



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C:
CONTRIBUCIÓN DEL AUMENTO DE COLESTEROL
MITOCONDRIAL MEDIADO POR MLN64

ELISA BALBOA CASTILLO

MARZO 2015



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

**DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C:
CONTRIBUCIÓN DEL AUMENTO DE COLESTEROL
MITOCONDRIAL MEDIADO POR MLN64**

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los
Requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Médicas

Por

ELISA BALBOA CASTILLO

Director de Tesis:

SILVANA ZANLUNGO

Comisión de Tesis:

Dr. Marcos Arrese

Dr. Alvaro Elorza

Dr. José Chianale

Marzo 2015

DEDICATORIA

A José Miguel, a mis Padres Nilda y Juan,
A mis hermanos Lucia, Javier, Teresa, y a mis sobrinos
Quienes llenan mis días de alegría y amor

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvana Zanlungo, no sólo por ser la guía de mi tesis, sino también por todas sus enseñanzas, apoyo, paciencia y comprensión, por darme la oportunidad de trabajar en su equipo y entregarme las herramientas para convertirme en la profesional que soy hoy.

Al Dr. José Fernández-Checa del instituto de investigaciones Biomédicas de Barcelona por recibirme en su laboratorio en Barcelona por tres meses y por darme la posibilidad de trabajar con tecnología de punta.

Al Dr. Álvaro Elorza y Dr. Tomás Regueira por facilitarme los equipos necesarios para evaluar consumo de oxígeno en células y tejidos respectivamente.

A la Dra. Alejandra Álvarez y a su equipo, especialmente a Alexis Martinez por la colaboración que permitió realizar experimentos para determinar la morfología mitocondrial en células MEF.

A la comisión de evaluación por sus comentarios para mejorar la calidad de mi tesis y por su disposición para orientarme durante el desarrollo de mi investigación.

A quienes dirigen el Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, por su ayuda y preocupación.

A Juan Castro y Ludwig Amigo por su gran ayuda técnica y consejos sobre protocolos.

A todos mis compañeros de laboratorio, por hacer que cada día de trabajo sea grato, por los consejos y la buena disposición para enseñar y ayudar.

A mis padres, hermanos, sobrinos, a José miguel y a mis amigas por ser aquellas personas que me han acompañado en todo el largo proceso de estudio.

A la beca para doctorados nacionales de CONICYT y a la Facultad de Medicina de la Universidad Católica por el apoyo económico con los cuales mis estudios de postgrado fueron posibles.

El desarrollo de esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1110310.

1 INDICE

1	INDICE	5
2	INDICE DE FIGURAS	8
3	LISTA DE ABREVIATURAS	9
4	RESUMEN	11
5	INTRODUCCIÓN	13
5.1	Etiología de la Enfermedad NPC.....	13
5.2	Patogénesis de la Enfermedad NPC	14
5.3	Estrés oxidativo en la Enfermedad NPC	15
5.4	Alteraciones mitocondriales en la enfermedad NPC	16
5.5	Transporte de colesterol hacia la mitocondria mediado por MLN64	19
5.6	HIPÓTESIS	22
5.7	OBJETIVO GENERAL	22
5.7.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6	METODOLOGIA.....	23
6.1	REACTIVOS	23
6.1.1	Materiales y medios para cultivo celular	23
6.1.2	Sistemas Comerciales	24
6.1.3	Anticuerpos	24
6.1.4	Modelos de estudio	25
6.2	MÉTODOS	27
6.2.1	Anestesia, sacrificio y toma de tejidos de los animales	27
6.2.2	Cultivo primario de neuronas hipocámpales de rata	27
6.2.3	Tratamiento de células con U18666A	28
6.2.4	Transfecciones de células CHO	28
6.2.5	Inmunofluorescencias indirectas de los cultivos celulares	28
6.2.6	Tinciones de filipina y Hoescht	29
6.2.7	Homogenizados de proteínas de cultivos celulares y de tejido para western blot	29
6.2.8	Análisis mediante western blot de lisados celulares y homogenizados de hígado	30
6.2.9	Infección de células HepG2 con adenovirus Ad. MLN64	30
6.2.10	Infección de ratones C57BL6/J con adenovirus Ad. MLN64	31
6.2.11	Infección de células y ratones Balb/c con adenovirus Ad.shMLN64	31
6.2.12	Fraccionamiento subcelular y purificación de mitocondrias	31
6.2.13	Purificación de mitocondrias mediante inmunoprecipitación	32
6.2.14	Tinción con las sondas Mitotracker red, Mitotracker green y Mitosox	32
6.2.15	Estudio de morfología mitocondrial en células MEF	33
6.2.16	Ensayo de funcionalidad mitocondrial por reducción del MTT	33
6.2.17	Consumo de Oxígeno de tejidos y células	33

6.2.18	Actividad de ATPasa	34
6.2.19	Medición del contenido de colesterol mitocondrial	35
6.2.20	Determinaciones de glutatión hepático y mitocondrial	35
6.2.21	Microscopía electrónica de hígado de ratones Balb/C	36
6.2.22	Tratamiento de los animales con GSH-EE y Piracetam	36
6.2.23	Pruebas Locomotoras, ganancia de peso y sobrevida de ratones	36
6.2.24	Análisis Estadístico	37
7	RESULTADOS	38
7.1	Las células modelo de la enfermedad NPC presentan disminución en el potencial de membrana y alteraciones en la morfología mitocondrial	38
7.2	Las mitocondrias de los tejidos de los ratones <i>Npc1</i> ^{-/-} son más pequeñas y presentan alteraciones en la dinámica mitocondrial en comparación con las mitocondrias WT	42
7.3	Las células modelo de la enfermedad NPC presentan aumento en la producción de superóxido mitocondrial	44
7.4	Los hígados de los ratones <i>Npc1</i> ^{-/-} presentan aumento del contenido de colesterol mitocondrial	45
7.5	Las células NPC presentan disminución de la defensa antioxidante y aumento de estrés oxidativo.	47
7.6	Las células NPC no presentan alteraciones en el consumo de oxígeno en presencia de glucosa, piruvato y glutamato.	49
7.7	Las mitocondrias aisladas de hígado de ratón <i>Npc1</i> ^{-/-} no presentan alteraciones en el consumo de oxígeno y presentan alteraciones en la actividad de la ATPasa.	50
7.8	El tratamiento con Piracetam tiene un efecto protector de la función mitocondrial en células modelo de la enfermedad NPC	52
7.9	El tratamiento con GSH-EE produce un efecto positivo en la ganancia de peso de los ratones <i>Npc1</i> ^{-/-}	54
7.10	La expresión de MLN64 está aumentada en modelos NPC.	56
7.11	El siRNA contra MLN64 logra disminuir los niveles de la proteína y produce aumento del potencial de membrana y disminución de la producción de superóxido en células NPC.	58
7.12	La depleción de MLN64 en hígado de ratones <i>Npc1</i> ^{-/-} produce disminución del colesterol total y aumento del contenido de colesterol mitocondrial	60
7.13	La sobreexpresión de MLN64 en hígado de ratón y células HepG2 produce aumento del contenido de colesterol mitocondrial	61
7.14	La sobreexpresión de MLN64 produce alteraciones mitocondriales en hígado de ratones y en células HepG2.	64
7.15	Las células que sobreexpresan MLN64 presentan alteraciones en la morfología mitocondrial y en marcadores de dinámica mitocondrial	67
8	DISCUSIÓN	70
8.1	Disminución del potencial de membrana y aumento del contenido de colesterol mitocondrial en modelos NPC	70
8.2	Alteraciones en la morfología mitocondrial en modelos NPC	71

8.3	Aumento del contenido de colesterol en modelos NPC	73
8.4	Metabolismo energético en modelos NPC	75
8.5	Relevancia de la disfunción mitocondrial en modelos NPC	76
8.6	Relevancia de MLN64 en el aumento de colesterol mitocondrial en modelos NPC.....	77
8.7	Efecto de la sobreexpresión de MLN64	80
9	CONCLUSIÓN	82
10	BIBLIOGRAFÍA	83

2 INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de egreso del colesterol de los lisosomas.....	14
Figura 2: Dinámica mitocondrial.....	16
Figura 4: Los modelos celulares NPC acumulan colesterol libre.	42
Figura 5: Los modelos celulares NPC presentan disminución en el potencial de membrana mitocondrial.	44
Figura 6: Los fibroblastos de embrión de ratón tratados con U18 presentan alteraciones en la morfología mitocondrial.	45
Figura 7: Las células CHO NPC presentan aumento del marcador de fisión FIS1.....	46
Figura 8: Las mitocondrias de hígado de ratones <i>Npc1</i> ^{-/-} son más pequeñas y presentan disminución de MFN2.....	47
Figura 9: Las células modelo NPC presentan aumento de las especies reactivas de Oxígeno mitocondrial.	49
Figura 10: Las mitocondrias de hígado de ratón NPC presentan aumento del contenido de colesterol mitocondrial.	51
Figura 11: Las células NPC presentan disminución de la defensa antioxidante y aumento del daño oxidativo.....	52
Figura 12: Las mitocondrias aisladas de hígado de ratón <i>Npc1</i> ^{-/-} no presentan alteraciones en el consumo de oxígeno y presentan alteraciones en la actividad de la ATPasa	55
Figura 13: El tratamiento con Piracetam tiene un efecto protector de la función mitocondrial en células modelo de la enfermedad NPC	57
Figura 14: El tratamiento con GSH-EE produce un efecto positivo en la ganancia de peso de los ratones <i>Npc1</i> ^{-/-}	¡Error! Marcador no definido. 59
Figura 15: Niveles de GSH mitocondrial en tejido de ratones de 8 semanas WT y <i>Npc1</i> ^{-/-}	59
Figura 16: Los niveles de expresión de MLN64 están aumentados en modelos NPC.	61
Figura 17: La depleción de MLN64 en células CHO NPC recupera el potencial de membrana mitocondrial y disminuye los niveles de ROS mitocondrial.	63
Figura 18: La depleción de MLN64 en hígado de ratones <i>Npc1</i> ^{-/-} produce disminución del colesterol total y aumento del contenido de colesterol mitocondrial	64
Figura 19: La sobreexpresión de MLN64 en hígado de ratón produce aumento del contenido de colesterol mitocondrial	67
Figura 20: Contenido de colesterol mitocondrial en células HepG2 infectadas con un adenovirus recombinante para MLN64.	68
Figura 21: Consumo de oxígeno y actividad ATPasa en mitocondrias de hígados de ratones infectados con un adenovirus recombinante para MLN64.	70
Figura 22: Alteraciones de la funcionalidad mitocondrial en células HepG2 infectadas con un adenovirus recombinante de MLN64.	71
Figura 23: Las células que sobreexpresan MLN64 presentan fragmentación mitocondrial y disminución de MFN2.....	73

3 LISTA DE ABREVIATURAS

3D: 3 dimensiones
ADP: Adenosín difosfato
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
ATP: Adenosín trifosfato
ANT: transportador de nucleótidos de adenina
BSA: Albúmina de Suero Bovino
CAV1: Proteína caveolina 1
CHO: Células de ovario de hámster chino
Drp1: Dynamin-related protein 1
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
FIS1: Mitochondrial fission 1 protein
GSH: Glutación
GSH-EE: Etil éster de glutation
HE1: Human Epididimus 1; Proteína de Niemann Pick tipo C2
IF: Inmunofluorecencia
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
MEF: Fibroblastos de embrión de ratón
MEM: membrana externa mitocondrial
MFN2: proteína mitofusina 2
mGSH: glutación mitocondrial
MIM: membrana interna mitocondrial
MLN64: metastatic lymph node 64 protein
MT: mitotracker
MTT: 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyltetrazolium bromide
NAC: N-Acetil-Cisteína
N-Tyr: Nitro-tirosinas
NPC: Niemann Pick tipo C
Npc1^{-/-}: Ratón deficiente de *Npc1* (BALC/cnpcnih)
NPC1: Proteína de Niemann Pick tipo C1
NPC2: Proteína de Niemann Pick tipo C2
OPA1: Optic atrophy type 1 protein
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PFA: Para-Formaldehído
PIR: piracetam
Q-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
RE: Retículo Endoplásmico
ROS: Especies reactivas de Oxígeno
SDS-PAGE: Dodecil Sulfato de Sódio
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA

StAR: steroidogenic acute regulatory protein

START: StAR-related lipid transfer domain

TEMED: tetrametiletilendiamina

U18: U18666A, 3- β -[2-(diethylamino)etoxi]androst-5-en-17-ona

VDAC: voltage-dependent anion channel

WB: Western blot

WT: Wild type, Silvestre

4 RESUMEN

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) se caracteriza por la acumulación lisosomal de colesterol, presencia de estrés oxidativo y muerte celular. Los tejidos más afectados son el cerebro y el hígado. Hasta la fecha, no se ha determinado el o los mecanismos que producen la muerte celular en estos tejidos. Para tratar de entender estos mecanismos y dado que se ha demostrado la contribución del daño mitocondrial en otras enfermedades neurodegenerativas y con daño hepático nosotros proponemos estudiar el funcionamiento y la dinámica mitocondrial en modelos NPC y evaluar la contribución de la disfunción mitocondrial en el daño celular observado en la enfermedad.

Las mitocondrias son esenciales para la integridad celular, por lo que su dinámica está estrechamente regulada. La dinámica mitocondrial abarca procesos de fusión, fisión, biogénesis y autofagia.

En las células NPC se ha observado que existe un mayor contenido de colesterol en la membrana mitocondrial y que procesos importantes de la mitocondria están alterados, como la síntesis de ATP y la entrada de GSH a la mitocondria. Se ha descrito además alteraciones en la morfología mitocondrial en tejidos NPC. Nuestra hipótesis es que el aumento de colesterol en la membrana mitocondrial produce disfunción mitocondrial en las células NPC. Además proponemos que la proteína MLN64 mediaría el transporte de colesterol a las mitocondrias en células NPC. En conjunto estas alteraciones convergerían en una reducción en la producción de energía, aumento en la producción de ROS y en la demanda de energía de las células NPC.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar si el aumento de colesterol, mediado por la proteína MLN64, contribuye a la disfunción mitocondrial y su relevancia en la patogenia de la enfermedad NPC. Para evaluar esto en diferentes modelos modulamos los niveles de expresión de MLN64 y evaluamos la función mitocondrial en diferentes modelos celulares y en tejidos del ratón *Npc1^{-/-}*. Para mejorar la función mitocondrial en células NPC y ratones *Npc1^{-/-}* usamos GSH-EE como antioxidante y Piracetam, una droga que estimula la producción de ATP.

Nuestros resultados muestran, en diferentes modelos celulares NPC, disminución en el potencial de membrana, aumento de la producción de superóxido mitocondrial, disminución de GSH y alteraciones en la morfología mitocondrial en comparación con las células control. Las alteraciones en la morfología se relacionaron con disminución y aumento en los niveles de la proteína de fusión MFN2 y a de la proteína de fisión FIS1, respectivamente. En el hígado de ratones *Npc1^{-/-}* encontramos disminución en la actividad de la ATPasa lo que se relacionó con un aumento significativo en el contenido de colesterol mitocondrial.

El tratamiento con Piracetam previno la pérdida del PMM y el aumento de producción de superóxido mitocondrial en células tratadas con U18, pero en ratones *Npc1*^{-/-} no tuvo efectos positivos. El tratamiento con GSH-EE previno la pérdida de peso en ratones *Npc1*^{-/-} hasta las 8 semanas. Sin embargo, no tuvo efectos positivos en el comportamiento locomotor y en la supervivencia.

Las células NPC y el hígado del ratón *Npc1*^{-/-} presentaron aumento de la expresión de MLN64. Al disminuir los niveles de MLN64 en células NPC se previno la pérdida del potencial de membrana y disminuyeron los niveles de ROS mitocondrial. En el hígado de los ratones *Npc1*^{-/-} la disminución de MLN64 provocó disminución del contenido de colesterol libre total y sorprendentemente un aumento en el contenido de colesterol mitocondrial.

Por otra parte, en las células que sobreexpresan MLN64 encontramos alteraciones en la función mitocondrial y cambios en la morfología mitocondrial, estos últimos, asociados a disminución en la expresión de MFN2. La sobreexpresión de MLN64 en hígado de ratones produjo un aumento significativo en los niveles de colesterol mitocondrial, disminución en la actividad de la ATPasa, alteraciones en el consumo de oxígeno, disminución en el contenido de GSH mitocondrial y disminución de MFN2. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existen alteraciones en la función mitocondrial en la enfermedad NPC y sugieren que MLN64 estaría involucrado en estas alteraciones, ya que la sobreexpresión de MLN64, produce alteraciones en la función y dinámica mitocondrial similares a las observadas en modelos NPC. En este trabajo por primera vez se demostró que la expresión de MLN64 está aumentada en modelos NPC, lo que podría constituir un mecanismo patogénico en la enfermedad NPC. Los resultados obtenidos y antecedentes de la bibliografía sugieren que MLN64 participaría en la homeostasis celular del colesterol y favorecería la acumulación de colesterol en la mitocondria en la enfermedad NPC. La función de la proteína MLN64 no ha sido completamente dilucidada y no se puede descartar que MLN64 regule la función de otras proteínas transportadoras de colesterol que pueden favorecer el transporte de colesterol a la mitocondria.

Las conclusiones de este trabajo es que en modelos NPC existen alteraciones en la función y en la morfología mitocondrial. Estas alteraciones estarían relacionadas a un aumento del contenido de colesterol mitocondrial mediado por MLN64 y a cambios en la expresión de proteínas reguladoras de los procesos de fusión y fisión mitocondrial.

La importancia de este trabajo es que se demuestra que existe disfunción mitocondrial en la enfermedad de NPC y que esta disfunción podría estar relacionada al aumento de colesterol mitocondrial y al aumento de expresión de MLN64.

5 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) es un desorden neurodegenerativo de herencia autosómica recesiva, que se clasifica como una enfermedad de depósito lisosomal neurovisceral, y se caracteriza por la acumulación de colesterol no esterificado en el hígado, el bazo y el sistema nervioso central [1]. Es una enfermedad con un amplio espectro clínico que va desde un trastorno neonatal rápidamente mortal hasta un inicio en la adultez de una enfermedad neurodegenerativa crónica. En la mayoría de los casos la gravedad de la enfermedad está determinada por la evolución neurológica, sin embargo los síntomas neurológicos suelen ser precedidos por signos sistémicos (ictericia colestásica en el período neonatal, y/o hepatoesplenomegalia en la infancia y la niñez) [1]. En la forma más común de presentación o la enfermedad de NPC clásica los pacientes presentan un deterioro neurológico progresivo. En el periodo infantil temprano existe retraso en el desarrollo motor, y en el último periodo infantil y juvenil comienzan a aparecer problemas en la marcha, caídas, torpeza, cataplejía, y problemas escolares. En algunos casos también existen trastornos psiquiátricos como demencia progresiva [2].

Actualmente esta enfermedad tiene una incidencia estimada mínima de 1 / 120.000 nacidos vivos [2] y es una enfermedad progresiva mortal que no tiene cura. En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos moleculares que desencadenan la enfermedad para aportar en el conocimiento de nuevos tratamientos y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Las características de la enfermedad NPC que conocemos actualmente y que sustentan nuestra investigación son múltiples y las mencionaré a continuación, para finalmente exponer nuestra propuesta de trabajo.

5.1 Etiología de la Enfermedad NPC

La enfermedad NPC se origina por mutaciones en los genes *NPC1* y *NPC2*. Un 95% de los casos de la enfermedad se deben a mutaciones en el gen de *NPC1* localizado en el cromosoma 18q11 [3, 4], y el 5% restante se deben a mutaciones en el gen de *NPC2* localizado en el cromosoma 14q24 [5].

NPC1 es una proteína de varios dominios de transmembrana localizada en los compartimentos endosomales tardíos y lisosomas [6], mientras que *NPC2* es una proteína relativamente pequeña ubicada en el lumen lisosomal [7]. El modelo actual de transporte de colesterol en los lisosomas es que *NPC2* une colesterol libre y lo transfiere a *NPC1*, la que transportaría el colesterol a través del glicocalix hasta la membrana de los endosomas / lisosomas para ser liberado del organelo (**Fig.1**) por

mecanismos que aún no han sido determinados [8]. Tanto las deficiencias en NPC1 como en NPC2 provocan la acumulación intracelular de colesterol libre y glicosfingolípidos [9].

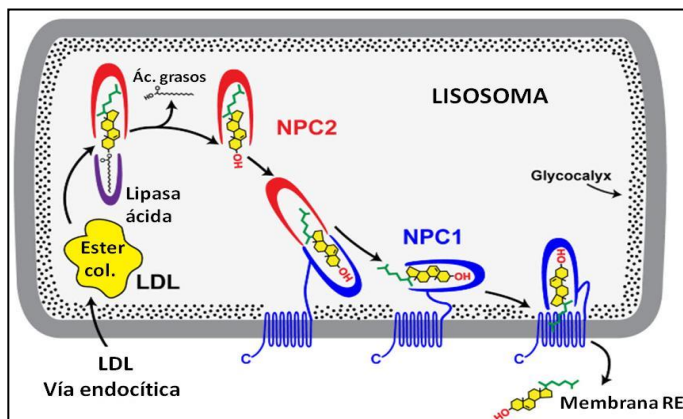


Figura 1: Modelo de egreso del colesterol de los lisosomas.

El colesterol proveniente de la vía endocítica es hidrolizado en el lisosoma a colesterol libre, que es unido por NPC2 y entregado a NPC1 para que ésta lo saque del lisosoma hacia el RE donde es redistribuido para requerimientos celulares. Adaptado de Kwon y cols., 2009

La función exacta de las proteínas NPC1 y NPC2 aún no está clara, y aunque la enfermedad NPC está descrita como un defecto en el tráfico celular de colesterol, en el cerebro, los lípidos que se acumulan principalmente son los gangliósidos [1]. Estas evidencias han llevado a proponer múltiples hipótesis sobre la patogénesis de la enfermedad y de los mecanismos que finalmente llevan a la muerte celular.

5.2 Patogénesis de la Enfermedad NPC

La principal característica de la enfermedad NPC es la acumulación de lípidos en varios órganos, como el hígado, el bazo, el cerebro y en algunos casos también se ven afectados los pulmones [1, 10, 11]. En el hígado y el bazo existe acumulación de colesterol libre, esfingomielina, LBPA, glicolípidos y esfingosina libre. En el tejido cerebral además se produce acumulación de glicosfingolípidos, especialmente los gangliósidos GM2 y GM3 [1].

En nuestro laboratorio hemos encontrado que en el hígado de los ratones *Npc1*^{-/-} hay señales de inflamación y fibrosis, aumento de las proteínas carboniladas y disminución del contenido de glutatión, lo que tiene relación con un aumento del estrés oxidativo [12]. Además en los ratones *Npc1*^{-/-}, nuestro grupo ha descrito un aumento de apoptosis y daño oxidativo, especialmente de las neuronas cerebelares de Purkinje, que llevaría a la activación de la vía pro- apoptótica c-Abl/p73 [13, 14]. Otro hallazgo reciente es que además en los lisosomas de los ratones *Npc1*^{-/-} existe acumulación de vitamina E [15], un importante antioxidante lo que contribuiría aún más al estrés oxidativo presente en la enfermedad. De hecho tratamientos con alta dosis de vitamina E logran revertir el daño oxidativo y aumentar la sobrevivencia de los ratones *Npc1*^{-/-} [16].

Entre otras posibles causas de muerte celular en modelos de la enfermedad NPC se han reportado: disfunción peroxisomal [17], neuroinflamación [18], inducción de apoptosis [19] y disminución en la síntesis de neuroesteroides [20]. Interesantemente, todos estos mecanismos provocan o son provocados por el estrés oxidativo, por lo que varios grupos [14, 21], incluido el nuestro, han propuesto el aumento del estrés oxidativo como mecanismo patogénico en la enfermedad de NPC.

5.3 Estrés oxidativo en la Enfermedad NPC

Existen muchos estudios consistentes con la hipótesis que el estrés oxidativo podría ser un factor que contribuye a la fisiopatología de la enfermedad NPC. Al analizar por microarreglos el genoma de fibroblastos de pacientes que poseen mutaciones en el gen de NPC1 se encontraron perfiles de aumento de expresión de genes indicativos de estrés oxidativo. Por ejemplo, se encontraron aumentos en la expresión de genes componentes de la NADPH oxidasa, los que al estar sobreexpresados pueden generar ROS y también de genes que responden a estrés oxidativo como *MT1G*, *MT3*, *GPX3* entre otros [22]. En otros modelos de la enfermedad NPC se encontró mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación de lípidos [23]. Además al comparar el plasma de pacientes que tienen la enfermedad NPC con plasma de pacientes controles se encontró una disminución significativa en la fracción de coenzima Q10 reducida y en la capacidad antioxidante trolox equivalente [21].

Nuestro grupo ha demostrado que existe un aumento del estrés oxidativo en neuronas modelos de la enfermedad NPC y que el tratamiento con el antioxidante NAC es capaz de inhibir la activación de la vía pro-apoptótica c-Abl/p73 y de aumentar la sobrevivencia de dichas neuronas [14]. Además, recientemente nuestro grupo ha demostrado que un tratamiento con la vitamina E, un potente antioxidante, es capaz de inhibir la misma vía pro-apoptótica y mejora el comportamiento locomotor y la sobrevivencia en ratones *Npc1*^{-/-} [16]. Estas evidencias en conjunto corroboran la importancia del estrés oxidativo como agente patológico en la enfermedad NPC.

Aunque se ha demostrado la presencia de estrés oxidativo en pacientes NPC y en células y tejidos provenientes de modelos animales de la enfermedad [14], aun no se ha determinado el mecanismo por el cual se produce el aumento de estrés oxidativo en las células NPC.

En este trabajo nosotros proponemos que el aumento de estrés oxidativo en la enfermedad de NPC puede deberse principalmente a fallas en la función y dinámica mitocondrial, lo que favorece la producción de ROS y disminuye la defensa antioxidante en la célula.

5.4 Alteraciones mitocondriales en la enfermedad NPC

La mitocondria es un organelo dinámico que pasa constantemente por sucesivos estados de fusión y fisión con un intercambio activo de componentes para segregar los elementos funcionales y dañados (Fig.2). [24].

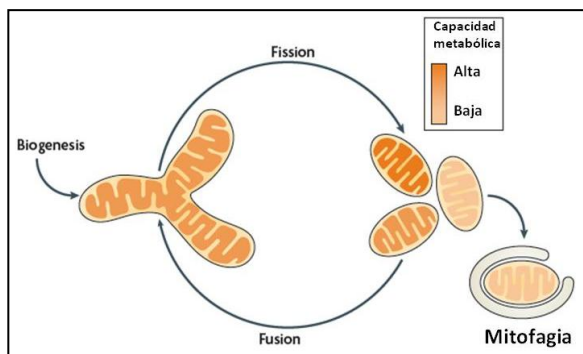


Figura 2: Dinámica mitocondrial.

El ciclo de vida de la mitocondria empieza con el crecimiento y la división de otra mitocondria preexistente (biogénesis) y termina cuando disminuye su funcionalidad por autofagia mitocondrial (mitofagia). Adaptado de Westerman, 2010.

En el cerebro de ratones NPC se ha visto que existe predominio de mitocondrias más pequeñas y redondeadas [25], lo que sugiere que podrían existir alteraciones en los procesos de la dinámica mitocondrial, ya que cuando existe aumento de la fisión y/o disminución en la fusión predominan las mitocondrias pequeñas [26].

Otro factor que afecta la función mitocondrial es el contenido de colesterol en sus membranas. Como se ha demostrado ampliamente el aumento de colesterol afecta la fluidez de las membranas biológicas y tiene efectos perjudiciales en la función mitocondrial [27].

Las mitocondrias aisladas de cerebros de ratones deficientes en NPC1 presentan disminución en la producción de ATP, debido a una disminución en la actividad de la ATP sintasa [25], mayor susceptibilidad a la producción de ROS estimulado por el péptido A β , y mayor liberación de proteínas pro-apoptóticas mitocondriales [28]. Estas alteraciones se correlacionan con un aumento de colesterol en la membrana mitocondrial, lo que queda demostrado al tratar estas mitocondrias con el agente quelante de colesterol metil- β -ciclodextrina, condiciones en las que las mitocondrias NPC recuperan la capacidad de producir ATP a niveles similares a los controles [25].

Otros hallazgos apoyan la hipótesis de que el aumento de colesterol en la membrana mitocondrial es el causante de las alteraciones mitocondriales observadas en las células NPC. Así, se ha demostrado en células cancerígenas que presentan un mayor contenido de colesterol en la membrana mitocondrial, que este aumento de colesterol afecta la síntesis de ATP por la ATP sintasa, el intercambio de ATP/ADP en la membrana interna por la adenina nucleótido translocasa (ANT) y el intercambio de

ATP/ADP en la membrana externa mitocondrial por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) [29].

Además, se ha demostrado que al incubar mitocondrias silvestres con colesterol se produce un efecto inhibitorio en la actividad de la ATPasa, efecto que no se observa al analizar la fracción de subpartículas mitocondriales en donde se encuentra la ATPasa. Esto sugiere que el efecto inhibitorio lo ejerce el colesterol que se aloja en las membranas mitocondriales y que no es un efecto directo sobre la ATPasa [30].

Los estudios en células deficientes de caveolina 1 (CAV1) sugieren también que la acumulación de colesterol mitocondrial se asocia a disfunción mitocondrial. Las células deficientes en CAV1 presentan un aumento en el contenido de colesterol mitocondrial, y en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se relacionan con el aumento de la apoptosis [31].

Aunque se han realizado varios estudios sobre el efecto del colesterol en la membrana mitocondrial, el aumento de colesterol en la membrana mitocondrial de los animales NPC es controversial, ya que cuando se purifican mitocondrias por centrifugación por gradiente pueden resultar contaminadas por pequeñas cantidades de endosomas/lisosomas, en particular cuando la densidad y tamaño de éstos se encuentra alterada por la acumulación de colesterol por la deficiencia de NPC1 [32]. A pesar de estas dificultades técnicas, existe otro modelo que también apoya la hipótesis de aumento de colesterol en las membranas mitocondriales de células deficientes en NPC1. Se demostró que mitocondrias purificadas de células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en NPC1 tenían un aumento del colesterol en la membrana mitocondrial [33]. Esto se determinó midiendo la síntesis de pregnenolona, en la cual el paso limitante es la llegada de colesterol a la membrana mitocondrial, donde se encuentra la enzima que sintetiza la pregnenolona. Así se pudo medir indirectamente el aumento en el transporte de colesterol hacia la mitocondria cuantificando la cantidad de pregnenolona producida. Las células CHO deficientes en NPC1, transfectadas con plásmidos codificantes para la enzima esteroidogénica que produce pregnenolona CYP11A1, presentaron un aumento significativo en los niveles de pregnenolona sintetizado [33], lo que reafirma la hipótesis de que las membranas mitocondriales de las células NPC presentan mayor contenido de colesterol o que existe una mayor llegada de colesterol a la mitocondria.

Aunque se ha reportado que existe un aumento de colesterol en la membrana mitocondrial de las células NPC, y uno de los pasos limitantes para la síntesis de hormonas esteroidales es la llegada de colesterol a la mitocondria, al contrario de lo que se espera, la síntesis de hormonas esteroidales se encuentra disminuida en los cerebros de ratones NPC [20]. Esto sugiere que el colesterol produce

cambios en la estructura de la membrana mitocondrial, lo que sería perjudicial para la función de las enzimas que se encuentran en la membrana, por lo que estos hallazgos también apoyan la hipótesis de disfunción mitocondrial en la enfermedad NPC.

En los ratones deficientes de NPC1 un aumento en el contenido del colesterol mitocondrial se asocia a una disminución en la fluidez de la membrana mitocondrial y a un aumento en la susceptibilidad a la apoptosis desencadenada por TNF- α [34]. Al igual que los ratones NPC, los ratones transgénicos que sobreexpresan el factor de transcripción SREBP-2 también presentan acumulación de colesterol intracelular y acumulación de colesterol en las mitocondrias [28]. En estos ratones el aumento del colesterol mitocondrial se asocia a disminución en la entrada de glutatión a la mitocondria, mayor estrés oxidativo, inflamación y mayor muerte neuronal desencadenada por el péptido A β [28]. Consecuentemente, en hepatocitos de ratones *Npc1*^{-/-} se ha visto disminuido el contenido de glutatión (GSH) mitocondrial y esto se atribuye a un mayor contenido de colesterol en la membrana mitocondrial [34].

El GSH es un importante antioxidante y es la principal defensa para la mantención de un ambiente mitocondrial redox apropiado, repara modificaciones oxidativas y evita la disfunción mitocondrial y muerte celular. Es un compuesto tiol, no proteico que requiere ATP para su síntesis en el citoplasma. La mitocondria no posee la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar GSH, sin embargo éste puede atravesar fácilmente a través de poros en la membrana externa mitocondrial (MEM). Dada la naturaleza aniónica del GSH a pH fisiológico, éste no puede difundir a través de la membrana interna mitocondrial (MIM). El GSH es transportado hacia la matriz mitocondrial por transportadores que se localizan en la MIM, donde el principal de estos transportadores es el transportador de 2-Oxoglutarato (OGC) (**Fig.3**).

La disminución en el transporte de GSH hacia las mitocondrias en células NPC se explicaría por las características del transporte de GSH hacia la matriz mitocondrial, que es altamente dependiente de una dinámica apropiada de la membrana mitocondrial. Así se ha visto que al modificar la fluidez de la membrana mitocondrial con alcohol, el transporte de GSH hacia la matriz mitocondrial disminuye considerablemente [35], esto debido a que la rigidez de la membrana mitocondrial aumenta por el etanol, produciendo un aumento en la razón colesterol/fosfolípidos en la membrana mitocondrial (**Fig.3**).

En acuerdo con lo anterior, se ha visto que en experimentos en los que se cargan con colesterol mitocondrias aisladas, existe una disminución en la entrada de mGSH a dichas mitocondrias [31].

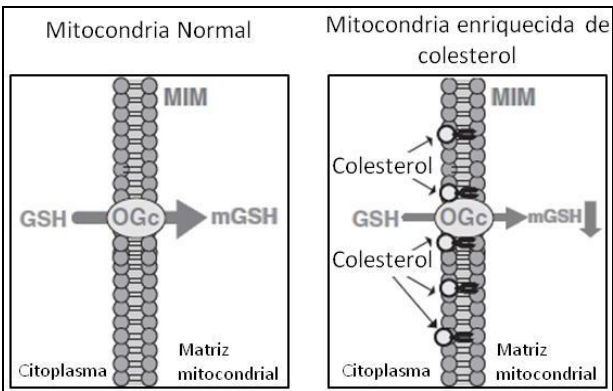


Figura 3. Transporte de mGSH.

El transporte dinámico de GSH a través del transportador 2-Oxoglutarato hacia la mitocondria depende de la fluidez de membrana que está dada por la razón colesterol/fosfolípidos, si aumenta el contenido de colesterol en la membrana mitocondrial, disminuye el transporte de GSH hacia la matriz mitocondrial. Adaptado de Marí y cols., 2009

Más aún, al tratar a ratones que presentan mayor contenido de colesterol mitocondrial como los Tg-SREBP-2 con GSH-EE, una forma de GSH que es permeable a la membrana, se restableció el contenido de mGSH y se previno el estrés oxidativo, el daño neuronal y la susceptibilidad a la muerte celular inducida por A β [28]. Estos resultados muestran la importancia del mGSH como defensa antioxidante y sugieren que restablecer los niveles de mGSH con GSH-EE podría ser una terapia efectiva para disminuir el daño oxidativo y la muerte celular observados en la enfermedad NPC.

En estudios recientes se ha visto que las células NPC presentan alteraciones metabólicas como aumento en la secreción de lactato, disminución de la respiración mitocondrial dependiente de glutamina y disminución en el transporte de ATP a través de la membrana mitocondrial, y que todas estas alteraciones son prevenidas cuando se bloquea el transporte de colesterol hacia la mitocondria inhibiendo la expresión de las proteínas MLN64 y NPC2 [36]

En conjunto todas las evidencias mencionadas anteriormente apoyan la hipótesis de que el aumento de colesterol en la mitocondria produce disfunción mitocondrial.

5.5 Transporte de colesterol hacia la mitocondria mediado por MLN64

Las mitocondrias son organelos pobres en colesterol, sin embargo se ha observado el aumento de colesterol en las mitocondrias de miocardio sometido a isquemia y en las mitocondrias de células cancerígenas [30]. A pesar de estas evidencias, se desconocen los mecanismos de destinación del colesterol hacia la mitocondria. En tejidos esteroideogénicos existen proteínas, incluyendo la familia de proteínas START, que son capaces de transportar colesterol hacia la mitocondria donde se sintetizan las hormonas esteroidales. Las proteínas START contienen un dominio llamado de la misma manera, que permite la transferencia de lípidos. El primer miembro de esta familia en ser identificado, llamado

StAR, facilita el movimiento de colesterol desde fuentes intracelulares a la mitocondria, en tejidos esteroideogénicos, estimulando la síntesis de hormonas esteroideas [37].

En la búsqueda de posibles candidatos que pudieran transportar colesterol hacia la mitocondria, en nuestro laboratorio quisimos estudiar la posible participación de MLN64. MLN64 (o STARD3) es otro miembro de la familia START, sin embargo su función en el transporte de lípidos no ha sido completamente dilucidada [38, 39]. El ADNc de MLN64 codifica para una proteína de 445 aminoácidos, que está compuesta por dos dominios distintos: el dominio amino terminal que contiene cuatro hélices transmembrana, y se denomina MENTAL; y el dominio carboxilo terminal que contiene el dominio START, característico de los miembros de la familia [40].

El análisis ultraestructural de MLN64 confirmó la presencia del dominio START, y además se determinó la habilidad de este dominio para unir colesterol en una razón equimolar [41]. El análisis de la distribución subcelular de MLN64 muestra su colocalización con un lípido endosomal llamado LBPA, además se ha visto que MLN64 se localiza en endosomas tardíos junto con la proteína ABCA3 y en una población distinta de endosomas de NPC1. Se ha propuesto que MLN64 participa en el transporte intracelular de colesterol endocitado. De acuerdo a éste modelo el colesterol primero entraría a los compartimentos MLN64 positivos desde donde podría ser reciclado hacia la membrana plasmática y en una segunda etapa el colesterol entraría a los compartimentos NPC1 positivos donde se exporta colesterol hacia el retículo endoplasmático [42]. Concordante con este modelo las imágenes obtenidas con microscopía electrónica muestran que MLN64 se encuentra en la membrana de los endosomas tardíos. Por otra parte, con la microinyección de anticuerpos específicos se observó que el dominio START de MLN64 es citoplasmático [43]. La topología de MLN64 en la membrana de los endosomas tardíos predice que el dominio START proyectado hacia el citoplasma, sería capaz de transportar colesterol hacia membranas aceptoras [43]. Por otro lado, el dominio MENTAL está relacionado con la dinámica de los endosomas, ya que cuando se sobreexpresa produce alteraciones en la distribución y tamaño de estos organelos [44] y además se ha visto que al igual que el dominio START une colesterol a una razón equimolar [45].

En estudios *in vitro* en que se usó la proteína MLN64 intacta y una proteína MLN64 truncada, que no posee el dominio START, se demostró que las células transfectadas con la proteína truncada acumularon colesterol con un fenotipo similar al fenotipo NPC e inhibición del tráfico de los endosomas tardíos [43]. Otros estudios *in vitro* sugieren que el dominio START de MLN64 media la transferencia de colesterol entre membranas y estimula el metabolismo mitocondrial del colesterol hacia hormonas esteroideas [46]. Estos hallazgos sugieren fuertemente que MLN64 podría tener

participación en la mantención de la homeostasis intracelular de colesterol. Sin embargo aunque MLN64 es una proteína capaz de unir colesterol y se localiza en los endosomas, su sobreexpresión no es capaz de rescatar el fenotipo NPC [43] lo que sugiere que MLN64, NPC1 y NPC2 actuarían concertadamente en una vía común para sacar el colesterol de los endosomas tardíos y lisosomas [43].

Estudios de Charman y cols. [33] sugieren la contribución de MLN64 en el transporte de colesterol desde la vía endosomal hacia la mitocondria, ya que se demostró que el silenciamiento de MLN64 utilizando ARN de interferencia disminuye el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial y produce una reducción de los niveles de colesterol mitocondrial en células carentes de NPC1. Esto sugiere que MLN64 es capaz de transportar colesterol a la mitocondria, incluso en ausencia de NPC1 [33]. En resumen Charman y cols. [33] describieron una vía de transporte para el colesterol endosomal hacia las mitocondrias que requiere MLN64, pero no NPC1, y que puede ser responsable del aumento del colesterol mitocondrial en la enfermedad de NPC. Sin embargo, no se determinó con estos estudios la relevancia de esta vía para la función y dinámica mitocondrial, ni para el daño oxidativo y muerte celular característicos de las células NPC.

Interesantemente, en una reciente publicación donde se estudió el mecanismo de resistencia a la muerte celular inducida por la toxina del ántrax en macrófagos de ratón, se sugiere que la inhibición de la expresión de MLN64 previene la muerte celular inducida por la toxina, confiriendo resistencia a las células infectadas. Los resultados de este estudio sugieren que MLN64 es capaz de cambiar su localización desde los lisosomas hacia la mitocondria produciendo un aumento en el contenido de colesterol mitocondrial, aumento de la producción de ROS y depleción de mGSH, llevando finalmente a muerte celular [47].

Interesantemente, en nuestro laboratorio se demostró hace algunos años que la sobreexpresión de MLN64 en ratones produce daño hepático correlacionado con un aumento de la apoptosis y un aumento del colesterol hepático libre [48]. Sin embargo, no se demostró la contribución de MLN64 en el transporte de colesterol a la mitocondria, y posterior muerte celular. Dado estos hallazgos en nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar la posible participación de MLN64 en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, especialmente en células NPC.

En resumen el aumento de colesterol en la membrana mitocondrial de las células NPC tendría consecuencias perjudiciales para la función mitocondrial y podría estar afectando procesos vitales para la célula como la producción y degradación de ATP, la síntesis de neuroesteroides y el transporte de glutatión (GSH) hacia la mitocondria.

5.6 HIPÓTESIS

La disfunción mitocondrial, producida por el aumento de colesterol mitocondrial mediado por MLN64, contribuye a la patogénesis de la enfermedad Niemann-Pick tipo C

5.7 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la disfunción mitocondrial, inducida por aumento de colesterol mitocondrial es mediado por MLN64 y contribuye a la patogénesis de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C

5.7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) **Determinar si existen alteraciones estructurales y funcionales en la mitocondria en modelos celulares y en tejidos de ratones *Npc1*^{-/-}.**

Evaluar la función mitocondrial en modelos NPC *in vivo* e *in vitro*

Evaluar el contenido de colesterol mitocondrial *in vivo* e *in vitro*

Evaluar la dinámica mitocondrial en modelos NPC *in vivo* e *in vitro*

- b) **Evaluar la contribución de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la enfermedad NPC en modelos celulares y en ratones *Npc1*^{-/-}.**

Evaluar la función mitocondrial *in vitro* usando piracetam para aumentar la producción de ATP y con GSH-EE para aumentar los niveles de mGSH

Evaluar el efecto de piracetam y GSH-EE *in vivo* sobre los niveles de estrés oxidativo en el hígado y cerebro, la función hepática, la función locomotora y la supervivencia de los ratones *Npc1*^{-/-}.

- c) **Evaluar la contribución de MLN64 en el aumento de colesterol mitocondrial y en la disfunción mitocondrial**

Sobreexpresar los niveles de MLN64 mediante un adenovirus recombinante y evaluar contenido de colesterol mitocondrial, función mitocondrial, dinámica mitocondrial, y daño oxidativo.

Disminuir los niveles de MLN64 con shRNA y evaluar contenido de colesterol mitocondrial, función mitocondrial, dinámica mitocondrial y daño oxidativo.

6 METODOLOGIA

6.1 REACTIVOS

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA): Tritón X-100, albúmina de suero de bovino (BSA), dodecilsulfato de sodio (SDS), Tween 20, NP-40, persulfato de amonio, β -mercaptoetanol, tetrametiletilendiamina (TEMED), bicarbonato de sodio, filipina, Hoesch, fosfato inorgánico, adenosina trifosfato (ATP), oligomicina, Carbonil cianide 4-(trifluorometoxy)phenilhidrazona (FCCP), rotenona, antimicina, Etil ester de glutatión (GSH-EE), piracetam y Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania): NaCl, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $HClO_4$, H_2O_2 , HCl, $Na_2S_2O_5$, Na_2SO_3 , metanol, glucosa, sacarosa y los solventes de grado analítico.

Los siguientes reactivos de grado biología molecular se obtuvieron de Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA): Tris, glicina, estándar de peso molecular de 100 pb DNA *ladder*, *benchmark protein ladder* preteñido, Taq polimerasa.

La agarosa de grado biología molecular fue adquirida en BioWhittaker Molecular Applications (Rockland, USA).

La solución de Chomczynski-Fenol para la extracción de ARN se obtuvo de Winkler (Santiago, Chile)

El líquido de montaje para inmunofluorescencia *Fluoromount* se obtuvo de Electron Microscopy Sciences (Washington, USA).

El papel filtro Nº2 se obtuvo en Whatman (Maidstone, Inglaterra), la membrana de nitrocelulosa para *western blot* de BIORAD (Hercules, USA).

6.1.1 Materiales y medios para cultivo celular

Los siguientes materiales para cultivo celular se obtuvieron de Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Bélgica): frascos de 25 cm² y 75 cm², placas de 20 mm, 60 mm y 150 mm, pipetas estériles desechables de 5 ml y 10 ml y rastrillos estériles desechables.

Los tubos cónicos de polipropileno de 15 ml y 50 ml se obtuvieron de Falcon (St. Louis, USA). Los filtros de 0.22 μm se adquirieron de Millipore (Bedford, USA).

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Gibco Invitrogen (Carlsbad, CA): medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), F12 Nutrient Mixture, Advanced MEM, suero fetal bovino, tripsina-EDTA,

glutamina, piruvato, antibiótico-antimicótico, neurobasal, B27, penicilina, estreptomicina y Arabinósido de Citocina.

Los ARN de interferencia y el reactivo *Dharmafect* para realizar la transfección fueron obtenidos de Dharmacon, GE healthcare (Colorado, USA).

6.1.2 Sistemas Comerciales

El sistema para la transcripción reversa cDNA reverse transcription kit y el sistema para q-PCR Fast SYBR green master mix se obtuvieron de Applied Biosystems, life technologies (Carlsbad, USA).

Las sondas para microscopía Mitotracker red, Mitotracker green y Mitosox fueron obtenidas de Molecular Probes, Life technologies (Carlsbad, USA).

El sistema para para medir colesterol, Amplex red cholesterol assay, fue obtenido de Invitrogen, Life technologies (Carlsbad, USA).

El sistema para medir GSH en tejidos y células se obtuvo de Arbor Assays (Ann Arbor, USA).

El sistema para purificar mitocondrias se obtuvo de MACS, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania).

El sistema de quimioluminiscencia para visualizar la unión de los anticuerpos primarios a las muestras proteicas de un *western blot* se obtuvo de Perkin Elmer LifeSciences, Inc. (Boston, USA).

El sistema para medir transaminasas plasmáticas se obtuvo de Kovalent, Reagelabor (Sao Paulo, Brasil).

El sistema para medir la concentración de proteína BCA Protein Assay Kit, Pierce, Thermo Scientific (Waltham, USA)

6.1.3 Anticuerpos

El anticuerpo policlonal anti calbindina (AB1778) se obtuvo de Chemicon International Temecula, CA).

El anticuerpo policlonal anti nitrotirosinas (NITT12-A) se obtuvo de Alpha Diagnostic (San Antonio, TX).

Los anticuerpos secundarios anti-mouse y anti-rabbit conjugado con peroxidasa de rábano se obtuvieron de Upstate Charlottesville, USA).

Los anticuerpos secundarios anti-rabbit y anti-mouse conjugados con Alexa Fluor-488 y Alexa Fluor-594 fueron obtenidos de Molecular Probes (Eugene, OR).

Los anticuerpos monoclonales anti catepsina B (ab58802), anti CoxIV (ab14744) y los policlonales anti mitofusina 2 (ab50838), anti Opa1 (ab42364), anti FIS1 (ab71498) y anti MLN64 (ab3478) fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, UK).

El anticuerpo monoclonal anti citocromo C (556432) se obtuvo de BD Pharmingen (New jersey, USA). Los anticuerpos usados como control de carga, el anticuerpo policlonal de conejo anti b-actina fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology y el, anticuerpo policlonal de conejo anti anti- ϵ -COP fue donado gentilmente por el Dr Monty Krieger; Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.

6.1.4 Modelos de estudio

En el presente estudio se utilizaron líneas celulares, cultivo primario y animales de experimentación que se describen a continuación:

6.1.4.1 Fibroblastos deficientes de NPC1

En el laboratorio disponemos de líneas celulares de fibroblastos de ratón wild type (WT) y con mutaciones en el gen de *NPC1*. Los fibroblastos WT fueron gentilmente donados por el Dr. Schuchman del Source Department of Genetics & Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine (New York, USA). Los fibroblastos con mutaciones en la proteína NPC1 (*Npc1*^{-/-}) fueron donados gentilmente por el Dr. Petel Lobel del Departamento de Farmacia de la University of Medicine and Dentistry of New Jersey- Robert Wood Johnson Medical School (New Jersey, USA).

Los fibroblastos fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino y 1% de antibiótico-antimicótico a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora Water-Jacketed 3250 (Forma Scientific, Marietta, USA).

6.1.4.2 Células de Ovario de Hámster Chino deficientes de NPC1

Las células CHO-K1 fueron obtenidas de American Type Cultura Collection (ATCC) (Vancouver, Canadá). Las células CHO-K1 deficientes para la proteína NPC1 fueron gentilmente donadas por la Dra. Laura Liscum del Tufts University School of Medicine (Boston, Massachusetts, USA).

Estas células fueron mantenidas en medio de cultivo F12 suplementado con 7,5% de suero fetal de bovino y 1% de antibiótico-antimicótico a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora Water-Jacketed 3250 (Forma Scientific, Marietta, USA).

6.1.4.3 Neuronas de hipocampo de rata

Hipocampos de ratas Sprague-Dawley en estado embrionario fueron disecados, y los cultivos primarios de hipocampo fueron preparados como se describe por Alvarez et al. [49]. Las células hipocampales fueron sembradas en pocillos recubiertos con poli-lisina, mantenidas en medio neurobasal y suplementadas con B27, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de Estreptomicina por 5-7 días antes de los tratamientos posteriores. Para inhibir la proliferación glial, se añadió 2 uM de Arabinósido de citosina (AraC) en el tercer día del cultivo, el que fue removido dos días después.

6.1.4.4 Línea celular HT22

Las células HT22 son una línea celular neuronal de hipocampo que fueron obtenidas mediante la inmortalización de un cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón. Estas células fueron gentilmente donadas por la Dra. Alejandra Álvarez del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Los cultivos fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino y 1% de antibiótico-antimicótico a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora Water-Jacketed 3250.

Las neuronas (tanto las de cultivo primario como las HT22) fueron tratadas con U18666A a una concentración final de 1 µg/mL para tratamientos cortos (menores de 1 día) y de 0,5 µg/mL para tratamientos por tiempos largos.

6.1.4.5 Línea Celular HepG2

Las células HepG2 provienen de un hepatocarcinoma humano y poseen morfología epitelial. Estas células fueron obtenidas desde American Type Culture Collection (ATCC) (Vancouver, Canadá). Los cultivos fueron mantenidos en medio de cultivo Advanced MEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino y 1% de antibiótico-antimicótico a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora Water-Jacketed 3250. Al momento de la infección con adenovirus el medio de cultivo se cambió por Advanced MEM suplementado con 2% de suero fetal de bovino.

6.1.4.6 Animales de experimentación

En el Departamento de Gastroenterología disponemos de ratones silvestres BALB/c y deficientes para la proteína NPC1 (*Npc1*^{-/-}), BALB/c npc^{nih}, que fueron gentilmente donados por el Dr. Peter Pentchev (Sección de Patofisiología Celular y Molecular de la rama de Neurología Metabólica y del Desarrollo, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Además disponemos de los ratones de la cepa C57BL/6 que fueron utilizados para los experimentos de infección con adenovirus.

Los ratones se mantienen actualmente en el vivero del Departamento de Gastroenterología de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, a temperatura controlada (21°C) y sometidos a un régimen de luz correspondiente a ciclos alternados de 12 h (luz: 9 AM – 9 PM) para la mantención de un ritmo circadiano constante.

Los animales tienen libre acceso a agua y a una dieta estándar (Prolab RMH 3000) obtenida de PMI Feeds Inc. (Brentwood, USA). Esta dieta estándar tiene una composición de 22% de proteína, 5% de grasa y 0.02% de colesterol y permite una adecuada reproducción y crecimiento de los ratones manteniendo un estado metabólico estable.

Luego del destete, los ratones fueron genotipificados mediante PCR de DNA obtenido de la cola. Los procedimientos en ratones forman parte del proyecto Fondecyt 1110310 de la Dra. Zanlungo y cuentan con la aprobación ética correspondiente del Comité de Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina de la P. Universidad Católica de Chile.

6.2 METODOS

6.2.1 Anestesia, sacrificio y toma de tejidos de los animales

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de xilacina (0,12 mg por cada 10 g animal)/ketamina (0,8 mg por cada 10 g animal). Para preparar homogenizados de proteínas y extraer RNA se removió el hígado, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Para purificar mitocondrias se extrajo el hígado y se procedió inmediatamente a la homogenización. Para fijar los animales, éstos fueron perfundidos intracardiamente con 50 mL de NaCl 0,9% y posteriormente con PFA 4%. Los cerebros fueron removidos y mantenidos en postfijación con PFA 4% por 24 h. A continuación, los cerebros se mantuvieron en una solución de sacarosa al 30 % por 48-72 h. Los cerebros fueron cortados en un crióstato a 40 µm de espesor.

6.2.2 Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata

Los hipocampos de ratas en el día embrionario 18 fueron disectados y los cultivos fueron preparados como se describe brevemente. Se removieron los hipocampos de las ratas y se incubaron con tripsina 0,25% por 17 min. Luego se inactivó la tripsina con suero de caballo, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con medio Hanks 1X. Los hipocampos se resuspendieron en 2-3 mL de medio de

adhesión a 37°C y el tejido se disgregó con un suave pipeteo. Las células se centrifugaron, el pellet fue lavado con medio de adhesión y las células se volvieron a disgregar, utilizando una pipeta Pasteur de menor diámetro. Este proceso se repitió una tercera vez y luego las células se contaron en una cámara Neubauer. Las neuronas hipocampales fueron sembradas en placas cubiertas con polilisina y mantenidas en medio neurobasal suplementado con B27 con 100U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina por 5 días antes de tratarlas. Para inhibir la proliferación glial, a los cultivos se les agregó Arabinósido de Citocina (AraC) en el tercer día de cultivo quedando en una concentración final de 2µM por un tiempo total de 48 horas.

6.2.3 Tratamiento de células con U18666A

Los cultivos fueron tratados con U18666A a una concentración final de 1 µg/mL para tratamientos cortos (24 horas) y de 0,5 µg/mL para tratamientos por tiempos largos.

6.2.4 Transfecciones de células CHO

Las células CHO fueron mantenidas en medio F12 suplementado con SFB al 7,5%, 100 U/mL de penicilina y 100mg/mL de estreptomicina. Brevemente, se sembraron 1×10^6 de células CHO WT y NPC en placas de cultivo de 60 mm y luego de 24 horas se realizó la transfección con 15 µl de Dharmafect y la cantidad suficiente de siRNA para obtener una concentración final en la placa de 5 nM para cada siRNA empleado, tanto para siRNA-control (nontargeting siRNA #1, D-001210) y el siRNA-MLN64 (siGENOME dúplex #3 D-048833) que se encuentran en la plataforma de Dharmacon, y que fueron obtenidos de GE Healthcare Dharmacon. Después de incubar 5 min a temperatura ambiente se mezcló los siRNA con el reactivo de transfección dharmafect y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, se agregó la mezcla a cada pocillo, que contenían 3 ml de medio sin antibióticos. Se incubó 24 h a 37°C en atmósfera 5% CO₂ saturada de humedad. Luego de este período, el medio fue reemplazado por F12 completo por 72 horas. El grado de depleción de la proteína fue testeado por inmunofluorescencia contra MLN64.

6.2.5 Inmunofluorescencias indirectas de los cultivos celulares

Una vez finalizado el tratamiento de las células, éstas fueron lavadas con PBS 1X y fijadas en Paraformaldehído al 4%, Sacarosa 4% en PBS 1X suplementado con CaCl₂ 10 µM y MgCl₂ 1 µM (PBS-CM), por 20 min a temperatura ambiente y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1% por 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se bloqueó con una solución de Gelatina al 0,2% en PBS 1X por 20 min a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios fueron incubados en cámara húmeda, a 4°C durante toda la noche. Luego de lavar 3 veces por 15 min con PBS-CM se procedió a incubar el anticuerpo secundario en cámara húmeda, protegida de la luz, a temperatura ambiente por 2 h. Finalmente, se lavaron 3 veces por 15 min con PBS 1X y después de eliminar el exceso de líquido, se montaron con solución de montaje Fluoromont y se dejó polimerizar en oscuridad durante toda la noche. Las diluciones de los anticuerpos se prepararon en solución de bloqueo según se indica: anti rabbit nitrotirosina (NITT12-A, 1:100); anti rabbit MLN64 (ab3478, 1:500), anti mouse citocromo C (556432, 1:200), los anticuerpos secundarios anti-mouse y anti-rabbit conjugados con Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594 fueron utilizados en una dilución 1:1000.

6.2.6 Tinciones de filipina y Hoescht

Tinción con Filipina en células: después de haber realizado las inmunofluorescencias, las células se incubaron con Filipina 25 µg/mL por 30 min en oscuridad.

Tinción con Hoescht: una vez realizada las inmunofluorescencias, las células fueron incubadas con Hoescht (Sigma) a una concentración final de 0,05µg/mL por 30 min en oscuridad.

6.2.7 Homogenizados de proteínas de cultivos celulares y de tejido para western blot

Para lisar las células se utilizó la solución tampón RIPA alto detergente (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 1%, Deoxicolato Sódico 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) más inhibidores de proteasas (1 µg/µl 27 Leupeptina, 1 µg/µl Pepstatina, 1 mM PMSF), utilizando un volumen de 100 µl por cada placa de 60 mm. Luego de los raspados a 4°C, el homogenizado se pasa a tubos eppendorf y la suspensión obtenida se centrifugó a 13000 g por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante obtenido y se cuantificó la cantidad de proteínas totales presentes por el método del ácido bicinconinico (BCA) usando un sistema comercial.

Para la preparación de homogenizados de hígado se homogenizó el hígado completo, para posteriormente seguir con la purificación de mitocondrias, en amortiguador de homogenización (Manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EGTA 0,1 mM, BSA 1mg/ml, Hepes 10 mM) utilizando el un homogeneizador Dounce. Para homogenizar hígado congelado se tomaron 0,15 g de tejido hepático congelado y se mezclaron con 1 ml de amortiguador de homogenización (Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, sacarosa 0.25 M pH 7,2) y antiproteasas como PMSF (0,035g/ml de etanol), leupeptina (10mg/ml H₂O) y pepstatina (2mg/ml metanol) y se homogenizaron mediante un homogenizador mixer mil (Retsch).

El homogenizado resultante se centrifugó a 3000 g a 4°C por 10 min. Se recuperó el sobrenadante obtenido y se cuantificó la cantidad de proteínas totales presentes.

6.2.8 Análisis mediante western blot de lisados celulares y homogenizados de hígado

Para el análisis de western blot se utilizaron 50 µg de proteínas de lisado de células y 50 µg de homogenizado total de hígado. Las muestras fueron sometidas a electroforesis denaturante en un gel al 10%, 12% o 15% de poliacrilamida-0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) según el peso molecular de la proteína a analizar en amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v a 100 V por 1.5-2 h y luego transferidas a una membrana de PVDF o nitrocelulosa en amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20% v/v a 350 mA por 1 h. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada con 20 mL de leche al 5% en TBS suplementado con Tween 20 0,1% por toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo por una hora a temperatura ambiente. Para controlar la carga proteica de cada muestra, la membrana se cortó y se incubó con un anticuerpo policlonal anti ϵ -cop preparado en conejo en una dilución 1:5000 en TBS/Tween 20 0.1%/leche 5% por 1 h a temperatura ambiente. Luego, se procedió a lavar ambas membranas 3 veces con TBS/Tween 20 0,1% por 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente en una dilución 1:5000 SFB-10% en TBS/Tween 20 0,1%/leche 5% por 1 h a temperatura ambiente.

Las diluciones de los anticuerpos primarios usados fueron: anti MLN64 1:1000; anti catepsina B 1:1000, anti CoxIV 1:1000, anti mitofusina 2 1:1000, anti Opa1 1:1000, anti FIS1 1:250.

La unión del complejo anticuerpo primario/anticuerpo secundario a las muestras proteicas fue visualizada usando el procedimiento de quimioluminiscencia (Perkin Elmer Life Sciences, Inc.) y expuestas en un film Super HR-GB Fuji, que se reveló manualmente.

Las señales detectadas en los western blots se cuantificaron mediante el programa ImageJ.

6.2.9 Infección de células HepG2 con adenovirus Ad. MLN64

Las células HepG2 en cultivo fueron infectadas con una dosis previamente estandarizada de adenovirus Ad.MLN64. En placas de 60 mm de diámetro (80% confluencia) se infectó con 1.65×10^9 partículas virales en 3 ml de DMEM 2% suero fetal bovino, 1% antibiótico-antimicótico. Luego de 4 h se suplementaron con suero fetal bovino para alcanzar una concentración final de suero del 5%. A las 48 h post-infección se procedió a cosechar las células mediante raspado para posteriormente lisarlas

en una solución de lisis. A estos lisados se les midió la concentración de proteínas para realizar los ensayos de western blot y medición de colesterol.

6.2.10 Infección de ratones C57BL6/J con adenovirus Ad. MLN64

Para administrar el virus, los animales fueron anestesiados con isoflurano. Se ubicó la vena de la cola y se inyectó por vía intravenosa 1×10^{11} partículas de adenovirus recombinante en 0,1 mL de amortiguador fosfato salino con una jeringa insulina de 0,5 mL. Como grupos controles, se utilizaron animales inyectados con el adenovirus recombinante control Ad.E1Δ que no lleva ningún transgen. A las 48 h post infección los animales fueron sometidos a eutanasia y remoción del hígado, el cual se lavó en suero fisiológico y se congeló para su posterior uso.

6.2.11 Infección de células y ratones Balb/c con adenovirus Ad.shMLN64

Para disminuir los niveles de expresión de MLN64 *in vivo* se diseñó un adenovirus que contiene un shRNA para MLN64 de ratón. Este adenovirus fue creado usando el kit comercial Knockout™ Adenoviral RNAi System 1 (Clontech).

Para administrar el virus, los animales fueron anestesiados con isoflurano. Se ubicó la vena de la cola y se inyectó por vía intravenosa 1×10^{11} partículas de adenovirus recombinante en 0,1 mL de amortiguador fosfato salino con una jeringa insulina de 0,5 mL. A los 7 días post infección los animales fueron sometidos a eutanasia y remoción del hígado y plasma. El hígado fue usado posteriormente para purificar mitocondrias.

Las células fueron infectadas con una dosis de $1,4 \times 10^9$ partículas virales por cada $2,5 \times 10^6$ células utilizando el mismo procedimiento que para la infección con Ad.MLN64.

6.2.12 Fraccionamiento subcelular y purificación de mitocondrias

El fraccionamiento subcelular se realizó con el fin de obtener una fracción enriquecida en mitocondrias. Para esto se hizo un homogenizado de tejido (cerebro e hígado) usando un homogeneizador Dounce en 5 ml de amortiguador A (manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EGTA 0,1 mM, BSA 1mg/ml, hepes 10 mM) por cada 1g de tejido. El homogenizado se centrifugó 15 min a 700 g. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 10000 g. El precipitado que corresponde a las mitocondrias crudas se re suspendió en amortiguador B (sacarosa 395 mM, EGTA 0,1 mM, hepes 10 mM). El extracto crudo de mitocondrias fue sometido a ultracentrifugación por 35 min a 95000 g en un gradiente discontinuo de percoll. De esta ultracentrifugación se obtiene una banda que

corresponde a las mitocondrias purificadas. Esta banda es recuperada y sometida a una siguiente purificación mediante inmunoprecipitación.

6.2.13 Purificación de mitocondrias mediante inmunoprecipitación

Con el fin de obtener mitocondrias purificadas sin contaminación de otros organelos la fracción que se obtuvo al centrifugar el gradiente de percoll se procesó según instrucciones del fabricante del sistema comercial para purificar mitocondrias (MACS, Milenyi Biotec). Brevemente la muestra se incubó toda la noche en la disolución de separación y el anticuerpo anti-TOM22 acoplado a bolas magnéticas. Luego esta mezcla se pasó por las columnas de separación montadas en un soporte magnético. Finalmente para recuperar las mitocondrias las columnas fueron liberadas del soporte magnético y de la elución de las columnas se recuperó las mitocondrias purificadas. Las proteínas fueron cuantificadas con el método del BCA y las muestras congeladas a -20 °C hasta su uso.

La pureza de las fracciones fue comprobada mediante western blot usando como marcador de lisosomas la proteína catepsina B y como marcador de mitocondrias la proteína CoxIV.

6.2.14 Tinción con las sondas Mitotracker red, Mitotracker green y Mitosox

Para evaluar el potencial de membrana se utilizó la sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes), la que corresponde a una tinción fluorescente roja que tiñe mitocondrias en células vivas y cuya acumulación depende del potencial de membrana. Para marcar las mitocondrias de forma independiente del potencial de membrana se utilizó la sonda Mitotracker Green (Molecular Probes). Las células en cultivo se sembraron a un 40% de confluencia, se lavaron con medio HANK a 37°C y se incubaron con la sonda por 30 min a 37°C. Para extraer el exceso de sonda se lavó con HANK 3 veces por 10 min y se observó usando un microscopio confocal.

Para evaluar la producción de superóxido mitocondrial se utilizó la sonda fluorescente MitoSOX™ Red (Molecular Probes), que se dirige a la mitocondria selectivamente y es rápidamente oxidado por el superóxido mitocondrial, pero no por otras especies reactivas de oxígeno, produciendo fluorescencia roja. Las células en cultivo se sembraron a un 40% de confluencia, se lavaron con medio HANK a 37°C y se incubaron con la sonda por 10 min a 37°C. Para extraer el exceso de sonda se lavó con HANK, inmediatamente las células fueron observadas usando un microscopio confocal.

6.2.15 Estudio de morfología mitocondrial en células MEF

Para estudiar la morfología de las mitocondrias se utilizó la línea celular de fibroblastos de embrión de ratón (MEF), las que fueron transfectadas para expresar establemente la proteína fluorescente cerulean acoplada a la secuencia de destinación mitocondrial de 20 aminoácidos del C-terminal de la proteína humana Bcl-xL. Estas células fueron gentilmente donadas por el laboratorio de la Dra. Alejandra Álvarez de la Facultad de Ciencias Biológicas de la PUC. Las células fueron observadas al microscopio confocal, donde se obtuvieron imágenes en 3 dimensiones para posteriormente hacer un análisis estructural y determinar el porcentaje de esfericidad de las mitocondrias mediante el programa IMARIS.

Las MEFs fueron tratadas con U18 a una concentración de 1 μ g/ml por 24 h para evaluar la morfología mitocondrial en un modelo NPC. Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de MLN64 las MEFs fueron infectadas con 1,4 x10⁹ partículas virales por cada 2,5 x 10⁶ células por 48 horas.

6.2.16 Ensayo de funcionalidad mitocondrial por reducción del MTT

El ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) es un ensayo colorimétrico para la medición de la actividad de las enzimas mitocondriales que reducen el tetrazolio a un compuesto coloreado que se puede medir por espectrofotometría. Las células se sembraron a un 90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se agregó 250 μ l de MTT al 10 % en PBS. Las células se incubaron por 4 h a 37 °C. Posteriormente se agregó 200 μ l de solución para terminar la reacción de MTT y se incubó de 15-20 h a 37 °C. Finalmente se midió la D.O. 570 nm en el espectrofotómetro. Los resultados de viabilidad celular se expresaron como porcentaje de D.O. por mg de proteína, asumiendo los valores de los controles sin tratar como el 100%.

6.2.17 Consumo de Oxígeno de tejidos y células

Para medir consumo de O₂ en tejidos se utilizó homogenizado total o mitocondrias crudas utilizando el medio MiR05 (EGTA 0,5 mM, MgCl₂·6H₂O 3 mM, K-lactobionato 60mM, Taurina 20mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20mM, Sucrosa 110mM, BSA 1 g/l, pH 7,1) y se utilizó el equipo respirómetro Oxygraph-2k (OROBOROS instrument), el que tiene un sensor para medir con alta resolución el consumo de oxígeno, tanto de células intactas como de mitocondrias aisladas u homogenizado total de tejido.

Para medir consumo de O₂ en células se utilizó el equipo XF24 de Seahorse Bioscience. Las células fueron sembradas 20000 células en placas de 24 pocillos de Seahorse Bioscience 24 h antes del experimento. 1 hora antes de realizar la medición las células se lavaron en PBS 1X y se agregó 700 μ l

de DMEM sin suero y sin bicarbonato, suplementado con glucosa 10 mM, piruvato 1 mM y glutamato 2 mM y se dejaron a 37 °C por una hora.

Tanto para tejidos como células se utilizó el experimento clásico para evaluar consumo de O₂ que consiste en adicionar 3 compuestos a la muestra. La primera inyección es Oligomicina, que inhibe la síntesis de ATP por el bloqueo del canal de protones de la parte ATP sintetasa (complejo V), en consumo de Oxígeno en estas condiciones puede ser utilizado para distinguir el porcentaje de consumo de O₂ dedicado a la síntesis de ATP y el porcentaje de consumo de O₂ necesarios para superar la pérdida natural de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La segunda inyección es FCCP (cianuro de carbonilo-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine), que es un ionóforo portador de iones móviles. Se trata de un agente de desacoplamiento, ya que altera la síntesis de ATP por el transporte de iones de hidrógeno a través de la membrana mitocondrial en lugar del canal de protones de la ATP sintasa (complejo V). Este colapso del potencial de membrana mitocondrial conduce a un rápido consumo de energía y oxígeno sin la generación de ATP. En este caso, tanto la tasa de consumo de oxígeno (OCR) como la tasa de acidificación extracelular (ECAR) aumentarán, debido al desacoplamiento de OCR, y ECAR como el intento de las células para mantener su balance de energía mediante el uso de la glucólisis para generar ATP. El FCCP se puede utilizar para calcular la capacidad máxima respiratoria de las células. En la tercera inyección se añade rotenona, un inhibidor de Complejo I. Se observará una disminución de la OCR, debido a la función mitocondrial alterada, con un aumento concomitante de la ECAR ya que la célula se desplaza hacia un estado más glucolítico con el fin de mantener su balance energético.

6.2.18 Actividad de ATPasa

Esta técnica se basa en la determinación colorimétrica del fosfato inorgánico producido a partir de ATP por la ATPasa de muestras de mitocondrias aisladas de tejido según el método de Sumner [50]. Brevemente 1mg de proteínas de la fracción de mitocondrias purificadas fueron incubadas en 2 ml de amortiguador (KCL 100 mM, Tris/HCL 10mM, pH 7,3) a 30 °C por 5 min. Luego para empezar la reacción se adicionó ATP para llegar a una concentración final de 4 mM. A los 10 min la reacción se detuvo con 6% de ácido tricloroacético (TCA), se centrifugó a 2500 g por 10 min y se determinó el fosfato inorgánico liberado al sobrenadante mediante una reacción colorimétrica a una longitud de onda de 660 nm.

6.2.19 Medición del contenido de colesterol mitocondrial

El contenido de colesterol mitocondrial de hígado de ratones C57/BL6 se cuantificó en la fracción purificada de mitocondrias, mediante HPLC (high performance liquid chromatography) usando una columna de fase reversa μ Bondapak C18 10- μ m (30 cm $\times$ 4 mm diámetro interior) siguiendo el protocolo de Duncan y cols. [51].

El contenido de colesterol en mitocondrias purificadas de hígado de ratones Balb/C y en homogenizado de células se midió usando el sistema comercial *Amplex Red Cholesterol Assay* (Invitrogen).

Además para medir el contenido de colesterol mitocondrial en células se utilizó una aproximación indirecta de medición de colesterol colocalizando marcadores de mitocondria con marcadores de colesterol libre como Citocromo C y filipina respectivamente.

6.2.20 Determinaciones de glutatión hepático y mitocondrial

Para las determinaciones de glutatión en mitocondrias purificadas de hígado se utilizó un método enzimático que detecta la aparición de un compuesto coloreado que se produce a partir del DNTB, el cual es cuantificado en un espectrofotómetro. Las muestras se recolectaron en tubos que contenían 2 mL de una solución de ácido sulfosalicílico al 5% para evitar oxidaciones. Estas muestras se diluyeron 20 veces en este mismo ácido. Se tomaron 25 μ L de las diluciones, se les agregó 700 μ L de NADPH 25mg/100mL en amortiguador (buffer stock: 0,12M Na₂HPO₄, 0,023M NaH₂PO₄, 0,0063M EDTA, pH 7,5), 100 μ L de DTNB 6mM en amortiguador, 175 μ L de agua y 2 unidades de la enzima glutatión reductasa a cada muestra. Se incubó por 15 min y se determinó la absorbancia a 412 nm.

Para aislar el GSH citosólico del GSH mitocondrial en células se usó el protocolo descrito por Lluís y cols.[52]. Brevemente las células fueron despegadas usando un rastrillo y fueron resuspendidas en 100 μ L de PBS 1X. Esta suspensión de células fue mezclada con 100 μ L de digitonina (15 mg/ 10 ml de 250 mM manitol, 20 mM EDTA, 17 mM hepes). Esta mezcla fue centrifugada a 13.000 rpm por 2 min en un tubo que contenía TCA al 10% y una mezcla con 5 partes de silicona y 1 parte de parafina. Posterior a la centrifugación se forman dos fases acuosas, una sobre la silicona:parafina y otra abajo que contiene el TCA. El GSH citosólico se obtuvo de la fase acuosa sobre la silicona:parafina y el GSH mitocondrial se obtuvo de la fase acuosa con TCA. Finalmente el GSH en las fracciones se midió usando el sistema comercial *Glutathione Colorimetric Detection kit*, de Arbor Assays.

6.2.21 Microscopía electrónica de hígado de ratones Balb/C

Para estudiar la morfología mitocondrial en cortes de hígado se usó microscopía electrónica. Luego de sacrificar a los ratones se removió el hígado y se guardó un trozo de hígado en solución de fijado para microscopía electrónica. Posteriormente los tejidos fueron procesados por la Unidad de Microscopía Avanzada (UMA) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Chile y las fotografías fueron obtenidas en el Microscopio Electrónico de Transmisión de la misma unidad. El tamaño de las mitocondrias fue evaluado usando el programa Image J.

6.2.22 Tratamiento de los animales con GSH-EE y Piracetam

Desde el día post nacimiento 7 y hasta que de acuerdo a las tablas de supervisión diaria se determinó el sacrificio humanitario, los ratones Balb/C WT y *Npc1*^{-/-} fueron inyectados de forma diaria cada 12 h con GSH EE (1,25 mmol/ kg) o con suero fisiológico (vehículo). Además otro grupo fue tratado con una inyección diaria de Piracetam (300 mg/kg) a partir de las 4 semanas de vida hasta que se determinó el sacrificio. A partir de las 4 semanas de vida de los ratones se realizaron las pruebas conductuales y motoras.

6.2.23 Pruebas Locomotoras, ganancia de peso y supervivencia de ratones

Para la prueba de Hanging, los animales se colocaron con sus patas delanteras en el centro de una barra horizontal (3 mm de diámetro y 35 cm de longitud) donde se observó su comportamiento locomotor durante 30 s. En esta prueba al ratón se le asignó un puntaje de 0 a 5 basado en sus habilidades motoras, siendo cero el peor puntaje y 5 el máximo, de acuerdo a los parámetros definidos por Voikar y cols [53] . Los valores asignados fueron los siguientes: 0, se cae antes de 10 s; 1, se mantiene agarrado a la barra con sus dos patas delanteras; 2, trata de trepar con sus patas traseras hacia la barra; 3, se agarra a la barra con sus dos patas delanteras y una o dos traseras; 4, se agarra de la barra con su 4 patas y la cola; 5, se escapa activamente de la barra y llega hasta un extremo. Esta prueba se realizó a partir de las 4 semanas

Para la prueba de la barra los animales fueron entrenados desde las 4 semanas de vida para caminar sobre una barra de aluminio de 1 metro de largo y 3 cm de ancho. La prueba se realizó 1 vez por semana a contar de las 2 semanas de tratamiento. Se analizó el número de caídas de los animales, permitiendo un máximo de 5 caídas. Esta prueba fue adaptada de Voikar y cols [53].

Además los ratones fueron supervisados diariamente para registrar la ganancia de peso, ya que este parámetro es un indicador del estado de salud del animal. Adicionalmente, se realizaron estudios de

sobrevida, para lo cual los ratones NPC tratados fueron sacrificados cuando presentaron un deterioro significativo indicativo de sufrimiento de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Ética de Bienestar Animal.

6.2.24 Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ error estándar de la media. Las diferencias observadas entre los promedios de los parámetros determinados para todos los grupos fueron valoradas estadísticamente mediante la aplicación del test de *t-Student* para datos pareados, usando el software de análisis estadístico Graph Pad Prism (Graph Pad Software, Inc., San Diego, USA). Una diferencia entre grupos experimentales se consideró estadísticamente significativa cuando el valor *p* fue menor de 0,05.

7 RESULTADOS

7.1 Las células modelo de la enfermedad NPC presentan disminución del potencial de membrana y alteraciones en la morfología mitocondrial

La disfunción mitocondrial juega un rol clave en muchas enfermedades neurodegenerativas y con compromiso hepático [54], por lo que quisimos evaluar la función mitocondrial en varios modelos celulares de la enfermedad NPC.

Un buen modelo *in vitro* de la enfermedad NPC corresponde a células tratadas con el compuesto U18666A (U18), droga que produce acumulación de colesterol en lisosomas en las células generando un fenotipo NPC [55]. Además en el laboratorio disponemos de modelos genéticos que presentan mutaciones en el gen de NPC1 y no expresan la proteína. Como se muestra en la figura 4 nuestros modelos acumulan colesterol como se espera para las células NPC.

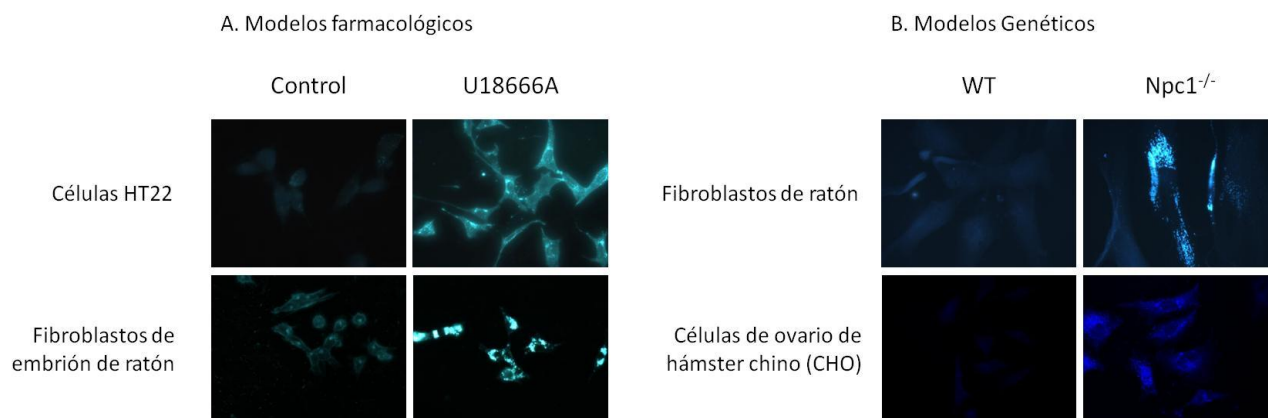


Figura 4: Los modelos celulares NPC acumulan colesterol libre.

Los diferentes modelos celulares fueron fijados y teñidos con 25 $\mu\text{g/ml}$ de filipina, para marcar colesterol libre, montados y observados al microscopio. (A) Para inducir el modelo NPC las células fueron tratadas con una concentración de U18666A de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ por 48 h. (B) Los modelos genéticos son células que tienen mutaciones en el gen de la proteína NPC1. Cada experimento se repitió 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 10 imágenes.

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial (PMM) se utilizó la sonda fluorescente Mitotracker Red (Molecular Probes®). Esta tinción es específica para mitocondrias y su acumulación depende del potencial de membrana.

Se evaluó el PMM en cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata (NHC), en células HT22 derivadas de cultivo primario de neuronas inmortalizadas de hipocampo de ratón, tratadas con U18, en fibroblastos de ratón y en células CHO con mutaciones en el gen de NPC1. Como se puede observar en la figura 5 todos los modelos evaluados presentan disminución en la intensidad de la fluorescencia de Mitotracker red (MT red), lo que indica que hay una disminución en el PMM. Al marcar las mitocondrias con MT red también se puede observar la morfología mitocondrial. En muchas oportunidades observamos que las mitocondrias de las células tratadas con U18 y de las células deficientes de NPC1 presentan una forma más pequeña y redondeada que las células control.

Como el MT red es una sonda que marca la mitocondria de forma dependiente del potencial de membrana no es la herramienta más adecuada para evaluar morfología mitocondrial, por lo que para corroborar alteraciones en la morfología mitocondrial en células NPC utilizamos fibroblastos de ratón en estado embrionario (MEFs) que fueron trasfectados para expresar establemente un constructo de la proteína fluorescente cerulean con la señal de destinación mitocondrial de la proteína Bcl-xL y fueron tratados con U18. En estas células es posible estudiar la morfología mitocondrial sin utilizar tinciones para visualizar la mitocondria que puedan ser perjudiciales para la célula. Como se observa en la figura 6 las células tratadas con U18 presentaron una marcada fragmentación de las mitocondrias, lo que fue evaluado cuantitativamente mediante un programa computacional diseñado para evaluar el porcentaje de esfericidad de las mitocondrias en imágenes obtenidas en 3 dimensiones (Slidebook software (Intelligent Imaging Innovations)). De acuerdo a nuestras observaciones al cuantificar el porcentaje de esfericidad, que mientras más cercano a 1 es más esférico, se encontró que el tratamiento con U18 aumenta el porcentaje de células con mitocondrias esféricas (round) en comparación a las células control (Fig. 6B).

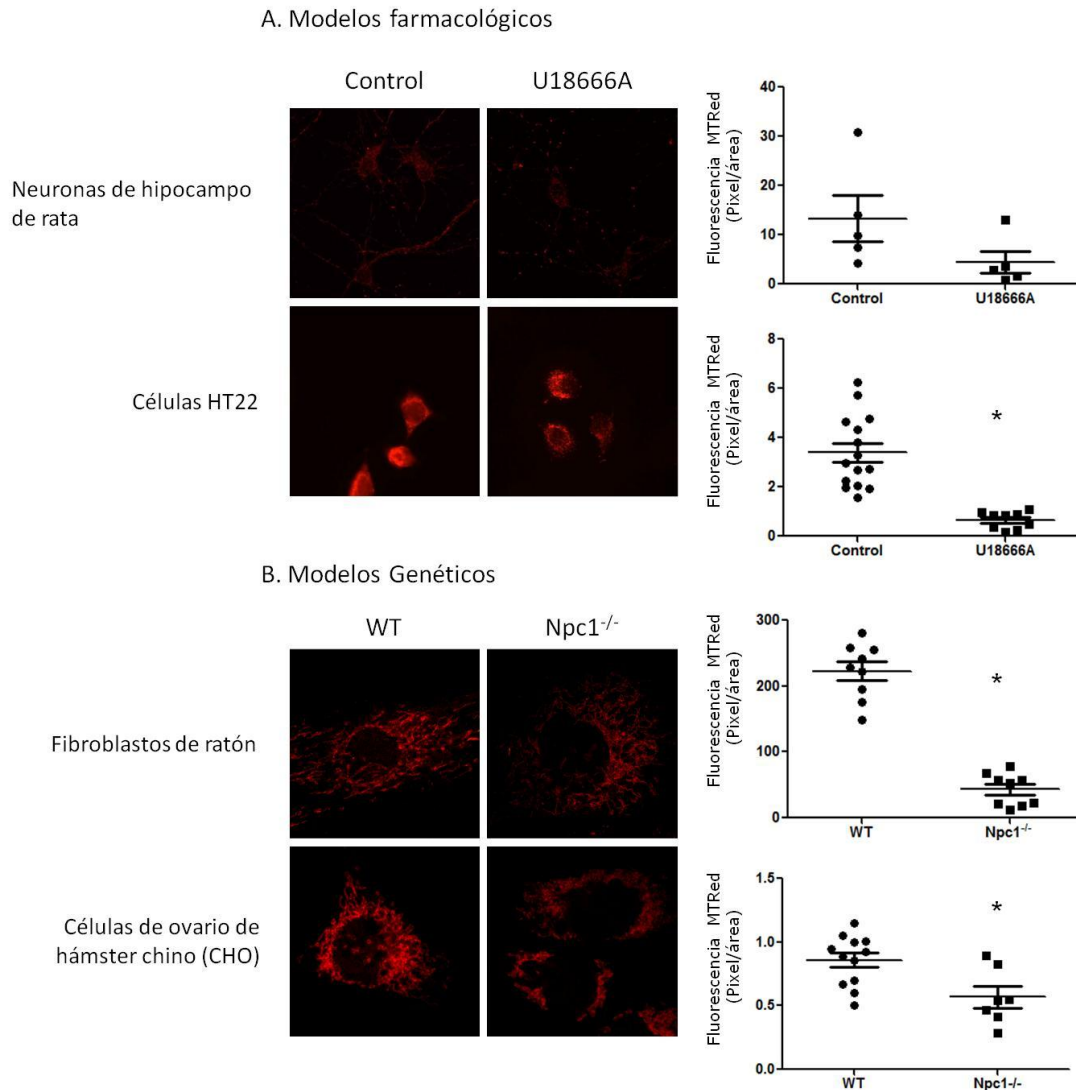
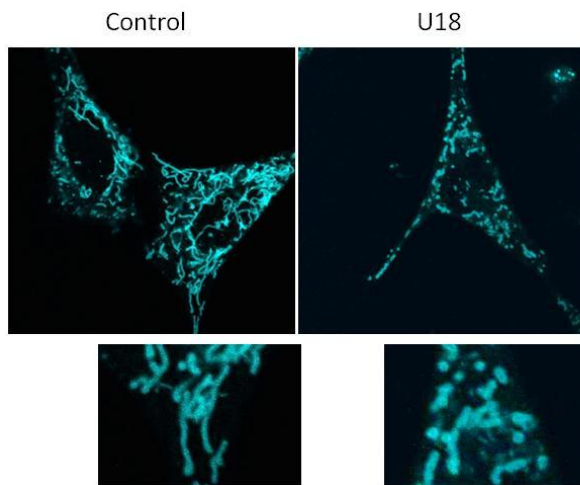


Figura 5: Los modelos celulares NPC presentan disminución en el potencial de membrana mitocondrial.

Los diferentes modelos celulares fueron teñidos con la sonda Mitotracker Red a una concentración 25 nM por 30 min a 37°C. Posteriormente fueron fijadas y montadas para ser observadas al microscopio. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó con el programa Image J. (A) Las neuronas de hipocampo de rata y las células HT22 fueron tratadas con U18666A 0,5 ug/ml por 48 h. (B) Fibroblastos de ratón y células CHO silvestres (WT) y fibroblastos y células CHO mutantes para la proteína NPC1 (*Npc1*^{-/-}). *diferencia significativa en comparación al control con $p < 0,05$ en test de T-Student. Cada experimento se repitió 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 10 imágenes de las cuales se realizó la cuantificación seleccionando como región de interés (ROI) cada célula por separado.

A. Microscopía Confocal células MEFS



B. Índice de esfericidad

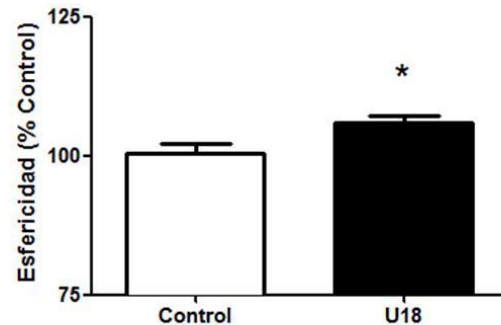


Figura 6: Los fibroblastos de embrión de ratón tratados con U18 presentan alteraciones en la morfología mitocondrial.

Los fibroblastos de embrión de ratón (MEF) con una transfección estable para expresar la proteína de fusión que contiene un dominio de destinación a la membrana externa mitocondrial acoplado a la proteína fluorescente cerulean fueron tratadas por 48h con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de la droga U18666A y observadas al microscopio confocal (A). Las imágenes fueron obtenidas en 3D para hacer un análisis completo de la morfología mitocondrial mediante el programa computacional IMARIS que cuantifica esfericidad de las mitocondrias (B). Cada experimento se repitió 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 3 imágenes en 3D.

Estas alteraciones en la morfología mitocondrial puede deberse a alteraciones en los procesos de dinámica mitocondrial que abarcan procesos de fusión y fisión. Para evaluar estos procesos analizamos la expresión de las proteínas reguladoras de la fusión como OPA1 y MFN2 y las reguladoras de la fisión con FIS1. Para realizar este experimento utilizamos el modelo genético de células CHO deficientes para NPC1 para evitar posibles artefactos inducidos por la droga U18.

Como se observa en la figura 7A las células CHO-NPC presentan alteraciones visibles en la morfología mitocondrial y al analizar las proteínas marcadoras de la dinámica mitocondrial encontramos que las células NPC presentan aumento en la proteína de fisión FIS1 (Fig.7B) en comparación con las células WT.

A. Mitotracker green en células CHO

B. Western blot FIS1, MFN2 y OPA1

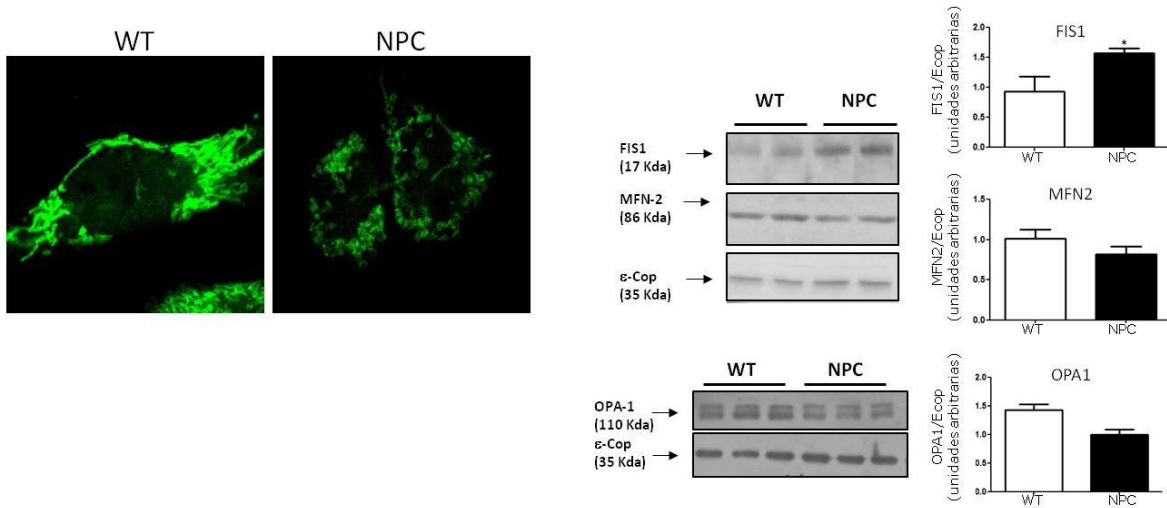


Figura 7: Las células CHO NPC presentan aumento del marcador de fisión FIS1

(A) Para evaluar la morfología mitocondrial las células fueron teñidas con la sonda fluorescente Mitotracker green y fueron observadas al microscopio de fluorescencia. Cada experimento se repitió 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 5 imágenes (B) Western blot de proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial. Las células fueron homogenizadas y para realizar el western blot se cargo 50 µg de proteína por carril. Las proteínas MFN2 y OPA1 son marcadores de fusión y la proteína FIS1 es marcador de fisión. Como control de carga se utilizó la proteína ε-cop. *diferencia significativa en comparación al control con $p < 0,05$ en test de T-Student. Cada experimento se repitió 3 veces, y cada set experimental se hizo por triplicado.

En conjunto estos resultados demuestran que existe disminución del potencial de membrana mitocondrial en diferentes modelos celulares NPC y que existen alteraciones en la morfología mitocondrial. Los resultados sugieren que los cambios en la morfología mitocondrial pueden deberse a alteraciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial.

7.2 Las mitocondrias de los tejidos de los ratones *Npc1*^{-/-} son más pequeñas y presentan alteraciones en la dinámica mitocondrial en comparación con las mitocondrias de los ratones WT

Ya que en modelos celulares NPC encontramos alteraciones en la morfología mitocondrial quisimos evaluar si estos resultados se reproducían en hígado de ratones *Npc1*^{-/-}.

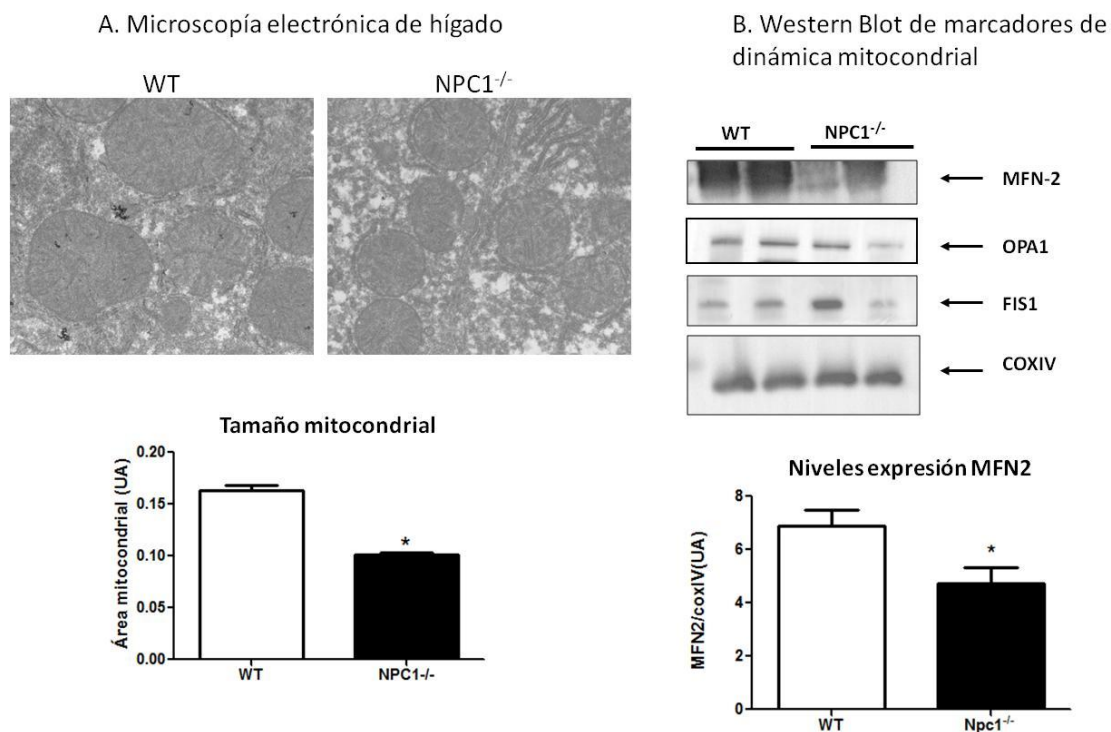


Figura 8: Las mitocondrias de hígado de ratones *Npc1*^{-/-} son más pequeñas y presentan disminución de MFN2

Los ratones fueron sacrificados a las 8 semanas de edad. El hígado fue extraído y una parte se conservó para la obtención de muestras de microscopía electrónica y el resto fue homogenizado para purificar mitocondrias. A) Análisis de hígado por microscopía electrónica, el tamaño mitocondrial fue cuantificado midiendo el área mitocondrial usando el programa imagen y los resultados fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. Se analizó hígado de dos ratones (WT y NPC), de cada hígado se analizaron 3 cortes histológicos y de cada corte se obtuvieron 5 imágenes. B) Para el análisis por Western blot de marcadores de la dinámica mitocondrial en cada carril se cargó 50 μ g de proteínas de la fracción enriquecida en mitocondria. La intensidad de cada banda se cuantificó usando el programa image J. Como control de carga se utilizó la proteína mitocondrial CoxIV. * diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. El experimento se realizó 3 veces con 3 individuos para cada fenotipo.

Para evaluar si en hígado de ratones había alteraciones en la morfología mitocondrial y si además existían alteraciones en los procesos de dinámica mitocondrial observamos hígado de ratones usando microscopía electrónica y evaluamos la expresión de proteínas marcadoras de dinámica mitocondrial. Como se observa en la figura 8A las mitocondrias de los hígados de los ratones *Npc1*^{-/-} son significativamente más pequeñas en comparación con las mitocondrias de los ratones WT. Como se observa en la figura 8B la expresión de la proteína de fusión MFN2 está disminuida significativamente en un 30% en las mitocondrias de hígado de ratones *Npc1*^{-/-} en comparación con las WT.

Estos resultados sugieren que el predominio de mitocondrias pequeñas en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} puede deberse a alteraciones en la dinámica mitocondrial, y que existe una disminución en la fusión.

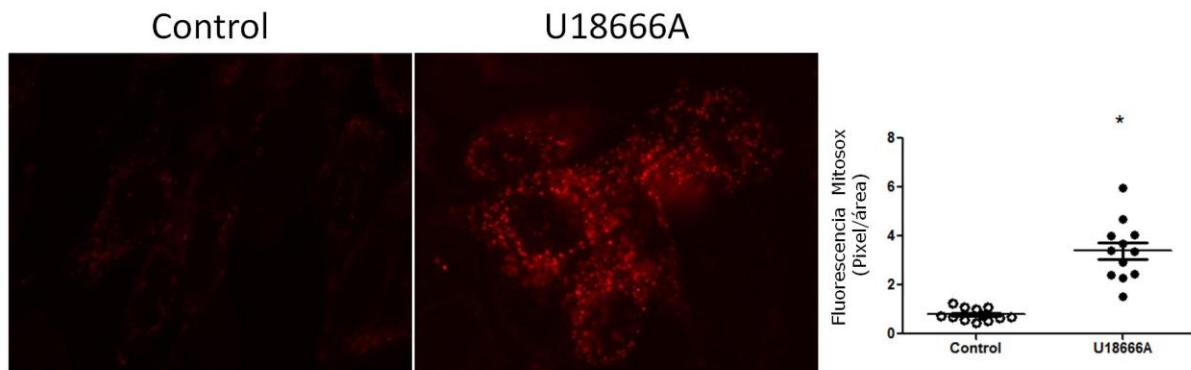
7.3 Las células modelo de la enfermedad NPC presentan aumento en la producción de superóxido mitocondrial

Para analizar si los cambios en el potencial de membrana observados en nuestros modelos NPC y los cambios en la morfología mitocondrial tenían consecuencias en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondrial, evaluamos la producción de superóxido mitocondrial en células HT22 tratadas con U18 y en células CHO NPC, usando la sonda fluorescente MitoSox (Molecular Probes) que ingresa a la mitocondria, es oxidado por el superóxido mitocondrial y es retenido en las mitocondrias.

En la figura 9A se puede observar que las células HT22 tratadas con U18 presentan un aumento significativo de MitoSox indicando la presencia de estrés oxidativo mitocondrial. Este resultado se reprodujo en las células CHO-NPC, como se observa en la figura 9B.

En conjunto hasta ahora los resultados demuestran que existen alteraciones en la función mitocondrial en diferentes modelos NPC. Estas alteraciones podrían relacionarse a un aumento del contenido de colesterol en la membrana mitocondrial, que se ha demostrado que es perjudicial para varios procesos que ocurren en la mitocondria [30, 34].

A. Células HT22



B. Células CHO

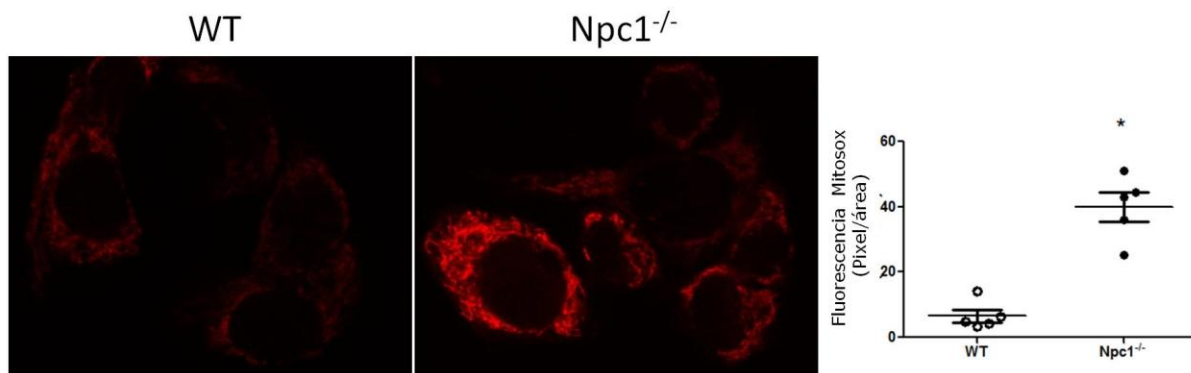


Figura 9: Las células modelo NPC presentan aumento de las especies reactivas de Oxígeno mitocondrial.

Los diferentes modelos celulares fueron teñidos con la sonda Mitosox a una concentración 5 mM por 20 min a 37°C. Inmediatamente fueron observadas al microscopio. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó con el programa Image J. A) Las células HT22 fueron tratadas con U18666A 0,5 ug/ml por 48 h. B) Células CHO silvestres (WT) y células CHO mutantes para la proteína NPC1 (*Npc1*^{-/-}). *diferencia significativa en comparación al control con $p < 0,05$ en test de T-Student. Cada experimento se repitió 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 10 imágenes de las cuales se realizó la cuantificación seleccionando como región de interés (ROI) cada célula por separado.

7.4 Los hígados de los ratones *Npc1*^{-/-} presentan aumento del contenido de colesterol mitocondrial

Se ha demostrado que una de las posibles causas de disfunción mitocondrial son cambios en la estructura lipídica mitocondrial, especialmente en el colesterol libre presente en la membrana [56]. Para evaluar el contenido de colesterol mitocondrial es necesario obtener una fracción pura de mitocondrias sin contaminaciones con otros organelos. Para medir el contenido de colesterol en células purificamos mitocondrias de lisados celulares de células CHO. Como se observa en la figura

10A fuimos capaces de obtener una fracción enriquecida en mitocondrias y con poca contaminación con otros organelos como los lisosomas. Al evaluar los niveles de colesterol celular total (Fig. 10B) no se observó diferencias entre las células silvestres (WT) y las células NPC. Este no era el resultado esperado, ya que como se muestra en la figura 4B las células CHO NPC acumulan colesterol, por lo tanto esperábamos encontrar un aumento en el contenido de colesterol total. Al evaluar el contenido de colesterol mitocondrial (Fig.10C) no encontramos diferencias. Probablemente el aumento de colesterol mitocondrial en estas células es muy discreto y es necesario utilizar otros métodos para cuantificar los niveles de colesterol mitocondrial en este modelo. De hecho utilizando un método indirecto de medición de colesterol otros grupos han demostrado que existe aumento del contenido de colesterol mitocondrial en células CHO NPC [25, 33, 36].

Dado que no encontramos diferencias significativas en las células CHO NPC y es muy difícil purificar mitocondrias con alto rendimiento y la alta pureza necesarias para medir colesterol mitocondrial decidimos evaluar el contenido de colesterol mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de ratón *Npc1*^{-/-}. Como se observa en la figura 10D obtuvimos mitocondrias de alta pureza, lo que se puede apreciar por la ausencia de los marcadores de endosomas tardíos y lisosomas Lamp1 y Catepsina B. De acuerdo a lo esperado los hígados de los ratones *Npc1*^{-/-} presentaron un aumento en el contenido de colesterol libre total (Fig. 10E). Interesantemente y de acuerdo a nuestra hipótesis encontramos que el colesterol mitocondrial se encuentra significativamente aumentado en mitocondrias de hígado de ratones *Npc1*^{-/-} en comparación a los WT (Fig. 10F).

Los resultados obtenidos, junto con otros datos publicados, sugieren que existe un aumento en el contenido de colesterol mitocondrial en las células y tejidos NPC.

Como se mencionó anteriormente el aumento de colesterol en la mitocondria es perjudicial para la función mitocondrial. El siguiente paso fue evaluar procesos celulares que se ha demostrado que están alterados cuando existen alteraciones en el contenido de colesterol mitocondrial.

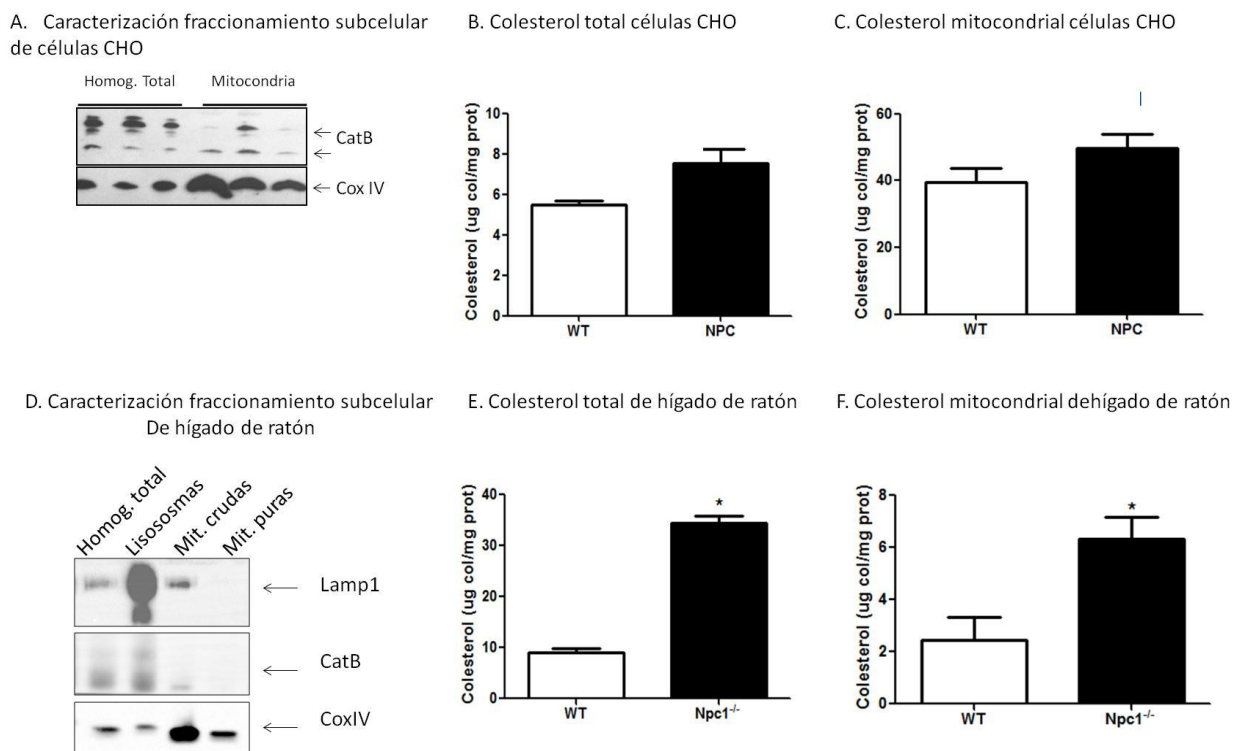


Figura 10: Las mitocondrias de hígado de ratón NPC presentan aumento del contenido de colesterol mitocondrial.

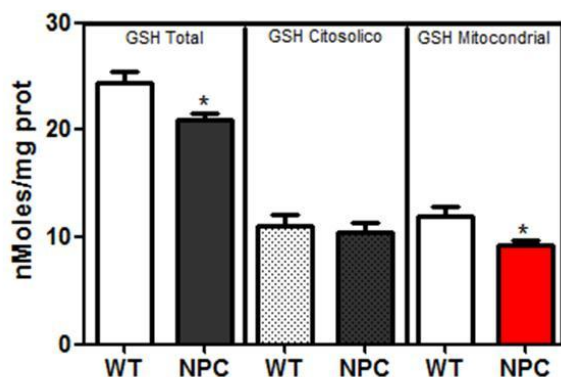
Para medir el colesterol mitocondrial se realizó un fraccionamiento subcelular. Para evaluar la pureza de la fracción mitocondrial se hizo western blot. En cada carril se cargó 50 µg de proteína. La proteína Catepsina B (CatB) y Lamp1 son marcadores de lisosomas, la proteína Cox IV es un marcador mitocondrial. El contenido de colesterol se midió usando un kit comercial (invitrogen) en el homogenizado total y en la fracción enriquecida en mitocondrias. (A) caracterización de mitocondrias purificadas de células CHO. (B) Colesterol total y (C) colesterol mitocondrial de células CHO. n=5 (D) Caracterización de mitocondrias purificadas de hígado de ratón. (E) Colesterol total y (F) colesterol mitocondrial de hígado de ratón n=5. *diferencia significativa en comparación al control con $p < 0,05$ en test de T-Student.

7.5 Las células NPC presentan disminución de la defensa antioxidante y aumento de estrés oxidativo.

El colesterol presente en las membranas mitocondriales determina la fluidez de las membranas y de esta fluidez depende el transporte de glutatión hacia la mitocondria [35]. El glutatión mitocondrial es un importante antioxidante y evita el exceso de radicales libres en la mitocondria. Los radicales libres, moléculas claves en el desarrollo de numerosas enfermedades y en particular el estrés oxidativo mitocondrial, se han demostrado determinantes en el control de la funcionalidad de la mitocondria y en consecuencia de la viabilidad celular. Como observamos que en las células NPC existe un aumento

del colesterol mitocondrial y además un aumento en la producción de anión superóxido quisimos evaluar los niveles de GSH. Como se observa en la figura 11A los niveles de GSH total y GSH mitocondrial están disminuidos en las células CHO-NPC en comparación con las células WT. Esta disminución en la defensa antioxidante podría explicar el aumento de ROS mitocondrial observado previamente.

A. Niveles Glutati6n en células CHO WT y NPC



B. Niveles de prote6nas nitrotirosinadas en células CHO WT y NPC

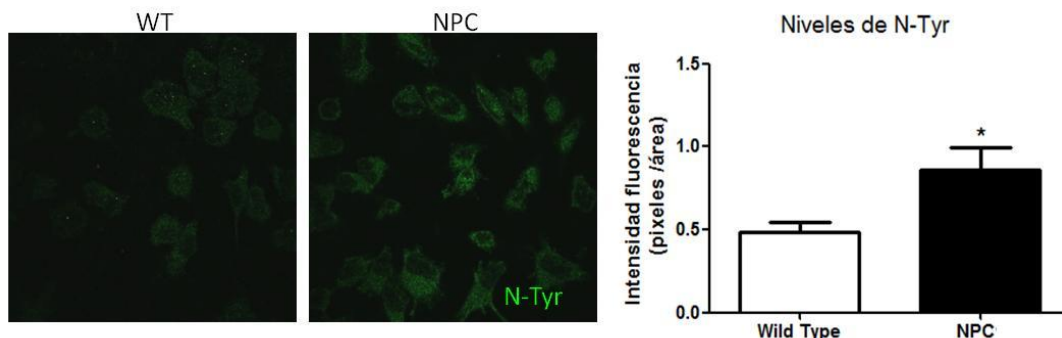


Figura 11: Las células NPC presentan disminuci6n de la defensa antioxidante y aumento del da6o oxidativo.

(A) El contenido de glutati6n (GSH) se midi6 en homogenizado total celular (GSH total), en la fracci6n citos6lica y en la fracci6n mitocondrial usando un kit comercial. n=5 (B) Las c6lulas CHO silvestres (WT) y las c6lulas CHO mutantes para NPC1 (NPC) fueron sembradas para realizar inmunofluorescencia contra prote6nas nitrotirosinadas usando un anticuerpo primario anti nitrotirosina (N-Tyr) y un anticuerpo secundario fluorescente verde (alexa fluor 488), fueron fijadas y observadas al microscopio. La fluorescencia fue cuantificada usando el programa ImageJ. * diferencias estad6sticamente significativas con $p < 0,05$ en comparaci6n al control. Cada experimento se repiti6 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 5 im6genes de las cuales se realiz6 la cuantificaci6n seleccionando como regi6n de inter6s (ROI) cada c6lula por separado.

Como ya habíamos encontrado un aumento en la producción de ROS mitocondrial y encontramos el GSH disminuido quisimos evaluar si las células NPC presentaban daño oxidativo. En la figura 11B se observa que las células CHO NPC presentan aumento en las proteínas nitrotirosinadas, en comparación con las células WT, lo que es un indicativo de la presencia de daño oxidativo celular. Estos resultados en conjunto sugieren que existe un desbalance en el estado redox de las células NPC y como consecuencia se produce un aumento del daño oxidativo. El aumento de producción de ROS en la mitocondria a la vez puede deberse por alteraciones en la cadena respiratoria. Una forma de evaluar el funcionamiento de la cadena respiratoria es evaluar el consumo de oxígeno en la célula.

7.6 Las células NPC no presentan alteraciones en el consumo de oxígeno en presencia de glucosa, piruvato y glutamato.

Es posible obtener Información valiosa sobre el estado fisiológico de las células a través de la medición de la tasa de oxígeno consumido por las células para la producción de ATP. Para evaluar la tasa de consumo de oxígeno (OCR) o respiración mitocondrial en células se usó el analizador XF (Seahorse Bioscience), el que mide en tiempo real el consumo de O_2 en las células de forma no invasiva. Además, las células también pueden generar ATP a través de la glucólisis, es decir, la conversión de glucosa a lactato, independiente de oxígeno. Este proceso también se puede cuantificar usando el analizador XF mediante la medición del ácido láctico producido indirectamente a través de los protones liberados en el medio extracelular que rodea las células, lo que provoca la acidificación del medio y proporciona la velocidad de acidificación extracelular (ECAR).

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) basal fue establecida por las primeras 3 mediciones como se muestra en la Figura 12A. Oligomicina, un inhibidor de la ATP mitocondrial-sintasa se inyectó en el medio para estimar el OCR acoplado a la síntesis de ATP. El OCR que permanece después de agregar oligomicina corresponde al OCR residual, éste menos el OCR no mitocondrial puede ser atribuido a la fuga de protones o “leak mitocondrial”. Al añadir el desacoplador FCCP para determinar la OCR máxima, seguido de antimicina-A, un inhibidor de la respiración mitocondrial, para determinar las fuentes no mitocondriales de consumo de oxígeno, se observó que las células WT y las células NPC no presentan diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Tampoco mostraron diferencias en la ECAR. Apoyando nuestros resultados, recientemente fue publicado un trabajo en el que se observó que las células CHO NPC no presentan cambios en el consumo de O_2 en comparación con células WT en presencia de glucosa. Sin embargo, en presencia de glucosa y glutamina si se

detectaron cambios significativos en la OCR basal, cambios en la razón ADP/ATP y la respiración máxima, lo que sugiere que existe un aumento en la glicólisis en las células NPC [36], los que nosotros no habríamos detectado por los sustratos utilizados en los experimentos.

Como las células *in vitro* son capaces de adaptarse a las condiciones de cultivo para sobrevivir, probablemente es más difícil ver los cambios en el consumo de oxígeno en estas condiciones y además como previamente habíamos encontrado cambios más significativos en hígado de ratón quisimos evaluar el consumo de oxígeno en tejidos de ratones *Npc1*^{-/-}.

7.7 Las mitocondrias aisladas de hígado de ratón *Npc1*^{-/-} no presentan alteraciones en el consumo de oxígeno y presentan alteraciones en la actividad de la ATPasa.

Previamente se demostró que no existen alteraciones en la función de los complejos I,II,III, IV y V mitocondriales en cerebro de ratones *Npc1*^{-/-}, encontrándose sólo alteraciones en el complejo V: ATPasa, ATPsintasa [25]. Sin embargo, para hacer estas mediciones se evaluó la actividad enzimática de estos complejos y no el consumo de oxígeno, que es una mejor herramienta para evaluar la funcionalidad de toda la cadena respiratoria en conjunto. Para determinar si existían alteraciones en la cadena respiratoria en hígado de los ratones *Npc1*^{-/-} nosotros cuantificamos el consumo de oxígeno usando el equipo Oxygraph-2k (Oroboros). Primero evaluamos la tasa de consumo basal, el leak mitocondrial, la respiración máxima y la respiración no mitocondrial y no encontramos diferencias entre las mitocondrias provenientes de los hígados de los ratones *Npc1*^{-/-} comparados con los ratones WT (Fig. 12B).

Posteriormente, evaluamos el consumo de oxígeno estimulando cada complejo de la cadena respiratoria con sus sustratos para determinar si había diferencias en la utilización de sustratos en hígado de ratones WT y *Npc1*^{-/-} y nuevamente no encontramos diferencias (Fig. 12C). Estos resultados sugieren que no existen alteraciones en el consumo de oxígeno en estas condiciones.

Como se mencionó anteriormente, se había descrito que los ratones *Npc1*^{-/-} presentaban alteraciones en la actividad de la ATPasa, y esta enzima es susceptible a los cambios del contenido de colesterol en la membrana mitocondrial [30]. Al evaluar la actividad de esta enzima en mitocondrias aisladas de hígado y de cerebro se encontró una disminución tanto en hígado como en cerebro de ratones *Npc1*^{-/-} (Fig. 12D).

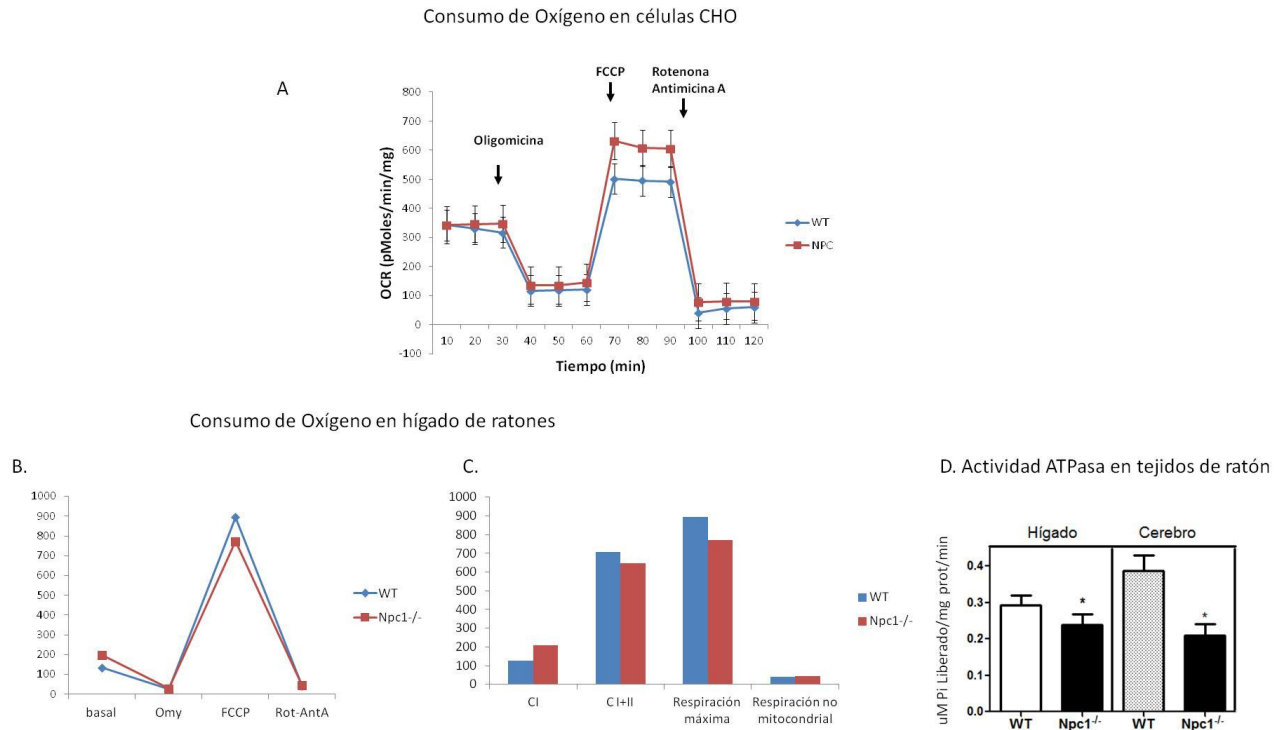


Figura 12: Las mitocondrias aisladas de hígado de ratón *Npc1*^{-/-} no presentan alteraciones en el consumo de oxígeno y presentan alteraciones en la actividad de la ATPasa

(A) Par medir consumo de oxígeno en células se utilizó el equipo XF-Seahorse. Las células fueron sembradas (50×10^3 cels/pocillo) con XF-DMEM en placas XF de 24 pocillos 24 horas antes de realizar la medición. Los valores de OCR se normalizaron con el contenido total de proteínas en los pocillos correspondientes y se expresaron como pmol / min / mg de proteína. 10x de: oligomycin (20mM), FCCP (10mM), antimicina A (40mM), y rotenona (10 mM) diluido en medios XF se cargan en los puertos de inyección indicadas en la placa. Cada punto es el promedio de 5 pocillos independientes de células WT y células NPC. n=2. (B) El consumo de oxígeno en hígado de ratón se midió en el respirómetro Oxygraph-2k (Oroboros Instrument). Cada gráfico es una imagen representativa de 3 mediciones. Se utilizó el medio MIR05. Se midió el consumo de oxígeno basal, luego se agregó oligomycin (omy), FCCP y finalmente rotenona y antimicina A. (C) El flujo de oxígeno en estado 2 atribuible al complejo I (CI) se midió mediante la adición Glutamato (concentración final 2 mM) y Malato (2mM), posterior a ello se agregó succinato (10mM) con lo que se midió la oxidación adicional del complejo II (CI + II). Para obtener la respiración máxima se agregó FCCP (1mM) Finalmente, el transporte de electrones a través de complejo I y III fue inhibida por la adición secuencial de rotenona (0.1 mM) y antimicina A (2,4 M) respectivamente para obtener el flujo de oxígeno independiente del sistema de transferencia de electrones. (D) Los ratones WT y *Npc1*^{-/-} fueron sacrificados a las 8 semanas y se extrajo hígado y cerebro. Las mitocondrias se purificaron de tejido fresco mediante ultracentrifugación. La actividad de la ATPasa fue determinada cuantificando el fosfato orgánico (Pi) liberado por minuto por mg de proteína. n=5. * diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ en comparación al control.

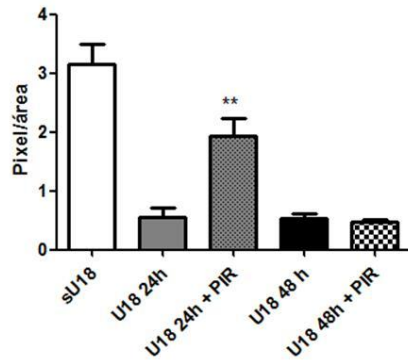
Finalmente con los resultados obtenidos hasta ahora podemos decir que se realizó una caracterización parcial de la función mitocondrial en modelos NPC y encontramos que existen alteraciones en células y tejidos NPC. Para evaluar la relevancia de estas alteraciones para la patogenia de la enfermedad se hicieron tratamientos con piracetam que aumenta la producción de ATP y con GSH-EE que recupera los niveles de GSH mitocondrial.

7.8 El tratamiento con Piracetam tiene un efecto protector de la función mitocondrial en células modelo de la enfermedad NPC

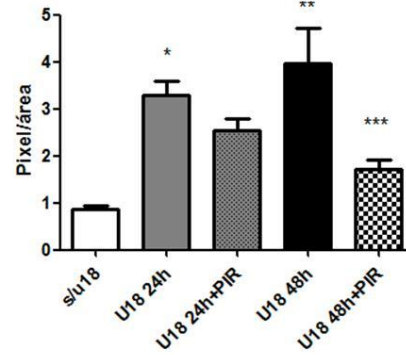
Los resultados anteriores sugieren que existe disfunción mitocondrial en células NPC, por lo que quisimos evaluar el efecto *in vitro* de Piracetam (PIR), molécula potenciadora de la función mitocondrial. Para evaluar el efecto de Piracetam se trataron células HT22 con la droga U18 por 24 y 48 h para inducir el fenotipo NPC. Además las células se trataron con una concentración 1 mM de la droga Piracetam por 24 h. Post tratamiento se analizó el PMM y la producción de superóxido mitocondrial. Como se observa en la figura 13A el Piracetam previene la bajada del PMM inducido por el U18 a las 24 h, sin embargo no es capaz de rescatar la bajada del PMM inducido por el U18 a las 48 h. En la figura 13B se observa que el Piracetam disminuye la producción de superóxido significativamente de las células tratadas por 48 h con U18. Estos resultados en conjunto sugieren que el Piracetam puede mejorar la disfunción mitocondrial inducida por la droga U18, por lo que el siguiente objetivo fue evaluar el efecto del Piracetam *in vivo* en ratones *Npc1*^{-/-}.

Los ratones *Npc1*^{-/-} y WT fueron tratados desde el día post natal 28 (p28) hasta las 8 semanas con una dosis diaria de 300 mg/Kg de Piracetam. El tratamiento no tuvo efecto positivo en la ganancia de peso (Fig. 13C). Ya que esta droga no tuvo efectos beneficiosos en ratones no se realizaron más ensayos en ratones por consideraciones éticas.

A. Mitotracker red en células HT22 tratadas con Piracetam



B. Mitosox en células HT22 tratadas con Piracetam



C. Ganancia de peso de ratones tratados con Piracetam

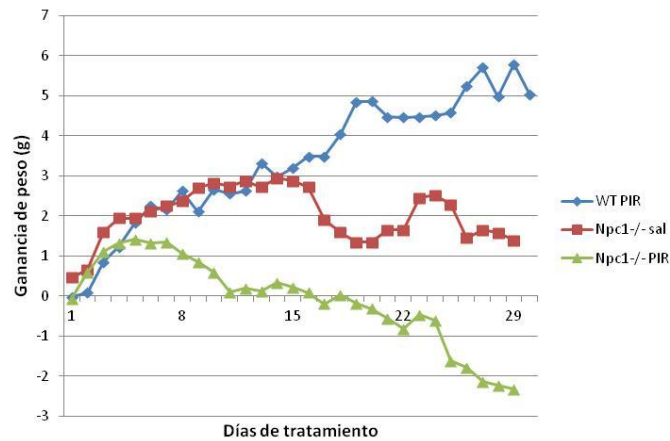


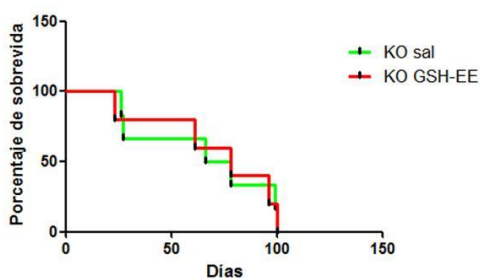
Figura 13: El tratamiento con Piracetam tiene un efecto protector de la función mitocondrial en células modelo de la enfermedad NPC

Las células HT22 fueron tratadas con U18666A por 24 y 48 h con una dosis de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Además se realizó un co-tratamiento de 24 h con una dosis de Piracetam 1mM. (A) Post tratamiento las células se incubaron con la sonda Mitotracker red por 30 min a 37°, se fijaron y se observaron al microscopio. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó usando el programa ImageJ. (B) Las células se incubaron con la sonda fluorescente Mitosox para determinar presencia de superóxido. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó usando el programa ImageJ. (C) Los ratones fueron tratados diariamente desde p28 hasta p60 con una dosis de 300 mg/ kg y fueron supervisados y pesados diariamente para evaluar el efecto del tratamiento. El n experimental fue el siguiente: WT PIR=1, *Npc1*^{-/-} (KO) salino=2, *Npc1*^{-/-} (KO) PIR=2. * diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ en comparación al control.

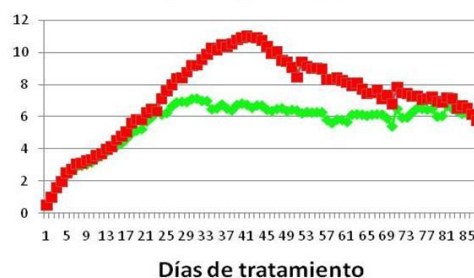
7.9 El tratamiento con GSH-EE produce un efecto positivo en la ganancia de peso de los ratones *Npc1*^{-/-}

Como se mostró anteriormente, los modelos de células NPC presentan disminución en los niveles de GSH mitocondrial. Por esta razón, tratamos a los ratones WT y a los ratones *Npc1*^{-/-} con éster de GSH (GSH-EE), una molécula derivada del GSH que no necesita de transportadores para llegar a la mitocondria ya que difunde pasivamente a través de las membranas. El objetivo de este tratamiento fue recuperar los niveles de mGSH en los ratones *Npc1*^{-/-} y así disminuir el estrés oxidativo y lograr una mejoría en estos ratones.

A. Curva de Kaplan-Meier



B. Ganancia de Pesos



C. Test Locomotores

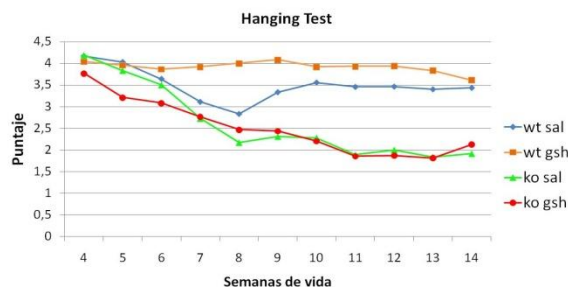
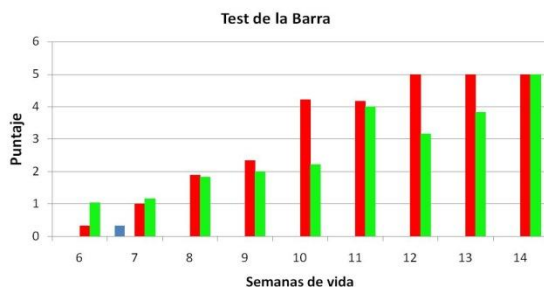


Figura 14: El tratamiento con GSH-EE produce un efecto positivo en la ganancia de peso de los ratones *Npc1*^{-/-}

Los ratones fueron tratados desde el séptimo día de nacidos cada 12 h con éster de glutatión (GSH-EE) o vehículo. (A) Curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier. (B) Los ratones fueron supervisados y pesados diariamente para registrar las variaciones en el peso durante el tratamiento. (C) Test para evaluar el compartimento locomotor de los animales. Para el test de la barra un puntaje más bajo indica mejor desempeño, en el caso del test "hanging" un mayor puntaje indica mejor desempeño. El n experimental para todos los test fue el siguiente: WT salino=4, WT GSH=2, *Npc1*^{-/-} (ko) salino=5, *Npc1*^{-/-} (ko) GSH-EE=6.

Al tratar los ratones con 1,25 mmol/kg de GSH-EE dos veces al días observamos un efecto positivo en la ganancia de peso entre las 5 y las 12 semanas de vida pero no observamos un aumento en la sobrevivida (Fig. 14). Al evaluar el comportamiento locomotor de los animales no observamos diferencias significativas en las pruebas de la barra y de “hanging”.

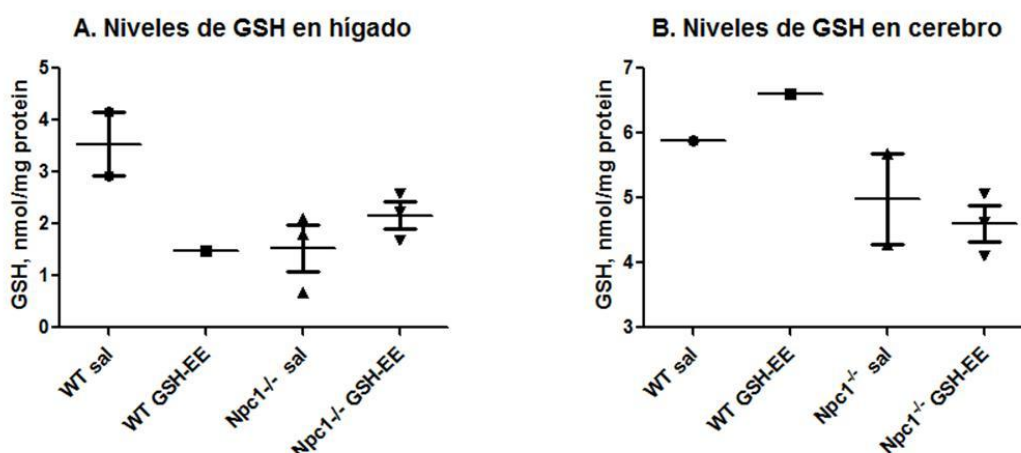


Figura 15: Niveles de GSH mitocondrial en tejido de ratones de 8 semanas WT y *Npc1*^{-/-}

Los ratones fueron tratados desde el séptimo día de nacidos cada 12 h con éster de glutatión (GSH-EE) o vehículo, fueron sacrificados y se purificó mitocondrias de hígado y de cerebro para medir GSH. (A) Niveles de mGSH en hígado de ratones. (B) Niveles de GSH en cerebro de ratones. n hígado: WT salino=2, WT GSH=1, *Npc1*^{-/-} (ko) salino=3, *Npc1*^{-/-} (ko) GSH-EE=3. . n cerebro: WT salino=1, WT GSH=1, *Npc1*^{-/-} (ko) salino=1, *Npc1*^{-/-} (ko) GSH-EE=3.

Estos resultados muestran que el tratamiento con GSH-EE produce un aumento en el peso de los ratones pero no logra aumentar la sobrevivida de los ratones *Npc1*^{-/-}. Esto puede explicarse porque la terapia no recupera los niveles de mGSH a los niveles esperados (Fig.15) en los ratones *Npc1*^{-/-}, probablemente debido la forma de administración o a la dosis usada.

En conclusión no pudimos evaluar la relevancia de la disfunción mitocondrial en la enfermedad de NPC y no se puede descartar que los resultados obtenidos con Piracetam y GSH-EE pueden deberse a que además de la disfunción mitocondrial en NPC existen otros factores que llevan a un aumento del

estrés oxidativo [54] y probablemente una terapia conjunta con otros antioxidantes podría tener mejores efectos.

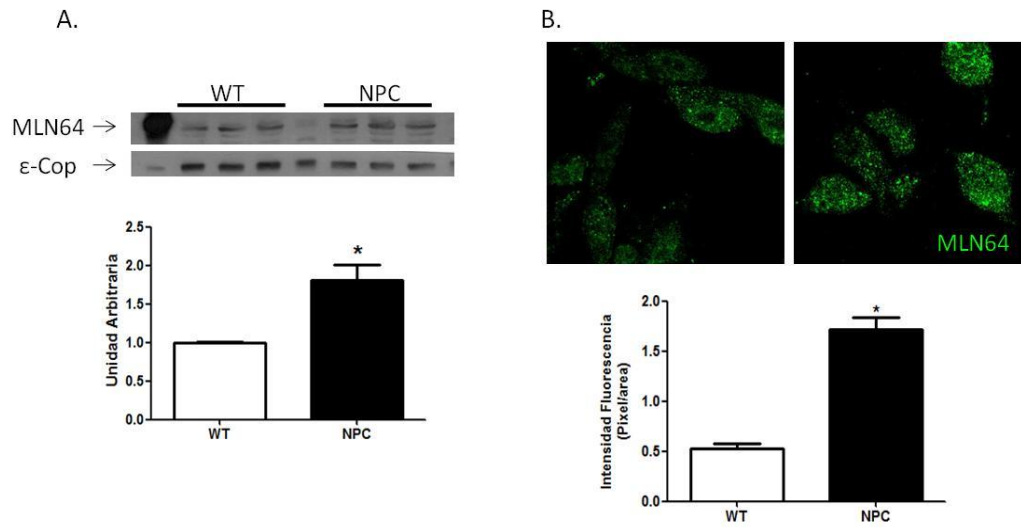
En esta tesis se propone que la disfunción mitocondrial en las células NPC es causada por un aumento del transporte de colesterol hacia la mitocondria. Un posible candidato responsable de este transporte de colesterol hacia la mitocondria es la proteína MLN64, ya que es una proteína se expresa en los endosomas y lisosomas en todos los tejidos y posee alta homología con la proteína StAR que transporta colesterol hacia la mitocondria en tejidos esteroideogénicos.

7.10 La expresión de MLN64 está aumentada en modelos NPC.

Interesantemente, al analizar la expresión de MLN64 en células CHO por Western blot (Fig. 16A) y por inmunofluorescencia (Fig. 16B) encontramos que las células NPC presentan mayores niveles de la proteína MLN64 que las células WT. En el hígado de ratones se encontró un aumento de 1,7 veces de la expresión génica de Mln64, evaluado por qPCR (Fig. 16C), y un aumento de 2,4 veces en los niveles de la proteína MLN64, evaluado por WB (Fig. 16D).

El aumento de expresión de MLN64 en modelos NPC se ha demostrado por primera vez en este trabajo. Este hallazgo y datos de la literatura sugieren que MLN64 podría estar involucrado en el aumento del contenido de colesterol mitocondrial observado en modelos NPC, por lo que decidimos evaluar la participación de esta proteína en la función mitocondrial y el contenido de colesterol mitocondrial en modelos NPC evaluando el efecto de la inhibición de la expresión de MLN64.

Niveles de Expresión de MLN64 en células CHO



Niveles de Expresión de MLN64 en hígado de ratones

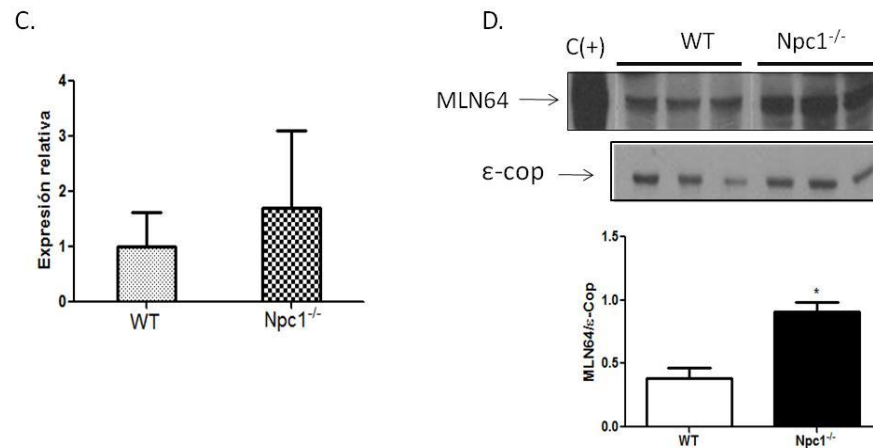


Figura 16: Los niveles de expresión de MLN64 están aumentados en modelos NPC.

(A) Western blot para MLN64, en cada carril se cargaron 50 µg de homogenizado total de células silvestres (WT) y células mutantes para NPC1 (NPC). Como control de carga se usó la proteína épsilon Cop (ε-Cop). La intensidad de las bandas fue cuantificada usando el programa imageJ. Como control positivo (C+) se utilizó homogenizado de células HepG2 infectadas con un adenovirus recombinante para MLN64. n=3 B) Las células WT y NPC fueron sembradas para realizar la inmunofluorescencia contra la proteína MLN64. Se usó un anticuerpo primario anti MLN64 y un secundario fluorescente verde (alexa fluor 488). La intensidad de la fluorescencia se cuantificó usando el programa ImageJ. Los ratones fueron sacrificados y se extrajeron trozos de hígado para preparar RNA y proteínas. (C) qPCR para MLN64, el *Npc1*^{-/-} fue comparado con el WT que presenta una expresión relativa 1 y los datos fueron normalizados por los valores del 18S. n=3 (D) Las proteínas del homogenizado total fueron separadas por electroforesis y analizadas por Western blot. Como control de carga se utilizó ecop. n=5 * diferencias estadísticamente significativas con p<0,05.

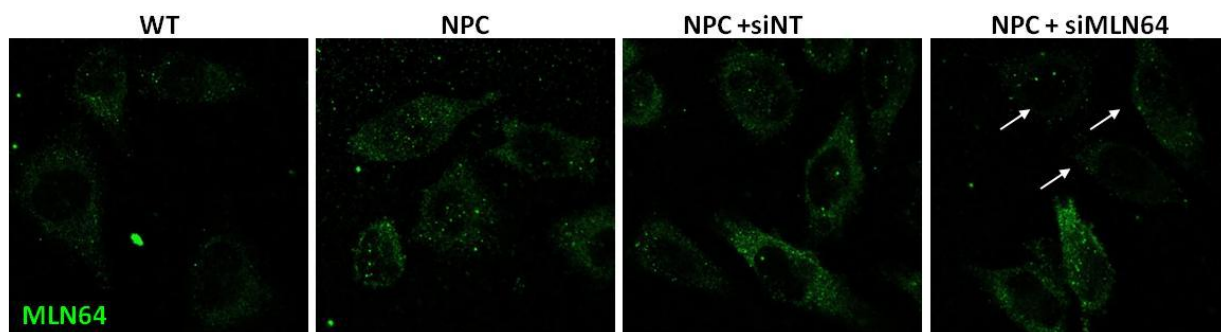
7.11 El siRNA contra MLN64 logra disminuir los niveles de la proteína y produce aumento del potencial de membrana y disminución de la producción de superóxido en células NPC.

Para estudiar la participación de MLN64 en la disfunción mitocondrial decidimos disminuir los niveles de MLN64 en las células CHO NPC, ya que previamente observamos que estas células tienen un aumento en la expresión de MLN64. Para disminuir los niveles de MLN64 usamos un ARN de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) dirigido contra la secuencia de MLN64 y probamos diferentes condiciones. Para chequear la efectividad de los siRNA evaluamos la expresión de MLN64 mediante inmunofluorescencia y qPCR. La expresión de MLN64 disminuye significativamente a las 72 y a las 96 h con una concentración de siRNA de 5 nM (datos no mostrados). Los siguientes experimentos se realizaron usando una concentración de 5 nM por 96 horas. Como se observa en la figura 17A la expresión de MLN64 no disminuye en todas las células transfectadas con el siRNA-MLN64, pero existen poblaciones de células que presentan disminución de la expresión de MLN64.

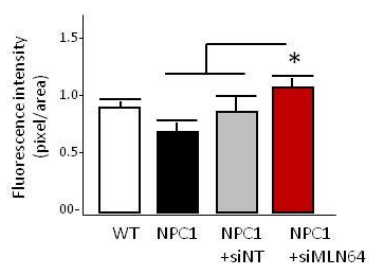
El siguiente paso fue determinar la función mitocondrial en las células tratadas con el siRNA. Como previamente se mostró que las células NPC presentan disminución del potencial de membrana, aumento en la producción de superóxido mitocondrial y disminución en el contenido de GSH, evaluamos estos parámetros en las células tratadas con siRNA-MLN64. Para cuantificar el PMM y la producción de superóxido mitocondrial sólo se consideraron las células que presentaban disminución en la expresión de MLN64.

Como se puede observar en la figura 17 las células NPC transfectadas con el siRNA-MLN64 presentan un aumento en el potencial de membrana y una disminución en la producción de superóxido en comparación con las células NPC sin transfectar. Al cuantificar los niveles de GSH en homogenizado total de células no se encontraron diferencias significativas entre las células NPC transfectadas con el siRNA-MLN64 y las células no transfectadas, sin embargo los niveles de GSH de las células NPC transfectadas con siRNA-MLN64 son comparables a los niveles de las células WT, lo que sugiere que la disminución de la expresión de MLN64 produce una recuperación en los niveles de GSH en las células NPC. En conjunto estos resultados sugieren que la disminución de la expresión de MLN64 es beneficiosa para las células CHO NPC y que este efecto beneficioso podría tener relación con una disminución en el transporte de colesterol hacia la mitocondria.

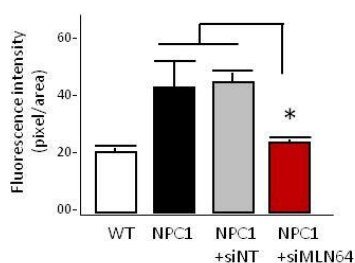
A Inmunofluorescencia para MLN64 en células CHO



B Mitotracker Red



C Mitosox



D GSH total

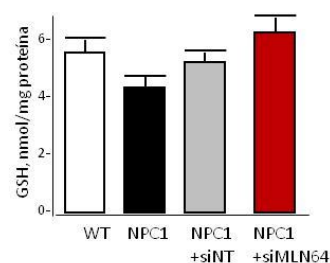


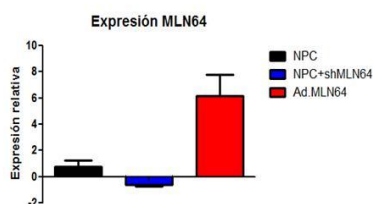
Figura 17: La depleción de MLN64 en células CHO NPC recupera el potencial de membrana mitocondrial y disminuye los niveles de ROS mitocondrial.

Las células CHO silvestres (WT) y las células CHO mutantes para Npc1 (NPC) fueron sembradas y transfectadas con una concentración de 5 μ M de siRNA por 96h. Para evaluar el potencial de membrana se utilizó tinción por Mitotracker red y para medir producción de superóxido mitocondrial se utilizó la sonda fluorescente Mitosox, posteriormente fueron fijadas y se realizó inmunofluorescencia con un anticuerpo primario anti MLN64 y un secundario fluorescente verde (alexa fluor 488). Para cuantificar la fluorescencia de ambas sondas se seleccionó sólo las células que presentaban disminución de la expresión de MLN64. A) inmunofluorescencia para MLN64 (verde). La intensidad de la fluorescencia de mitotracker red (B) y Mitosox (C) se cuantificó usando el programa ImageJ. Cada experimento se repitió 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 5 imágenes de las cuales se realizó la cuantificación seleccionando como región de interés (ROI) cada célula por separado. * diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ en comparación al control. D) el contenido de GSH total se midió en homogenizado total de células.

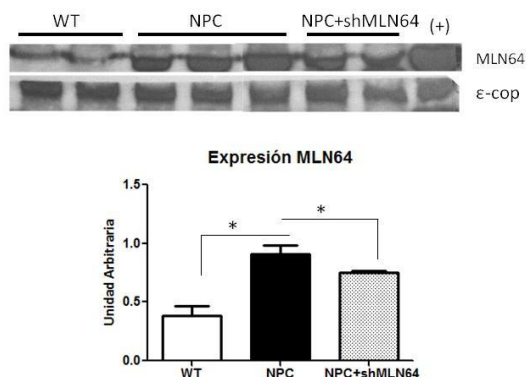
7.12 La depleción de MLN64 en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} produce disminución del colesterol total y aumento del contenido de colesterol mitocondrial

Para lograr mejores niveles de inhibición de la expresión de MLN64 se utilizó un adenovirus para expresar un ARN de interferencia (“short hairpin” RNA, shRNA) dirigido contra MLN64 y se infectó ratones *Npc1*^{-/-} logrando una disminución de la expresión de MLN64 en el hígado (Fig. 18A y B).

A. qPCR para MLN64

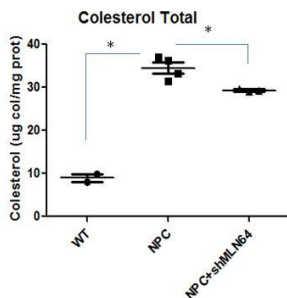


B. Western blot para MLN64



Contenido de Colesterol en hígado de ratones infectados con Ad.shRNA-MLN64

C.



D.

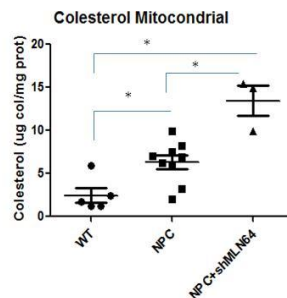


Figura 18: La depleción de MLN64 en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} produce disminución del colesterol total y aumento del contenido de colesterol mitocondrial

Los ratones WT y *Npc1*^{-/-} (NPC) fueron infectados con un adenovirus recombinante que contiene un shRNA contra MLN64 (Ad.shRNA.MLN64) por 7 días. Los ratones fueron sacrificados y se extrajeron trozos de hígado para preparar RNA y proteínas. (A) qPCR para MLN64, cada grupo fue comparado con el WT que presenta una expresión relativa 0 y los datos fueron normalizados por los valores del 18S. Como control positivo (+) se utilizó un animal infectado con Ad.MLN64. n=3 (B) Las proteínas del homogenizado total fueron separadas por electroforesis y analizadas por Western blot. Como control de carga se utilizó ecop. n=4 * diferencias estadísticamente significativas con p<0,05. (C) Colesterol total en homogenizado de hígado. n=4 (D) Contenido de colesterol de mitocondrias purificadas mediante ultracentrifugación, gradiente de percoll e inmunoprecipitación. n WT=5, n NPC= 8, n NPC+shMLN64= 3. * diferencias estadísticamente significativas con p<0,05.

Previamente vimos que los ratones *Npc1*^{-/-} tienen aumentados los niveles de colesterol mitocondrial y nuestra hipótesis es que MLN64 transporta colesterol hacia la mitocondria en células NPC. Al contrario de lo que esperábamos encontramos un aumento del contenido de colesterol mitocondrial y una disminución del colesterol libre total (Fig. 18C y D) en hígado de ratones que fueron infectados con el adenovirus shRNA-MLN64. Estos resultados inesperados son interesantes ya que es primera vez que se observa que la depleción de MLN64 produce aumento de colesterol mitocondrial en tejidos NPC y a la vez son controversiales con otros resultados publicados en otros tipos celulares. Hasta ahora no tenemos una explicación para estos resultados, que parecen ser contrarios a nuestra hipótesis. Es posible especular que la disminución de la expresión de MLN64 activa una vía de transporte adicional de colesterol a la mitocondria. Un posible candidato sería la proteína NPC2, la que se ha reportado puede mediar transporte de colesterol a la mitocondria en ausencia de NPC2[57].

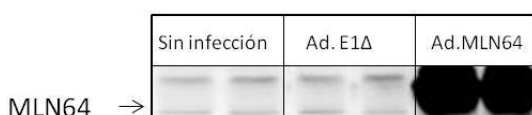
La información que existe hasta ahora sugiere que la función de MLN64 es compleja y puede estar regulada por muchos factores. Por otra parte, es posible que la función de MLN64 se encuentre alterada en modelos NPC. Si bien el modelo de inhibición de la expresión de MLN64 entregó información interesante, es posible que parte de la respuesta observada se deba al aumento compensatorio en la expresión de otras proteínas involucradas en el transporte de colesterol a la mitocondria en el ratón NPC. Considerando lo anterior quisimos complementar nuestros resultados con un modelo de sobreexpresión de MLN64 en ratones silvestres.

7.13 La sobreexpresión de MLN64 en hígado de ratón y células HepG2 produce aumento del contenido de colesterol mitocondrial

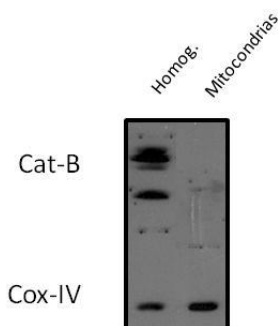
Para lograr la sobreexpresión de MLN64 en hígado utilizamos un adenovirus recombinante que contiene el cDNA de MLN64, Ad.MLN64, y lo inyectamos vía venosa en ratones C57BL6/J silvestres. Al infectar los ratones con Ad.MLN64 por 48 h logramos sobreexpresar la proteína MLN64 en el hígado (Fig. 19A). Para medir el contenido de colesterol mitocondrial purificamos mitocondrias por fraccionamiento subcelular y luego por gradiente de percoll, de manera de obtener una fracción libre de contaminación por otros componentes celulares (Fig. 19B). Concordante con nuestra hipótesis se observó que los hígados de los ratones que sobreexpresan MLN64 presentaban mayor contenido de colesterol mitocondrial que los ratones que fueron infectados con un adenovirus control Ad.E1Δ (Fig. 19C).

Para medir el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el contenido de colesterol mitocondrial en hepatocitos en cultivo infectamos células HepG2 con el Ad.MLN64 y se realizó una purificación de mitocondrias mediante inmunoselección magnética. Sin embargo, el rendimiento de la técnica no nos permitió obtener la cantidad de mitocondrias necesarias para medir los niveles de colesterol. Como alternativa se realizó una tinción de mitocondrias con el anticuerpo fluorescente anti-citocromo C (CytC), y se marcó el colesterol libre con filipina y consideramos como colesterol mitocondrial la colocalización entre ambas marcas.

A. Western blot para MLN64



B. Caracterización fracción mitocondrial



C. Niveles de colesterol mitocondrial

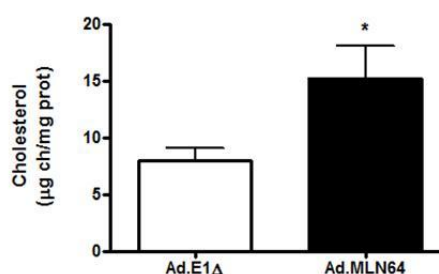


Figura 19: La sobreexpresión de MLN64 en hígado de ratón produce aumento del contenido de colesterol mitocondrial

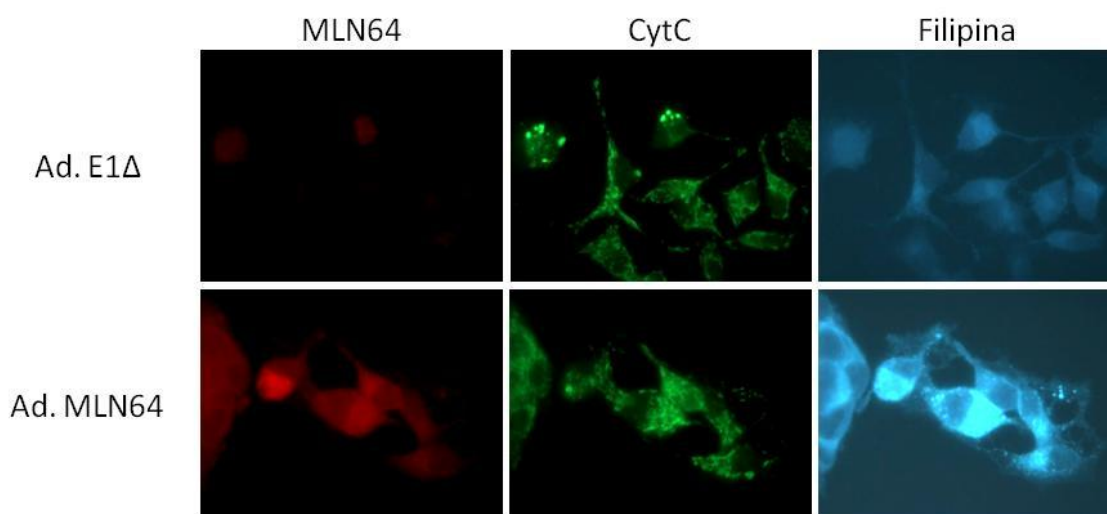
Los ratones fueron infectados con una dosis única de adenovirus de 1×10^{11} partículas virales por 48 h. Post infección se extrajo el hígado y se realizó fraccionamiento subcelular y purificación de mitocondrias por gradiente de Percoll. A) Western blot anti MLN64 de homogenizado total de hígado. B) caracterización de la pureza de la fracción mitocondrial mediante western blot para el marcador lisosomal catepsina B y el marcador mitocondrial coxIV. C) Niveles de colesterol medidos por HPLC en la fracción de mitocondrias purificadas. $n=5$. * diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ en comparación al control.

Como se observa en la figura 20A, las células que sobreexpresan MLN64 presentan mayor tinción para filipina. Al colocalizar la marca para filipina con la marca para CytC (Fig. 20B) encontramos que las

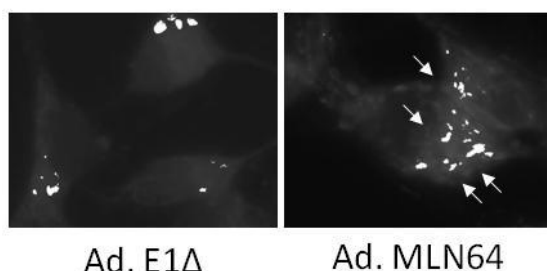
células que sobreexpresan MLN64 presentan un mayor índice de Pearson (Fig. 20C), indicando que las mitocondrias de estas células tienen mayores niveles de colesterol.

Estos resultados sugieren que MLN64 mediaría el transporte de colesterol hacia la mitocondria tanto en hígado de ratones como en células HepG2.

A. Inmunofluorescencia para MLN64, CytC y filipina



B. Colocalización de CytC y filipina



C. Coeficiente de Pearson



Figura 20: Contenido de colesterol mitocondrial en células HepG2 infectadas con un adenovirus recombinante para MLN64.

Las células HepG2 fueron infectadas por 48 h con un adenovirus recombinante que carece de la región codificante (Ad.E1Δ) y con un adenovirus que codifica para la proteína MLN64 (Ad.MLN64). A) Inmunofluorescencia para MLN64 (rojo), CytC (verde) y tinción para filipina en células HepG2. B) Colocalización de la proteína CytC y filipina. C) Coeficiente de Pearson de la colocalización entre CytC y filipina. Cada experimento se repitió 3 veces. Se cuantificaron 5 imágenes por set experimental.

7.14 La sobreexpresión de MLN64 produce alteraciones mitocondriales en hígado de ratones y en células HepG2.

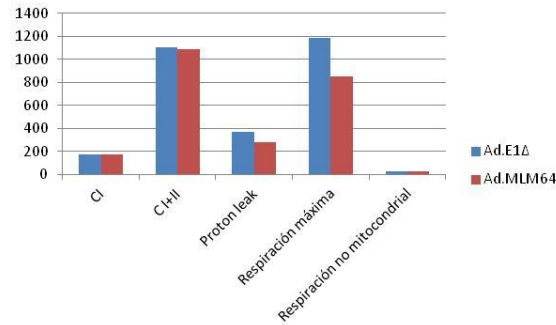
En el resultado anterior se demostró que la sobreexpresión de MLN64 produce aumento del colesterol mitocondrial en hígado de ratones y en células HepG2 en cultivo.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la función mitocondrial medimos el consumo de oxígeno y la actividad de la ATPasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratón. Como se observa en la figura 21A la sobreexpresión de MLN64 produce una disminución en la respiración máxima, lo que indica posibles alteraciones en la utilización de sustratos o disminución en la integridad de la cadena transportadora de electrones.

Al analizar la actividad de la ATPasa mitocondrial (Fig. 21B) encontramos que la sobreexpresión de MLN64 produce una disminución significativa de la actividad de la ATPasa, lo que podría relacionarse a un aumento del contenido de colesterol mitocondrial, ya que existen evidencias que un aumento en el contenido de colesterol en la membrana mitocondrial produce alteraciones en la actividad de la ATPasa [25, 30].

Al infectar las células HepG2 con un adenovirus recombinante para MLN64 encontramos que no todas las células sobreexpresaban MLN64, pero interesantemente sólo las células que sobreexpresaban MLN64 presentaron disminución en el PMM (Fig. 22A). Además, al evaluar la producción de superóxido mitocondrial usando la sonda Mitosox encontramos que las células que sobreexpresaban MLN64 presentaban mayor fluorescencia para Mitosox, lo que indica mayor producción de superóxido en mitocondrias (Fig 22B). Para controlar que la infección con el adenovirus no fuera la causante de estos fenómenos usamos el adenovirus control Ad.E1Δ. El Ad.E1Δ no produjo disminución en el potencial de membrana ni aumento en la fluorescencia de Mitosox. Lo siguiente que quisimos evaluar fueron los niveles de GSH mitocondrial (mGSH) y además la funcionalidad mitocondrial usando el ensayo de MTT ((3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio de bromo). La figura 22C muestra que los niveles de mGSH están significativamente disminuidos en las células que sobreexpresan MLN64. Al evaluar la viabilidad o funcionalidad mitocondrial por MTT encontramos que la infección con Ad.MLN64 producía una disminución significativa de la funcionalidad mitocondrial (Fig.22D).

A Consumo de oxígeno de Mitocondrias aisladas de hígado



B Actividad ATPasa de mitocondrias aisladas de hígado

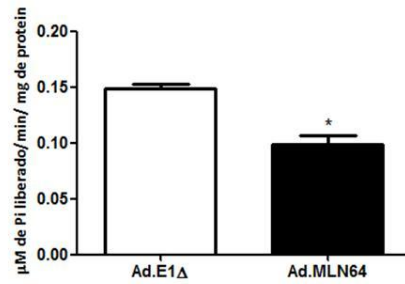


Figura 21: Consumo de oxígeno y actividad ATPasa en mitocondrias de hígados de ratones infectados con un adenovirus recombinante para MLN64.

Los ratones fueron infectados con un adenovirus recombinante y 48 h post-infección fueron sacrificados. El hígado de homogenizó y se purificaron mitocondrias mediante ultracentrifugación. A) Se midió la respiración celular en mitocondrias utilizando el respirómetro Oxygraph-2k (Oroboros Instrument). Cada gráfico es una imagen representativa de 3 mediciones. Se utilizó el medio MiRO5. El flujo de oxígeno en estado 2 atribuible al complejo I (CI) se midió mediante la adición Glutamato (2 mM) y Malato (2mM), posterior a ello se agregó succinato (10mM) con lo que se midió la oxidación adicional del complejo II (CI + II). Para obtener el “proton leak” se agregó oligomicina (20 mM). Para obtener la respiración máxima se agregó FCCP (1mM). Finalmente, el transporte de electrones a través de complejo I y III fue inhibida por la adición secuencial de rotenona (0.1 mM) y antimicina A (2,4 M) respectivamente para obtener el flujo de oxígeno independiente del sistema de transferencia de electrones. n=3 B) La actividad de la ATPasa fue medida en mitocondrias aisladas y se cuantificó el Pi liberado por minuto por mg de proteína. n=5. * diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$.

Estos resultados en conjunto sugieren que la sobreexpresión de MLN64 produce disfunción mitocondrial *in vivo* e *in vitro*, la que, por los resultados anteriores, puede ser atribuida a un aumento del contenido de colesterol mitocondrial.

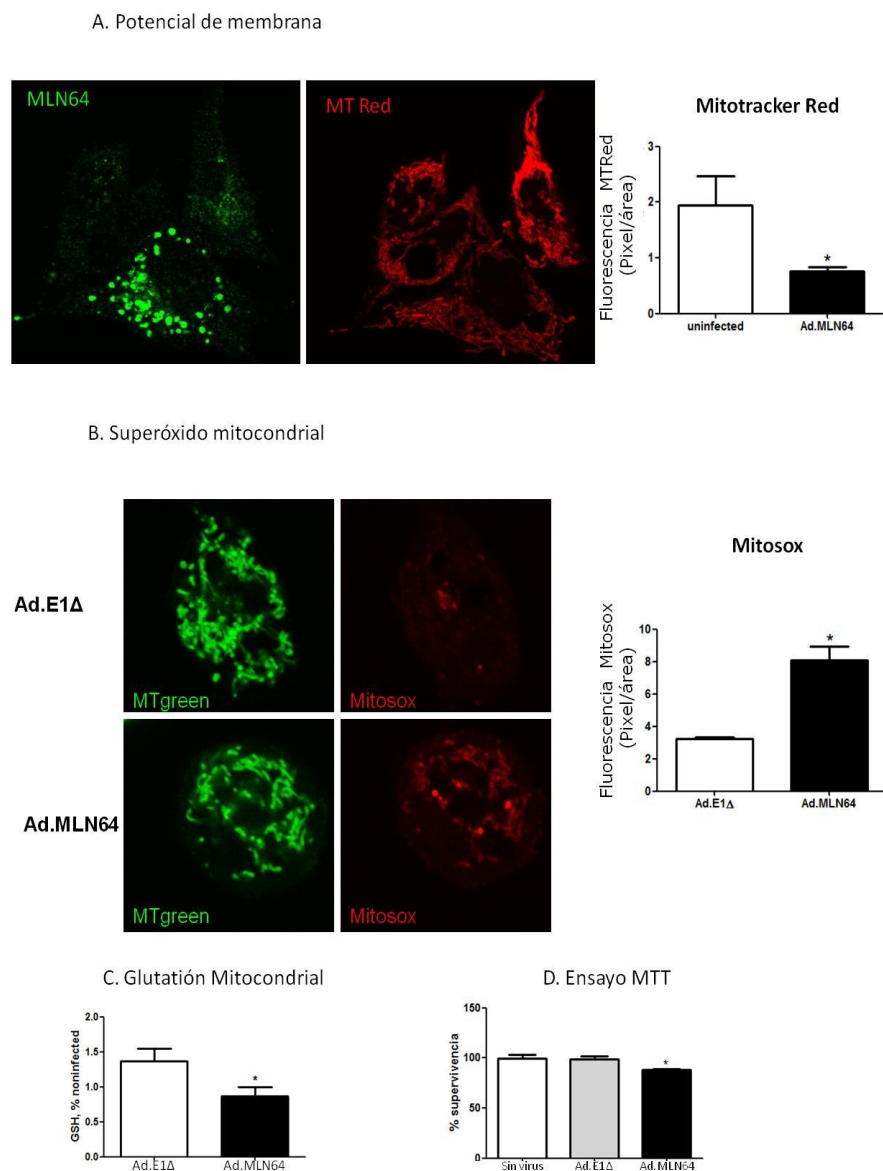


Figura 22: Alteraciones de la funcionalidad mitocondrial en células HepG2 infectadas con un adenovirus recombinante de MLN64.

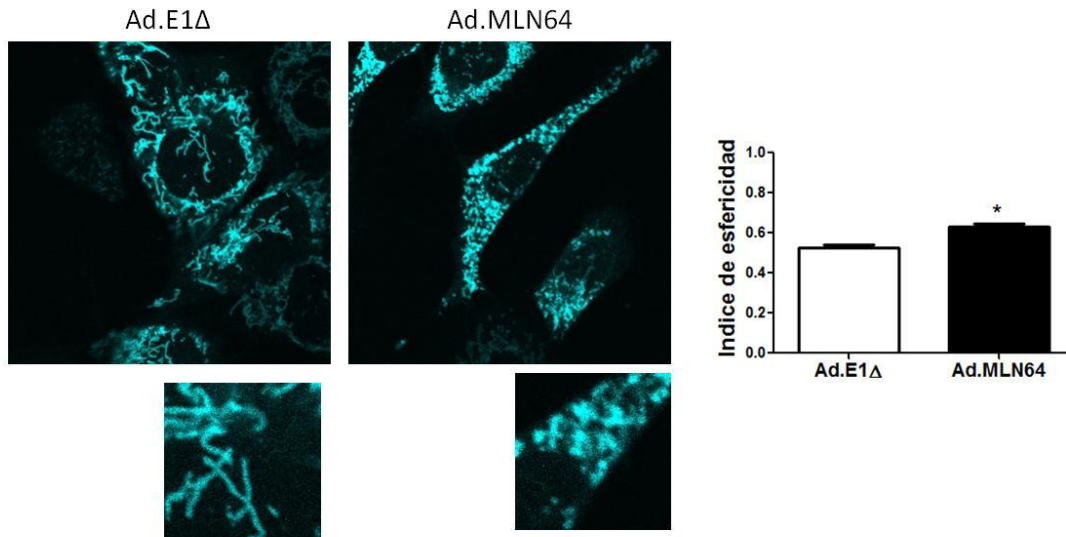
Las células HepG2 fueron infectadas por 48 h con un adenovirus recombinante que carece de la región codificante (Ad.E1Δ) y con un adenovirus que codifica para la proteína MLN64 (Ad.MLN64). A) para evaluar el PMM se usó la sonda fluorescente Mitotracker Red. Para identificar las células infectadas con el Ad.MLN64 se realizó una inmunofluorescencia para marcar MLN64 (verde). La intensidad de la fluorescencia de mitotracker Red se cuantificó utilizando el programa ImageJ. B) Para cuantificar la producción de superóxido en la mitocondria se usó la sonda fluorescente Mitosox. C) Los niveles de glutatión mitocondrial se midieron según el método de Tietze y fueron normalizados por los niveles de glutatión mitocondrial de las células que no fueron infectadas. n=5. D) Para evaluar la funcionalidad de la mitocondria se realizó el ensayo de MTT. n=5. * diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ en comparación al control.

7.15 Las células que sobreexpresan MLN64 presentan alteraciones en la morfología mitocondrial y en marcadores de dinámica mitocondrial

Cuando sobreexpresamos MLN64 en células HepG2 con el adenovirus Ad.MLN64 encontramos que un porcentaje alto de las células infectadas por 48 h presentaban alteraciones en la morfología mitocondrial, presentando mitocondrias más pequeñas y redondeadas. Para corroborar estas observaciones se infectaron con Ad.MLN64 las células MEFs transfectadas establemente con la proteína Bcl-xL-Cerulean para visualizar las mitocondrias. Como se observa en la figura 23A las mitocondrias de las células infectadas con Ad.MLN64 se ven más pequeñas y redondeadas en comparación a las infectadas con el Ad.E1Δ. Al cuantificar el porcentaje de esfericidad se encontró que la sobreexpresión de MLN64 aumenta en un la esfericidad de las mitocondrias (Fig. 23A). Estos resultados sugieren que podrían existir alteraciones en la dinámica mitocondrial en las células que sobreexpresan MLN64.

Por este motivo evaluamos marcadores de dinámica mitocondrial por Western blot y qPCR. Como se ve en la figura 23B la sobreexpresión de MLN64 produce una disminución significativa en los niveles de la proteína de fusión MFN2. En conjunto estos resultados sugieren que la sobreexpresión de MLN64 produce aumento en el contenido de colesterol mitocondrial y alteraciones en la morfología y en la dinámica mitocondrial en hígado de ratones y en células.

A. Microscopía Confocal células MEFS



B. Western blot de proteínas reguladoras de dinámica mitocondrial

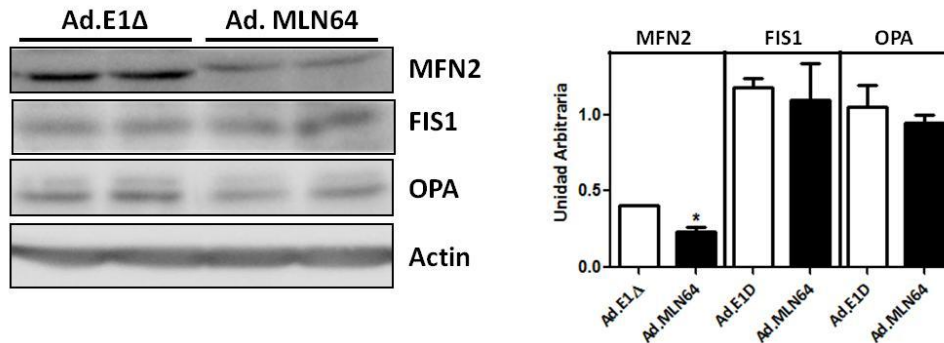


Figura 23: Las células que sobreexpresan MLN64 presentan fragmentación mitocondrial y disminución de MFN2.

(A) Los fibroblastos de embrión de ratón (MEFS) con una transfección estable con una proteína de fusión que contiene un dominio de destinación a la membrana externa mitocondrial acoplado a la proteína fluorescente cerulean (plasmido OMM-cerulean) fueron infectadas con un adenovirus recombinante que carece de la región codificante (Ad.E1Δ) y con un adenovirus que codifica para la proteína MLN64 (Ad.MLN64) por 48 horas, observadas al microscopio confocal y analizadas para calcular el índice de esfericidad (Round). Cada experimento se repitió 3 veces. Para cada set experimental se obtuvieron 3 imágenes en 3D. (B) Las células HepG2 fueron infectadas por 48 h con Ad.E1Δ y con un Ad.MLN64, fueron homogenizadas y para realizar el western blot se cargó 50 µg de proteína por carril. Cada experimento se repitió 3 veces por duplicado. Las proteínas MFN2 y Opa1 son marcadores de fusión y la proteína FIS1 es marcador de fisión. Como control de carga se utilizó la proteína actina. *p<0.05

En conjunto los resultados obtenidos hasta ahora permiten proponer que MLN64 media el transporte de colesterol hacia la mitocondria, que el aumento del colesterol mitocondrial tiene un efecto negativo sobre la función mitocondrial y que además MLN64 produciría alteraciones en proteínas reguladoras de la dinámica y función mitocondrial como MFN2. Además los resultados sugieren que MLN64 participaría en las alteraciones mitocondriales observadas en los modelos NPC, ya que las alteraciones que se vieron en las células que sobreexpresan MLN64 son similares a las obtenidas en las células NPC, que además presentan niveles aumentados de MLN64.

8 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la existencia de alteraciones mitocondriales en modelos NPC *in vitro* e *in vivo* y sugieren fuertemente que el mecanismo por el cual se producen estas alteraciones involucra el aumento del contenido de colesterol mitocondrial y la participación de la proteína MLN64.

8.1 Disminución del potencial de membrana y aumento del contenido de colesterol mitocondrial en modelos NPC

El primer objetivo de este trabajo fue determinar si existían alteraciones mitocondriales en modelos NPC, como se ve en la figura 5 todos los modelos NPC *in vitro* que evaluamos presentaron disminución del potencial de membrana. Aunque previamente se había demostrado que neuronas y astrocitos *Npc1*^{-/-} presentan disminución del potencial de membrana y disfunción mitocondrial [25], no se había determinado la causa de estas alteraciones. Nosotros proponemos que estas alteraciones se producen, al menos en parte, por aumento en el contenido de colesterol mitocondrial en células NPC. Previamente se había reportado que las células NPC presentan alteraciones en los niveles de colesterol mitocondrial [19, 25, 33, 57] y además se había demostrado que el aumento de colesterol mitocondrial afecta la fluidez de las membranas [27], disminuye la producción de ATP [25] y produce mayor liberación de proteínas proapoptóticas mitocondriales en células NPC[28].

Una disminución del potencial de membrana también se ha reportado en modelos de la enfermedad de Alzheimer, donde se ha observado que las mitocondrias de las células cercanas a los agregados del péptido A β presentan disminución del potencial de membrana y mitocondrias fragmentadas [58]. Estas alteraciones funcionales y estructurales pueden explicar el aumento del daño oxidativo y de la muerte celular provocada por el péptido A β y también podría constituir un mecanismo patogénico en la enfermedad de NPC, ya que se ha visto en modelos NPC que también existe acumulación de péptido A β [59]. Cabe destacar que un aumento en los niveles de colesterol mitocondrial hacen más susceptibles a las células al daño por péptido A β [28], lo que apoyaría nuestra hipótesis del daño mitocondrial inducido por colesterol en la membrana mitocondrial.

Otros autores atribuyen la bajada del potencial de membrana en células NPC a las alteraciones reportadas en la homeostasis del calcio. El calcio es un importante mediador de la función mitocondrial, aumenta la utilización de sustratos, la producción de NADH, la actividad de la ATP sintasa y algunas enzimas del ciclo del TCA (revisado en [60]). Se ha visto además en tejidos

esteroidogénicos que al aumentar los niveles de calcio se aumenta el transporte de colesterol desde la MEM hacia la MIM, aumentando la síntesis de hormonas esteroideas [61] y disminuyendo la cantidad de colesterol mitocondrial. En adición se ha visto que células de pacientes NPC y de modelos animales presentan niveles de calcio disminuidos [62] y al aumentar los niveles de calcio intracelular en células NPC se produce una disminución en la acumulación de colesterol en los lisosomas y además se rescata la función mitocondrial aumentando el potencial de membrana y aumentando la expresión del complejo IV que se encuentra disminuido en estas células. Estos efectos no se observan cuando se usa un quelante de calcio, lo que demuestra que el recuperar los niveles de calcio lisosomal mejoran la función mitocondrial [63].

Estos hallazgos sugieren que el transporte de colesterol hacia la mitocondria también se vería afectado por las alteraciones en la homeostasis de calcio presentes en células NPC y las alteraciones mitocondriales atribuidas a la falta de calcio podrían deberse a aumento de los niveles de colesterol mitocondrial. En este sentido cabe destacar que el agente curcumina, una sustancia que aumenta los niveles de calcio intracelular aumenta la supervivencia de ratones *Npc1*^{-/-} [62], lo que sugeriría que la disfunción mitocondrial podría ser relevante en la enfermedad NPC.

Por otro lado en otras enfermedades de depósito lisosomal se ha propuesto como mecanismo patogénico la fragmentación mitocondrial y la pérdida en la capacidad de la mitocondria de ejercer su función de tampón del calcio intracelular dejando la célula más susceptible a estímulos apoptóticos [64, 65].

8.2 Alteraciones en la morfología mitocondrial en modelos NPC

Otro parámetro que quisimos evaluar fue la morfología mitocondrial. La morfología de la mitocondria, el tamaño y el número de éstas están definidos por el balance entre los procesos de fusión y fisión. La fisión se lleva a cabo mediante un complejo de proteínas que incluyen DRP1, FIS1 entre otras. Su inhibición induce la formación de mitocondrias elongadas. La fragmentación de las mitocondrias inducida por DRP1 y FIS1 precede la apoptosis. La fusión mitocondrial es llevada a cabo por las proteínas Opa1 y mitofusinas (revisado en [65]).

En este trabajo se demuestra por primera vez que existen alteraciones en las proteínas de fisión y fusión en células NPC (Fig.7 y 8). El aumento de FIS1 en células CHO explicaría el aumento de mitocondrias más pequeñas. La disminución de MFN2 que encontramos en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} podría explicar las mitocondrias más pequeñas vistas por microscopía electrónica. La disminución de MFN2 en ratones *Npc1*^{-/-} no sólo produciría mitocondrias más pequeñas sino que también podría

explicar otras alteraciones en la función mitocondrial que observamos en este trabajo. MFN2 no sólo regula la fusión en la mitocondria, se ha visto que también participa en la regulación de la cadena respiratoria, el potencial de membrana, el metabolismo celular y la apoptosis [66, 67]. También se ha observado que mutaciones en la proteína MFN2 causa la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la que se caracteriza por degeneración de los axones periféricos y donde la ausencia de MFN2 disminuiría el transporte axonal de mitocondrias disminuyendo la disponibilidad de energía en los axones periféricos [68]. Esta disminución en el transporte de mitocondrias ha sido propuesto como un potencial mecanismo en muchas enfermedades neurodegenerativas [69] y podría contribuir al daño del SNC observado en la enfermedad de NPC.

No se puede descartar que la presencia de mitocondrias fragmentadas observadas por nosotros en modelos NPC (Fig. 6 y 8) sea consecuencia de otro proceso defectuoso en las células NPC como la autofagia. Alteraciones en la autofagia y acumulación de mitocondrias fragmentadas disfuncionales se ha propuesto como mecanismo patogénico en varias enfermedades lisosomales que presentan mutaciones en diferentes genes sin embargo comparten fenotipos similares [64, 70].

Existen evidencias que la autofagia selectiva de mitocondrias se induciría por disfunción mitocondrial, formación del poro de transición de la membrana mitocondrial, disminución en el potencial de membrana y por aumento en la producción de ROS [71]. Sin embargo, aún no se determina que es específicamente lo que induce la autofagia selectiva de las mitocondrias dañadas.

En la enfermedad de NPC se ha visto que existen alteraciones en la autofagia. En lisado de cerebro de ratones NPC se encontró aumento del marcador LC3-II y en el cerebelo de estos ratones se observó mayor cantidad de vacuolas y autofagosomas en las células de Purkinje [72]. Se ha demostrado que en los tejidos NPC existe inducción de genes relacionados con la autofagia, sin embargo también se ha visto acumulación de vacuolas ricas en proteínas destinadas a degradación (proteínas ubiquitinadas) [73], lo que sugiere que el proceso de autofagia es disfuncional en las células NPC. Este fenómeno no ocurre en fibroblastos de pacientes [74]. Esta diferencia en dos tipos celulares diferentes puede explicar la muerte de células neuronales antes que otras células en la enfermedad NPC. En este sentido, un incremento de autofagia podría constituir un mecanismo de defensa en el SNC, proporcionando una vía de escape alternativa del colesterol acumulado en los lisosomas mediante la salida de colesterol del autolisosoma hacia otros destinos celulares.

Recientemente, se ha propuesto que alteraciones en la función de los lisosomas llevarían a la acumulación de mitocondrias defectuosas y a disfunción mitocondrial, y que éste sería un potencial mecanismo en común de las enfermedades lisosomales con las neurodegenerativas [75]. Finalmente

nosotros proponemos que las alteraciones funcionales y estructurales encontradas en los modelos NPC precede la autofagia, y una disfunción en la autofagia contribuye a la acumulación de mitocondrias más pequeñas y disfuncionales en los modelos NPC.

8.3 Aumento del contenido de colesterol en modelos NPC

Como se mencionó previamente nosotros postulamos que un aumento en los niveles de colesterol mitocondrial produce alteraciones en la función mitocondrial. Para probar nuestra hipótesis evaluamos el contenido de colesterol mitocondrial en células CHO NPC y en hígados de ratones *Npc1*^{-/-}. Al evaluar los niveles de colesterol mitocondrial en las células CHO (Fig.10B) no encontramos diferencias significativas. La dificultad de obtener diferencias significativas en esta medición puede deberse a una mínima contaminación con lisosomas o a que la cuantificación del contenido de colesterol mitocondrial en células es difícil debido a que el colesterol mitocondrial sólo representa un 5% del colesterol total celular. Sin embargo, no podemos descartar deficiencias metodológicas ya que mediante el kit para medir colesterol utilizado tampoco fuimos capaces de detectar aumento en el contenido total de colesterol en células CHO NPC comparadas con las WT. Interesantemente, y de acuerdo a lo esperado encontramos un aumento en el colesterol mitocondrial en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} (Fig.10F), lo que previamente no había sido descrito. Este aumento de colesterol mitocondrial puede deberse a un aumento del transporte de colesterol mediado por MLN64.

Charman y cols. [33] postulan que el colesterol se acumula en las células NPC por el aumento del transporte de colesterol mediado por MLN64 a la membrana externa mitocondrial, donde el paso limitante sería la entrada de colesterol a la membrana interna y que el colesterol que se transporta sería proveniente del colesterol acumulado en los lisosomas o colesterol sintetizado endógenamente de las células NPC, porque al disminuir los niveles de MLN64 no se alteran los niveles de colesterol mitocondrial en las células WT.

Otra alternativa es que MLN64 transporte colesterol desde la membrana plasmática hacia la mitocondria, ya que se ha descrito que MLN64 cicla entre endosomas tardíos y la membrana plasmática [42, 76], y además otro estudio ha descrito que existe transporte de colesterol desde la membrana plasmática hacia la mitocondria [77].

Otra proteína que podría estar involucrada en el transporte de colesterol hacia la mitocondria es NPC2. Recientemente se publicó que en ensayos usando células semipermeabilizadas existe un transporte no vesicular de colesterol directamente desde los endosomas hacia la mitocondria, que no requiere proteínas citosólicas, pero si requiere NPC2 [57]. En este mismo estudio se vio que al

disminuir la expresión de NPC2 mediante un ARN de interferencia disminuía significativamente el contenido de colesterol mitocondrial, y al restituir la expresión de NPC2 se restituía el transporte de colesterol hacia la mitocondria. En células deficientes para NPC1 se ha visto que existe un aumento de la expresión de NPC2 [78]. Interesantemente en este trabajo por primera vez se demuestra un aumento en la expresión de MLN64 (Fig.16) en modelos NPC, esto sumado a la sobreexpresión de NPC2 contribuiría al aumento del contenido de colesterol mitocondrial observado.

Consecuente con el aumento del contenido de colesterol mitocondrial nosotros encontramos, disminución del GSH (Fig. 11) y aumento de superóxido mitocondrial (Fig.9) en células NPC, y disminución de la actividad de la ATPasa en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} (Fig.12). Algunas de estas alteraciones mitocondriales han sido observadas en un modelo de rata de esteatohepatitis, en que las mitocondrias de hepatocitos presentaban mayor contenido de colesterol mitocondrial y disminución de mGSH, lo que sensibilizaba a los hepatocitos a la muerte celular inducida por TNF- α y FAS.

El aumento de supeóxido mitocondrial en células NPC no había sido reportado previamente y podría preceder otras alteraciones vistas en modelos NPC como estrés oxidativo y activación de la apoptosis [14] y ser unos de los factores que contribuyen al daño oxidativo observado en las células NPC. De hecho, las células NPC también presentaron un aumento de los niveles de proteínas nitrorosinadas (Fig.11) lo que indica aumento del daño oxidativo.

En adición se ha descrito que la actividad de la ATPasa disminuye cuando aumentan los niveles de colesterol en la mitocondria. Dado que en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} encontramos aumentado significativamente el contenido de colesterol mitocondrial evaluamos la actividad de la ATPasa. Como era lo esperado la actividad de la ATPasa se encontró disminuida en hígado y en cerebro de ratones *Npc1*^{-/-} (Fig.12).

Sin embargo no podemos descartar que otros factores, además del contenido de colesterol mitocondrial, afecten la actividad de esta enzima como por ejemplo la disminución en la expresión de la enzima. La ATPasa forma parte del complejo V mitocondrial (F_1F_0), junto con la ATPsintasa. Cuando el potencial de membrana disminuye por disminución de sustrato, la ATPasa puede hidrolizar ATP a ADP, lo que moviliza protones que son capaces de recuperar el potencial de membrana [79], siendo este un mecanismo para recuperar el potencial de membrana. Una disminución en la actividad de la ATPasa concuerda con nuestros resultados de disminución del potencial de membrana en células NPC. Esta disminución de la actividad de la ATPasa podría ser perjudicial y constituiría otra alteración en la función mitocondrial en los tejidos *Npc1*^{-/-}.

Alteraciones en la actividad de la ATPasa por mutaciones se ha visto que produce acidosis láctica, cardiomegalia, hepatomegalia, ataxia, entre otros síntomas [60]. Interesantemente algunos de estos síntomas están presentes en pacientes NPC.

8.4 Metabolismo energético en modelos NPC

Dado que encontramos alteraciones en la actividad de la ATPasa y cambios en el potencial de membrana en células NPC esperábamos encontrar alteraciones en el consumo de oxígeno. Sin embargo no se encontraron cambios en el consumo de oxígeno ni en células ni en tejidos NPC (Fig.12). Estos resultados concuerdan con resultados publicados recientemente por Kennedy y cols.[36], en los que se muestra que en presencia de glucosa no existen cambios en el consumo de oxígeno en células NPC, sin embargo en presencia de glucosa y glutamina existen cambios significativos en la OCR basal, la fosforilación de ADP y respiración máxima, lo que sugiere que existen alteraciones en la utilización de algunos sustratos en las células NPC.

De acuerdo con lo anterior en un estudio en ratones WT y *Npc1*^{-/-} al realizar análisis metabolómicos en diferentes regiones del cerebro se encontró en cerebelo y corteza un aumento en la producción de lactato y una disminución en la utilización de piruvato en el ciclo del TCA. Además se encontró un aumento en la expresión de genes glicolíticos como la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) [80]. Los niveles aumentados de lactato y el aumento de la enzima LDH sugieren un aumento de la glicólisis anaeróbica en cerebro de ratones *Npc1*^{-/-}, y la disminución de la utilización de piruvato sugiere una disminución en la utilización de glucosa para el metabolismo oxidativo. Este fenómeno de aumento de la glicólisis hacia lactato puede tener efectos nocivos en el SNC ya que limita la disponibilidad de glucosa para la vía de la pentosa fosfato, disminuyendo la síntesis de NADPH y como consecuencia disminuyendo la regeneración de GSH.

Aunque se han reportado alteraciones en el consumo de oxígeno en modelos similares al que se usó en este trabajo nosotros no vimos cambios al realizar nuestras mediciones (fig.12). Esto puede deberse a la edad de los ratones utilizados, ya que se ha visto variabilidad en parámetros metabólicos dependiendo la edad del ratón. Así se ha visto que al analizar la producción de ATP en cerebelo de ratones se encontró diferencias significativas en ratones de 3 semanas, viéndose que los ratones *Npc1*^{-/-} producían menos ATP que los WT, sin embargo estas diferencias no se observaron a las 7 semanas de edad [80]. En el mismo estudio se observó a las 3 semanas de edad disminución en la expresión de la enzima piruvato deshidrogenasa, lo que produce acumulación de piruvato y por lo tanto disminución en la fosforilación oxidativa y disminución en la producción de ATP. En etapas

sintomáticas de la enfermedad no se encontraron alteraciones en la producción de ATP, pero se encontró mayor producción de lactato [80], lo que podría reflejar un cambio hacia glicolisis anaeróbica y producción de energía por esta vía. Esta disfunción mitocondrial en etapas tempranas presintomáticas de la enfermedad podría indicar que la disfunción mitocondrial precede otras alteraciones como aumento del estrés oxidativo y aumento de la apoptosis.

8.5 Relevancia de la disfunción mitocondrial en modelos NPC

Dadas las alteraciones que encontramos en los modelos NPC quisimos evaluar la relevancia de la disfunción mitocondrial en la patogenia de la enfermedad. Para esto buscamos drogas que se habían reportado previamente ser efectivos en otros modelos en los que existía disfunción mitocondrial y aumento del contenido de colesterol mitocondrial.

El Piracetam (PIR) es una droga que ha sido usado en pacientes con Alzheimer y que se ha mostrado produce mejoras en la función mitocondrial y aumenta la producción de ATP [81, 82]. En nuestro modelos NPC *in vitro* el PIR tuvo el efecto esperado previniendo la caída del potencial de membrana y el aumento de ROS mitocondrial (Fig.13). Sin embargo al hacer pruebas en ratones *Npc1*^{-/-} el PIR no tuvo ningún efecto en los parámetros evaluados (Fig. 13). Cabe destacar que iniciamos este tratamiento en ratones de 4 semanas de edad, y como se mencionó previamente existen disminución en la producción de ATP desde las 3 semanas de edad en ratones *Npc1*^{-/-} [80]. Es posible que se requiera iniciar tratamientos antes para observar efectos positivos. De hecho, varios grupos, incluidos el nuestro, han mostrado que mientras antes se inician los tratamientos terapéuticos en los ratones NPC mejores son los resultados obtenidos [13, 23]. Además no sabemos si esta droga es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, sólo se ha reportado la presencia de Piracetam en fluido cerebroespinal en pacientes tratados por vía intravenosa [83].

Por otro lado utilizamos etil éster de GSH (GSH-EE) que es un compuesto que regenera el GSH mitocondrial. Este compuesto ha demostrado tener efectos positivos en un modelo de ratón que presenta niveles de colesterol mitocondrial aumentados y susceptibilidad a muerte celular inducida por el péptido A β [28]. Nuevamente no obtuvimos los resultados esperados (Fig.14) al tratar los ratones *Npc1*^{-/-} con esta droga. Esto puede deberse a que la terapia usada no aumento los niveles de mGSH como nosotros esperábamos, probablemente la ruta de administración o la dosis usada no es la adecuada para lograr los efectos esperados en ratones *Npc1*^{-/-}.

La ganancia de peso observada en los ratones *Npc1*^{-/-} puede deberse al discreto aumento de mGSH en el hígado (Fig.15). Esta ganancia de peso en los ratones *Npc1*^{-/-} se asocia a un mejor estado de salud,

ya que pueden alcanzar mejor el alimento y tienen la capacidad de deglutirlo. Los ratones *Npc1*^{-/-} alrededor de las 6 semanas de vida presentan síntomas como ataxia y problemas para deglutir el alimento debido al daño en el SNC, específicamente en áreas del tronco cerebral como el núcleo Pontino [84]. Cabe destacar que normalmente los ratones *Npc1*^{-/-} no viven más de 12 semanas. Resulta llamativo que 2/6 y 2/5 de los ratones tratados con la droga y el vehículo, respectivamente, vivieron hasta la semana 14. Una posible causa de este aumento en la sobrevivencia de los ratones podría ser el tratamiento con vehículo (suero fisiológico), ya que al efectuarse dos veces al día podría proporcionar hidratación, los que por su avanzada edad tienen problemas para alimentarse y tomar agua. Otra posibilidad es que por azar estos ratones hayan vivido más tiempo que el promedio de los ratones *Npc1*^{-/-}.

Los hallazgos más relevantes de esta tesis en relación a las mitocondrias en modelos de la enfermedad de NPC son que existen alteraciones en la función mitocondrial que estarían relacionadas al aumento del colesterol mitocondrial y también existen alteraciones en la morfología mitocondrial lo que se relacionaría con disminución de la proteína de fusión MFN2 y aumento de la proteína FIS1. Sin embargo, no fue posible evaluar la relevancia de estas alteraciones en la patogenia de la enfermedad NPC ya que las intervenciones utilizadas como Piracetam y GSH-EE no fueron eficaces para rescatar la función mitocondrial como nosotros esperábamos.

Nosotros proponemos que la proteína MLN64 participaría en el transporte de colesterol hacia la mitocondria. Para determinar la participación de MLN64 en el aumento del contenido de colesterol mitocondrial y en las alteraciones mitocondriales observadas, realizamos experimentos en los que se inhibió la expresión de MLN64 y en los que se sobreexpresó MLN64.

8.6 Relevancia de MLN64 en el aumento de colesterol mitocondrial en modelos NPC

MLN64 es una proteína que se ha estudiado recientemente y sin embargo se ha visto que desempeña múltiples funciones en distintos tipos celulares sin que todavía se conozca su función específica. En este trabajo por primera vez se demostró que MLN64 está aumentado en células y tejidos NPC (Fig.16). Como se mencionó previamente nosotros postulamos que MLN64 favorece el aumento de colesterol en la mitocondria, por mecanismos que aún no se han dilucidado. A continuación se discutirán los mecanismos que se proponen según los últimos hallazgos y de acuerdo a los resultados encontrados en esta tesis.

Al disminuir los niveles de MLN64 en células CHO encontramos que las células NPC recuperan los niveles de potencial de membrana y superóxido mitocondrial alcanzando niveles comparables a las células WT (Fig.17). Esto se explicaría por los hallazgos recientes donde se ha postulado un rol de MLN64 en muerte celular, específicamente aumentando el colesterol mitocondrial y haciendo más susceptible a la célula frente a daños. Esto por los hallazgos encontrados en macrófagos donde la toxina del ántrax produciría una proteólisis y posterior translocación de MLN64 a la mitocondria, lo que produciría un aumento de colesterol mitocondrial, hiperpolarización de la mitocondria, aumento de ROS y disminución de GSH mitocondrial [47]. En este sentido, en células esteroideogénicas se ha descrito, específicamente en mitocondrias aisladas de sincitiotrofoblastos, que MLN64 es cortada proteolíticamente y se libera un fragmento de aproximadamente 30 Kda que estimula la síntesis de progesterona [85]. Las células CHO al derivar de ovario podrían tener la maquinaria para proteolizar y translocar a MLN64 hacia la mitocondria con el subsecuente transporte de colesterol lo que produciría disfunción mitocondrial. En condiciones fisiológicas este transporte de colesterol sería mínimo, sin embargo como en células NPC se acumula colesterol y además MLN64 se encuentra aumentado, el transporte de colesterol por MLN64 constituiría un mecanismo patogénico en células NPC.

Sin embargo, no es posible descartar que otras proteínas, además de MLN64, faciliten el transporte de colesterol a la mitocondria en células NPC. Recientemente, se ha propuesto que la proteína NPC2, cuya expresión aumenta en células deficientes de NPC1, también facilitaría el transporte de colesterol a la mitocondria en células que carecen de NPC1 [57].

Por otro lado, sorprendentemente al disminuir la expresión de MLN64 en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} encontramos disminución en el contenido de colesterol libre total y un aumento significativo en los niveles de colesterol mitocondrial (Fig.18). Estos hallazgos son sorprendentes porque nosotros esperábamos al igual que lo descrito previamente e en células CHO NPC, que al disminuir los niveles de MLN64, disminuiría el contenido de colesterol mitocondrial. Otro hallazgo sorprendente fue que disminuyera el contenido de colesterol libre total al disminuir los niveles de MLN64 (Fig.18).

Estas diferencias entre células CHO e hígado puede deberse a diferencias en la regulación de la homeostasis del colesterol en los diferentes tipos celulares. Las células CHO provienen de un tejido esteroideogénico, donde el colesterol que llega a la mitocondria se utiliza principalmente para la síntesis de hormonas esteroideas y en el hígado el colesterol que llega a las mitocondrias se utiliza principalmente para la síntesis de sales biliares de la vía alternativa o ácida por la enzima CYP27A1.

Un mecanismo que explicaría un aumento del contenido de colesterol mitocondrial al disminuir MLN64 en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} es que en estas condiciones se favorecería el transporte de

colesterol a la mitocondria por StAR. Se ha visto que cuando se sobreexpresa StAR aumenta la síntesis de sales biliares, donde el paso limitante es la llegada de colesterol a la mitocondria, sin embargo cuando StAR se sobreexpresa junto con MLN64, MLN64 inhibe la acción de StAR. Por lo tanto, si se disminuye la expresión de MLN64 disminuye su acción inhibitoria sobre StAR y aumentaría el transporte de colesterol hacia la mitocondria.

Sin embargo este mecanismo no explica por qué en modelos NPC en los que existe aumento de MLN64 se ve un aumento de colesterol mitocondrial. Nosotros proponemos que en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} la acción de MLN64 sumado a la de NPC2 favorece el transporte de colesterol hacia la mitocondria. Se ha demostrado que MLN64 quedaría atrapado en los lisosomas en enfermedades que existen alteraciones en el tráfico de colesterol, como NPC [86]. Sin embargo MLN64 es sintetizado en el RE, transferido a la membrana plasmática y luego internalizado y puede llegar a compartimentos NPC1 positivos o ser reciclado a la membrana plasmática [87]. En células NPC parte de MLN64 quedaría atrapado en los lisosomas y otra parte sería reciclada hacia la membrana plasmática llevando consigo colesterol, que eventualmente podría llegar a la mitocondria. Cuando se inhibe la expresión de MLN64 se pierde la inhibición de StAR y se favorecería la llegada de colesterol a la mitocondria. Esto sumado al aumento de expresión de NPC2 en células NPC explicaría un aumento del contenido de colesterol mitocondrial al disminuir MLN64.

Otra función de MLN64 que explicaría la disminución del colesterol libre total que vimos al disminuir los niveles de MLN64 en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} sería su función en el tráfico de endosomas tardíos. Se ha visto que la depleción de MLN64 produce la dispersión de los endosomas hacia la periferia de la célula [5, 6, 8, 9], disminuyendo la interacción con lisosomas, y por lo tanto disminuyendo la llegada de colesterol a los lisosomas. Van der Kant y cols. [42] por primera vez demostraron que MLN64 se encuentra en una población de endosomas tardíos diferente de NPC1. El colesterol endocitado pasaría primero por endosomas tardíos “tempranos” que contienen MLN64 y de aquí puede ser redirigido a la membrana o a endosomas tardíos “tardíos” que contienen NPC1.

Con estos antecedentes y nuestros resultados podemos proponer que en hígado de ratones *Npc1*^{-/-}, MLN64 ejercería su función de manera normal hasta llegar a los lisosomas, donde en parte quedaría retenido lo que explicaría su sobreexpresión en modelos NPC (Fig.16). Esto produciría la pérdida en la inhibición de StAR, lo que sumado a la acumulación de colesterol en los lisosomas y un aumento en la expresión de NPC2 favorecería el transporte de colesterol hacia la mitocondria. Al inhibir la expresión de MLN64 en hígado de ratones *Npc1*^{-/-} además se perdería su función en el transporte y fusión de endosomas, por lo que disminuiría el contenido de colesterol en los lisosomas. Cabe destacar que

nosotros no logramos una depleción completa de MLN64 en nuestros modelos, por lo que se mantendría una actividad remanente de MLN64. Se requieren de otros estudios para determinar la relevancia de MLN64 en el manejo de colesterol en ratones *Npc1*^{-/-}.

8.7 Efecto de la sobreexpresión de MLN64

Para entender de mejor manera la función fisiológica de MLN64 en un modelo donde no existieran otras alteraciones como lo modelos evaluados previamente sobreexpresamos la proteína en células HepG2 y en hígado de ratones silvestres.

En células HepG2 encontramos que la sobreexpresión de MLN64 disminuye el PMM, aumentan los niveles de superóxido mitocondrial, disminuye la viabilidad celular y disminuyen los niveles de GSH mitocondrial (Fig.22). Estos resultados son similares a los que encontramos en las células modelos NPC, por lo que nosotros planteamos que MLN64 mediaría el transporte de colesterol a la mitocondria y afectaría los parámetros evaluados.

Concordante con esta hipótesis se ha reportado que MLN64 sería la responsable de aumentar los niveles de colesterol mitocondrial, aumentar la producción de ROS, hiperpolarizar la membrana y de la depleción de GSH en células RAW264 y en macrófagos expuestos a la toxina del ántrax y que cuando MLN64 está disminuida las células son resistentes a la muerte celular.

Para chequear si MLN64 efectivamente transportaba colesterol a la mitocondria evaluamos el colesterol mitocondrial en las células HepG2 y en hígado de ratones que sobreexpresan MLN64. Al evaluar los niveles de colesterol en las células que sobreexpresan MLN64 encontramos un aumento en los niveles de colesterol mitocondrial en comparación con las células que no sobreexpresan MLN64 (Fig.20). Por otro lado al evaluar los niveles de colesterol mitocondrial en mitocondrias purificadas de hígados de ratones que sobreexpresan MLN64 (Fig.19) encontramos diferencias significativas, lo que indica que la sobreexpresión de MLN64 produce un aumento en los niveles de colesterol mitocondrial. Finalmente como observamos que en tejidos *Npc1*^{-/-} y en células NPC existían cambios en la morfología y dinámica mitocondrial y además había disminución de MFN2 evaluamos estos parámetros en las células que sobreexpresan MLN64. Como se observa en la figura 23 sobreexpresión de MLN64 produce una disminución en el tamaño de las mitocondrias, y disminución de la proteína MFN2, lo que indicaría una disminución de la fusión. Estas alteraciones podrían explicar los hallazgos anteriores de disminución del potencial de membrana y aumento de la producción de ROS, ya que se ha visto en un modelo de esteatohepatitis en células HepG2 que la disminución de

MFN2 produce disminución en los niveles de ATP, aumento en la producción de ROS y mitocondrias fragmentadas [88].

En conjunto los resultados obtenidos hasta ahora en este objetivo permiten proponer que MLN64 media el transporte de colesterol hacia la mitocondria cuando se sobreexpresa, que el aumento del colesterol mitocondrial tiene un efecto negativo sobre la función mitocondrial y que además MLN64 produciría alteraciones en proteínas reguladoras de la dinámica y función mitocondrial como MFN2.

Nosotros proponemos que cuando se sobreexpresa MLN64 en células WT produciría un aumento del contenido de colesterol en endosomas tardíos y lisosomas imitando el fenotipo NPC y además facilitaría el transporte de colesterol hacia la membrana plasmática y de aquí a la mitocondria. Esto lo apoyan los antecedentes en los que se ha visto que la sobreexpresión de MLN64 en células HeLa produce la formación de organelos endocíticos más grandes y menos abundantes en comparación a células control [45] y en células COS-1 aumenta la fusión de endosomas tardíos de manera dependiente de actina y estimula la deposición de colesterol en estos organelos [89]. En adición se ha propuesto que MLN64 podría producir el aumento del colesterol mitocondrial mediando el transporte de colesterol entre endosomas tardíos y la membrana plasmática [42]. Entonces la sobreexpresión de MLN64 favorecería el transporte de colesterol hacia la membrana plasmática y de aquí el colesterol llegaría a la mitocondria. Esta suposición se apoya por el hecho que se ha visto que la mayor fuente de colesterol que llega a la mitocondria proviene de la membrana plasmática [90, 91], principalmente proveniente de HDL. Además como MLN64 ejerce una acción inhibitoria sobre StAR el colesterol que llegaría a la membrana mitocondrial no se utilizaría y se alojaría en la membrana produciendo daño.

Finalmente las alteraciones mitocondriales que encontramos en células que sobreexpresan MLN64 se explicarían por un aumento de los niveles de colesterol mitocondrial mediados por MLN64, ya que son las mismas alteraciones que encontramos en células NPC que también presentan niveles de colesterol aumentados. Además por un mecanismo que no se ha dilucidado aún la sobreexpresión de MLN64 produce fragmentación mitocondrial y una disminución en la expresión de MFN2, lo que también podría estar relacionado al incremento en los niveles de colesterol mitocondrial. Como se mencionó previamente altos niveles de colesterol en la membrana mitocondrial son perjudiciales para la función mitocondrial y podrían explicar la bajada en el potencial de membrana, el aumento en la producción de ROS mitocondrial, la disminución en la ATPasa y la fragmentación mitocondrial encontrados en nuestros modelos.

En este trabajo por primera vez se ha demostrado que la proteína MLN64 podría tener un rol en la disfunción mitocondrial favoreciendo el enriquecimiento de colesterol de la membrana mitocondrial y

produciendo alteraciones funcionales y estructurales en la mitocondria. Además se demostró que su expresión esta aumentada en modelos NPC, lo que podría constituir un mecanismo patogénico en la enfermedad de NPC.

9 CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis demuestran la existencia de alteraciones mitocondriales funcionales y estructurales en modelos *in vitro e in vivo* de NPC. Este trabajo presenta la primera evidencia de aumento de la expresión de MLN64 en modelos NPC y que al inhibir la expresión de MLN64 se rescata la función mitocondrial y disminuye el colesterol total, en células CHO NPC y en hígado de ratones respectivamente. Nuestros resultados sugieren que existe una correlación entre el contenido de colesterol mitocondrial con la disfunción mitocondrial y con la expresión de MLN64 en modelos NPC. Además en este trabajo se presenta la primera evidencia que las alteraciones en la estructura de las mitocondrias se correlacionan con alteraciones en la expresión de MFN2 y FIS1 en modelos NPC

Por otra parte se demostró que los tratamientos con Piracetam y GSH-EE no fueron efectivos en rescatar la función mitocondrial *in vivo*, por lo que no se pudo determinar la relevancia de la disfunción mitocondrial en el desarrollo de la enfermedad NPC.

La sobreexpresión de MLN64 produjo alteraciones funcionales y estructurales en la mitocondria *in vivo e in vitro*, los que se relacionaron con un aumento del contenido de colesterol mitocondrial y disminución de MFN2 respectivamente. Nuestros datos sugieren fuertemente que el aumento del contenido de colesterol mitocondrial es perjudicial para la función mitocondrial. Los resultados de los estudios *in vitro e in vivo* donde se muestra la relación entre aumento de contenido de colesterol mitocondrial, MLN64 y disfunción mitocondrial en NPC forman parte de un artículo que próximamente será enviado a publicar.

Los resultados presentados en esta tesis indican que estrategias para disminuir el contenido de colesterol mitocondrial podría ser beneficioso para la salud de los pacientes NPC.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Vanier, M.T., *Niemann-Pick disease type C*. Orphanet J Rare Dis, 2010. **5**: p. 16.
2. Patterson, M., *Niemann-Pick Disease Type C*. 1993.
3. Carstea, E.D., et al., *Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis*. Science, 1997. **277**(5323): p. 228-31.
4. Carstea, E.D., et al., *Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 2002-4.
5. Naureckiene, S., et al., *Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease*. Science, 2000. **290**(5500): p. 2298-301.
6. Davies, J.P. and Y.A. Ioannou, *Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24367-74.
7. Friedland, N., et al., *Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2512-7.
8. Kwon, H.J., et al., *Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1213-24.
9. Pentchev, P.G., et al., *The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1225**(3): p. 235-43.
10. Vanier, M.T., *Biochemical studies in Niemann-Pick disease. I. Major sphingolipids of liver and spleen*. Biochim Biophys Acta, 1983. **750**(1): p. 178-84.
11. Davidson, C.D., et al., *Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6951.
12. Vázquez, M.C., et al., *Alteration of Gene Expression Profile in Niemann-Pick Type C Mice Correlates with Tissue Damage and Oxidative Stress*. PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e28777.
13. Alvarez, A.R., et al., *Imatinib therapy blocks cerebellar apoptosis and improves neurological symptoms in a mouse model of Niemann-Pick type C disease*. FASEB J, 2008. **22**(10): p. 3617-27.
14. Klein, A., et al., *Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons*. Neurobiol Dis, 2011. **41**(1): p. 209-18.
15. Yevenes, L.F., et al., *Lysosomal vitamin E accumulation in Niemann-Pick type C disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(2): p. 150-60.
16. Marin, T., et al., *Vitamin E Dietary Supplementation Improves Neurological Symptoms and Decreases c-Abl/p73 Activation in Niemann-Pick C Mice*. Nutrients, 2014. **6**(8): p. 3000-17.
17. Schedin, S., et al., *Peroxisomal impairment in Niemann-Pick type C disease*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6245-51.
18. Baudry, M., et al., *Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: immunohistochemical observations of microglia and astroglia*. Exp Neurol, 2003. **184**(2): p. 887-903.

19. Wu, Y.P., et al., *Apoptosis accompanied by up-regulation of TNF-alpha death pathway genes in the brain of Niemann-Pick type C disease*. Mol Genet Metab, 2005. **84**(1): p. 9-17.
20. Griffin, L.D., et al., *Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 704-11.
21. Fu, R., et al., *Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C*. Mol Genet Metab, 2010. **101**(2-3): p. 214-8.
22. Reddy, J.V., I.G. Ganley, and S.R. Pfeffer, *Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling*. PLoS One, 2006. **1**: p. e19.
23. Zampieri, S., et al., *Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9B): p. 3786-96.
24. Gottlieb, R.A. and R.S. Carreira, *Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(2): p. C203-10.
25. Yu, W., et al., *Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11731-9.
26. Westermann, B., *Mitochondrial fusion and fission in cell life and death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 872-84.
27. Campbell, A.M. and S.H. Chan, *The voltage dependent anion channel affects mitochondrial cholesterol distribution and function*. Arch Biochem Biophys, 2007. **466**(2): p. 203-10.
28. Fernandez, A., et al., *Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity*. J Neurosci, 2009. **29**(20): p. 6394-405.
29. Campbell, A.M. and S.H. Chan, *Mitochondrial membrane cholesterol, the voltage dependent anion channel (VDAC), and the Warburg effect*. J Bioenerg Biomembr, 2008. **40**(3): p. 193-7.
30. Echegoyen, S., et al., *Cholesterol increase in mitochondria: its effect on inner-membrane functions, submitochondrial localization and ultrastructural morphology*. Biochem J, 1993. **289** (Pt 3): p. 703-8.
31. Bosch, M., et al., *Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility*. Curr Biol, 2011. **21**(8): p. 681-6.
32. Sobo, K., et al., *Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e851.
33. Charman, M., et al., *MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein*. J Lipid Res, 2010. **51**(5): p. 1023-34.
34. Mari, M., et al., *Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 185-98.
35. Mari, M., et al., *Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2685-700.
36. Kennedy, B.E., et al., *Adaptations of Energy Metabolism Associated with Increased Levels of Mitochondrial Cholesterol in Niemann-Pick Type C1-deficient Cells*. J Biol Chem, 2014. **289**(23): p. 16278-89.
37. Stocco, D.M. and B.J. Clark, *Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells*. Endocr Rev, 1996. **17**(3): p. 221-44.

38. Watari, H., et al., *MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8462-7.
39. Rigotti, A., D.E. Cohen, and S. Zanlungo, *STARTing to understand MLN64 function in cholesterol transport*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2015-7.
40. Moog-Lutz, C., et al., *MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas*. Int J Cancer, 1997. **71**(2): p. 183-91.
41. Tsujishita, Y. and J.H. Hurley, *Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(5): p. 408-14.
42. van der Kant, R., et al., *Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1*. J Lipid Res, 2013. **54**(8): p. 2153-65.
43. Alpy, F., et al., *The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4261-9.
44. Alpy, F., et al., *MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50780-7.
45. Alpy, F., et al., *Functional characterization of the MENTAL domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 17945-52.
46. Kallen, C.B., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26285-8.
47. Ha, S.D., et al., *Cellular adaptation to anthrax lethal toxin-induced mitochondrial cholesterol enrichment, hyperpolarization, and reactive oxygen species generation through downregulating MLN64 in macrophages*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(23): p. 4846-60.
48. Tichauer, J.E., et al., *Overexpression of the cholesterol-binding protein MLN64 induces liver damage in the mouse*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(22): p. 3071-9.
49. Alvarez, A.R., et al., *Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-beta-peptide and reactive oxygen species*. Neurobiol Dis, 2004. **17**(2): p. 326-36.
50. Sumner, J.B., *A Method for the Colorimetric Determination of Phosphorus*. Science, 1944. **100**(2601): p. 413-4.
51. Duncan, I.W., P.H. Culbreth, and C.A. Burtis, *Determination of free, total, and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr, 1979. **162**(3): p. 281-92.
52. Lluís, J.M., et al., *Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress*. Gastroenterology, 2003. **124**(3): p. 708-24.
53. Voikar, V., H. Rauvala, and E. Ikonen, *Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease*. Behav Brain Res, 2002. **132**(1): p. 1-10.
54. Vazquez, M.C., et al., *Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 205713.
55. Cenedella, R.J., *Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes*. Lipids, 2009. **44**(6): p. 477-87.
56. Montero, J., et al., *Cholesterol and peroxidized cardiolipin in mitochondrial membrane properties, permeabilization and cell death*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 1217-24.

57. Kennedy, B.E., M. Charman, and B. Karten, *Niemann-Pick Type C2 protein contributes to the transport of endosomal cholesterol to mitochondria without interacting with NPC1*. J Lipid Res, 2012. **53**(12): p. 2632-42.
58. Xie, H., et al., *Mitochondrial alterations near amyloid plaques in an Alzheimer's disease mouse model*. J Neurosci, 2013. **33**(43): p. 17042-51.
59. Kodam, A., et al., *Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains*. Glia, 2010. **58**(11): p. 1267-81.
60. Rasola, A. and P. Bernardi, *The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells*. Cell Calcium, 2014. **56**(6): p. 437-45.
61. Cherradi, N., et al., *Calcium stimulates intramitochondrial cholesterol transfer in bovine adrenal glomerulosa cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 25971-5.
62. Cianciola, N.L., C.R. Carlin, and T.J. Kelley, *Molecular pathways for intracellular cholesterol accumulation: common pathogenic mechanisms in Niemann-Pick disease Type C and cystic fibrosis*. Arch Biochem Biophys, 2011. **515**(1-2): p. 54-63.
63. Visentin, S., et al., *The stimulation of adenosine A2A receptors ameliorates the pathological phenotype of fibroblasts from Niemann-Pick type C patients*. J Neurosci, 2013. **33**(39): p. 15388-93.
64. Jennings, J.J., Jr., et al., *Mitochondrial aberrations in mucopolipidosis Type IV*. J Biol Chem, 2006. **281**(51): p. 39041-50.
65. Kiselyov, K. and S. Muallem, *Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in lysosomal storage diseases*. Cell Calcium, 2008. **44**(1): p. 103-11.
66. Pich, S., et al., *The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(11): p. 1405-15.
67. Pang, W., et al., *Low expression of Mfn2 is associated with mitochondrial damage and apoptosis in the placental villi of early unexplained miscarriage*. Placenta, 2013. **34**(7): p. 613-8.
68. Misko, A., et al., *Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex*. J Neurosci, 2010. **30**(12): p. 4232-40.
69. Duncan, J.E. and L.S. Goldstein, *The genetics of axonal transport and axonal transport disorders*. PLoS Genet, 2006. **2**(9): p. e124.
70. Settembre, C., et al., *A block of autophagy in lysosomal storage disorders*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(1): p. 119-29.
71. Rodriguez-Hernandez, A., et al., *Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy*. Autophagy, 2009. **5**(1): p. 19-32.
72. Ko, D.C., et al., *Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease*. PLoS Genet, 2005. **1**(1): p. 81-95.
73. Pacheco, C.D. and A.P. Lieberman, *The pathogenesis of Niemann-Pick type C disease: a role for autophagy?* Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e26.
74. Ordonez, M.P., et al., *Disruption and therapeutic rescue of autophagy in a human neuronal model of Niemann Pick type C1*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(12): p. 2651-62.
75. Osellame, L.D. and M.R. Duchen, *Quality control gone wrong: mitochondria, lysosomal storage disorders and neurodegeneration*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(8): p. 1958-72.

76. Ren, S., et al., *Effect of increasing the expression of cholesterol transporters (StAR, MLN64, and SCP-2) on bile acid synthesis*. J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 2123-31.
77. Lange, Y., et al., *Regulation of fibroblast mitochondrial 27-hydroxycholesterol production by active plasma membrane cholesterol*. J Lipid Res, 2009. **50**(9): p. 1881-8.
78. Blom, T.S., et al., *Defective endocytic trafficking of NPC1 and NPC2 underlying infantile Niemann-Pick type C disease*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(3): p. 257-72.
79. Nicholls, D.G., *The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution*. Eur J Biochem, 1974. **50**(1): p. 305-15.
80. Kennedy, B.E., et al., *Pre-symptomatic activation of antioxidant responses and alterations in glucose and pyruvate metabolism in niemann-pick type c1-deficient murine brain*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82685.
81. Kurz, C., et al., *The metabolic enhancer piracetam ameliorates the impairment of mitochondrial function and neurite outgrowth induced by beta-amyloid peptide*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(2): p. 246-57.
82. Leuner, K., et al., *Improved mitochondrial function in brain aging and Alzheimer disease - the new mechanism of action of the old metabolic enhancer piracetam*. Front Neurosci, 2010. **4**.
83. Calliauw, L. and M. Marchau, *Clinical trial of piracetam in disorders of consciousness due to head injury*. Acta Anaesthesiol Belg, 1975. **26**(1): p. 51-60.
84. Walterfang, M., et al., *Pontine-to-midbrain ratio indexes ocular-motor function and illness stage in adult Niemann-Pick disease type C*. Eur J Neurol, 2012. **19**(3): p. 462-7.
85. Esparza-Perusquia, M., et al., *Mitochondrial proteases act on STARD3 to activate progesterone synthesis in human syncytiotrophoblast*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(1): p. 107-17.
86. Strauss, J.F., 3rd, et al., *START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **202**(1-2): p. 59-65.
87. Zhang, M., et al., *MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33300-10.
88. Zhang, Y., et al., *Mitochondrial dysfunction during in vitro hepatocyte steatosis is reversed by omega-3 fatty acid-induced up-regulation of mitofusin 2*. Metabolism, 2011. **60**(6): p. 767-75.
89. Holtta-Vuori, M., et al., *MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(8): p. 3873-86.
90. Gocze, P.M. and D.A. Freeman, *Plasma membrane cholesterol is utilized as steroidogenic substrate in Y-1 mouse adrenal tumor cells and normal sheep adrenal cells*. Exp Cell Res, 1993. **209**(1): p. 21-5.
91. Freeman, D.A., A. Romero, and Y.S. Choi, *Plasma membrane steroidogenic cholesterol: the relative importance of membrane internalization rate and cholesterol extraction rate of internalized membrane*. Endocr Res, 1998. **24**(3-4): p. 619-22.