, Peake KB (2011) Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass

- by β -cyclodextrin. *Curr Opin Lipidol* 22:204–209.
- Vanier MT (2010) Niemann–Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis* 5:16.
- Wang S, Zhang B. and Faller DV (2004) BRG1/BRM and prohibitin are required for growth suppression by estrogen antagonists. *Embo J* 23:2293–2303.
- Wang XQ, Xiao AY, Sheline C, Hyrc K, Yang A, Goldberg MP, Choi DW, Yu SP (2003). Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J Cell Sci.* 116:2099-110.
- Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi-Moshleh L, Kwon HJ, Brown MS, and Goldstein JL (2010) *Cell Metab.*1, this issue, 166-173.
- Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner A, Ritter F, Netto CA (2000): Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res* 25: 971-975.
- Yu A& Dayan P (2003) Expected and unexpected uncertainty: ACh and NE in the neocortex, Accepted by NIPS, 2003.
- Zampieri S, Mellon SH, Butters TD, Nevyjel M, Covey DF, Bembi D, Dardis A (2009) Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J. Cell Mol Med* 13:3786-3796.

Acknowledgements: This work was supported by Coordinating Agency Training of Superior- Level Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Figure Captions

Fig. 1. Effect of U18666A on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in astrocytes from 0-3-day-old rats. Values are expressed as nmol/mg protein. Statistically significant differences from control were determined by ANOVA followed by Tukey's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. We used 6 animal per group for each one.

Fig. 2. Effect of U18666A on protein sulphhydryl groups in astrocytes from 0-3-day-old rats. Values are expressed as nmol/mg protein. Statistically significant differences from control were determined by ANOVA followed by Tukey's test: * $p < 0.0001$. We used 6 animal per group for each one.

Fig. 3. Effect of U18666A on carbonyl formation in astrocytes from 0-3-day-old rats. Values are expressed as nmol/mg protein. Statistical analyses for the control were determined by ANOVA followed by Tukey's test: * $p < 0,04$. We used 6 animal per group for each one.

Fig. 4. Effect of U18666A on nitric oxide (NO) production in astrocytes from 0-3-day-old rats. Values are expressed as nmol/mg protein. Statistically significant differences from control were determined by ANOVA followed by Tukey's test: * $p < 0.0008$. We used 6 animal per group for each one.

Fig. 5. Effect of U18666A on superoxide dismutase in astrocytes from 0-3-day-old rats. Values are expressed as nmol/ mg protein. Statistically significant differences from control

were determined by ANOVA followed by Tukey's test: * $p < 0.0119$. We used 6 animal per group for each one.

Fig. 6. Effect of U18666A on the activities of the antioxidant enzymes catalase in astrocytes from 0-3-day-old rats. Values are expressed as nmol/ mg protein. Statistically significant differences from control were determined by ANOVA followed by Tukey's test: * $p < 0.0045$. We used 6 animal per group for each one.

Fig. 7. Effect of U18666A on the activities of Na^+ , K^+ -ATPase in astrocytes from of 0-3-day-old rats. Values are expressed as nmol/mg protein. Statistically significant differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test: * $p < 0.0021$. We used 6 animal per group for each one.

FIGURE 1

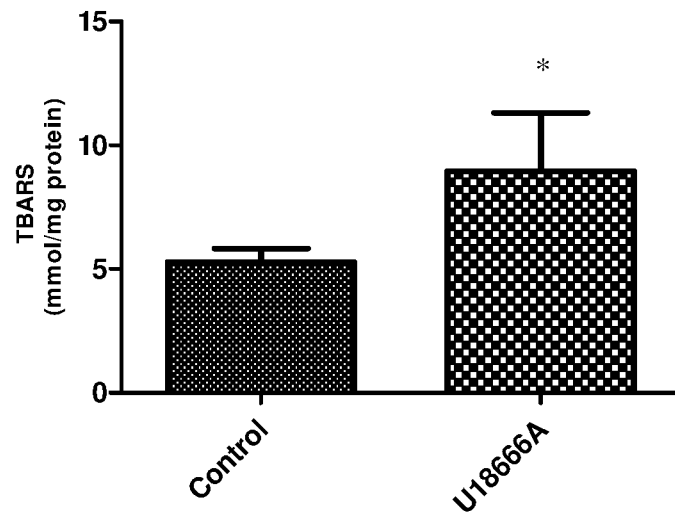


FIGURE 2

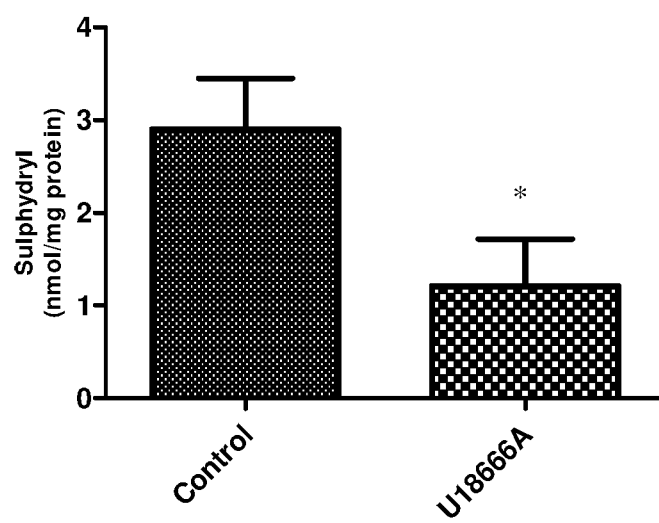


FIGURE 3

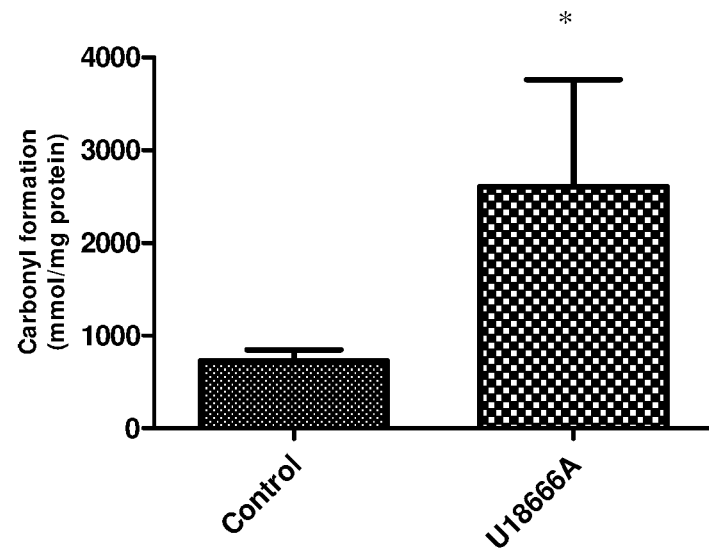


FIGURE 4

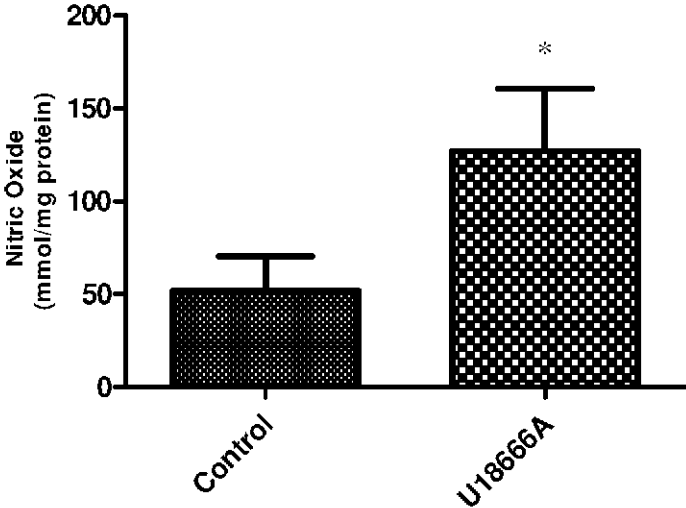


FIGURE 5

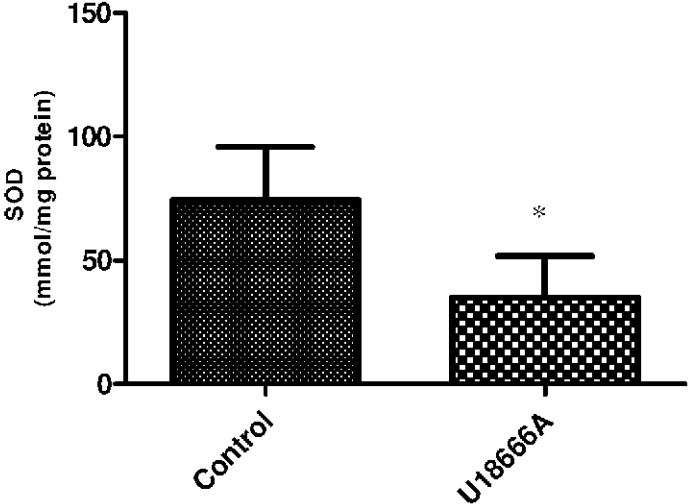


FIGURE 6

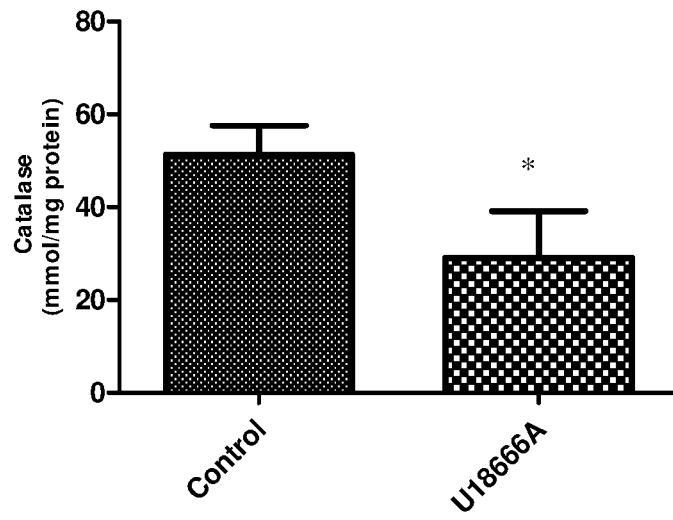
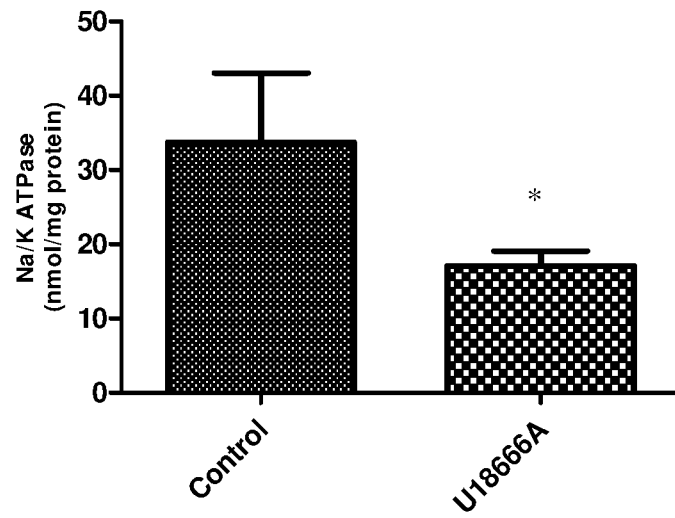


FIGURE 7



5. CAPÍTULO III

Artigo: *Endosomal accumulation of lipids in U18666A- induced NPC leads to hyperphosphorylation of GFAP and VIMENTIN in culture of astrocytes.*

ARTIGO

ENDOSOMAL ACCUMULATION OF LIPIDS IN U18666A-INDUCED NPC LEADS TO HYPERPHOSPHORYLATION OF GFAP AND VIMENTIN IN CULTURE OF ASTROCYTES

Daniela Copetti Santos^a, Carolina Gonçalves Fernandes^b, Paula Pierozan^b, Regina Pessoa Pureur^b, Janice Carneiro Coelho^a

- a. Postgraduate Program, Biochemistry Department, Lysosomal Storage Diseases Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil
- b. Postgraduate Program, Biochemistry Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

U18666A is a drug that had been used in several models both in vivo and in vitro to mimic Niemann-Pick type C disease (NPC). MK-801 is an uncompetitive NMDA (N-Methyl-D-aspartate) receptor, a receptor of glutamate which is one of the brain's primary neurotransmitters. Recent studies have reported the toxicity of glutamate on neuron cells (excitotoxicity). The goal of the present study was to observe the hyperphosphorylation of intermediate filaments (GFAP and vimentin) in astrocyte cultures from Wistar rats 0 to 3 days old. These analyses were carried out using four different groups based on whether or not they used the U18666A drug or MK-801. Analyses in these groups show that U18666A, after causing an increase in cell cholesterol, leads to hyperphosphorylation of the intermediate filaments, both GFAP and vimentin. However, MK-801, being an NMDA antagonist and acting on the glutamate receptors, was shown to inhibit the excitotoxicity caused by U18666A. The results obtained may enable inferring that substances that decrease the excitotoxicity caused by the higher cholesterol levels observed in NPC, such as the NMDA receptor antagonist MK-801, can be viable tools to aid in the treatment of neurodegenerative diseases related to glutamatergic excitotoxicity.

Key-words: U18666A, Niemann-Pick disease, cholesterol, glutamate, intermediate filaments

1. Introduction

Niemann-Pick type C disease (NPC) is characterized as a neurodegenerative disease caused by changes in lipid metabolism, particularly of cholesterol. Cholesterol levels are highly regulated among neurons and glia and changes in lipid metabolism, especially of cholesterol, lead to an imbalance that may cause diseases, among which NPC (Karten et al., 2009; Vance et al., 2005). Lipoproteins and cholesterol in the central nervous system (CNS) do not come from peripheral blood, but are instead synthesized by glial cells, mainly astrocytes (Hayashi et al., 2011).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the main intermediate filament (IF) of mature astrocytes, thus it is considered a marker for these cells. Vimentin is the IF expressed in mesenchymal cells, besides being found in immature astrocytes (Alberts et al., 2008). It is important to point out that cells with no vimentin IF are unable to carry LDL cholesterol derived from low-density lipoproteins from their lysosomes to the endoplasmic reticulum (ER) (Sarria et al., 1992), resulting in a phenotype similar to that observed in NPC cells.

GFAP's main structural role in astrocytes has been long known. However, in recent years, it has been shown to be important in several astrocyte functions such as regeneration after pathological processes, synaptic plasticity, reactive gliosis, shape maintenance, cell migration, and as the target of signal transduction pathways. Moreover, GFAP takes part in an elaborate communication system between astrocytes and neurons (Middeldorp and Hol, 2011).

Several diseases cause an increase in GFAP expression, such as Alzheimer's disease, encephalomyelitis, multiple sclerosis (Eng and Ghirnikar, 1994), and Alexander disease (Middeldorp and Hol, 2011). On the other hand, studies with GFAP knockout

animals have shown that the lack of this protein seems to make astrocytes less efficient in dealing with acute states of CNS lesions (Pekny and Pekna, 2004).

IFs are the largest components of the cell cytoskeleton and are actively associated and disassociated via the phosphorylation-dephosphorylation cycle (Klymkowsky, 1995).

A decrease in phosphorylation of soluble vimentin and an increase of insoluble vimentin has been observed in human fibroblasts with NPC (Walter et al., 2009), which led to an imbalance in the vimentin association-disassociation cycle. This results in a state of dephosphorylated polymerized filaments (insoluble vimentin) and small depolymerized and phosphorylated units (soluble vimentin) (Klymkowsky, 1995; Inagaki et al., 1997; Eriksson et al., 2004). This imbalance may occur due to the inhibition of several kinases, such as protein kinase C (PKC), which has been associated to vimentin phosphorylation (Ivaska et al., 2005).

Dizocilpine, also known as (+)5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,b]-cycloheptane-5,10-imine, or MK-801, is an uncompetitive antagonist of N-Methyl-D-aspartate (NMDA), a glutamate receptor. NMDA is one of the brain's most important excitatory neurotransmitters. Studies have reported glutamate toxicity on neuron cells (excitotoxicity) and that the use of antagonists of the NMDA receptor (such as MK-801) might have a neuroprotective effect in several situations since they lower the activation of glutamatergic receptors (Luby et al., 1959; Korpi et al., 1987).

NMDA receptor antagonists, including MK-801, have been extensively studied for use in the treatment of diseases with excitotoxicity components, such as stroke, traumatic brain injury, and neurodegenerative diseases such as Huntington's disease, Alzheimer's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. MK-801 has been effective in protecting neurons

in cell cultures and in the excitotoxic neurodegeneration in animal models (Mukhin et al., 1997; Ayala and Tapia, 2005; Kocacli et al., 2005).

Phenotypes similar to NPC can be induced using several pathways and drugs, among which 3- β -[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one (U18666A). This drug has been used to mimic the NPC phenotype, thus causing cholesterol accumulation in the intracellular spaces of treated cells, similar to human fibroblasts with NPC (Vanier, 2010; Wang et al., 2010; Neufeuld et al., 1999; Lange et al., 2002; Copetti-Santos, 2015).

The present study aimed to study the phosphorylation of GFAP and vimentin and the reversion of these settings after adding MK-801 to cultures of astrocytes with U18666A-induced NPC phenotype.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Pregnant Wistar rats (200–250 g) were obtained from the breeding stock of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Rats were maintained on a 12 h/12 h photoperiod in a colony room with constant temperature (22 °C), with food and water at libitum. The animals were observed on gestational day 22. As soon as delivery finished, mothers and pups were sacrificed by decapitation without anesthesia. The experimental protocol followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NHI publication 85-23, revised 1996) and was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul (number 18266). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2. Cortical Astrocyte Culture

Astrocyte primary cultures were prepared from the cerebral cortex of newborn (0–3-day old) Wistar rats as described by Loureiro et al. (2010). Briefly, rats were decapitated, brain structures were removed, and the meninges were carefully stripped off. Mechanically dissociated cells were plated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/10% FBS (pH 7.4) supplemented with glucose (33 mM), glutamine (2 mM), and sodium bicarbonate (3 mM) in a 15.6 and 34.8 mm diameter well (6- and 24-well plate) (Corning Inc., New York, New York) previously coated with polyornithine (1.5 µg/mL, Sigma, St. Louis, MO).

After astrocytes reached confluence, the culture medium was removed by suction and the cells were incubated for 1 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in DMEM without fetal bovine serum (FBS) in the absence (controls) or presence of U18666A at a dose of 0.25 µg/mL for 48 h as described below. To evaluate glutamatergic involvement on NPC astrocytes, cells were pre-incubated in the presence of the NMDA antagonist MK-801 (50 µM) for 30 min before U18666A treatment (Copetti-Santos et al., 2015).

2.3. Drug Treatment

In order to investigate the effects of U18666A-induced cholesterol accumulation and of MK-801 on the hyperphosphorylation of intermediate filaments, the astrocyte cultures were treated as follows: group 1 = cultures with no added drug (controls); group 2 = cultures added with U18666A (0.25 µg/mL) (treated group); group 3 = cultures with MK-801 (50 µM) added to the medium; and group 4 = cultures with U18666A and MK-801 (50 µM) added to the medium. All culture plates were incubated for 48 h. Cell cultures containing over 95% GFAP-positive cells were used in all trials.

2.4. In Vitro Phosphorylation

Astrocytes were incubated for 24 h in the presence or absence of U18666A, then the medium was changed and incubation for 1 h was carried out at 30°C with 1,000 mL of a medium containing 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM Na-HEPES (pH 7.4), 12 mM glucose, and 1 mM CaCl₂ and the following protease inhibitors: 1 mM benzamidine, 0.1 mM leupeptin, 0.7 mM antipain, 0.7 mM pepstatin, 0.7 mM chymostatin, and 10 mCi [³²P]- orthophosphate with or without addition of U18666A (0.25 µg/mL). In the experiments designed to study signaling mechanisms, cells were pre-incubated for 30 min in the presence or absence of 50 µM MK-801. The labeling reaction was normally allowed to proceed for 1 h at 30 °C and stopped with 1 mL of cold stop buffer (150 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, Tris-HCl, 50 mM, pH 6.5, and the protease inhibitors described above). Cells were then washed twice by decantation with stop buffer to remove excess radioactivity. Next, preparations of IF-enriched high-salt Triton-insoluble cytoskeletal fraction were obtained from striatal primary astrocytes, as described by Funchal et al. (2003). Briefly, cells were homogenized in 200 µL of ice-cold high-salt buffer containing 5 mM KH₂PO₄ (pH 7.1), 600 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2mM EGTA, 1% TritonX-100, and the protease inhibitors described above. The homogenate was centrifuged at 15,800 x g for 10 min at 4 °C in an Eppendorf centrifuge and the supernatant was discarded. The Triton-insoluble IF-enriched pellet, containing GFAP and vimentin, was dissolved in 1% SDS and protein concentration was determined using the method by Lowry et al.

2.5. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

The cytoskeletal fraction was prepared as described above. Equal protein concentrations were loaded onto 10% polyacrylamide gels and analyzed by SDS-PAGE

(Laemmli, 1970). After drying, the gels were exposed to T-MAT films at -70°C with intensifying screens and finally the autoradiograph was obtained. Cytoskeletal proteins were quantified by scanning the films with a Hewlett-Packard Scanjet 6100C scanner and optical densities were determined with an Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company). Density values were obtained for the proteins studied.

2.6. Statistical Analysis

Data were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test when the *f* test was significant and necessary. All analyses were performed using the SPSS software program on an IBM-PC compatible computer.

3. Results

Initially, the effects of U18666A on astrocyte cell cultures from Wistars rats 0 to 3 days old on the endogenous phosphorylation system associated with enriched cytoskeletal IF fractions from the cerebral cortex regarding both vimentin and GFAP were studied. Astrocyte cultures in contact with U18666A showed an increase in IF protein hyperphosphorylation when compared with the control cells (drug free). These analyses indicate that phosphorylation increased both in GFAP and insoluble vimentin by nearly two fold, as shown in Fig. 1, with a significant difference (GFAP = $p < 0.0001$; vimentin = $p < 0.0001$). Western blot analyses on the IF subunits confirm that the cells in contact with U18666A do undergo hyperphosphorylation (Fig. 2). These results were observed due to the addition of ^{32}P both in vimentin and in GFAP.

Subsequently, cells cultured drug free were put in contact with MK-801, an uncompetitive NMDA antagonist, and it was observed that this agent tends to does not alter the phosphorylation, remaining at normal levels, driving it to even lower levels than in the control cells, which shows a significant difference when the GFAP IFs are analyzed ($p < 0.0001$) (Fig 3).

Concomitantly, cultures of astrocytes treated with U18666A were also put in contact with MK-801 and protein phosphorylation did not increase regarding both GFAP and insoluble vimentin. That shows that MK-801 inhibits the action of the drug U18666A, thus preventing hyperphosphorylation of the FI insoluble (Fig 3).

4. Discussion

U18666A (3- β -[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one), a hydrophobic amine, has been used to mimic NPC in human and animal tissues, among which: fibroblasts of newborn rats (Bierkamper and Cenedella, 1978), fibroblasts of NPC-free humans (Lange et al. 2002), NPC knockout mice (NPC^{-/-}) (Sáez et al., 2013), and Wistar rat astrocyte cultures (Copetti-Santos et al., 2015).

Considering that, from the development of the NPC phenotype with U18666A, changes have already been observed in the activity of lysosomal hydrolases which are also changed in human NPC (Copetti-Santos et al., 2015) and that changes have already been observed in the cellular cytoskeleton in human NPC (Walter et al., 2009), the aim of this study was to observe that these changes are present in U18666A-induced NPC astrocyte cultures.

In the present study, first hyperphosphorylation was observed in cytoskeleton IF both in GFAP and insoluble vimentin in cultures of U18666A-induced NPC astrocytes. Kodam et al. (2010) also observed an insoluble hyperphosphorylation of vimentin in the hippocampus of mice NPC1^{-/-}. The same was also observed by Walter et al. (2009) in human fibroblasts with NPC1.

As to GFAP, our results also agree with the literature. Hovakimyan et al. (2013) observed an increase of this protein insoluble phosphorylated in the olfactory bulb and Luan et al. (2007) and Bae et al. (2005), had the same result in astrocytes, both worked in an experimental model of NPC1^{-/-} mice.

The intermediate filaments were also studied in other neurodegenerative diseases. An increase in GFAP insoluble phosphorylated was observed in Alzheimer's disease (Ning et al., 2014) and Parkinson's disease (Thornton et al., 2012) and Huntington's disease (Pierozan et al., 2014) and induced neurodegeneration diteluride (Heimfarth et al., 2008). Vimentin insoluble phosphorylated also proved to be increased in Alzheimer disease (Levin et al., 2009), Huntington disease (Pierozan et al., 2008) and neurodegeneration induced diteluride (Heimfarth et al., 2008).

These results were supported by the evidence that phosphorylation may regulate the dynamic properties of IF, thus leading to a reorganization of the IF network (Inagaki et al., 1996b). In addition, the pathological hyperphosphorylation of the cytoskeletal protein is thought to be related to neuronal damage and formation of aggregates of cytoskeletal elements in different cell compartments, which can be considered a common characteristic of some neurodegenerative diseases (Petzold, 2005).

Among the receptors involved in excitotoxicity, the NMDA receptor (NMDAR) stands out as the main one taking part in this phenomenon. Astrocyte cultures in contact with MK-801, since it is an uncompetitive NMDA antagonist, enable full prevention by lowering hyperphosphorylation levels and leading to regular phosphorylation levels in the IFs both in vimentin and GFAP. This neuroprotective action has been also observed in cortical cells using MK-801, which inhibits the action of NMDA (Parsons et al., 1995; Palmer et al., 1997).

Hyperphosphorylation of IFs caused by the U18666A-induced cholesterol accumulation, was prevented by MK-801, thus showing the cytotoxic effects involved in cytoskeleton protein deregulation. As shown in this study, MK-801 fully prevented hyperphosphorylation both in vimentin and GFAP. Therefore, the mechanisms that led to IF hyperphosphorylation were likely the ones dependent on the NMDA receptor, supporting U18666A as a glutamatergic agonist that acts on the cytoskeleton, besides being directly linked to the increase in cholesterol.

The results obtained may enable inferring that substances that decrease the excitotoxicity caused by the higher cholesterol levels observed in NPC, such as the NMDA receptor antagonist MK-801, can be viable tools to aid in the treatment of neurodegenerative diseases related to glutamatergic excitotoxicity.

References

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 2002.

- Ayala GX, Tapia R.(2005) Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci.* 22(12):3067-76.
- Baba A, Lee E, Tatsuno T, Yamaguchi S, Mizuo H & Iwata H (1982) Cysteine sulfinic acid in the central nervous system: antagonistic effect of taurine on cysteine sulfinic acid-stimulated formation of cyclic AMP in guinea pig hippocampal slices, *Journal of Neurochemistry*, 38, 1280-1285.
- Bae J-S, Furuya S, Ahn S-J, Yi S-J, Hirabayashi Y, Jin HK(2005) Neuroglial activation in Niemann–Pick Type C mice is suppressed by intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Neuroscience Letters.* 381(3):234-236.
- Bierkamper GG, Cenedella RJ.(1978) Induction of chronic epileptiform activity in the rat by an inhibitor of cholesterol synthesis, U18666A. *Brain Res.* 150(2):343-351.
- Copetti- Santos D, Garcia CS, Andrade CV, Daitx VV, Moraes VC, Rohden F, Coelho JC. (2015) Effect of U18666A on Beta-Glucosidase, Sphingomyelinase, and Beta-Galactosidase activities in astrocyts of young rats. *The Journal of Membrane Biology.* 1(1696), 248.
- Eng LF, Ghirnikar RS (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229 –237.
- Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén A-S, Hellman J, Chou Y-H, Goldman RD. (2004) Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci* 117:919–932.
- Funchal C, de Almeida LM, Oliveira Loureiro S, Vivian L, de Lima Pelacz P, Dall Bello Pessutto F (2003) In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 11(2):111-118.

- Hannun YA, Bell RM. (1989) Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*. 243(4890):500-7.
- Hayashi H (2011) Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. *Biol Pharm Bull.*;34(4):453-461.
- Heimfarth L, Loureiro SO, Zamoner A, Pelacz Pdc L, Nogucira CW, Rocha JB, Pessoa-Pureur R.(2008) Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. *Neurotoxicology.*;29(1):40-47.
- Hovakimyan M, Meyer A, Lukas J, Luo J, Gudziol V, Hummel T, Rolfs A, Wree A, Witt M (2013) Olfactory deficits in Niemann-Pick type C1 (NPC1) disease. *PLoS One*. 31;8(12).
- Inagaki N, Tsujimura K, Tanaka J, Sekimata M, Kamei Y, Inagaki M.(1996) Visualization of protein kinase activities in single cells by antibodies against phosphorylated vimentin and GFAP. *Neurochem Res.*;21(7):795-800. Review.
- Inagaki M, Inagaki N, Takahashi T, Takai Y (1997) Phosphorylation-dependent control of structures of intermediate filaments: a novel approach using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *J Biochem*. 121(3):407-14.
- Karten B, Peake KB, Vance JE (2009) Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochim Biophys Acta Epub* 1791(7):659-70.
- Klymkowsky MW. (1995) Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. *Curr Opin Cell Biol*. (1):46-54.

- Kocaeli H, Korfali E, Oztürk H, Kahveci N, Yilmazlar S. (2005) MK-801 improves neurological and histological outcomes after spinal cord ischemia induced by transient aortic cross-clipping in rats. *Surg Neurol.* 64 Suppl 2:S22-6; discussion S27.
- Kodam A, Maulik M, Peake K, Amritraj A, Vetrivel KS, Thinakaran G, Vance JE, Kar S (2010) Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia.* 15;58(11):1267-1281.
- Korpi ER, Kleinman JE, Goodman SI, Wyatt RJ (1987) Neurotransmitter amino acids in post-mortem brains of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 22(4):291-301.
- Lacmmlli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 15;227(5259):680-5.
- Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck TL (2002) Dynamics of lysosomal cholesterol in Niemann-Pick type C and normal human fibroblasts. *J Lipid Res.* 43(2):198-204.
- Levin EC, Acharya NK, Sedeyn JC, Venkataraman V, D'Andrea MR, Wang HY, Nagele RG (2009) Neuronal expression of vimentin in the Alzheimer's disease brain may be part of a generalized dendritic damage-response mechanism. *Brain Res.* 17;1298:194-207.
- Loureiro SO, Romao L, Alves T, Fonseca A, Heimfarth L, Moura Neto V, Wyse AT, Pessoa-Pureur R (2010) Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain Res* 1355:151-164.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem* 193(1):265-275.

- Luan Z, Saito Y, Miyata H, Ohama E, Ninomiya H, Ohno K (2007) Brainstem neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *J Neurol Sci.* 15;268(1-2):108-16.
- Luby E, Cohen B, Rosenbaum G, Gottlieb J, Kelley R (1959) Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *Am Med Assoc Arch Neurol Psychiatry* 81:363–369.
- Middeldorp J, Hol EM. (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* Epub 93(3):421-443.
- Mukhin A, Kovaleva ES, London ED (1997) Two affinity states of N-methyl-D-aspartate recognition sites: modulation by cations. *J Pharmacol Exp Ther.* 282(2):945-954.
- Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JF 3rd, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ.(1999) The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem.* 274(14):9627-9635.
- Ning M, Wu Y, Ni X, Zhao Y, Ling R (2014) Cerebral microemboli increase β -amyloid protein deposition, MMP-9, and GFAP expression in the Alzheimer's model of APP/PS1 double transgenic mice. *Curr Neurovasc Res.*;11(3):190-201.
- Palmer GC, Miller JA, Cregan EF, Gendron P, Peeling J (1997) Lowaffinity NMDA receptor antagonists. The neuroprotective potential of ARL 15896AR. *Ann NY Acad Sci* 825:220–231.
- Parsons C.G., Quack G., Bresink I., Baran L., Przegalinski E., Kostowski W., Krzascik P., Hartmann S., Danysz W. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency

- of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology*. 1995;34:1239–1258.
- Pekny M and Pekna M (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *The Journal of Pathology* 204(4): 428–437.
- Petzold A(2005) Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci*. 15;233(1-2):183-198. Review.
- Pierozan P, Ferreira F, Ortiz de Lima B, Gonçalves Fernandes C, Totarelli Monteforte P, de Castro Medaglia N, Bincoletto C, Soubhi Smaili S, Pessoa-Pureur R.(2014) The phosphorylation status and cytoskeletal remodeling of striatal astrocytes treated with quinolinic acid. *Exp Cell Res.*;322(2):313-323.
- Sácz PJ, Orellana JA, Vega-Rivcros N, Figucroa VA, Hernández DE, Castro JF, Klein AD, Jiang JX, Zanlungo S, Sáez JC (2013) Disruption in connexin-based communication is associated with intracellular Ca²⁺ signal alterations in astrocytes from Niemann-Pick type C mice. *PLoS One* 15;8(8):e71361.
- Sarría A, Moreno L, Fleta J, Lasierra MP, Roda L, Giner A, Larraz L, Bueno M (1992) Immunoglobulins, complement components and lymphocyte subsets are related to plasma lipoproteins in healthy children. *Atherosclerosis* 93(1-2):157-159.
- Tasca CI, Cardoso LF, Martini LH, Ramírez G, Souza DO (1998) Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptor activation. *Neurochem Res*. 23(2):183-188.

Thornton E, Vink R.(2012) Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease.

Vance JE, Hayashi H, Karten B (2005) Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 16(2):193-212.

Vanier MT. (2010) Niemann- Pick C disease: history, current research topics, biological and molecular diagnosis *Arch Pediatr.* 17 Suppl 2:S41-4.

Walter M, Chen FW, Tamari F, Wang R, Ioannou YA (2009) Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment. *Biol Cell.* 101(3):141-152.

Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi-Mosleh L, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2010) Identification of surface residues on NiemannPick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab.* 4;12(2):166-73.

Acknowledgements: This work was supported by Coordinating Agency Training of Superior- Level Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Figure Legends

Figure 1- Effect of U18666A on the phosphorylation of FI of (A) GFAP and (B) vimentin in the cytoskeletal fraction from rats' astrocytes cultures. Different statistically significant from control were determined by Student t test: * $p < 0.0001$, $t = 6.86$ (A), $t = 6.66$ (B). We used a $n = 6$ per group for each experiment.

Figure 2- Coomassie blue stained molecular weight standards, representative stained gel of a control (C) and treated samples (T), corresponding autoradiograph, and western blot for vimentin and GFAP. Equal amounts of the cytoskeletal fraction ($50\mu\text{g}$) from control and treated samples were run in 7,5% polyacrylamide gel electrophoresis. MW: molecular weight standard proteins; WB: Western blotting. We used a $n = 6$ per group for each experiment.

Figure 3- Effect of MK 801 and U18666A on the phosphorylation of FI of (A) GFAP and (B) vimentin in the cytoskeletal fraction from rats' astrocytes cultures. Different statistically significant were determined by ANOVA followed by Tukey's test: $p < 0.0001$.

* Different from control, # different from control, MK-801 and MK-801 + U18666A. We used a $n = 6$ per group for each experiment

FIGURE 1

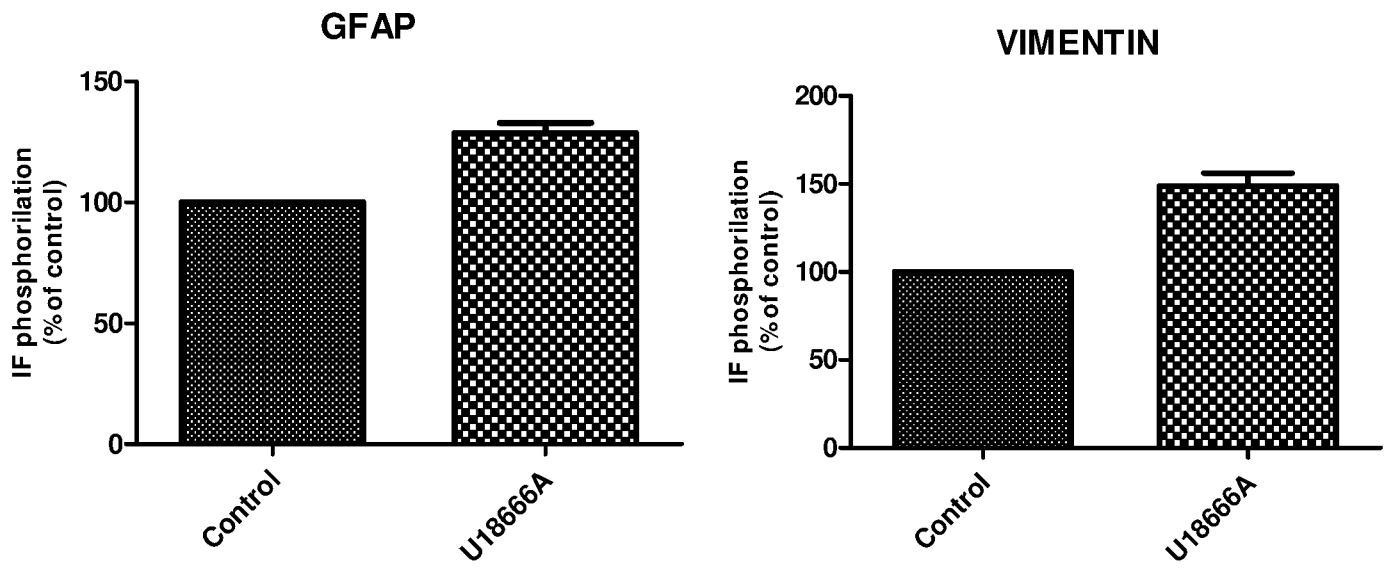


Figure 2

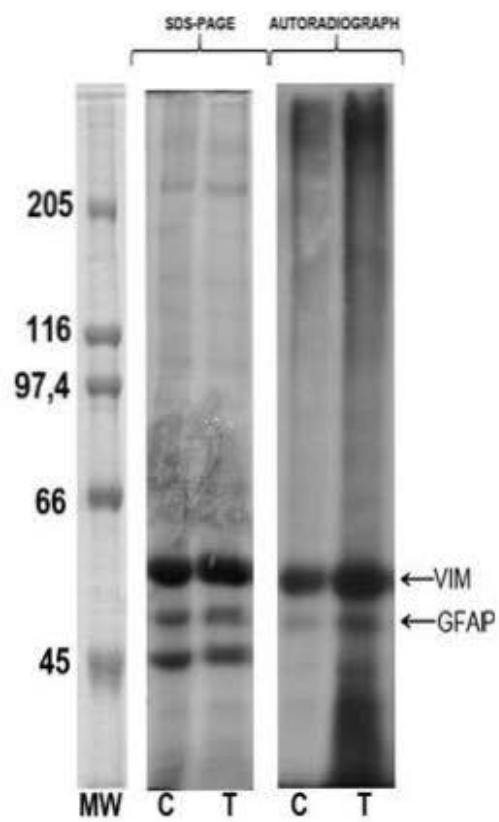
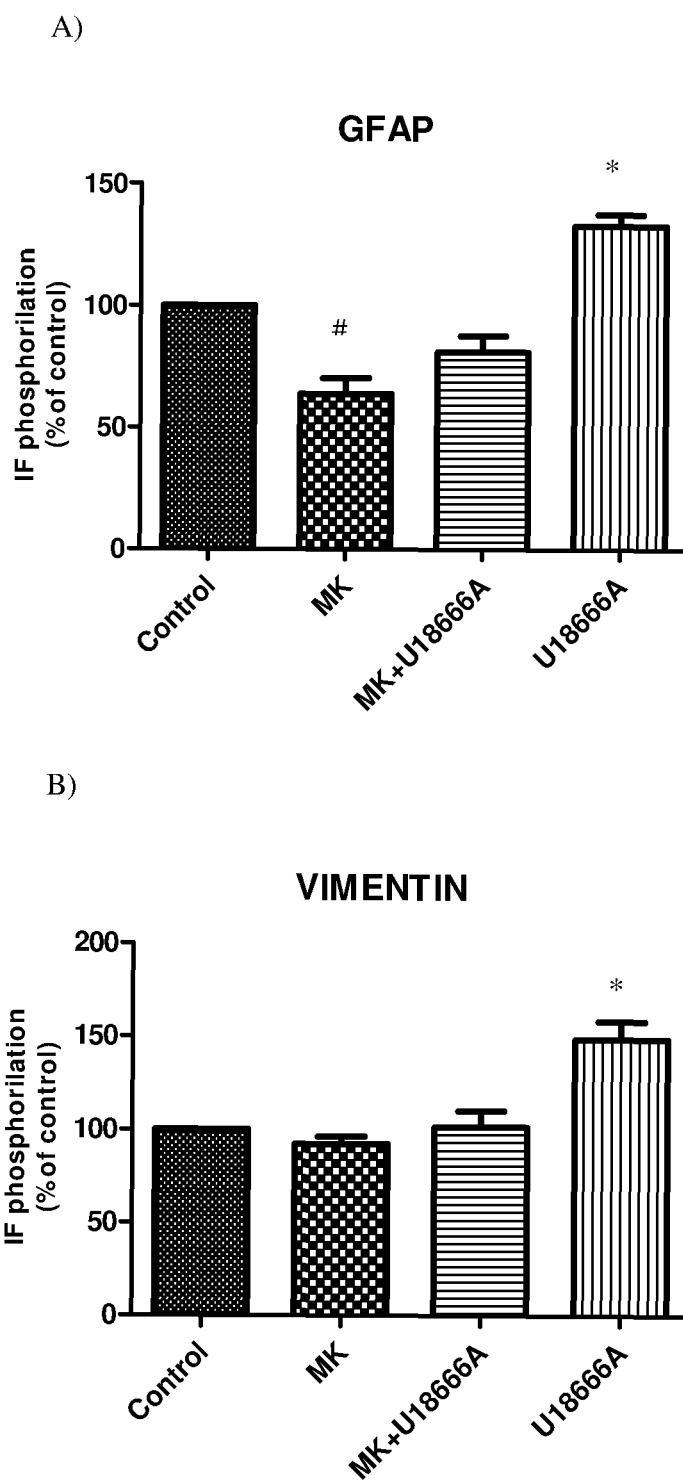


FIGURE 3



6. DISCUSSÃO

A doença de Niemann Pick Tipo C (DNPC) é uma doença rara, crônica, caracterizada por uma desordem progressiva no transporte intracelular de lipídios (Itturriaga et al., 2006; Patterson et al., 2001; Vanier et al., 2010). Ela envolve o acúmulo de colesterol não esterificado e glicoesfingolipídios em lisossomos intracelulares de vários tecidos, principalmente o fígado, baço e cérebro (Héron et al., 2012; Patterson et al., 2010; Pineda et al., 2010).

O colesterol é um componente essencial do Sistema Nervoso Central (SNC) e existem evidências que sugerem uma associação entre a disfunção do metabolismo do colesterol no cérebro e o aparecimento de perturbações neurodegenerativas (Dietschy, Turley 2004). Alguns estudos sugerem que, *in vivo*, o colesterol no SNC seja derivado de astrócitos e então enviado para os neurônios maduros (Nieweg et al., 2009).

O propósito desse estudo foi mimetizar o acúmulo de colesterol em astrócitos de ratos jovens, como aquele que ocorre na DNPC, pela adição da droga U18666A, observando seu efeito sobre as atividades de hidrolases lisossomais, alguns parâmetros de estresse oxidativo e o metabolismo energético e sobre o citoesqueleto celular, no intuito de verificar alterações bioquímicas que possam contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentados por indivíduos com DNPC.

O acúmulo de colesterol foi induzido em cultura de astrócitos de ratos de idade entre 0 a 3 dias com a adição de U18666A. Essa droga já foi utilizada para mimetizar a doença de DNPC em modelos animais em outras células que não os astrócitos (Liscum and Faust, 1989; Underwood et al., 1996) e em camundongos knockout NPC^{-/-} (Sáez et al., 2013).

Em um primeiro momento, adaptamos a dose e o tempo de exposição dos astrócitos à droga, de modo a observarmos um aumento significativo de colesterol. Para tanto, utilizamos 5 doses de U18666A: 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 µg/mL e 3 tempos de exposição: 24, 48 e 72 horas. A dose de 0,25 µg/mL e o tempo de 48 horas foram escolhidos porque após esse período e com dosagem maior, o aumento ocorrido não foi significativamente diferente. Cheung et al. (2004), quando utilizaram altas doses de U18666A em culturas de neurônios corticais de roedores, observaram um aumento significativo na probabilidade de ocorrer apoptose celular. Com isso, esses autores optaram por usar doses e tempos de incubação similares aos do nosso estudo, não observando assim, morte celular. Estes achados, portanto, reforçam a dose e o tempo escolhido em nosso trabalho.

A verificação da presença de colesterol nos fibroblastos de pacientes com DNPC é realizada pelo teste de Filipin. Este teste consiste em verificar a presença de colesterol acumulado no espaço perinuclear e compará-la com amostras de indivíduos normais. Ao final desta técnica, é realizada uma observação subjetiva, em microscópio de fluorescência, do colesterol acumulado. Com o objetivo de transformarmos esta visualização em um método mais objetivo, nós associamos esta fluorescência com o número de pixels gerados, através de um programa de computador, o CellM. Este método, mostrou-se prático e não subjetivo. Essa técnica mostrou uma diferença significativa entre o acúmulo de colesterol não esterificado intralisossomal em células controle e aquelas contendo a droga.

No ensaio de quantificação de colesterol intracelular usando o kitAmplex® Red Cholesterol (Molecular Probe), demonstrou-se que os astrócitos tratados com U18666A tinham um maior acúmulo de colesterol não esterificado intralisossomal do que as células controle (não tratados com a droga). O nível médio de colesterol observados nas células controle foi 25,7 mg de colesterol / mg de proteína, o que corresponde a um pouco menos

de duas vezes o nível de colesterol acumulado nas células incubadas com U18666A (54,2 mg de colesterol / mg de proteína). Este kit foi usado por Tängemo et al (Tängerno et al., 2011) para quantificar o colesterol livre e colesterol não esterificado intralisossomal contido em fibroblastos de pacientes DNPC. Estes pesquisadores observaram que em células de pacientes com DNPC havia mais colesterol acumulado (3 vezes mais) do que naquelas de indivíduos normais. Estes resultados estão de acordo com os resultados aqui observados.

Os níveis de colesterol observados com o programa Cell-M corresponderam aos níveis de colesterol observados na quantificação usando o kit Amplex® Red Cholesterol, o que demonstra que o uso de um programa apropriado para quantificar a fluorescência do teste de Filipin fornece uma quantificação segura dos níveis de colesterol. Isto sugere que o ensaio tem o potencial para auxiliar no diagnóstico da doença de DNPC em células cultivadas.

Doenças Lisossomais de Depósito, dentre as quais se inclui a DNPC, são entendidas como uma consequência de mutações que resultam em síntese reduzida de enzimas lisossomais levando ao acúmulo de lipídios nesta organela celular. Em nosso estudo nós medimos a atividade de enzimas lisossomais associadas com a degradação de lipídios: esfingomielinase (ASM), β -glicosidase (GBA) e β -galactosidase (GLB). A atividade dessas enzimas está alterada em humanos com doença de Niemann-Pick tipo A e B, doença de Gaucher e Gangliosidose GM1, respectivamente (Vanier et al., 1991, Zimran et al., 1991; Suzuki et al., 1991).

Percebemos que a atividade da ASM em astrócitos contendo U18666A foi reduzida, significativamente, em relação aos astrócitos controles sem atingir níveis próximos a zero como ocorre na Doença de Niemann-Pick tipo A ou B. Estes resultados foram compatíveis

com aqueles que demonstraram uma atividade reduzida da ASM em cultura de fibroblastos de pacientes com DNPC (Pentchev et al., 1987; Vanier, 1988; Vanier, 1991), demonstrando, portanto, que nosso modelo mimetizou as condições patológicas humanas neste sentido. Conforme Reagan (2000) é evidente que a regulação de ASM não é simplesmente obtida através da redução da quantidade de enzima por meio de transcrição ou tradução. Em vez disso, as concentrações elevadas de colesterol livre intracelulares parecem alterar eventos de processamento e / ou tráfico críticos para a atividade da ASM ou induzir mudanças alostéricas que tornam a enzima inativa. Este regulamento pós-transducional mediado por colesterol parece estar envolvido diretamente na compreensão das vias regulatórias complexas que participam da homeostase do colesterol intracelular e da esfingomielina.

A atividade da enzima GBA em astrócitos de ratos também foi comparada entre amostras controle e amostras positivas para DNPC, e encontramos uma diferença significativa entre os dois grupos. Amostras de astrócitos DNPC mostraram uma diminuição significativa nos níveis de GBA. Isso também tinha sido observado em estudos anteriores em fibroblastos de pacientes com DNPC (Vanier et al, 1980; Besley e Moss, 1983), o que demonstra também uma conformidade com o modelo empregado no presente trabalho. Esta diminuição, embora menor que aquela encontrada na doença de Gaucher, provavelmente deve-se à degradação acelerada da glicocerebrosidase madura, ao invés da diminuição na sua produção como aquela provocada pela mutação no gene GBA1 responsável pela doença de Gaucher (Salvioli et al., 2004).

Em relação à atividade da enzima GLB não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado em astrócitos de ratos. Em fibroblastos humanos, até o momento, não foi observado uma diferença significativa na atividade da GLB quando

comparado com a atividade em fibroblastos de pacientes com doença de Niemann Pick tipo C.

Estes resultados acima demonstraram que o modelo de DNPC em astrócitos de ratos jovens pela adição da droga U18666A, foi adequado para mimetizar a doença e que quando analisamos as atividades de enzimas que estão envolvidas com a degradação de lipídios acumulados nesta patologia, se mostrou compatível com os resultados observados em humanos.

O colesterol e a enzima Na^+ , K^+ -ATPase são dois componentes indispensáveis na membrana plasmática de mamíferos. A Na^+ , K^+ -ATPase regula o transporte transmembrana em mamíferos e é um receptor de esteróides cardiotônicos endógenos. As cavéolas consistem em um subconjunto dos “rafts” lipídicos, definidas pela presença da proteína caveolina (Parton e Simons, 2007). Esses “rafts” lipídicos são formados a partir da interação entre esfingolipídios, colesterol e proteína (Schoner e Scheiner- Bobis, 2007; Simon e Gerl, 2010). Essa complexa composição lipídica da membrana plasmática e a formação dos microdomínios lipídicos específicos são importantes na regulação da Na^+ , K^+ -ATPase, indicando que essa enzima pode estar associada com “caveolae/rafts”, mostrando uma importante função do colesterol na regulação da Na^+ , K^+ -ATPase (Cornelius, 2008).

Um decréscimo na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em células tubulares renais LLC-PK1 (camundongos BALB/c +/npc^{nih}) já foi observado em resposta ao tratamento com U18666A. Estudos prévios em camundongos NPC1^{-/-} mostraram também um decréscimo na atividade de Na^+ , K^+ -ATPase em estruturas neuronais e no fígado (Chen et al., 2011).

Levando-se isto em consideração, resolvemos testar como estaria a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em nosso modelo para DNPC.

A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em astrócitos de ratos jovens submetidos ao U18666A apresentou-se diminuída significativamente em relação aqueles em que a droga não foi adicionada. Estes resultados, portanto, estão de acordo com aqueles obtidos nos trabalhos citados acima em camundongos com DNPC, mostrando mais uma vez a eficiência de nosso modelo.

Acredita-se que a diminuição na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase seja pela interação entre o colesterol e a Na^+ , K^+ -ATPase atuando como um sensor de colesterol na membrana plasmática. A interrupção dessa interação prejudicaria as células na regulação do tráfego intracelular de colesterol e conseqüentemente a síntese desse composto e seu metabolismo, permitindo assim uma diminuição na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase.

Acredita-se que a morte neuronal provocada pela inibição da Na^+ , K^+ -ATPase pode ocorrer por vários mecanismos, como excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo (Lees, 1991). A recaptção de glutamato pelos astrócitos e pelo neurônio pré-sináptico (em menor quantidade) ocorre com co-transporte de sódio. Com a enzima inibida, a concentração extracelular de sódio diminui e a recaptção de glutamato pode ficar comprometida, resultando em estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos (Lipton e Rosenberg, 1994). Por outro lado, a estimulação excessiva de receptores de glutamato, incluindo o subtipo NMDA, provoca influxo de cálcio. O aumento intracelular excessivo de cálcio pode levar à produção de radicais livres, que pode levar a danos celulares (Avrova et al., 1999).

As alterações no transporte de neurotransmissores também podem estar relacionadas com a morte neuronal causada pela inibição da Na⁺,K⁺-ATPase, visto que a inibição da enzima está relacionada à liberação de neurotransmissores (Jacobson et al., 1986). Além disso, outros estudos indicaram que a inibição da Na⁺,K⁺-ATPase, secundária à depleção de energia e a produção de radicais livres, na presença de um insulto não-letal, ativa a cascata de apoptose e lesão neuronal provavelmente, amplificando a ruptura na homeostase de potássio (Wang et al., 2003). Essas evidências sugerem que o envolvimento do estresse oxidativo e ROS no desenvolvimento de DLDs, possam estar ocorrendo devido as alterações na enzima Na⁺, K⁺-ATPase. Isto nos levou a investigar, no presente estudo, se o estresse oxidativo está envolvido com células *in vitro* causados pela droga U18666A em culturas de astrócitos de ratos jovens.

O cérebro caracteriza-se por ter uma elevada taxa metabólica e baixos níveis de antioxidantes, e, por conseguinte, é bastante vulnerável a espécies reativas (Leonard, 2012). Atendendo que o cérebro tem uma reduzida capacidade antioxidante, isto faz com que os níveis de proteção contra ERO e processos inflamatórios sejam relativamente baixos (Leonard, 2012). Em função disso, é importante considerar que existem fundamentalmente três reações que são relevantes para o dano celular. A primeira diz respeito à lipoperoxidação das membranas, a segunda seria a própria mudança oxidativa nas proteínas e, por último, a reação que envolve lesões que podem ocorrer ao nível do DNA (Oliveira e Schoffen, 2010) inclusive aquele do complexo mitocondrial. Isto poderia levar à depleção de energia e servir como uma fonte de espécies reativas, causando os danos oxidativos e comprometimento da função celular em vários locais alvo (Milusheva et al., 2010).

O tratamento de culturas primárias de neurônios corticais com U18666A pode cau-

sar apoptose secundária devido ao aumento no ERO (Cenedella, 2009). O estresse oxidativo já foi observado em fibroblastos, eritrócitos e plasma de humanos com DNPC (Zampieri et al., 2009; Ribas, et al., 2012)

Um importante alvo dos estudos biológicos sobre o estresse oxidativo é o óxido nítrico (NO). Ele desempenha um papel regulador e, em condições normais, é produzido endogenamente por várias células (Wei et al., 2003), entre as quais os neurónios (Prast e Philippu, 2001). O NO é um dos principais mensageiros inter / intracelular, dentro e entre dos neurónios no sistema nervoso periférico e no SNC (Duncan e Heales, 2005). No SNC, o NO influencia a liberação de neurotransmissores e processos sinápticos (Contestabile, 2000) e parece estar envolvido, como um mediador intracelular na morte celular induzida por neurotoxina (Dawson et al., 1991). Vários modelos neurotóxicos mostram que o NO induz a morte de culturas de neurónios dopaminérgicos e que este processo de morte celular envolve o aumento do estresse oxidativo (Dehmer et al., 2000; Matthews et al., 1997; Muiswinkel et al., 1998), promovendo assim mecanismos patogênicos envolvidos em processos neurodegenerativos. O mecanismo exato através do qual o NO contribui para certas doenças neurodegenerativas ainda não foi completamente entendido.

Nosso estudo mostrou um aumento na produção do NO. Esses resultados confirmam o que já havia sido considerado por outros autores em condições fisiológicas onde o aumento nas concentrações de NO causou lesão celular, visto que promoveu a formação de radicais livres favorecendo os danos do estresse oxidativo (Wei et al., 2003). Além disso, a produção excessiva de NO pode contribuir para um processo denominado excitotoxicidade glutamatérgica que é descrita como uma condição resultante da liberação

excessiva de glutamato e a conseqüente entrada de cálcio no terminal pós-sináptico e ativação de NOS cálcio-dependente.

A excitotoxicidade parece ser responsável por grande parte do dano cerebral que ocorre em várias doenças neurodegenerativas (Duncan e Heales, 2005). A máxima atividade da NOS depende da sua localização. Essa enzima está localizada em invaginações especializadas da membrana plasmática, as caveólas. O RNA- mensageiro da caveolina é hiper-regulado quando a entrada do colesterol livre via LDL para a célula é aumentada e a regulação do efluxo de colesterol livre pela caveola é mediada pelo RNA mensageiro da caveolina (Fielding et al., 1997). Várias evidências indicam que o aumento da regulação da caveolina, em células expostas a altos níveis de LDL- colesterol, resultam diretamente de um aumento na transcrição do gene da NOS induzido pelo maior conteúdo celular de colesterol (Bist et al., 1997).

Enzimas antioxidantes como a CAT e a SOD representam a primeira barreira contra as espécies reativas e são essenciais para a sobrevivência da célula (Halliwell, 2001; Remacle, 1992). Tióis (SH) desempenham um papel fundamental na proteção antioxidante celular e papéis extracelulares contra o estresse oxidativo (Aksenov e Markesbery, 2001). As técnicas usadas no presente estudo mostraram uma diminuição significativa na atividade da CAT e na atividade da SOD no córtex cerebral de ratos jovens em contato com U18666A. Tais mudanças levam a um aumento significativo em lipídios no córtex cerebral (Medeiros et al., 2012). Estes resultados confirmam o que havia sido relatado por Funchal et al. (2010) em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos quando em contato com outras drogas que também causam peroxidação lipídica. O aumento da atividade da SOD e

CAT reflete um aumento da resistência ao estresse oxidativo (Barreiros et al. 2006; Torsdottir et al., 2010) podendo levar a uma tentativa de restabelecimento da homeostase.

A peroxidação lipídica é caracterizada por um aumento na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como uma consequência do ataque de ERO contra membranas celulares, causando uma perda de seletividade em permuta iônica e a liberação do conteúdo de organelas, tais como enzimas hidrolíticas lisossomais, e a formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997). Uma vez que a membrana celular e a matriz extracelular são estruturas vitais para a célula, não é surpreendente verificar que as ERO induzem lesões que influenciam a extensão de processos patológicos (Bulkley, 1983).

Observou-se que as culturas de astrócitos que receberam U18666A mostraram um aumento nos níveis de TBARS, o que indica que a droga induz a peroxidação de lipídios. Sendo a DNPC uma doença neurodegenerativa, esta era a nossa hipótese, visto que em certas doenças neurodegenerativas, tais como na Doença de Alzheimer e Parkinson já foram demonstrados níveis elevados de TBARS (Sundaram, et al., 1996; Nikam et al, 2009). Esse aumento também foi observado em fibroblastos e plasma de pacientes NPC1 (Ribas et al., 2012).

Astrócitos expostos a U18666A *in vitro* apresentaram uma redução significativa de grupos sulfidril, reduzindo assim suas defesas antioxidantes não-enzimáticas. Estudos prévios *in vitro* com organocalcogenol também mostram esta redução em grupos SH no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo dos ratos quando estão sob efeito citotóxico causado pelo uso da droga (Funchal et al., 2011). A redução significativa de grupos sulfidril,

também foi encontrada em outras doenças lisossômicas de depósito como a Mucopolissacaridose tipo II (Negretto et al., 2013).

Em relação aos grupos carbonila de proteínas, um marcador bioquímico de danos oxidativos, foi encontrado um aumento significativo nos astrócitos onde foi adicionada a droga, em relação aos astrócitos controles. Esses dados estão de acordo com aqueles observados em plasma de indivíduos com DNPC, sem tratamento, por Ribas et al (2012).

Os grupos carbonil são produzidos em cadeias laterais da proteína quando alguns aminoácidos (especialmente Pro, Arg, Lys e Thr) são oxidados (DalleDone et al., 2003). Estas alterações da estrutura da proteína podem afetar a função de receptores, enzimas e proteínas de transporte, resultando numa perda parcial ou completa da funcionalidade da proteína (Halliwell e Gutteridge, 2007). Considera-se que a oxidação proteica e lipídica pode resultar em disfunção celular. É concebível que o dano, lipídico e oxidativo das proteínas, verificado nos astrócitos *in vitro* e em pacientes não tratados, com DNPC, possa estar associado, pelo menos em parte com a lesão tecidual encontrado nos pacientes com DNPC.

A medida do conteúdo de grupamentos carbonila é o parâmetro mais utilizado como biomarcador de dano oxidativo severo a proteínas, sendo considerado um marcador precoce e de oxidação estável de proteínas (Levine et al., 1990) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Stadtman e Berlett, 1997). Embora a carbonilação de proteínas seja usualmente causada por dano oxidativo induzido por espécies reativas, nós não podemos excluir a possibilidade de que aldeídos resultantes da peroxidação lipídica possam também induzir a geração de carbonilas (DalleDone et al, 2003).

Estudos com cérebro de indivíduos com Doença de Parkinson, uma outra doença neurodegenerativa, mostraram que muitas subunidades catalíticas do complexo I apresentavam níveis elevados de modificações carbonil, indicativas de oxidação proteica (Bueler, 2009).

Com o intuito de continuarmos procurando alterações bioquímicas nos astrócitos submetidos ao modelo com U18666A, seguimos estudando o citoesqueleto celular.

Ao adicionar U18666A às culturas de astrócitos de ratos e induzirmos um fenótipo DNPC às mesmas, observamos uma hiperfosforilação de vimentina insolúvel e de GFAP.

Trabalhos de Kodam et al. (2010) também observaram uma hiperfosforilação de vimentina insolúvel em hipocampo de camundongo NPC1^{-/-}. O mesmo foi relatado por Walter et al., (2009) em fibroblastos humanos com NPC1.

Quanto à GFAP, nossos resultados são similares aos resultados encontrados na literatura. Hovakimyan et al. (2013), observaram um aumento desta proteína insolúvel fosforilada em bulbo olfatório e Luan et al., (2007) e Bae et al., (2005), tiveram o mesmo resultado em astrócitos, ambos os trabalhos em modelos experimental de ratos NPC1^{-/-}.

Algumas doenças neurodegenerativas também foram analisadas e demonstraram aumento de GFAP, entre essas doenças estão: Alzheimer (Ning et al., 2014), Parkinson (Thornton et al., 2012), bem como Huntington (Pierozan et al., 2014) e neurodegeneração induzida por diteluride (Heimfarth et al., 2008). Na doença de Huntington ((Pierozan et al., 2014), neurodegeneração induzida por diteluride (Heimfarth et al., 2008), e Doença de Alzheimer (Levin et al., 2009), também observou-se o aumento de vimentina insolúvel fosforilada.

As propriedades dinâmicas dos FI, podem ser reguladas pela fosforilação dessas proteínas (Inagaki et al., 1996b), o que pode ser suportado através dos resultados encontrados aqui, bem como em outros experimentos já realizados e outras doenças neurodegenerativas analisadas anteriormente por outros autores. Além disso, as doenças neurodegenerativas têm como característica a formação de agregados de elementos do citoesqueleto em diferentes compartimentos celulares, o que pode estar relacionado diretamente com a hiperfosforilação patológica das proteínas do citoesqueleto. (Petzold, 2005).

Existem receptores que estão diretamente envolvidos na excitotoxicidade, entre eles destaca-se o receptor NMDA (NMDAR) como principal receptor envolvido neste fenômeno.

Em nossas culturas de astrócitos, ao colocarmos o MK-801, por este ser um antagonista não competitivo de NMDA, observamos que os níveis de fosforilação tornaram-se mais baixos, permitindo assim uma total prevenção e tornando os níveis de fosforilação normais dos FI, tanto de vimentina quanto GFAP. Essa ação neuroprotetora já foi observada em células corticais utilizando MK-801, inibindo a ação do NMDA (Parsons et al., 1995; Palmer et al., 1997).

A hiperfosforilação dos FI, devido ao acúmulo de colesterol induzido pelo U18666A, foi prevenida pelo MK801, demonstrando dessa forma efeitos citotóxicos envolvidos na desregulação das proteínas do citoesqueleto. Conforme demonstrado neste trabalho, o MK801 preveniu totalmente a hiperfosforilação, tanto da vimentina quanto de GFAP. Portanto, provavelmente os mecanismos que levaram à hiperfosforilação dos FI

foram mecanismos dependentes do receptor NMDA, estando o colesterol, cujo aumento foi induzido pelo U18666A, agindo como um agonista glutamatérgico sobre o citoesqueleto.

A partir dos resultados obtidos, talvez possamos intuir que substâncias que diminuam a excitotoxicidade causada pelo aumento do colesterol, observado na DNPC, a exemplo do antagonista do receptor NMDA, MK-801, podem ser ferramentas viáveis para auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas relacionadas à excitotoxicidade glutamatérgica.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos estabelecidos para este trabalho, obtivemos as seguintes conclusões:

Capítulo I:

- 1) Após a utilização de U18666A na cultura de astrócitos, obtivemos uma curva dose-resposta, sendo a dose de 0.25ug/ml no tempo de 48 horas a estabelecida para mimificar a DNPC.
- 2) Através do CellM software foi possível verificar o padrão de fluorescência perinuclear de colesterol, observando-se assim que a quantidade de colesterol em células tratadas com a droga U18666A é significativamente mais elevada do que aquela das células controle. Esses resultados mostram que este é um bom método para se realizar o diagnóstico de acúmulo de colesterol na DNPC.
- 3) A quantidade de colesterol não esterificado intralisossomal, mostrou uma significativa diferença, aproximadamente duas vezes maior, nas células que receberam a droga quando comparadas com as células controle, quando utilizamos o Kit Amplex Red. Esses resultados, foram compatíveis com as análises feitas com o CellM software.
- 4) Após analisarmos a atividade de três importantes enzimas na degradação do metabolismo de lipídios observamos que: a atividade da esfingomielinase de astrócitos é significativamente menor nas células em contato com a droga (DNPC) em relação às células sem a droga (controles); a atividade da beta-glicosidase de astrócitos tratados foi significativamente menor do que aquela das células controle e a atividade da beta-galactosidase não diferiu entre os dois grupos.

Capítulo II:

- 1) As técnicas utilizadas para análises de TBARS, carbonila e sulfidril serviram para avaliar os danos aos lipídios e as proteínas, demonstrando que: o uso de U18666A nas culturas de astrócitos de ratos jovens leva a um significativo aumento de TBARS e carbonil, porém os níveis de sulfidril demonstram estar significativamente diminuídos em astrócitos com a droga. Esses resultados indicam que a droga pode estar levando a uma peroxidação lipídica quando comparados com as células controle.
- 2) A produção de óxido nítrico em astrócitos DNPC encontra-se mais elevada em comparação com as células controle. Este aumento pode estar diretamente envolvido no aumento do estresse oxidativo.
- 3) Ocorreu uma redução significativa na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no modelo de DNPC quando comparado com células controle.
- 4) A atividade específica da Na^+ , K^+ -ATPase em astrócitos de ratos submetidos à droga U18666A estava diminuída significativamente em relação às células controle, o que pode indicar uma interação entre o colesterol e essa enzima via neuronal.

Capítulo III:

- 1) Culturas de astrócitos quando em contato com U18666A, apresentaram um aumento significativo, quase duas vezes maior, na fosforilação das proteínas dos FI quando comparados com as células controle (sem a droga).
- 2) Análises de Western blot nas subunidades dos FI comprovaram, que as células em contato com o U18666A, realmente sofrem hiperfosforilação. Estes resultados foram observados devido ao acréscimo de ^{32}P , tanto em vimentina insolúvel, quanto em GFAP.
- 3) Quando colocamos as células não tratadas com U18666A em contato com MK-801, um antagonista não competitivo de NMDA, observamos uma diminuição significativa da fosforilação de GFAP e nenhuma mudança na fosforilação de vimentina.
- 4) Astrócitos tratados concomitantemente com MK-801 e U18666A, mostraram que esse antagonista diminuiu consideravelmente o nível de hiperfosforilação nos FI, inibindo assim a excitotoxicidade ocasionada pelo acúmulo de colesterol.

8.PERSPECTIVAS

Como continuação deste trabalho as seguintes perspectivas são colocadas:

- A droga U18666A serve como um excelente agente para mimificar a DNPC, isso serve como modelo para futuros estudos com outras células, inclusive fibroblastos humanos a fim de esclarecer a DNPC e suas implicações nos diferentes tecidos.

- Outras enzimas de síntese e degradação de lipídios, como por exemplo a hexosaminidase A e a galactocerebrosidase poderão ser analisadas e o efeito do aumento do colesterol, pelo U18666A poderá ser testado.

- O U18666A, sendo um excelente inibidor no transporte de colesterol e tendo sido testado em culturas de astrócitos de ratos wistar jovens com DNPC, torna-se um excelente agente para o estudo de diferentes parâmetros bioquímicos tanto em células com DNPC como em outras doenças neurodegenerativas.

- Outros agentes, que inibam a excitotoxicidade do U18666A, como o MK-801, podem ser testados tanto em astrócitos de ratos jovens como em outras células visando futuramente auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas relacionadas a excitotoxicidade glutamatérgica.

9.BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2010) Tráfego intracelular de vesículas. In: *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Araujo APQC (2004). Psychiatric Features of Metabolic Disorders. *Rev. Psiq. Clín.* 31 (6); 285-289.
- Avrova NF (1999) Biochemical mechanisms of the adaptation in vertebrate to the changing environment: the role of lipids. *Zh Evol Biokhim Fiziol.*;35(3):170-180.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.*; 21:279-286.
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.*; 78(2):547-581.
- Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS (2002) Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit Rev Biotechnol.*;22(4):375-407. Review
- Bianco F, Perrotta C, Novellino L, Francolini M, Riganti L, Menna E, Saglietti L, Schuchman EH, Furlan R, Clementi E, Matteoli M, Verderio C. (2009) Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* 22;28(8):1043-1054..45. Epub 19. Erratum in: *EMBO J.* 2009 May 6;28(9):1374.
- Bierkamper GG, Cenedella RJ. (1978) Induction of chronic epileptiform activity in the rat by an inhibitor of cholesterol synthesis, U18666A. *Brain Res.* 14;150(2):343-351.
- Bist A, Fielding PE, Fielding CJ (1997) Two sterol regulatory element- like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10693- 10698.

- Björkhem I, Meaney S (2004) Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;24(5):806-815.
- Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest.* ;76(4):1501-1513.
- Cenedella RJ, Bierkamper GG (1979) Mechanism of cataract production by 3-beta(2 diethylaminoethoxy) androst-5-en-17-one hydrochloride, U18666A: an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Exp Eye Res.*;28(6):673-688.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 13;261(5123):921-3.
- Dherai AJ (2012). Inborn errors of metabolism and their status in India. *Clin Lab Med.* ;32(2):263-279.
- Dietschy JM, Turley SD (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol.*;12(2):105-12.
- Eisele B, Budzinski R, Müller P, Maier R, Mark M (1997) Effects of a novel 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitor on cholesterol biosynthesis and lipid metabolism in vivo. *J Lipid Res.*;38(3):564-575.
- Engelking LJ, Evers BM, Richardson JA, Goldstein JL, Brown MS and Liang G (2006). Severe facial clefting in Insig- deficient mouse embryos caused by sterol accumulation and reversed by lovastatin. *J. Clin. Invest.* 116, 2356-2365.
- Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43:37–

71.

- Ferreira AL, Matsubara LS (1997) Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras.*;43(1):61-8. Review.
- Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res.*;38(8):1503-1521.
- Frost RG, Holmes EW, Norden AG, O'Brien JS (1978) Characterization of purified human liver acid beta-D-galactosidases A2 and A3. *Biochem J.* 1;175(1):181-188.
- Funchal C, de Andrade RB, Turcatel E, Guerra RB, Wannmacher CM, Gomez R (2011) Acute treatment with the organochalcogen 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-1-en-1-one produces behavioral changes and inhibition of creatine kinase activity in the brain of rats. *Int J Dev Neurosci.*Epub;29(8):903-907.
- Galvan C, Camoletto PG, Cristofani F, Van Veldhoven PP, Ledesma MD (2008) Anomalous surface distribution of glycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins in neurons lacking acid sphingomyelinase. *Mol Biol Cell.* Epub;19(2):509-522.
- Gattaz WF (2000) Neuroquímica da esquizofrenia: papel dos fosfolípidos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo.; 22. 5-8, Suplemento 1.
- Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS.(1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med.*;5(2):170-5.
- Grabowski GA, Gatt S, Horowitz M (1990) Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* ;25(6):385-414. Review.
- Gulbins E. (2003) Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide.

- Pharmacol Res.*;47(5):393-399. Review.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141(2): 312-322.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in Biology and Medicine. 4 ed. New York: Oxford University Press, Oxford.
- Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A (2010) Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation *J Cell Biol.*; 1;191(3):615-629.
- Heard JM, Bruyère J, Roy E, Bigou S, Ausseil J, Vitry S (2010) Storage problems in lysosomal diseases. *Biochem Soc Trans.*; 38:1442-1447.
- Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2008) NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Epub 7;105(40):15287-15292.
- Jacobson I, Hagberg H, Sandberg M, Hamberger A (1986) Ouabain-induced changes in extracellular aspartate, glutamate and GABA levels in the rabbit olfactory bulb in vivo. *Neurosci Lett.*;64(2):211-215.
- Junqueira, & Carneiro (2004). *Histologia Básica* (10ªed.) Guanabara Koogan S.A.
- Lachmann RH, Grant IR, Halsall D, Cox TM (2004) Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. *Q J Med.*; 97:199-204.
- Lange Y, Steck TL. (1994) Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *J Biol*

Chem. 25;269(47):29371-29374.

Ledesma MD, Princetti A, Sonnino S, Schuchman EH.(2011) Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *J Neurochem.*;116(5):779-788.

Lee JK, Jin HK, Park MH, Kim BR, Lee PH, Nakauchi H, Carter JE, He X, Schuchman EH, Bae JS (2007) Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease. *J Exp Med.* Epub. 28; 211(8):1551-70.

Lees GJ (1991) Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev.* ;16(3):283-300. Review.

Liebermann M, Marks AD, Peet A, Chansky M (2013) Relationship between Cell Biology and Biochemistry. In: Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. 4thed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Lingwood D, Kaiser HJ, Levental I, Simons K (2009) Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans.* ;37(Pt 5):955-960. Review.

Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 3;330(9):613-622. Review.

Liscum L, Sturley SL (2004) Intracellular trafficking of Niemann-Pick C proteins 1 and 2: obligate components of subcellular lipid transport. *Biochim Biophys Acta.* 11;1685(1-3):22-7.

- Lo SM, McNamara J, Seashore MR, Mistry PK (2010) Misdiagnosis of Niemann-Pick disease type C as Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis*.Epub ;33 Suppl 3:S429-33.
- Martins AM (1999). Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Sao Paulo*, 117(6):251-265.
- Martins AM, Frangipani BJ, Micheletti C, Oliveira RB (2006). Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo, 1ª ed., São Paulo, 13-29.
- McGovern MM and Schuchman EH (2009) Acid Sphingomyelinase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews [internet] Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014.
- Nakashima M, Kudoh T, Sukegawa K, Maruyama K, Orii T (1986) Metabolism of sphingomyelin in cultured skin fibroblasts from patients with different types of Niemann-Pick disease. *Tohoku J Exp Med*.;148(4):365-371.
- Negretto GW, Deon M, Burin M, Biancini GB, Ribas G, Garcia SC, Goethel G, Fracasso R, Giugliani L, Giugliani R, Vargas CR. (2013) In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients. *Mol Genet Metab*.Epub ;111(2):205-8.
- Nikam S, Nikam P, Ahalcy SK, Sontakke AV (2009) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Indian J Clin Biochem*. Epub;24(1):98-101.
- Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP (2002) Cholesterol interactions with

- phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res.* ;41(1):66-97
- Okada S, O'Brien JS. Generalized gangliosidosis: beta-galactosidase deficiency. *Science*. 1968 May 31;160(3831):1002–1004.
- Parenti G. (2009) Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med.*;1(5):268-279.. Review.
- Park JH, Lee MY, Han HJ (2009) A potential role for caveolin-1 in estradiol- 17 beta-induced proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Src, P13K/Akt and MAPKs pathways. *Int J Biochem Cell Biol.*;41(3):659-665.
- Parton RG, Simons K (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;8(3):185-94. Review
- Pfrieger FW. (2003) Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays.*; 25: 72–78.
- Ponting CP (1994) Acid sphingomyelinase possesses a domain homologous to its activator proteins: saposins B and D *Protein Sci.*;3(2):359-361.
- Quintern LE, Weitz G, Nehr Korn H, Tager JM, Schram AW, Sandhoff K (1987) Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta.* 14; 922(3)323-336.
- Ramos- Vasconcelos GR, Alves ALH, Hermes- Lima M (2000) Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. In: O que é Vida: Para Entender a Biologia do Século XXI, p. 209-231 (capítulo 9). Editado por CN El-Hani CN e AAP Videira. Editora Relume Dumará, Rio de Janeiro, p. 209- 331, 2000.
- Reagan JW Jr, Hubbert ML, Shelness GS (2000) Posttranslational regulation of acid

- sphingomyelinase in niemann-pick type C1 fibroblasts and free cholesterol-enriched chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1;275(48):38104-38110.
- Reinhard L, Tidow H, Clausen MJ, Nissen P (2012) Na(+),K (+)-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na(+),K (+)-ATPase. *Cell Mol Life Sci.* Epub ;70(2):205-22. Epub 14. Review.
- Reinshagen, VH, Burges BL, Wellington L (2009) Why lipids are important for Alzheimer disease? *Molecular and Cellular Biochemistry*, Dordrecht: 326, 121-129.
- Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajncr M, Vargas CR (2010). Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci.*; 28:127-132.
- Rodríguez-Pascau L, Coll MJ, Vilageliu L, Grinberg D. (2009) Antisense oligonucleotide treatment for a pseudocxon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. *Hum Mutat.*;30(11):E993-E1001.
- Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, Möbius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S, Nave KA. (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci.* Epub;8(4):468-475.
- Sainz CM, Muñoz CZ, Monteagudo AGQ (2002). Errores innatos del metabolismo: Enfermedades lisosomales. *Rev Cubana Pediatr.*; 74(1) 68-76.
- Sakuragawa N. (1982) Acid sphingomyelinase of human placenta: purification, properties, and 125iodine labeling. *J Biochem.*;92(3):637-646.
- Salvioli R, Scarpa S, Ciaffoni F, Tatti M, Ramoni C, Vanier MT, Vaccaro AM (2004)

- Glucosylceramidase mass and subcellular localization are modulated by cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *J Biol Chem.* Epub. 23;279(17):17674-17680.
- Saudubray JM, van der Berghe G, Walter JH (2012) (eds.) *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment.* Berlin: Springer- Verlag.
- Simons K, Vaz WL (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*;33:269-295. Review.
- Schuck PH, Ferreira GC, Moura AP, Busanello EN, Tonin AM, Dutra-Filho CS, Wajner M (2009). Medium- chain fatty acids accumulation in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochem Int* 54:519-525.
- Sgaravatti AM, Magnusson AS , de Oliveira AS, Rosa AP, Mescka CP, Zanin FR, Pederzoli CD, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner AM, Dutra-Filho CS (2009). Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24: 415- 425.
- Soliz J, Soulage C, Hermann DM, Gassmann M (2007) Acute and chronic exposure to hypoxia alters ventilatory pattern but not minute ventilation of mice overexpressing erythropoietin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293(4):R1702-1710.
- Storch J. and Xu Z. (2009) Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 671–678.
- Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR (1996) Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clinical Science* 90, 255-260.

- Suzuki Y, Sakuraba H, Oshima A, Yoshida K, Shimmoto M, Takano T, Fukuhara Y (1991) Clinical and molecular heterogeneity in hereditary beta-galactosidase deficiency. *Dev Neurosci.*;13(4-5):299-303. Review.
- Tettamanti G (2004) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J.* ;20(5):301-317. Review.
- Therien AG, Blostein R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.*;279(3):C541-566.
- Torsdottir G, Kristinsson J, Snædal J, Sveinbjörnsdóttir S, Gudmundsson G, Hreidarsson S, Jóhannesson T (2010) Case-control studies on ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in neurodegenerative diseases: a short review. *J Neurol Sci.* Epub ;299(1-2):51-54.
- Thurberg BL, Wasserstein MP, Schians T, O'Brien F, Richards S, Cox GF, McGovern MM (2012) Liver and skin histopathology in adults with acid sphingomyelinase deficiency (Niemann-Pick disease type B). *Am J Surg Pathol* 36: 1234-1246.
- Tonin AM, Grings M, Busanello EN, Moura AP, Ferreira GC, Viegas CM, Fernandes CG, Schuck PF, Wajner M (2010). Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulation in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int.*; 56:930-936.
- Valayannopoulos V, Bajolle F, Arnoux JB, Dubois S, Sannier N, Baussan C, Petit F, Labrune P, Rabier D, Ottolenghi C, Vassault A, Broissand C, Bonnet D, de Lonlay P (2011) Successful treatment of severe cardiomyopathy in glycogen storage disease type III with D,L-3-hydroxybutyrate, ketogenic and high-protein diet. *Pediatr Res* 70: 638–641.

- Vanier MT (1999) Lipid changes in Niemann- Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem Res* 24:481-489.
- Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho DM, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochem. Biophys. Acta* 1688:26-32.
- Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2004). The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherited Metab Dis* 27:427-448.
- Walkley SU, Suzuki K (2004) Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim Biophys Acta*.11;1685(1-3):48-62.
- Withers DJ (2001) Insulin receptor substrate proteins and neuroendocrine function. *Biochem Soc Trans.*;29(4):525-529. Review.
- Yamanaka T, Suzuki K (1982) Acid sphingomyelinase of human brain: purification to homogeneity. *J Neurochem.*;38(6):1753-1764.
- Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E (1991) High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet.*;49(4):855-859.