

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ESTUDO DA AÇÃO DE UM INDUTOR PEROXISSOMAL EM FIBROBLASTOS DE
PACIENTES COM DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C**

ANA PAULA COSTA BEHEREGARAY
ORIENTADORA: Prof. Dra Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre, 2002

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Janice por ser sempre otimista e motivadora na resolução dos problemas que tivemos que enfrentar durante a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas do Serviço de Genética Médica pela maneira que desenvolvem suas atividades, proporcionando um clima de amizade e “alto astral” .

À Fernanda agradeço pela ajuda na cultura de células e por tudo que dividimos durante estes dois anos criando um forte laço de amizade.

A todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho com sua experiência profissional ou mesmo simplesmente com apoio emocional.

“ Sem o esforço da busca é impossível a alegria do encontro.”

Dedico este trabalho à minha família que mesmo sem entender nada de Genética ou Bioquímica tem valorizado e admirado todas as minhas conquistas.

ABREVIATURAS

ACAT- AcilCoA colesterol acil transferase

DEHP- Diethylexyphthalato

DLD- Doença lisossômica de depósito

DMSO- Dimetilsulfóxido

EIM- Erros inatos do metabolismo

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

NPA- Niemann-Pick A

NPB Niemann-Pick B

NPC- Niemann-Pick C

NPD- Niemann-Pick D

PFOA- Ácido perfluorooctanóico

PPAR- Receptores ativadores de proliferador peroxissomal

SUMÁRIO

I CAPÍTULO I.....	1
I.1 INTRODUÇÃO.....	2
I.1.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	2
I.1.2 Doenças Lisossômicas de Depósito.....	5
I.1.2.1 Esfingolipidoses.....	6
I.1.3 Doença de Niemann-Pick.....	7
I.1.3.1 Doença de Niemann-Pick tipo C.....	8
I.1.3.2 Frequência.....	9
I.1.3.3 Diagnóstico.....	10
I.1.3.4 Defeito Bioquímico.....	11
I.1.3.5 Tratamento.....	13
I.1.4 Proliferadores Peroxissomais.....	14
I.2 JUSTIFICATIVA.....	17
I.3 OBJETIVOS.....	18
II CAPÍTULO II.....	19
II.1 Artigo submetido à publicação na European Journal of Pharmaceutical Sciences: <i>Effect of a Peroxisomal Proliferator Agent on Fibroblasts from Niemann-Pick Type C Disease Patients</i>	20
III CAPÍTULO III.....	40
III.1 CONCLUSÕES.....	41
IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....	42

CAPÍTULO I

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Erros Inatos do Metabolismo

O conceito de Erros Inatos do Metabolismo (EIM) surgiu em 1908 para caracterizar quatro doenças estudadas pelo médico inglês Archibald Garrod. Garrod achava que essas doenças eram devidas a um bloqueio metabólico e constatou que ocorriam mais freqüentemente em irmãos, filhos de pais consangüíneos. Nos anos subseqüentes situações semelhantes foram sendo descritas até que se chegasse a uma relação mais definida entre os aspectos bioquímicos e genéticos: a existência de uma mutação gênica afeta a função de uma enzima levando ao acúmulo ou falta de algum substrato, ou ainda ao desvio do substrato para uma rota metabólica alternativa (Giugliani,1988).

Atualmente já estão descritos em torno de 500 distúrbios, na sua maioria de herança autossômica recessiva mas também podendo existir formas ligadas ao X e dominantes, envolvendo defeitos na síntese, degradação, transporte e armazenamento de metabólitos no organismo. A classificação dos EIM pode ser feita de várias maneiras, como por exemplo, pela idade de apresentação ou pela área do

metabolismo afetada. A classificação segundo Sinclair(1982) é dividida de acordo com a repercussão celular e metabólica do defeito associado:

- 1) EIM envolvendo distúrbios do transporte: afetam o transporte renal e/ ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Costumam ser desencadeados pela dieta e levam à depleção tecidual e desnutrição. Exemplos são as deficiências de dissacaridases, defeitos no transporte de magnésio e doença de Hartnup.

- 2) EIM envolvendo distúrbios de armazenamento, degradação e secreção: os substratos acumulados são depositados em quantidades anormais nas células, usualmente alterando sua arquitetura e funcionamento. Os metabólitos armazenados não estão biologicamente disponíveis. As terapias dependem da reposição enzimática, do tecido ou do órgão, algumas das quais ainda em fase experimental. Como exemplos temos as doenças lisossômicas de depósito.

- 3) EIM envolvendo distúrbios da síntese: ocorrem quando a síntese de moléculas (hormônios, proteínas plasmáticas, enzimas, moléculas com função celular estrutural ou imunológica) é incompleta ou anormal. Um bom exemplo é a hiperplasia adrenal congênita, com defeito na síntese do cortisol por deficiência de 21-hidroxilase.

4) EIM envolvendo distúrbios do metabolismo intermediário: comprometem as vias de metabolização de pequenas moléculas. O defeito enzimático envolve passos metabólicos mais importantes, como os dos ciclos da uréia e dos ácidos tricarboxílicos. A gravidade e a forma de instalação dependerão principalmente da gravidade da deficiência enzimática, mas também dos ciclos vitais e do tecido de origem. Infecções e outros fatores que aumentem o catabolismo agravam estas condições. Alguns exemplos são as hiperfenilalaninemias, tirosinemia, homocistinúria, porfirias e distúrbios do metabolismo da glicina e das purinas.

Embora sejam individualmente raros, os Erros Inatos do Metabolismo são relativamente freqüentes em seu conjunto podendo ocorrer um caso em cada 1000 recém-nascidos vivos. Em grupos de alto risco, como recém-nascidos agudamente enfermos, esse número pode ser 10 a 20 vezes maior (Giugliani, 1988).

O grande número de defeitos envolvidos resulta em quadros clínicos extremamente diversos. Alguns podem ser assintomáticos enquanto outros podem ser tão graves que resultem em morte neonatal. De uma maneira geral os EIM são situações graves que se manifestam na infância. Algumas características inespecíficas indicativas de EIM são as seguintes (Karan et al.,2001):

- Recém-nascido apresentando coma, hipotonia, irritabilidade, convulsões, acidose metabólica persistente, distúrbio hidroeletrólítico, hipoglicemia, sepsis, icterícia, vômitos, diarréia crônica.

- Retardo do crescimento neuromotor, deficiência mental.
- Regressão neurológica com perda de habilidades já adquiridas.
- Hepato e/ ou esplenomegalia, icterícia colestática.
- Deficiência de crescimento e/ ou alterações osteoarticulares.
- Episódios recorrentes de hipoglicemia, acidose metabólica, desequilíbrio hidroeletrólítico.
- Relato de irmão falecido precocemente sem diagnóstico definido.
- Pais consangüíneos

O diagnóstico laboratorial baseia-se, de uma maneira geral, na identificação de um metabólito acumulado. Quando detectado, o resultado deve ser, sempre que possível, confirmado pela determinação da atividade da enzima que se suspeita deficiente (Hernandez et al., 1999).

I.1.2 Doenças Lisossômicas de Depósito

As enzimas lisossomais são aquelas que tem a capacidade de degradar macromoléculas como esfingolipídios, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, etc, dentro dos lisossomas. Quando existe um defeito em alguma destas enzimas, em seu sistema de transporte ou em proteínas que modulam sua atividade ocorre um acúmulo lisossomal de macromoléculas, conhecido como Doença Lisossômica de Depósito (DLD). A maior parte dessas doenças se expressa clinicamente com

quadros de deterioração neurológica progressiva, principalmente da área intelectual e motora (Hernandez et al.,1999).

As DLD podem ser classificadas em quatro grupos: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinoses, mucolipidoses e outras, dependendo do metabólito acumulado (Hernandez et al.,1999).

I.1.2.1 Esfingolipidoses

As esfingolipidoses correspondem a um grupo de aproximadamente 20 distúrbios hereditários, que resultam no depósito progressivo de diversos esfingolipídios nos lisossomas, especialmente do sistema nervoso central. Os esfingolipídios são moléculas complexas que compõe a estrutura das membranas celulares e derivam da esfingosina, um álcool de 18 carbonos. A esfingosina ligada a um ácido graxo por uma ligação amida origina a ceramida. A esta última podem se agregar diversas moléculas que dão origem à classificação dos esfingolipídios em três tipos fundamentais: esfingomielina (ceramida ligada a fosfocolina), cerebrosídeo (ceramida ligada a açúcar ou sulfatídeos) e gangliosídeo (ceramida ligada a oligossacarídeos) (Leistner et al., 1999).

Os esfingolipídios são catabolizados no interior dos lisossomas através da ação de enzimas lisossomais obtendo-se como produto compostos de menor peso molecular. O defeito congênito de alguma das enzimas lisossomais ou de cofatores necessários para sua ação, impede que o substrato seja degradado até uma

partícula de menor peso molecular, depositando-se progressivamente nos lisossomas e causando danos celulares (Leistner et al., 1999).

O sinal mais marcante no quadro clínico é a deterioração neurológica rápida ou lentamente progressiva que deve associar-se a um ou mais dos seguintes sintomas: presença de macrocefalia, malformações ósseas, hepato e/ ou esplenomegalia, presença de opacidade de córnea ou manchas vermelho cereja na retina (Leistner et al., 1999).

I.1.3 Doença de Niemann-Pick

A doença de Niemann-Pick consiste em um grupo de distúrbios produzidos pelo acúmulo de esfingomielina, principalmente em órgãos ricos em tecido retículo endotelial como fígado e baço. Os diferentes tipos se distinguem pelo fenótipo clínico e defeito bioquímico que as produz. São herdadas de modo autossômico recessivo (Leistner et al., 1999).

Segundo Crocker e Farber (1958), quatro formas clínicas distintas são conhecidas para esta enfermidade.

A Doença de Niemann-Pick tipo A (NPA) é produzida pela deficiência da enzima esfingomielinase ácida, manifesta-se nos primeiros 6 meses de vida com hepatoesplenomegalia moderada à grave, dificuldade para alimentar-se, infecções respiratórias freqüentes e deterioração neurológica progressiva.

Na Doença de Niemann-Pick tipo B (NPB) a atividade da esfingomielinase ácida também é muito baixa e o sintoma mais proeminente é a

hepatoesplenomegalia moderada à grave. A ausência de comprometimento neurológico a distingue do tipo anterior.

A Doença de Niemann-Pick tipo D (NPD) assemelha-se ao tipo C que será descrito em maiores detalhes a seguir. Este grupo (NPD) representa uma mutação única prevalente na Nova Escócia como resultado do efeito fundador .

I.1.3.1 Doença de Niemann-Pick tipo C (NPC)

Na maioria dos casos as anormalidades neurológicas manifestam-se entre os 3 e 6 anos de idade e a detecção de hepatoesplenomegalia pode ser prévia a estes sintomas. O defeito metabólico caracterizado pelo acúmulo de colesterol não-esterificado dentro dos lisossomas, podendo não ocorrer deficiência da esfingomielinase ácida ou ocorrer de forma secundária ao acúmulo de colesterol (Patterson et al., 2000).

As manifestações clínicas são heterogêneas podendo se apresentar a qualquer momento, desde a vida intra-uterina até a vida adulta. A maioria dos pacientes desenvolve danos neurológicos progressivos além de problemas hepáticos que podem levar à morte. Ataxia, distonia, hepatoesplenomegalia e demência são sintomas considerados clássicos. Outros fenótipos incluem hipotonia e retardo do desenvolvimento motor, bem como variantes adultas com predomínio de demência e psicose (Patterson et al., 2001).

A maioria dos pacientes com este fenótipo possui uma mutação no cromossomo 18, locus *NPC1*. O gene *NPC2* é defeituoso em uma pequena

porcentagem de pacientes mas ainda não foi mapeado. A identificação do gene *NPC1* foi possível com a ajuda de modelos murinos da doença (BALB/c). Em 1991, pesquisadores associaram a mutação NPC murina ao cromossomo 18 humano (Sakai et al., 1991). Trinta e uma famílias com diagnóstico de NPC participaram do mapeamento do gene que foi localizado na região central do cromossomo 18 (Carstea et al., 1993). A identificação do gene *NPC1* baseou-se na análise de mutações dos indivíduos afetados, bem como na habilidade em restaurar o fenótipo normal com a introdução de cDNA de NPC em culturas celulares de afetados pela doença (Carstea, et al., 1997).

O produto do gene *NPC1* é uma proteína composta de 1278 aminoácidos com peso molecular de 142 kDa. Baseando-se na análise da sequência de aminoácidos sugere-se que esta seja uma proteína integral de membrana com 13 a 16 domínios transmembrana. A proteína apresenta homologia com várias outras envolvidas na homeostasia do colesterol (Carstea, et al., 1997).

A identificação do gene e da proteína irão possivelmente esclarecer os mecanismos que governam a mobilização do colesterol lisossomal (Patterson et al., 2001).

Em homozigotos, várias características patológicas já foram descritas como a presença de células "espumosas" e histiócitos azul-mar encontrados em preparações de medula óssea, mas não são específicas da doença (Patterson et al., 2001).

I.1.3.2 Frequência

A doença de NP-C possui uma prevalência mundial estimada de aproximadamente 1:150000, tornando-a mais comum que a doença de NP-A e NP-B combinadas. É possível que a prevalência seja ainda maior devido a confusões na terminologia, falhas no reconhecimento do fenótipo e dificuldades no diagnóstico (Patterson et al., 2001)

No Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram diagnosticados 1910 casos de Erros Inatos do Metabolismo de 1982 até abril de 2002. Entre os casos diagnosticados 1079 correspondiam ao grupo das Doenças Lisossômicas de Depósito (56,4 %). Foram registrados neste período 73 (3,8%) casos de Doença de Niemann-Pick e 14 destes eram do tipo C (0,7%) .

I.1.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico requer o reconhecimento de vários sintomas clínicos e características patológicas para posterior confirmação pelo teste bioquímico.

Os testes bioquímicos são geralmente realizados em fibroblastos cultivados através da demonstração do acúmulo intralisossomal de colesterol não-esterificado. Isto é demonstrado através de um padrão característico de fluorescência perinuclear encontrado após o tratamento das células com meio enriquecido em LDL e coloração com reagente de Filipin (Kruth et al., 1986).

O diagnóstico molecular atualmente não é muito prático pois existem muitas mutações em várias regiões do gene e muitas parecem ser privadas. Além disso, muitos polimorfismos já foram observados tornando este diagnóstico útil somente em

populações específicas como as provenientes da Nova Escócia (Patterson et al., 2001).

I.1.3.4 Defeito Bioquímico

O colesterol é um elemento estrutural essencial das membranas celulares bem como um importante precursor para a síntese de hormônios, ácidos biliares e lipoproteínas. O principal local de síntese de colesterol em mamíferos é o fígado. Nos líquidos orgânicos o colesterol é transportado na forma de partículas lipoprotéicas (Stryer, 1996).

Em geral, as células obtêm o colesterol pela internalização de LDL (lipoproteína de baixa densidade) ou pela síntese *de novo* no retículo endoplasmático. O colesterol endocitado pode sofrer hidrólise lisossomal originando colesterol livre (não-esterificado) e ser usado para biossíntese de membranas. Como alternativa pode ser reesterificado para armazenamento no interior da célula. A enzima acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) cataliza esta reação (Stryer, 1996).

O mecanismo pelo qual o colesterol sai do lisossoma e é transportado até a membrana plasmática ainda não é bem conhecido. Sabe-se que o produto do gene *NPC1* é necessário para a saída do colesterol de dentro dos lisossomas já que os portadores da doença de NPC apresentam acúmulo de colesterol intracelular. Esta falha no transporte de colesterol causa uma deficiência na regulação da sua homeostase (Liscum & Underwood, 1995).

O conhecimento das bases celulares da doença evoluiu muito com os estudos no mutante murino BALB/c. Demonstrou-se neste modelo que havia uma lesão no processamento intracelular do colesterol (Pentchev et al., 1984). Isto levou à descoberta que células cultivadas destes mutantes não eram capazes de sintetizar ésteres de colesterol e acumulavam grandes quantidades de colesterol não-esterificado nos lisossomas se cultivadas em meio enriquecido com colesterol (Pentchev et al., 1986).

A internalização de LDL, seu transporte até os lisossomas e posterior hidrólise dos ésteres de colesterol não são deficientes na doença de NPC. O colesterol endocitado é, no entanto, seqüestrado nos lisossomas e seu transporte até a membrana plasmática e o retículo endoplasmático é retardado (Pentchev et al., 1987).

Existem três respostas homeostáticas principais após a internalização do colesterol LDL: (1) diminuição da síntese *de novo* de colesterol,(2) inibição do receptor que medeia a internalização e (3) ativação da esterificação do colesterol. Todos estes eventos estão comprometidos nos fibroblastos de NPC (Patterson et al., 2001)

As consequências celulares da doença podem ser descritas nesta ordem: a mutação leva ao seqüestro do colesterol endocitado, ao atraso na indução de regulação homeostática e finalmente ao acúmulo de colesterol nas células (Patterson et al.(2),2001).

A atividade da enzima esfingomielinase ácida encontra-se normal em tecidos e leucócitos de pacientes NPC. Em culturas de fibroblastos pode-se encontrar uma

deficiência parcial da enzima como consequência secundária do acúmulo de colesterol (Vanier et al., 1980)

Em 1997, Schedin et al. investigaram a possibilidade de os peroxissomas também estarem modificados na doença de Niemann-Pick tipo C. Neste estudo foram encontradas alterações nesta organela como o decaimento da atividade de enzimas peroxissomais hepáticas. Isto foi feito em um modelo animal (mutante murino BALB/c) e revelou novos aspectos da doença. As alterações peroxissomais parecem existir mesmo antes das manifestações clínicas e podem exercer um papel significativo nos eventos iniciais e na etiologia da doença.

I.1.3.5 Tratamento

Ainda não existe um tratamento específico para a doença de Niemann-Pick tipo C. Existem apenas formas de diminuir os sintomas como tremores e distonias com agentes anticolinérgicos e de controlar os ataques com anti-epiléticos (Patterson et al., 2001).

Várias estratégias de reduzir o acúmulo do colesterol intra-celular foram formuladas baseando-se na hipótese de que este é o metabólito prejudicial na doença. Combinações de agentes redutores do colesterol foram testadas mas não conseguem reverter o quadro neurológico porque não conseguem penetrar no cérebro ou porque o colesterol pode não ser o metabólito que cause o dano neurológico (Patterson et al., 2001).

O dimetilsulfóxido, que possui a propriedade de corrigir a deficiência parcial de esfingomielinase e reverter as anormalidades de transporte do colesterol, já foi testado em dois pacientes. Em um dos casos ocorreu a estabilização da degeneração neurológica mas em outro não trouxe nenhum benefício (Hashimoto et al., 1990). O DMSO também foi testado em fibroblastos cultivados de pacientes NPC mas não apresentou efeito sobre a quantidade de colesterol acumulada nas células (Scalco et al., 1999)

O transplante de medula óssea foi feito em um paciente de 3 anos e 5 meses. Ocorreu regressão da hepatoesplenomegalia e diminuição da infiltração das células espumosas na medula e pulmões 6 meses após o procedimento, mas continuou a ocorrer a deterioração neurológica, levando os autores a concluir que o transplante ainda não é o tratamento adequado para a doença (Hsu et al., 1999).

Em 1998, Schedin et al. testaram o tratamento com indutores peroxissomais em um modelo murino de NPC . A indução peroxissomal levou a um decréscimo do colesterol celular acumulado nos camundongos, provavelmente devido a um aumento no seu transporte. O uso destes indutores leva ao reestabelecimento da função original da organela o que enfatiza a importância dos peroxissomas na etiologia e desenvolvimento da doença. Estes achados são surpreendentes e podem sugerir uma nova linha de intervenção terapêutica. No entanto, até o momento não existem na literatura experimentos deste tipo em humanos.

I.1.4 Proliferadores Peroxissomais

Proliferadores peroxissomais são uma classe de compostos químicos que causam aumentos importantes no tamanho e na quantidade dos peroxissomas bem como na atividade das enzimas peroxissomais em roedores. O clofibrato (ethyl- α - ρ -chlorophenoxyisobutyrate), o diethylhexylphthalato (DEHP) e o ácido perfluorooctanóico (PFOA) são exemplos destes compostos. Vários destes proliferadores são considerados também fármacos com capacidade de diminuir triglicerídios e colesterol plasmático, hipoteticamente por induzir a internalização de lipoproteínas circulantes e aumentar a atividade de algumas enzimas que metabolizam lipídios. Parece razoável associar a capacidade aumentada de remover ácidos graxos com o aumento da beta-oxidação peroxissomal, mas esta pode não ser a causa dos efeitos hipolipidêmicos (Thorne et al., 1994).

Ocorreram avanços em determinar como os proliferadores interagem com os receptores e modificam a transcrição do DNA mas os aspectos que determinam como o metabolismo intracelular é alterado e os níveis de lipídios circulantes reduzidos permanecem obscuros (Thorne et al., 1994). Sabe-se que a ação hipolipidêmica no soro causada pelos proliferadores peroxissomais é mediada por receptores nucleares pertencentes à super família de receptores esteróides chamados de receptores ativadores de proliferador peroxissomal (PPAR)(Turunen, et al., 2000). Observando seus efeitos em reduzir os triglicerídios plasmáticos pode-se estimar que estes agentes causem alterações no metabolismo lipídico intracelular. Aparentemente estes proliferadores podem causar alterações no metabolismo lipídico de forma conflitante e adversa (Thorne et al., 1994).

Vários estudos apontam que os proliferadores peroxissomais provocam aumento de ubiquinona nas células de fígado de rato (Aberg et al., 1996; Schedin et al., 1998; Turunen et al., 2000). Este efeito foi inesperado pois sua síntese não ocorre nos peroxissomas. A ubiquinona é um lipídio sintetizado no retículo endoplasmático e está presente em todos tecidos animais. Sua cadeia isoprenóide parece localizar-se na porção central hidrofóbica da bicamada das membranas. As células utilizam a forma reduzida da ubiquinona como um antioxidante e uma das hipóteses levantadas para explicar o aumento deste lipídio é que o stress oxidativo causado pela proliferação peroxissomal possa gerar o aumento nos níveis de antioxidantes como resposta (Aberg et al.,1996).

Utilizando uma dieta suplementada com 0,05% de PFOA durante seis dias, Schedin et al.(1998) encontraram uma redução no colesterol acumulado em células hepáticas de modelos murinos da doença de NPC.

Em culturas da linhagem GRX tratadas por 72 horas com clofibrato, Rosa (1999) encontrou um aumento na atividade da enzima catalase. Esta linhagem possui características morfológicas e bioquímicas de cultura primária de tecido conjuntivo hepático humano mas foi estabelecida através de granulomas hepáticos de fígado de camundongos (Rosa, 1999). O aumento da catalase é um indício de que o tratamento com clofibrato por esse período é capaz de induzir peroxissomas.

I.2 JUSTIFICATIVA

Baseando-se na hipótese de os peroxissomas estarem envolvidos na patogênese da doença de NPC, proposta por Schedin et al. (1997) e na descoberta de que indutores peroxissomais diminuíaam o colesterol acumulado em células de fígado de camundongos Balb/c(modelos de NPC), feita por Schedin et al em 1998, resolvemos testar a ação de um indutor peroxissomal, o clofibrato, sobre células (fibroblastos) de indivíduos com doença de Niemann-Pick tipo C.

I.3. OBJETIVOS

Estudar o efeito do tratamento com clofibrato, um conhecido indutor peroxissomal, em fibroblastos de pacientes portadores da doença de Niemann-Pick tipo C sobre a quantidade de colesterol não-esterificado nos lisossomas.

CAPÍTULO II

**EFFECT OF A PEROXYSOMAL PROLIFERATOR AGENT ON FIBROBLASTS
FROM NIEMANN-PICK TYPE C DISEASE PATIENTS**

Ana Paula Costa Beheregaray, Fernanda Timm Seabra Souza, Janice Carneiro
Coelho

*Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS and Medical Genetics Service, Hospital
de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Correspondence to: Janice Carneiro Coelho, PhD
SGM
HCPA
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre, RS
90035-003
Brazil
Phone: 555133168011
Fax: 555133168010
Email: jcoelho@hepa.ufrgs.br

Abstract

Niemann-Pick type C (NPC) disease is a lysosomal storage disorder characterized by the accumulation of cholesterol, sphingomyelin, and glycosphingolipids. It is possible that peroxisomes are also modified and their alterations can be an early event in the process of the disease. As the use of peroxisomal inducers restores the original function of the organelle, the importance of peroxisomes is further emphasized and can suggest future therapeutic interventions. In the present study we treated 5 fibroblast cultures from NPC patients and 6 fibroblast cultures from normal individuals with clofibrate, a known peroxisomal proliferator, and evaluated its action on intracellular cholesterol content. Two concentrations of clofibrate were tested (200 and 400 μM) for 72 hours. Intracellular cholesterol content was determined by Filipin staining and quantitative measurement of unesterified cholesterol. No change in cholesterol content was observed by Filipin staining when cells from NPC patients or from normal individuals treated or not with 200 and 400 μM clofibrate were compared. However, unesterified cholesterol concentration was significantly increased in cells from NPC patients and from normal individuals treated with clofibrate when compared to untreated cells. These results demonstrate that clofibrate probably is not useful for treatment of patients with NPC

because, instead of reducing accumulated cholesterol in the cells of these individuals, it seems to contribute to its increase.

Key Words: Niemann-Pick disease, peroxisomes, clofibrate, cholesterol

1. Introduction

Niemann-Pick type C (NPC) disease is a lysosomal storage disorder characterized by the accumulation of cholesterol, sphingomyelin and glycosphingolipids (Pentchev et al., 1986). Most patients with NPC have progressive neurologic disease, variable hepatosplenomegaly, progressive ataxia, dystonia, and dementia . The primary molecular defect lies in the *NPC1* gene, localized in chromosome 18 (Sakai et al., 1991). The product of this gene is similar to proteins which are involved in the regulation of cholesterol homeostasis. In this disease, cultured fibroblasts show a unique disorder in their ability to synthesize cholesteryl esters during endocytic uptake of LDL, causing the storage of abnormal amounts of unesterified cholesterol in an intravesicular compartment when cultured in a cholesterol-enriched medium (Vanier et al., 1991).

Experiments using a mutant mouse model of this disease (BALB/c) showed that other mevalonate pathway lipids (like dolichyl phosphate) are also affected, raising several questions about the biochemical etiology of NP-C (Schedin et al., 1997). Schedin et al.(1997) investigated the possibility that peroxisomes are also modified and found alterations of peroxisomal enzymes as an early event in the process of the disease. In another study (Schedin et al., 1998) the treatment of the murine model with peroxisomal proliferators was tested and was found to decrease the amount of

cellular cholesterol in NPC mice. Since the use of peroxisomal inducers restores the original function of the organelle, the importance of peroxisomes is further emphasized and can suggest future therapeutic interventions.

In the present study we treated fibroblasts from NP-C patients with clofibrate (ethyl- α - p -chlorophenoxyisobutyrate), a known peroxisomal proliferator, and evaluated its action on intracellular cholesterol content by Filipin staining and determination of unesterified cholesterol.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

Five NPC fibroblast cultures and six normal fibroblast cultures were obtained from the Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Cells were grown in HAM-F10 medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing 10 % fetal bovine serum (FBS) obtained from Gibco BRL, at 37 °C.

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.2. Clofibrate addition

When cells were confluent they were treated with clofibrate (Sigma®) on cell culture dishes (Nunc®) measuring 35 mm in diameter (about 20,000 cells/dish) and in cell culture flasks. The test on dishes was performed to analyze the intracellular cholesterol content by Filipin staining and the test in culture flasks was performed to harvest the cells and measure the unesterified cholesterol.

For Filipin staining we used 4 dishes for each sample (patient or control). The cells were cultivated for five days in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco BRL®) supplemented with 5 % lipoprotein-deficient serum (LPDS) (Sigma®).

The culture dishes were placed in a 5 % CO₂ incubator at 37 °C. Following incubation, each sample received four treatments: 200 µM clofibrate, 400 µM clofibrate, 0.036% DMSO (Sigma), and MEM medium alone with LPDS. DMSO was used to dissolve clofibrate and therefore was also tested alone. The dishes were then placed again in the 5 % CO₂ incubator for 48 hours. Next, low density lipoprotein was added and 24 h later the cytochemical detection of unesterified cholesterol with Filipin was carried out by the method of Kruth et al (1986).

For the measurement of unesterified cholesterol we used 8 confluent flasks for each sample (patient or control). For each test we used two flasks in order to obtain sufficient material to harvest. The flasks were treated for five days with MEM supplemented with 5 % LPDS and then received the same treatment as described previously. After incubation with LDL the cells were harvested.

2.3. Unesterified Cholesterol Measurement

The cell pellets were disrupted by freezing and thawing in liquid nitrogen. Unesterified cholesterol was measured by the method of Gamble et al. (1978) and protein was measured by method of Lowry et al. (1951).

2.4. Statistical Analysis

Data are reported as mean ± SD. One-way ANOVA was used to compare groups, followed by the Tukey test when necessary. For comparison between normal individuals and NPC, we used the Student t-test. The analysis was performed using

the statistical software package SPSS/PC + and the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

Based on the hypothesis that peroxisomes are involved in the pathogenesis of NPC, as proposed by Schedin et al. (1996), and on the discovery that peroxisomal inducers reduce the cholesterol accumulated on the liver of Balb/c mice (NPC models) by Schedin et al. (1998), we decided to test the action of clofibrate, a peroxisomal inducer, on the fibroblasts of individuals with NPC disease. To this end, cells from NPC patients and from normal individuals were cultured in lipoprotein-free medium for 5 days (120 h) and then incubated with clofibrate at concentrations of 200 and 400 μ M for 72 hours. During the last 24 hours the medium was enriched with LDL. After this time the cells were stained with the fluorescent antibiotic Filipin which specifically binds to unesterified cholesterol.

The fibroblasts from NPC patients that did not receive any drug presented a pattern of intense perinuclear fluorescence associated with the accumulation of unesterified cholesterol that was not observed in normal fibroblasts (Figure 1). When unesterified cholesterol was measured by the method of Gamble et al (1986) (Table 1) we observed that the amount of cholesterol accumulated in the cells from NPC individuals was significantly increased ($t = 3.127$; $p < 0.02$) compared to control. This demonstrates the difficulty in normal regulation of intracellular cholesterol in NPC

patients, as well documented in the literature (Pentchev et al., 1987; Kruth et al., 1986; Pentchev et al., 1986).

No change in cholesterol content could be observed by staining with the Filipin reagent in cells from NPC patients or from normal individuals compared to cells treated or not with clofibrate (200 and 400 μM). However, when we measured the content of unesterified cholesterol we observed a significant increase in free cholesterol concentration ($F(3,10)=12.16$; $p<0.001$) in cells from NPC patients treated with 200 μM clofibrate compared to untreated cells (Table 1). The addition of 400 μM clofibrate also caused an increase in the amount of free cholesterol in NPC cells which was similar to that induced by the 200 μM concentration.

In the cells from normal individuals, the addition of clofibrate also increased the concentration of free cholesterol (Table 1), reaching levels similar to those of untreated NPC cells ($F(3,10)=3.701$; $p<0.05$).

The use of another peroxisomal inducer, perfluorooctanoic acid (PFOA) by Schedin et al. (1998) caused a reduction in the content of accumulated cholesterol in hepatocytes of murine models of the disease. Although both clofibrate and PFOA are peroxisomal inducers, it is necessary to consider the experimental differences, since we used human fibroblasts directly treated with clofibrate for 72 hours while Schedin et al (1998) used PFOA by the oral route for six days.

The use of peroxisomal proliferators is known to interfere with lipid metabolism but there are still many doubts with respect to the mechanism of action of these drugs. It has been assumed that interaction may occur with peroxisomal proliferator

activating receptors (PPAR), but many differences exist between humans and rodents in this interaction (Green, 1992).

Among PPAR target genes are those that code for apolipoproteins, lipoprotein lipase, and mitochondrial and peroxisomal fatty acid metabolizing enzymes. The use of peroxisomal proliferators in human fibroblast cultures showed that phospholipid metabolism, especially plasmalogen synthesis, was substantially altered in the endoplasmic reticulum, probably due to the changes occurring in this organelle, since the peroxisomal functions were not altered. The various classes of peroxisomal proliferators have differentiated interactions in the cells and many of them are species specific (Thorne et al., 1994).

The fact that intracellular cholesterol was increased in the model used in the present study may mean that the hypolipidemic action of clofibrate on serum is due to increased lipoprotein endocytosis. It is not possible to state that clofibrate had an effect on fibroblast peroxisomes since we did not evaluate the activity of any marker enzyme. The model used in the present study was based on the results obtained with clofibrate in GRX cells, in which clofibrate increased catalase activity, indicating an increase in peroxisomal proliferation.

Several studies have pointed out that peroxisomal proliferators cause an increase in ubiquinone in rat liver cells (Aberg et al., 1996; Schedin et al., 1998; Turunen et al., 2000). This effect is also unusual since ubiquinone is not synthesized in peroxisomes. Ubiquinone is a lipid synthesized in the endoplasmic reticulum and is present in all animal tissues. Its isoprenoid chain seems to be located in the central hydrophobic portion of the membrane bilayer (Aberg et al., 1996).

Peroxisome deficiency has been well described by Schedin et al (1997) in murine models of the disease. In humans, however, this condition needs more in-depth studies. An evaluation of the activity of enzymes isolated from the peroxisomes of NPC patients would be advisable.

Fibroblasts were also treated only with DMSO used as a solvent for clofibrate to determine whether this compound interfered with the experiment. The addition of DMSO did not cause any changes in the perinuclear fluorescence pattern obtained by the Filipin method and did not alter the content of free cholesterol in any group when the unesterified cholesterol was measured by a quantitative method.

The present results indicate that the action of clofibrate on fibroblast cultures from NPC patients and from normal individuals increases the content of unesterified cholesterol in these cells. They also show that clofibrate probably is not useful for the treatment of NPC patients since, instead of reducing the cholesterol accumulated in the cells of these individuals, it seems to contribute to its increased content.

Aknowledgements

This study was supported by CAPES, GPPG/HCPA and Pronex-MCT (Brazilian research agencies).

References

- Aberg, F., Zhang, Y., Tclebrhan, H., Appelkvist, E., Dallner, G., 1996. Increases in tissue levels of ubiquinone in association with peroxisome proliferation. *Chem.-Biol. Interact.* 99, 205-218.
- Gamble, W., Vaughan M., Kruth, H.S., Avigan, J., 1978. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells. *J. Lipid. Res.* 19, 1068-1970,
- Green, S., 1992. Receptor-mediated mechanisms of peroxisome proliferators. *Biochem. Pharmacol.* 43, (3),393-401,
- Kruth, H.S., Comly, M.E., Butler, J.D., Vanier, M.T., Fink, J.K., Wenger, D.A, Patel, S., 1986. Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 16769.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Pentchev, P.G., Comly, M.E., Butler, J.D., Sokol, J., Filling-Katz M.,1987 . Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts. *FASEB J.*1, 40.
- Pentchev, P.G., Kruth, H.S., Comly, M.E., Butler, J.D., Vanier, M.T., Wenger, D.A, Patel, S., 1986. Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein derived cholesterol in cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 16775-16780.
- Sakay, Y., Miyawaki, S., Shimizu, A., Ohno, K., Watanabe, T., 1991. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome18, including spm, Grl-1, Fim-2/c-fms, and Mpb. *Biochem. Genet.* 29, 103.
- Schedin, S., Pentchev, P., Dallner, G., 1998. Reduced cholesterol accumulation and improved deficient peroxisomal functions in a murine model of Niemann-Pick

type C disease upon treatment with peroxisomal proliferators. *Biochem. Pharmacol.* 56,1195-1199.

Schedin, S., Sindelar, P., Pentchev, P., Brunk, U., Dallner, G., 1997. Peroxisomal impairment in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* 272, (10), 6245-6251.

Thorne, P.C., Byers, D.M., Palmer, F.B.St.C., Cook, H.W., 1994. Clofibrate and other peroxisomal proliferating agents relatively specifically inhibit synthesis of ethanolamine phosphoglycerides in cultured human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1214, 161-170.

Turunen, M., Peters, J. M., Gonzales, F.J., Schedin, S., Dallner, G., 2000. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor α on ubiquinone biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 297, 607-614.

Vanier, M.T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N., Pentchev, P., 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.

Table 1- Effect of clofibrate on the amount of cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) accumulated in fibroblast cultures from patients with Niemann-Pick C disease and from normal individuals.

Data are reported as mean \pm standard deviation. The number of individuals is given in parenthesis.

	NPC patients	Control subjects
No drug	66 \pm 17 (5) ^A	32 \pm 6 (6) ^B *
200 μM Clofibrate	243 \pm 56 (5)	78 \pm 24 (6) *
400 μM Clofibrate	213 \pm 72 (5)	65 \pm 20 (6) *
0.036 % DMSO	79 \pm 16 (5)	44 \pm 16 (6) *

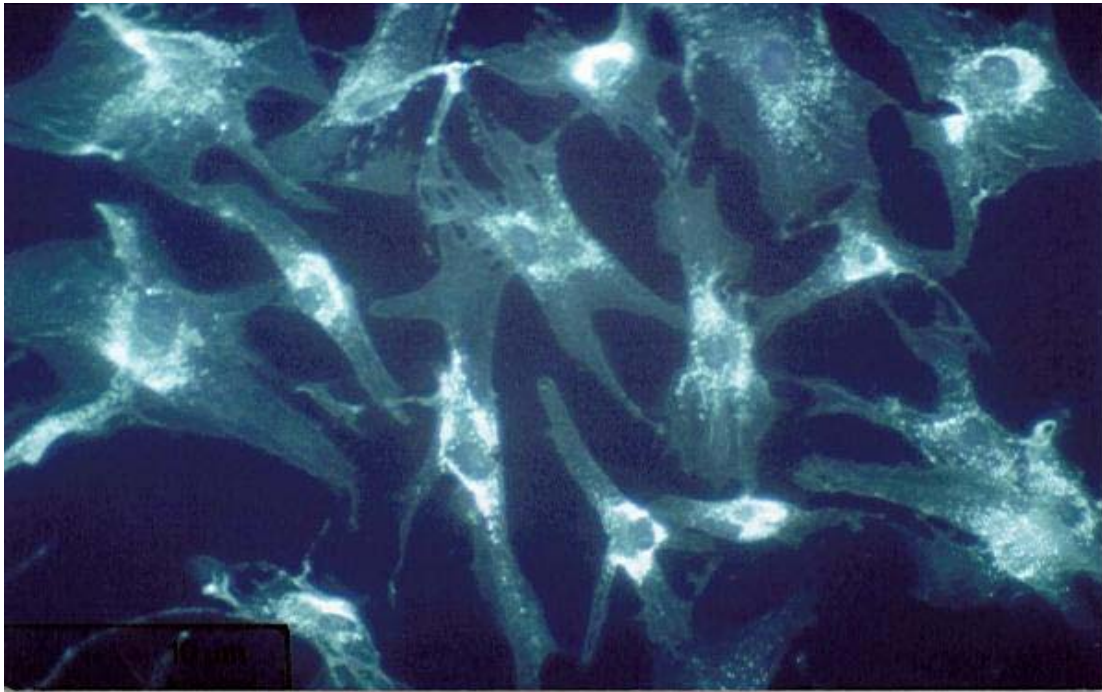
A: Statistically significant difference from NPC patients that received clofibrate 200 μM or clofibrate 400 μM by the t-test, $p < 0.01$.

B: Statistically significant difference from control subjects that received clofibrate 200 μM or clofibrate 400 μM by the t-test, $p < 0.01$.

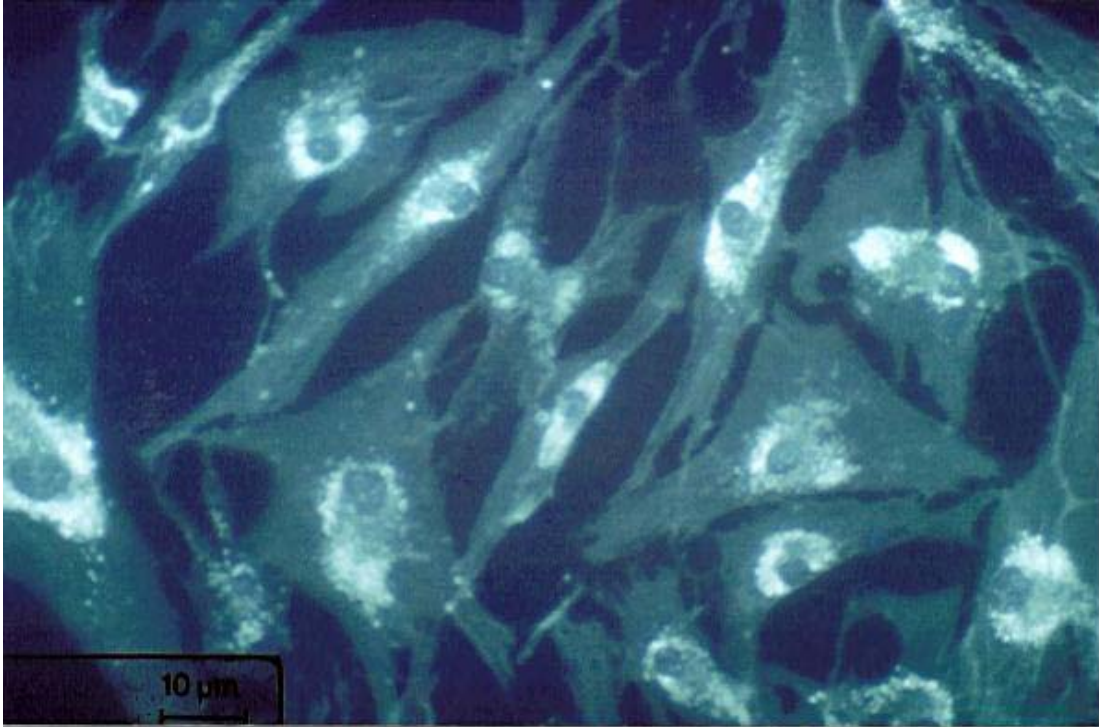
* Statistically significant difference from NPC patients by the t-test, $p < 0.01$

Figure Legend

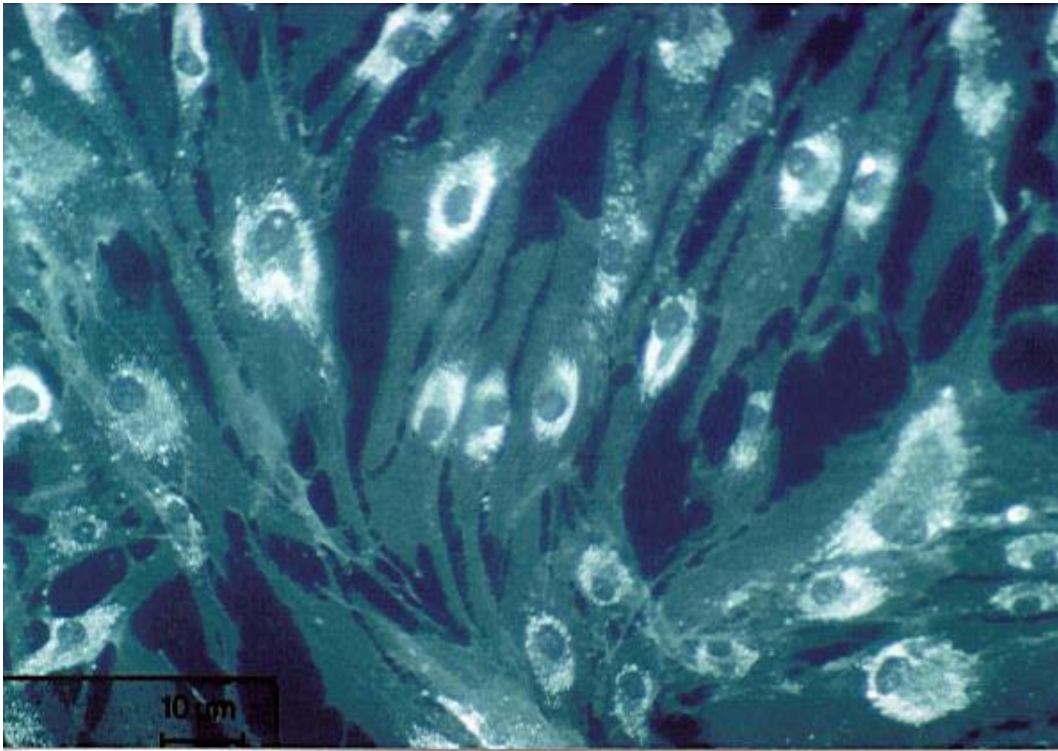
Fig. 1. Normal and NPC fibroblasts cultured with and without clofibrate (200 and 400 μM) and with 0.036 % DMSO cultures were stained with Filipin for fluorescence visualization of unesterified cholesterol after the addition of LDL. (A): NPC fibroblasts, (B): NPC fibroblasts incubated for 72 hours with 200 μM clofibrate, (C): NPC fibroblasts incubated for 72 hours with 400 μM clofibrate (D): NPC fibroblasts incubated for 72 hours with 0,036 % DMSO, (E): normal fibroblasts, (F): normal fibroblasts incubated for 72 hours with 200 μM clofibrate, (G):normal fibroblasts incubated for 72 hours with 400 μM clofibrate, (H):normal fibroblasts incubated for 72 hours with 0.036 % DMSO.



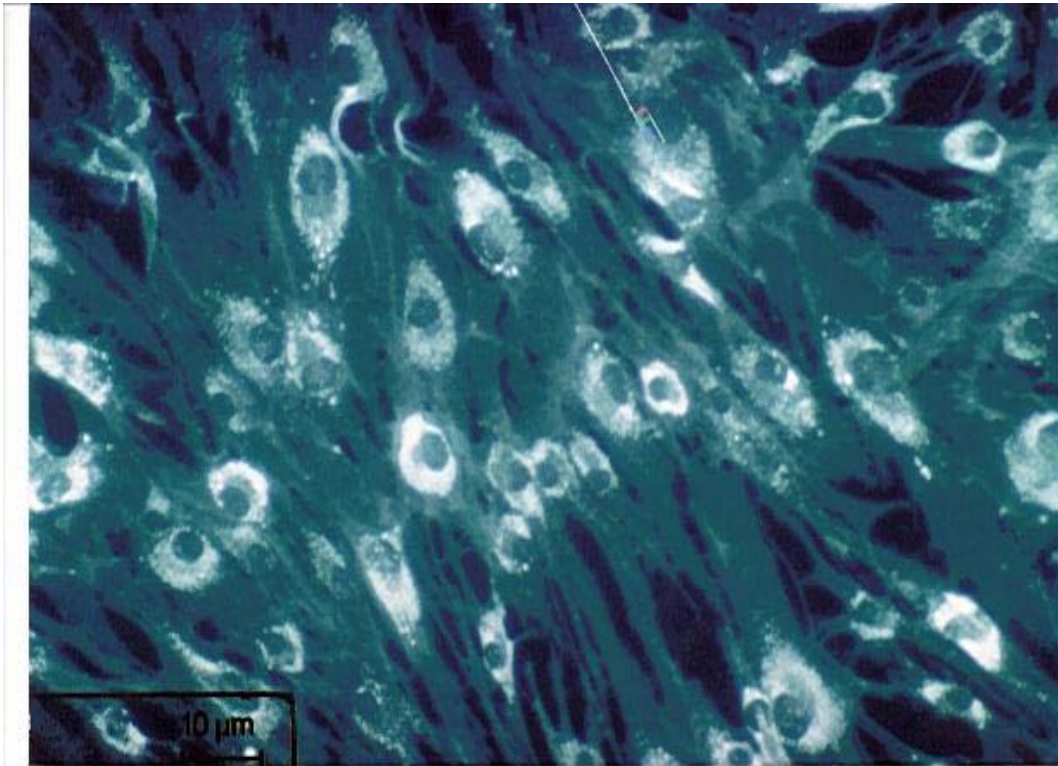
A



B



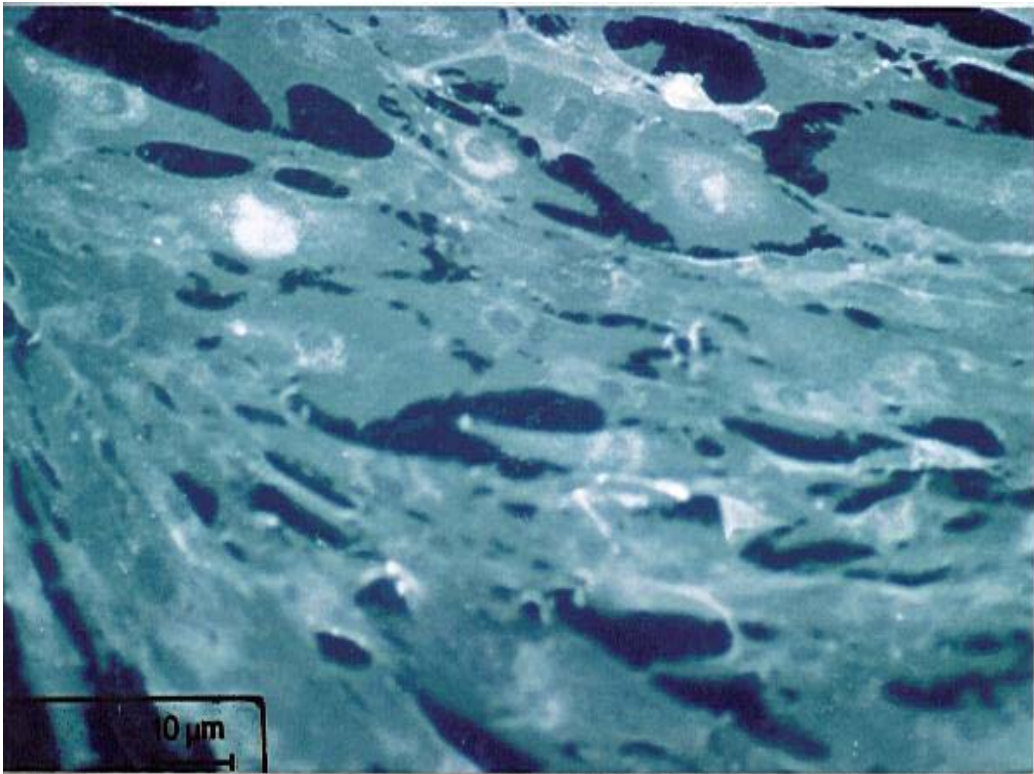
C



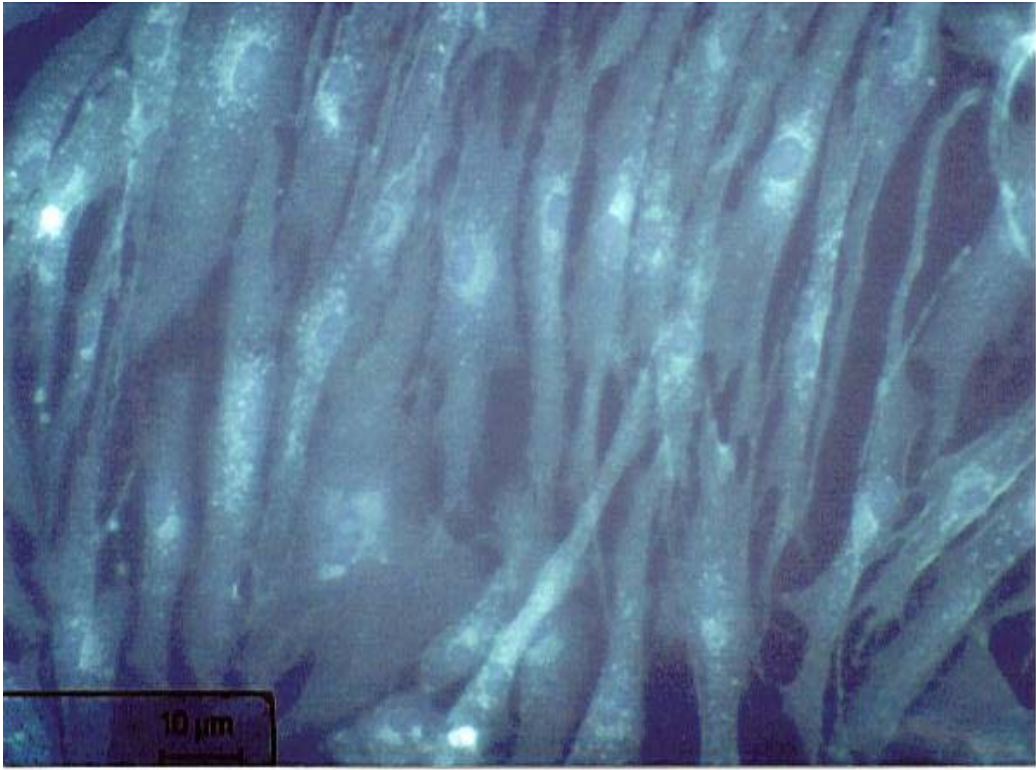
D



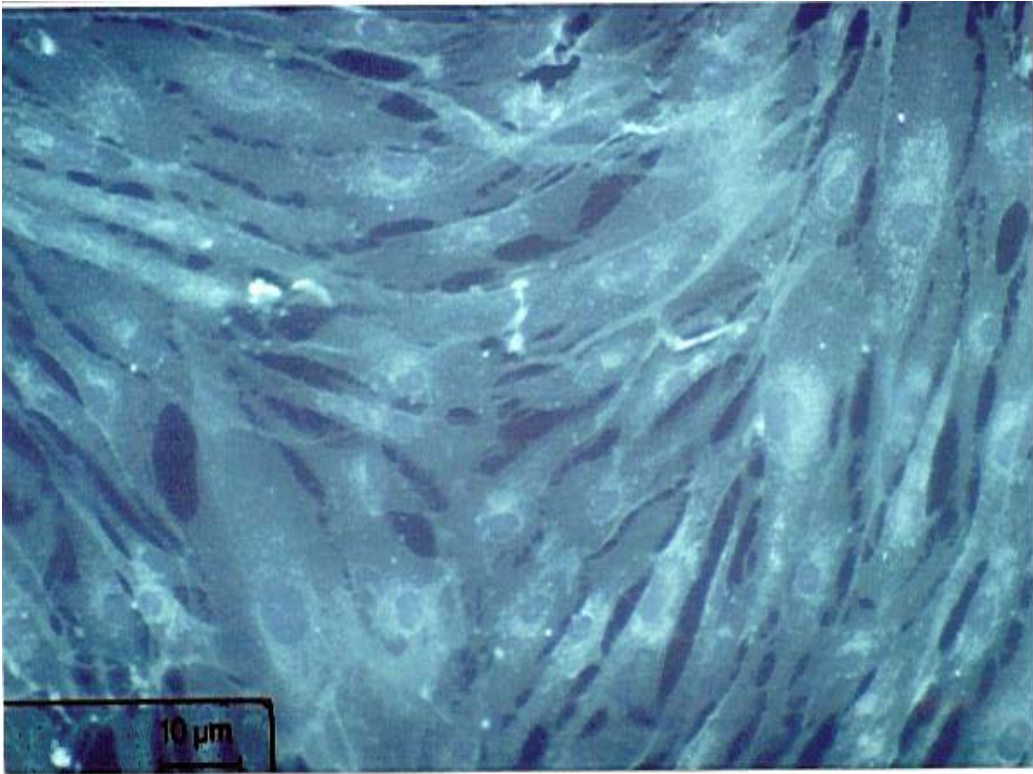
E



F



G



H

CAPÍTULO III

III. 1 CONCLUSÕES

Os fibroblastos de pacientes NPC corados pelo reagente de Filipin apresentaram um padrão de intensa fluorescência perinuclear que possibilitou diferenciá-los de fibroblastos de indivíduos normais.

A quantidade de colesterol livre medida em fibroblastos de pacientes com NPC foi superior àquela acumulada por indivíduos normais.

Não foi possível visualizar alterações no conteúdo de colesterol (fluorescência perinuclear) após a adição de clofibrato nos fibroblastos de pacientes NPC e de indivíduos normais quando corados pelo reagente de Filipin.

Quando medimos a concentração de colesterol livre pelo método de Gamble et al.(1978) observamos um aumento significativo no conteúdo de colesterol acumulado nos fibroblastos de indivíduos normais e pacientes NPC após a adição do clofibrato 200 e 400 μ M.

O DMSO não interferiu na quantidade de colesterol acumulada em fibroblastos de pacientes NPC e de indivíduos normais.

O clofibrato provavelmente não é útil no tratamento de pacientes NPC pois parece contribuir para o aumento do colesterol.

IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

- ABERG, F., et al. Increases in tissue levels of ubiquinone in association with peroxisome proliferation. **Chem.- Biol. Interact**, v. 99, p. 205-218, 1996.
- BRADY, R.O. et al. The metabolism of sphingomyelin. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 55, p. 366, 1966.
- CARSTEEN, E.D et al. Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis [Comments]. **Science**, v. 277, p. 228, 1997.
- CARSTEEN, E.D. et al. Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18. **Proc. Natl Acad Sci USA** , v. 90, p. 2002, 1993.
- CROCKER, A.C.; FARBER S: Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. **Medicine (Baltimore)** , v. 37:p. 1, 1958.
- GIUGLIANI, R. Erros Inatos do metabolismo: Uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna**, v. 23, nº1, 1988.
- HASHIMOTO, K et al. A case of Niemann- Pick disease type C. **No To Hattatsu**, v. 22, p. 381, 1990.
- HERNANDEZ, D.V.; Exámenes de Laboratorio en Errores Innatos del Metabolismo. In: COLOMBO, M.C.; CORNEJO, V.E.; RAIMANN, E.B.(Ed). **Errores Innatos en el Metabolismo del Niño**. Primera Edición. Santiago de Chile, 1999. Cap. 16, p. 388.
- HSU, Y. S et al. Niemann- Pick disease type C treated by bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant** , v. 24, p.103, 1999.
- KARAN S.M, SCHWARTZ I., GIUGLIANI R. Erros Inatos do Metabolismo. In: CARAKUSHANSKY, G. **Doenças Genéticas em Pediatria**. Primeira edição. Rio de Janeiro, 2001. Ed Guanabara Koogan. Cap. 14, p. 155-158.

- KRUTH, H.S. et al. Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. **J. Biol. Chem**, v. 261, p. 16769, 1986.
- LEISTNER, S. et al. ; **Errores Innatos del Metabolismo de las Enzimas Lisossomales**. In: COLOMBO, M.C.; CORNEJO, V.E.; RAIMANN, E.B.(Ed). Errores Innatos en el Metabolismo del Niño. Primera Edición. Santiago de Chile, 1999. Cap. 8, p. 228.
- LISCUM, L.; UNDERWOOD, K.W. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. **J. Biol Chem**, v. 270, n° 26, p.15443-15446, 1995.
- PATTERSON, M. C. et al. Niemann Pick Disease Type C : A Lipid Trafficking Disorder. In: SCRIVER, C.R; BEAUDET, AL; SLY, W.S; VALLE D. (Editors). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Eighth Edition. USA, 2001. Cap. 145, p. 3612.
- PATTERSON, M. C. et al.(2) Niemann Pick Disease Type C : A Lipid Trafficking Disorder. In: SCRIVER, C.R; BEAUDET, AL; SLY, W.S; VALLE D. (Editors). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Eighth Edition. USA, 2001. Cap. 145, p. 3619.
- PATTERSON, M.C. et al. The effect of cholesterol lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in Niemann-Pick disease type C. **Neurology**, v. 43, p. 61, 1993.
- PENTCHEV, PG. et al. A genetic storage disorder in BALB/c mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. **J. Biol Chem**, v. 259, p. 5784, 1984.
- PENTCHEV, P.G. et al. Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein derived cholesterol in cultured fibroblasts. **J. Biol. Chem**, v. 261, p. 16775-16780,1986.
- ROFF, C. F et al. Niemann-Pick Type C Disease: Deficient intracellular transport of exogenously derived cholesterol. **Am J Med Genet**, v. 42, p, 593, 1992.
- ROSA, T.G. Identificação de Éter-Fosfolipídios na Linhagem Celular GRX. Efeito do Clofibrato, um proliferador Peroxissomal, sobre a Atividade da Catalase e Incorporação de [¹⁴C] Acetato em Lipídios Neutros e Fosfolipídios. Dissertação de Mestrado, Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas. UFRGS,1999.

- SAKAY, Y. et al. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 18, including *spm*, *Grl-1*, *Fim-2/c-fms*, and *Mpb*. **Biochem. Genet**, v. 29, p. 103, 1991.
- SCALCO, F.B et al. Effect of dimethylsulfoxide on sphingomyelinase activity and cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C fibroblasts. **Brazilian J. of Med. and Biol. Res.**, v.32, n° 1, pp. 23-28, 1999.
- SINCLAIR, L. A new look at the inborn errors of metabolism. **Ann. Clin. Biochem.** v. 263, p. 3411-3417, 1982.
- SCHEDIN, S. et al. Reduced cholesterol accumulation and improved deficient peroxisomal functions in a murine model of Niemann-Pick type C disease upon treatment with peroxisomal proliferators. **Biochem. Pharmacol**, v. 56, p.1195-1199, 1998.
- SCHEDIN, S. et al. Peroxisomal impairment in Niemann-Pick type C disease. **J. Biol. Chem**, v.272, (10), p. 6245-6251, 1997.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4° ed. Cap. 27, p. 657-666. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.
- THORNE, P.C. et al. Clofibrate and other peroxisomal proliferating agents relatively specifically inhibit synthesis of ethanolamine phosphoglycerides in cultured human fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1214, p. 161-170, 1994.
- TURUNEN, M et al. Influence of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α on Ubiquinone Biosynthesis. **J. Mol. Biol**, v. 297, p. 607-614, 2000.
- VANIER, MT. et al. Sphingomyelinase activities of various human tissues in control subjects and in Niemann-Pick disease- Development and evaluation of a microprocedure. **Clin. Chim. Acta**, v. 106, p.257, 1980.

