

Alvim Manuel Matos Barroso

Esfingolípido: mediadores moleculares da resposta
celular e potenciais alvos terapêuticos



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

2012

Alvim Manuel Matos Barroso

Esfingolípido: mediadores moleculares da resposta
celular e potenciais alvos terapêuticos

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

2012

Esfingolípido: mediadores moleculares da resposta celular e potenciais alvos terapêuticos

Autor: Alvim Manuel Matos Barroso

Orientador: Professora Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro

Esfingolípido: mediadores moleculares da resposta celular e potenciais alvos terapêuticos

O aluno

Trabalho apresentado à
Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre
em Ciência Farmacêuticas

Resumo

Os esfingolípido, descritos em 1876 por J.L.W. Thudichum, são considerados constituintes essenciais das membranas das células eucarióticas. Para além do seu papel estrutural estão também envolvidos na sinalização celular. Do ponto de vista estrutural, os esfingolípido derivam da esfingosina. A acilação da esfingosina com um ácido gordo de cadeia longa origina a ceramida, que constitui a base molecular de todos os esfingolípido. O seu metabolismo integra vários compartimentos intracelulares que incluem o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, a membrana plasmática e o sistema endossomal/lisossomal. Alguns dos seus metabolitos, como a ceramida, a esfingosina, e a esfingosina-1-fosfato actuam como moléculas bioactivas, estando envolvidas em diversos eventos celulares, nomeadamente na regulação do crescimento celular, diferenciação, senescência, inflamação e apoptose. Uma das vias metabólicas mais interessantes do ponto de vista fisiológico e patológico é a via da esfingomielinase. Esta via permite regular o nível intracelular dos esfingolípido bioactivos através da acção concertada de duas famílias de enzimas, as esfingomielinases, que convertem a esfingomielina em ceramida, e as ceramidases que convertem a ceramida em esfingosina. Cada uma destas famílias de enzimas exhibe especificidade quanto ao compartimento celular/tecido e à natureza química do substrato. De facto, as células vivas contêm diversas espécies de ceramidas que diferem na extensão e grau de insaturação da cadeia acilo, o que parece ter grande importância e influência nas suas actividades biológicas.

Nas últimas décadas, a diversidade estrutural e funcional dos SLs tem suscitado algum interesse, em grande parte devido ao seu envolvimento em patologias de etiologia muito diversa mas com considerável impacto em termos de Saúde Pública. Neste contexto, o presente trabalho de pesquisa bibliográfica foi elaborado com o objectivo de proporcionar uma visão relativamente integrada sobre a estrutura, função e metabolismo dos esfingolípido em situações normais e em situações patológicas específicas, esperando-se que represente um contribuição útil para a difusão do conhecimento sobre estas multifacetadas e enigmáticas moléculas.

Palavras chave: esfingolípido, ceramida, esfingolipidose, doenças complexas, modulação do metabolismo.

Abstract

The sphingolipids, described in 1876 by JLW Thudichum are considered essential constituents of the membranes of eukaryotic cells. In addition to its structural role, they are also involved in cell signaling. From the structural point of view, the sphingolipids are derived from sphingosine. Acylation of sphingosine with a long chain fatty acid gives rise to the ceramide, which is the molecular basis of all sphingolipids. Its metabolism comprises several intracellular compartments including the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, the plasma membrane and the system endosomal / lysosomal system. Some of its metabolites, such as ceramide, sphingosine, and sphingosine 1-phosphate act as signaling and communication bioactive molecules, being involved in various cellular events, in particular in the regulation of cell growth, differentiation, senescence , inflammation and apoptosis. One of the metabolic pathways more interesting from the physiological and pathological standpoints is the metabolism of sphingomyelinase. This route is implicated in the regulation of the intracellular level of bioactive sphingolipids through the coordinated action of two families of enzymes, sphingomyelinases, which convert sphingomyelin into ceramide, and ceramidases, that convert ceramide in sphingosine. Each of these families of enzymes shows specificity regarding to the cell compartment / tissue and the chemical nature of the substrate. In fact, the living cells contain different species of ceramides which differ in length and degree of unsaturation of the acyl chain, which seems to have great importance and influence on their biological activities.

The structural and functional diversity of sphingolipids has attracted some interest in recent decades, largely due to its involvement in diseases of diverse etiology, but with considerable impact on public health. In this context, a literature review on these topics was prepared aiming to provide an integrated vision of the structure, function and metabolism of sphingolipids in normal and disease states, expecting that this work represents an useful contribution to the diffusion of the knowledge about these multifaceted and enigmatic molecules.

Key words: sphingolipids, ceramide, sphingolipidosis, complex diseases, metabolism modulation.

Índice Geral

Resumo	5
Abstract.....	5
Índice de Figuras	8
Índice de Tabelas	8
Abreviaturas e siglas.....	9
CAPÍTULO I: Introdução Geral.....	11
CAPÍTULO II: Desenvolvimento	13
1. Esfingolípido.....	14
1.1 - Aspectos estruturais.....	14
1.2 - Função celular	16
1.3 - Metabolismo e transporte intracelular.....	18
2. Doenças associadas a alterações esfingolípídicas	22
2.1 - Esfingolipidoses: doenças do catabolismo dos esfingolípido.....	22
2.2 - Doença de Alzheimer	24
2.3 - Cancro.....	26
2.4 - Esclerose Múltipla	28
2.5 - Patologias cardiovasculares	30
3. Potencialidade terapêutica da modulação do metabolismo esfingolípídico	33
CAPÍTULO III: Conclusões e perspectivas futuras	37
Bibliografia.....	39

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura dos SLs e GLSs	15
Figura 2 - Estrutura dos gangliosídeos e sulfatídeos	16
Figura 3 - Metabolismo e transporte dos esfingolípido	19
Figura 4 - Esfingolipidoses e o metabolismo dos esfingolípido	23
Figura 5 - Esfingolípido, moduladores positivos e negativos da resposta tumoral.....	27
Figura 6 - Papel da S1P na Esclerose Múltipla	30
Figura 7 - Relação da ceramida com a patologia cardiovascular.....	32
Figura 8 - Regulação do reóstato ceramida/esfingosina-1-fosfato	35
Figura 9 - Via biossintética esfingolipídica e potenciais inibidores	35

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características principais das ceramidases humanas	21
---	----

Abreviaturas e siglas

A β - Péptido β -amilóide

aCDase – Ceramidase ácida

APP – Proteína precursora amilóide

aSMase - Esfingomielinase ácida

ATP - Adenosina-trifosfato

C1P - Ceramida 1-fosfato

CAPK - Proteína cinase activada pela ceramida

CAPP - Proteína fosfatase activada pela ceramida

Cer - Ceramida

CERK - Ceramida cinase

CerS – Ceramida sintetase

CERT – Proteína de transferência da ceramida

CG – Complexo de Golgi

cPLA2 - Fosfolipase A2 citossólica

DA – Doença de Alzheimer

DES – Dihidroceramida desaturase

GalCer – Galactosilceramida

GCase - Glucocerebrosidase

GCS – Glucosilceramida sintetase

GD3 - Gangliosídeo GD3

GlcCer - Glucosilceramida

GM3 - Gangliosídeo GM3

GSLs - Glicoesfingolípido

LacCer - Lactosilceramida

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

L-SMase – Esfingomielinase lisossomal

Mg²⁺ - Catião magnésio

MP – Membrana plasmática

nCDase – Ceramidase neutra

NMDAR- Receptor N-metil-d-aspartato

PKC – Proteína cinase C

PLC - Fosfolipase C

RE – Retículo endoplasmático

S1P - Esfingosina 1-fosfato

S1Pr1 – Receptor 1 da esfingosina 1-fosfato

SLs – Esfingolípido

SM - Esfingomielina

SMase - Esfingomielinase

SMS – Esfingomielina sintetase

SNC – sistema nervoso central

Sph - Esfingosina

SphK - Esfingosina cinase

SPT - Serina palmitoil transferase

S-SMase – Esfingomielinase secretora

TNF- α – Factor de necrose tumoral alfa

Zn²⁺ - Catião zinco

CAPÍTULO I: Introdução Geral

Nas últimas décadas, os esfingolípidos (SLs) têm suscitado um interesse crescente devido à sua participação em eventos de sinalização intracelular.

A sinalização celular é uma actividade de considerável complexidade uma vez que é representada por uma cascata de eventos, desde a estimulação da via de sinalização até à resposta celular, e cuja operacionalidade depende do correcto posicionamento de cada componente e do seu nível intracelular. Os SLs têm sido considerados lípidos bioactivos multifacetados, isto é, capazes de condicionarem a execução de diferentes tipos de respostas celulares em virtude do seu envolvimento em vias de sinalização muito diversas. Por isso, apesar dos numerosos estudos de investigação sobre o papel dos SLs na biologia celular e fisiopatologia, a natureza exacta das suas funções biológicas ainda não está completamente identificada e caracterizada. Vários trabalhos de revisão sobre o tema têm sido publicados nos últimos anos, que se justificam não só pelo interesse que este tem suscitado junto da comunidade científica mas também pela necessidade em integrar os mais recentes avanços que se têm registado em domínios científicos muito distintos. De facto, dado o envolvimento dos SLs em processos celulares tão diversos como o tráfego intracelular, inflamação, apoptose, diferenciação celular, etc., uma compreensão abrangente do seu papel na fisiologia e patologia celulares implica também conhecimentos técnico-científicos muito diferenciados.

Neste contexto, o presente trabalho foi elaborado com o objectivo de reunir a informação relevante sobre a estrutura, metabolismo e função dos SLs, de forma integrada e o mais actualizada possível, e contribuir para uma melhor compreensão e divulgação de potenciais terapias baseadas na modulação da actividade destas moléculas lipídicas. Para a concretização destes objectivos foi efectuada uma revisão bibliográfica reportada aos últimos anos visando reunir informação suficiente não só para definir o estado da arte sobre o tema como também perspectivar novos rumos da investigação ao nível do tratamento de doenças de etiologia muito diversa, algumas das quais com um impacto significativo na Saúde Pública.

CAPÍTULO II: Desenvolvimento

1. Esfingolípido

1.1 - Aspectos estruturais

Os SLs são constituídos por três componentes: o grupo esfingóide, um ácido gordo e um grupo polar (Manso, 1977). As bases esfingóides variam quanto ao comprimento da cadeia alquilo, grau de saturação e de hidroxilação (Merril *et al.*, 2001; Weil, 2000).

A ceramida é o SL mais simples. Ela é constituída por uma esfingosina (álcool aminado com uma cadeia hidrocarbonada insaturada de 18 carbonos) modificada por um ácido gordo na posição C-2 por N-acilação (Cer, Figura 1). A ceramida é a base de todos os SLs mais complexos. Estas moléculas são formadas por ligação de grupos distintos ao C-1. Quando este grupo é a fosforilcolina, o SL designa-se esfingomielina (SM, Figura 1). A ligação de uma molécula de glucose ou de uma molécula de galactose constitui o primeiro passo para a formação dos esfingolípido complexos, ou seja, os glicosfingolípido (GSLs), tais como a glucosilceramida (GlcCer) e a galactosilceramida (GalCer), respectivamente (Figura 1).

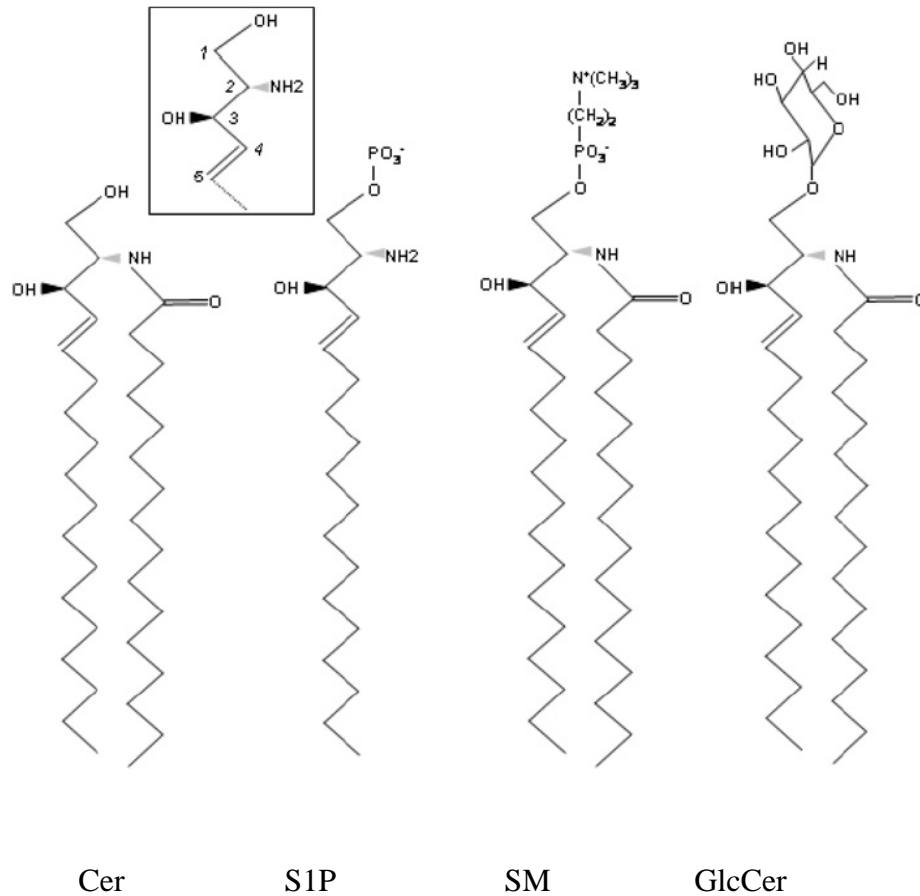


Figura 1. Estrutura dos SLs e GLSs. Cer, ceramida (palmitoil-esfingosina); S1P, esfingosina 1-fosfato; SM, Esfingomielina; GlcCer, glucosilceramida. Em destaque estão representados os primeiros cinco carbonos da esfingosina. Figura extraída de Lahiri e Futerman, 2007.

De acordo com a natureza química do grupo polar, os GSLs são comumente classificados numa das seguintes classes (rev. em Schmidt e Vankar, 2000): cerebrosídeos (contêm um resíduo de açúcar, por exemplo a GlcCer), sulfatídeos (contêm um resíduo de açúcar com um grupo sulfato) e gangliosídeos (contêm um ou mais resíduos de ácido N-acetilneuramínico). Na figura 2 é apresentada a estrutura de alguns gangliosídeos e de sulfatídeos. Em células humanas já foram identificados cerca de 60 tipos de esfingolípido, principalmente nas membranas dos neurónios. No entanto, para a maioria destas moléculas a função ainda não é conhecida (Merrill *et al.*, 1997).

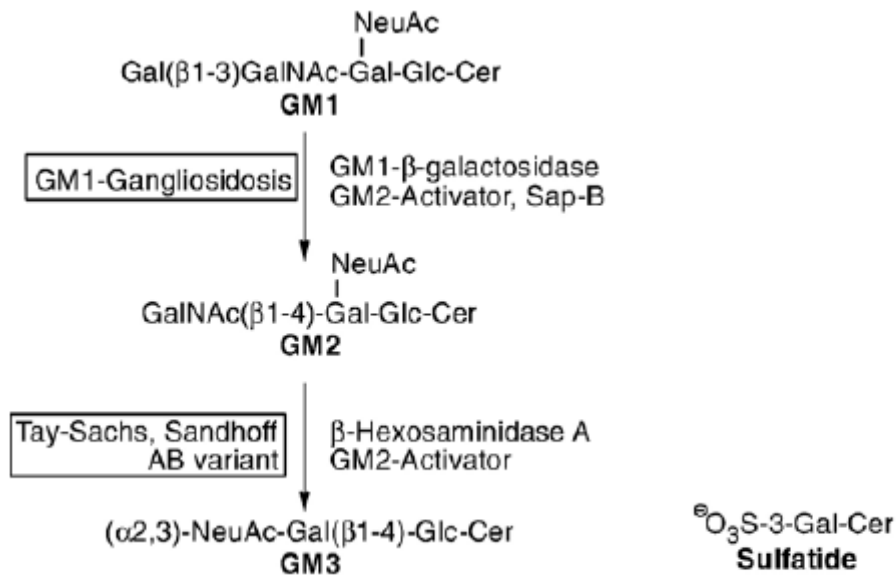


Figura 2. Estrutura dos gangliosídeos e sulfatídeos. Figura retirada e adaptada de Kolter e Sandhoff (2006).

1.2 Função celular

Segundo Merrill e colaboradores (1997), podem-se encontrar esfingolípido em todas as células eucarióticas. Estão localizados preferencialmente na membrana plasmática (cerca de 90%) que corresponde ao local onde exercem a sua função, ou integrados em lipoproteínas (principalmente as de baixa densidade), se em circulação. Na membrana plasmática representam cerca de 30% das moléculas lipídicas anfipáticas (Patton e Lester, 1991; Van der Rest *et al.*, 1995).

Para além do seu papel estrutural como moléculas constituintes das membranas celulares, os SLs também desempenham um importante papel na regulação e sinalização celular (Ferrante *et al.*, 2002). Até à década de 70, pensava-se que os lípidos tinham um papel estrutural e inerte (Huwiler *et al.*, 2000) e só recentemente foram reconhecidos

como moléculas lipídicas bioactivas, isto é, moléculas que activam ou actuam como segundos mensageiros, os quais regulam a actividade de proteínas cinases e fosfatases específicas (ou de outras proteínas com actividade reguladora). Por essa razão, os SLs têm sido envolvidos em processos biológicos muito diversos, nomeadamente crescimento e diferenciação celular, adesão celular, tráfego intracelular, apoptose, reconhecimento de microrganismos e toxinas microbianas, e inflamação (Dickson *et al.*, 2006, Merrill, 2002; Turner *et al.*, 1999).

Adicionalmente, os SLs também desempenham um papel importante na regulação da dinâmica das membranas biológicas, uma vez que integram microdomínios membranares designados “lipid rafts”. Estes microdomínios são ricos em colesterol que é uma molécula reguladora da fluidez da membrana. Por isso, é possível que esta função dos SLs seja exercida de forma articulada com a sua função sinalizadora. De facto, muitos receptores activam a produção de ceramida a partir da esfingomiéline (por acção de esfingomiélinases) induzindo, deste modo, a transformação dos microdomínios de membrana em grandes plataformas que integram agrupamentos de receptores, os quais se activam e transmitem sinais para o interior celular. É, por isso, através da alteração das propriedades biofísicas desses microdomínios induzida pelo aumento da concentração de ceramida dentro dos “lipid rafts” que é promovida a agregação dos microdomínios e, subsequentemente, a formação de domínios de maiores dimensões onde ocorre a oligomerização de receptores e a montagem de estruturas mais complexas (Bollinger *et al.*, 2005).

Devido ao papel dos SLs na regulação e sinalização de diversos processos cruciais para a vida da células, o seu estudo transformou-se numa área de investigação importante da biologia celular. Neste âmbito, destaca-se o papel da ceramida pela sua importância metabólica e biológica. Por um lado a ceramida é o metabolito comum da via biossintética e da via de degradação dos esfingolípido e, por outro lado, é considerada uma molécula reguladora do destino celular. De facto, a produção de ceramida é normalmente indutora de vias apoptóticas. Ao contrário, a sua transformação em ceramida 1-fosfato (C1P) ou em esfingosina e, posteriormente, em esfingosina 1-fosfato (S1P) activa, geralmente, vias mitogénicas envolvidas na diferenciação e na proliferação celular. Por isso, o balanço entre o nível de ceramida e de esfingosina em relação ao nível dos respectivos derivados fosforilados constitui um factor determinante

da morte ou da sobrevivência celular. Por estas razões, a ceramida e a esfingosina, e os seus derivados fosforilados, C1P e S1P, são frequentemente considerados os principais esfingolípido bioactivos. (Heinrich *et al.*, 2000; Huwiler *et al.*, 2004; Ruvolo, 2003).

Está bem documentado na literatura que as ceramidas actuam como segundos mensageiros activando inúmeras vias de transdução de sinal. O aumento do nível de ceramidas (geralmente apoptóticas) pode ser desencadeada por uma ampla diversidade de estímulos, tanto metabólicos como de stress, incluindo a exposição a agentes quimioterapêuticos, radiação gama ou ultra-violeta, choque térmico, privação de factores de crescimento e hipoxia (Levade *et al.*, 2002). Entre as proteínas que interagem com a ceramida incluem-se: a proteína cinase activada pela ceramida (CAPK), a proteína cinase supressora de Ras (KSR), as fosfatases PP2A e PP1B, a proteína cinase C (PKC), a catepsina D, a fosfolipase A2 citossólica (cPLA2) e a proteína cinase C tipo alfa (PKCa) (Heinrich *et al.*, 2000; Huwiler *et al.*, 2004; Ruvolo, 2003).

1.3 - Metabolismo e transporte intracelular

Os SLs são sintetizados no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de Golgi (CG), endereçados para a membrana plasmática (MP) e posteriormente internalizados por endocitose para compartimentos celulares diversos, nomeadamente para o CG ou para o lisossoma (Ozbayraktar e Ulgen, 2009; revisto em Sillence e Platt, 2004). O facto das reacções bioquímicas do metabolismo dos SLs ocorrerem em vários compartimentos celulares implica que os seus intermediários metabólicos tenham de ser transportados do local onde a sua síntese ocorre para o local onde são metabolizados, e os produtos desse metabolismo transportados para o compartimento intracelular onde a molécula esfingolipídica exercerá a sua acção biológica. A Figura 3 ilustra a compartimentação celular dos processos metabólicos que envolvem moléculas esfingolipídicas. Devido à natureza hidrofóbica dos seus substratos e produtos, as enzimas que participam no metabolismo dos SLs são geralmente proteínas membranares, periféricas ou integrais. No caso das enzimas serem solúveis, a sua acção é auxiliada por cofactores proteicos que visam promover a solubilização dos substratos hidrofóbicos.

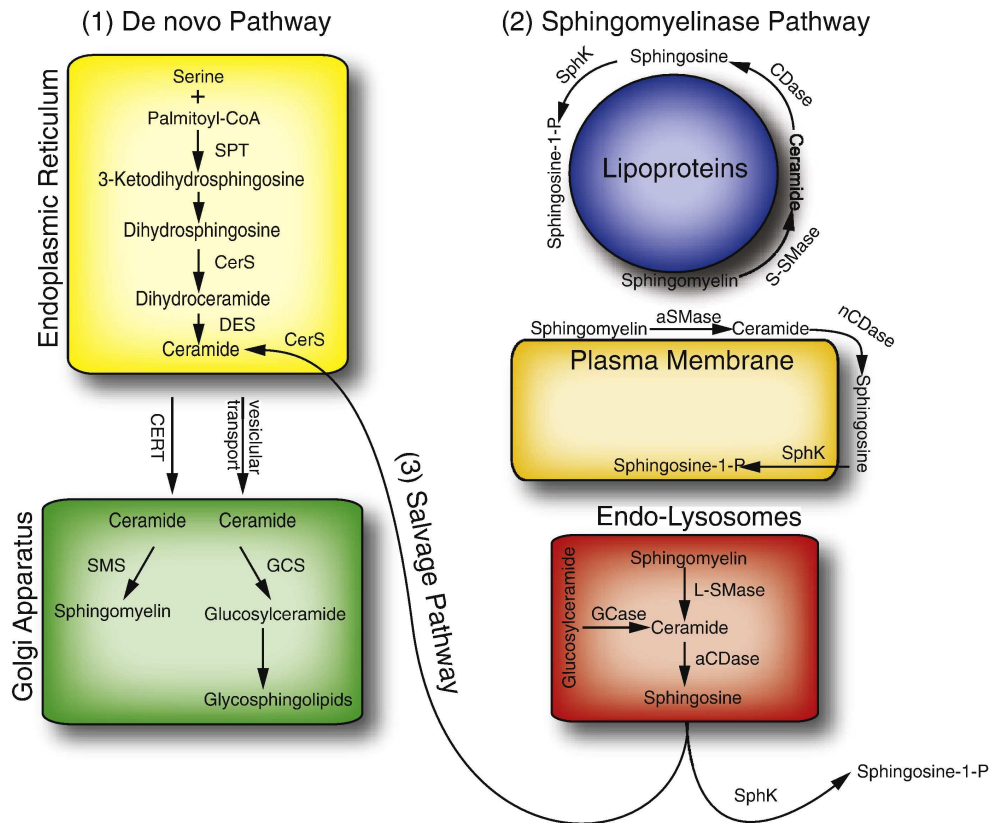


Figura 3. Metabolismo e transporte dos esfingolípido. SPT, Serina palmitoil-transferase; CerS, Ceramida sintetase; DES, Dihidroceramida desaturase; CERT, Proteína de transferência de ceramida; SMS, Esfingomielina sintetase; GCS, Glicosilceramida sintetase; aSMase, Esfingomielinase ácida; S-SMase, Esfingomielinase secretora; L-SMase, Esfingomielinase lisossomal; GCase, Glucocerebrosidase; aCDase, Ceramidase ácida; nCDase, Ceramidase neutra; SphK, Esfingosina cinase. Figura extraída de Jenkins *et al.*, 2009.

A síntese *de novo* da ceramida inicia-se no RE a partir da condensação da serina e palmitoil-CoA, por acção da enzima serina palmitoil transferase, formando-se a 3-cetoesfinganina que é posteriormente reduzida a esfinganina. De seguida, a esfinganina é acilada formando-se a dihidroceramida. No passo seguinte ocorre a formação da ceramida por acção da enzima dihidroceramida redutase. A ceramida é endereçada posteriormente para o complexo de Golgi onde é utilizada como substrato para a síntese de esfingolípido mais complexos, a esfingomielina (SM) e os glicosfingolípido

(GSLs) (revisado em Kolter e Sandhoff, 2006). Porém, esta não é a única fonte de ceramida endógena. Em mamíferos, a ceramida tem origem em três vias principais:

- (i) Via biossintética, que se realiza a partir de precursores simples.
- (ii) Via catabólica, que é catalisada por diferentes esfingomielinases. As esfingomielinases (SMases) catalisam a hidrólise de esfingomielina em ceramida e fosforilcolina por clivagem da ligação fosfodiéster. A hidrólise da SM ocorre no sistema endossomal-lisossomal, no folheto externo da MP, e também ocorre associada a lipoproteínas. Várias formas com diferente localização subcelular, pH ótimo e dependência de cátions têm sido identificadas e caracterizadas: SMase ácida (lisossomal), SMases neutras com diferentes graus de dependência em relação a cátions divalentes tais como Mg^{2+} e Zn^{2+} (membrana plasmática, citosol, nucleoplasma) e SMase alcalina (Levade *et al.*, 1999).
- (iii) Via de reciclagem, em que a ceramida é formada a partir da acilação da esfingosina e de outras bases esfingóides resultantes da degradação lisossomal de esfingolípido complexos. De facto, o catabolismo lisossomal de glicoesfingolípido decorre de forma sequencial e culmina com a produção de esfingosina e ácido gordo resultantes da acção da ceramidase ácida sobre a ceramida. Após atravessar a membrana lisossomal, a esfingosina pode ser usada na síntese de ceramida, por acção da ceramida sintetase, ou na síntese de esfingosina-1-fosfato, por acção da esfingosina cinase. Por outro lado a ceramida também pode ser convertida em ceramida-1-fosfato por acção da enzima ceramida cinase (Levade *et al.*, 1999).

Adicionalmente, o nível intracelular de ceramida também depende da acção de ceramidases. À semelhança da esfingomielinase ácida (aSMase), as ceramidases englobam uma família heterogénea de enzimas cuja função principal é a degradação da ceramida em esfingosina (revisto em Mao e Obeid, 2008). De facto, a degradação da ceramida pode ser efectuada por cinco ceramidases distintas (Tabela 1). A ceramidase ácida está localizada nos lisossomas e é activa a pH ácido (pH óptimo 4.5); as restantes quatro enzimas (ceramidase neutra e ceramidases alcalinas) não foram observadas no lisossoma. As ceramidases exibem diferente especificidade para os substratos. De facto, está documentado que a ceramidase neutra e ceramidase alcalina não compensam o defeito em ceramidase ácida lisossomal observada em doentes de Farber (revisto em Kolter e Sandhoff, 2006).

Tabela 1. Características principais das ceramidases humanas.

Ceramidase	Gene	Cromossoma	Proteína (kDa)	LCe	pH	Substrato
Ceramidase ácida	<i>ASHA1</i>	8	13 e 40	L	4.5	C6-C16-Cer (insaturado)
Ceramidase neutra	<i>ASHA2</i>	10	142 e 118	MP	7.0	≥C14-Cer
Ceramidase alcalina 1	<i>ASHA3</i>	19	31	RE	8.5	≥C14:1-Cer (insaturado)
Ceramidase alcalina 2	<i>ASHA3L</i>	9	313	CG	9.0	≥C14-Cer
Ceramidase alcalina 3	<i>PHCA</i>	11	316	CG	9.5	≤ C20:1-Cer (insaturado)

LCe, Localização celular; L, Lisossoma; CG, Complexo de Golgi; MP, Membrana plasmática; RE, Reticulo endoplasmático; pH, pH óptimo de actividade.

Em conclusão, dada a importância biológica da ceramida, o seu *turnover* celular deverá ser regulado de forma específica, rigorosa e complexa. Para isso contribui o facto do seu nível intracelular depender da contribuição de várias vias metabólicas: da

síntese *de novo*, da acção de SMases sobre a esfingomielina e da acção de ceramidases sobre a ceramida. A existência de diversas formas de SMases e ceramidases localizadas em diferentes compartimentos celulares sugere que a função que os lípidos bioactivos desempenham intracelularmente pode estar relacionada não só com aspectos estruturais mas também com o seu compartimento de origem.

2. Doenças associadas a alterações esfingolípídicas

Os esfingolípido, tal como referido anteriormente, são componentes essenciais das membranas das células eucarióticas e desempenham funções estruturais e reguladoras importantes *in vivo*, muito embora a função celular exacta de cada esfingolípido não seja ainda conhecida. A importância dos esfingolípido na fisiologia celular é evidenciada pela ocorrência de inúmeras doenças hereditárias metabólicas resultantes de bloqueios específicos na via de degradação dos glicosfingolípido e que são descritas nas próxima secção.

2.1 - Esfingolipidoses: doenças do catabolismo dos esfingolípido

Sabe-se que estas patologias metabólicas resultam da deficiência de enzimas lisossomais ou cofactores proteicos envolvidas na degradação lisossomal de glicosfingolípido. (Ginzburg *et al.*, 2004). Subsequentemente, acumulam-se esfingolípido no interior dos lisossomas da célula e essa sobrecarga conduz inicialmente a uma disfunção lisossomal e posteriormente a uma disfunção celular generalizada, dando origem a doenças geralmente graves e associadas a uma morte prematura. (Ginzburg *et al.*, 2004). O catabolismo lisossomal dos esfingolípido e as patologias associadas estão representadas na Figura 4.

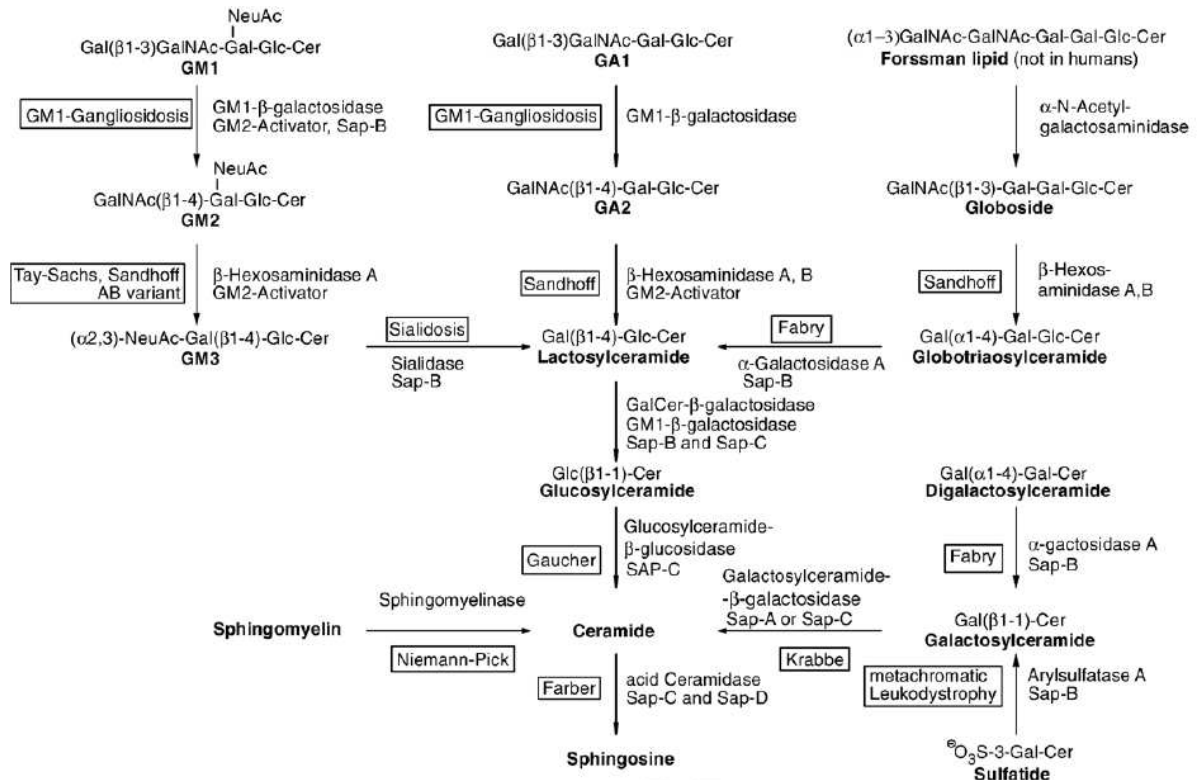


Figura 4. Esfingolipidoses e o metabolismo dos esfingolípido. Figura representativa da degradação lisossomal dos esfingolípido e das etapas que se encontram bloqueadas nas Esfingolipidoses. Figura retirada de Kolter e Sandhoff, 2006.

As Esfingolipidoses são doenças raras, mas altamente mortais, e a maioria apresenta um grau significativo de envolvimento neurológico, o qual depende do tipo de esfingolípido acumulado e da vulnerabilidade dos diferentes tipos celulares a essa sobrecarga.

A frequência de cada uma destas doenças não é elevada, mas enquanto grupo de doenças representa uma prevalência significativa e, por esse facto, as Esfingolipidoses são consideradas a causa mais comum de doença pediátrica neurodegenerativa. (Ginzburg *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2004).

Estas doenças são clinicamente heterogêneas, apresentando diferentes graus de severidade que estão relacionados com os níveis residuais de actividade enzimática e com o grau de envolvimento neurológico. Em geral, o nível residual de actividade enzimática correlaciona-se inversamente com a gravidade do fenótipo clínico. Assim, quando pouca ou nenhuma actividade enzimática é detectada, o fenótipo clínico associado é geralmente mais grave, com idade de início da doença no período neo-natal ou na infância, evolução rápida da doença e morte prematura da criança. Relativamente ao grau de envolvimento neurológico, na doença de Tay-Sachs, o envolvimento neurológico representa a única manifestação, com pouco ou nenhum envolvimento dos órgãos viscerais. No entanto, nas doenças de Gaucher, Niemann-Pick tipo B e Fabry, as manifestações são mais ao nível dos órgãos viscerais e o envolvimento neurológico é residual, pelo que estas patologias podem ter um início mais tardio e uma evolução mais lenta do que aquele que é observado em doenças com envolvimento neurológico, como é o caso da doença de Tay-Sachs (Ginzburg *et al.* 2004).

2.2 - Doença de Alzheimer

Para além do papel dos esfingolípido no desenvolvimento e progressão das Esfingolipidoses, nos últimos anos têm surgido publicações que sublinham o envolvimento de alguns esfingolípido, como a ceramida, noutras doenças neurológicas como a Doença de Alzheimer (DA) (Posse de Chaves , 2006)

Caracterizada clinicamente por uma progressiva perda de memória e patologicamente pela acumulação de péptido- β -amilóide (A β), proteínas Tau e pela formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares a nível cerebral, a DA, que deve o seu nome a Alois Alzheimer, é uma doença neurodegenerativa progressiva. A acumulação de A β está associada a características morfológicas típicas da DA, nomeadamente os emaranhados neurofibrilares, as placas neuríticas e angiopatia amiloide cerebral (Kreutzberg *et al.*, 1988).

Sendo a idade o maior factor de risco da DA, esta é uma doença com uma prevalência crescente numa população que tem uma esperança de vida cada vez maior (Yankner *et al.*, 2007).

A DA está associada ao processo de envelhecimento celular precoce (Kreutzberg *et al.*, 1988). De facto, o envelhecimento celular resulta da acção cumulativa de vários factores de stress celular, nomeadamente moléculas pró-inflamatórias e stress oxidativo, que podem estimular a actividade das esfingomielinases levando à produção do lípido pró-apoptótico, a ceramida (Constantini *et al.*, 2005).

No sentido de explicar a etiologia da doença, foram inicialmente propostas duas hipóteses: a cascata amiloidal e a colinérgica. De acordo com a hipótese da cascata amiloidal, a neurodegeneração na doença de Alzheimer inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP) e resulta na produção, agregação e deposição da substância β -amilóide (A β) e placas senis. (Hardy *et al.*, 2002). De acordo com a hipótese colinérgica, a disfunção do sistema colinérgico é suficiente para produzir uma deficiência de memória em modelos animais, a qual é semelhante à doença de Alzheimer. (Auld *et al.*, 2002). Cérebros de pacientes portadores da doença de Alzheimer mostraram degeneração dos neurónios colinérgicos ocorrendo também uma redução dos marcadores colinérgicos, tendo sido observada uma actividade reduzida das enzimas colina acetiltransferase e acetilcolinesterase no córtex cerebral de pacientes portadores da doença de Alzheimer (Auld *et al.*, 2002).

A ligação entre a DA e o desequilíbrio lipídico foi proposta na sequência da associação do alelo E4 da apolipoproteína E (apoE4) a um risco acrescido de desenvolvimento de DA hereditária ou esporádica, assim como o desenvolvimento precoce de algumas formas da doença (Constantini *et al.*, 2005). Estudos posteriores revelaram que na DA ocorriam alterações significativas de diversos lípidos tais como: ceramida, gangliosídeos, colesterol e sulfatídeos. Relativamente à ceramida, foi observado um aumento significativo do nível de ceramida em amostra de cérebro de doentes numa fase inicial da DA (Posse de Chaves, 2006), que pode resultar da inactivação de ceramidase (enzima que degrada a ceramida) ou da inibição da enzima glucosilceramida sintetase (Ozbayraktar *et al.*, 2009).

Haughey e colaboradores, em 2010, postularam que esta acumulação de A β pode contribuir para a morte neuronal via activação da via esfingomielina/ceramida. Esta relação foi também evidenciada por Xingxuan e colaboradores (2010), que observaram uma relação directa entre o aparecimento de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares em doentes com DA e a existência de níveis diminuídos de SIP e de níveis

aumentados de ceramida. Haughey e colaboradores (2010) observaram ainda uma diminuição da expressão da ceramida cinase e da ceramidase ácida, bem como da glucosilceramida transferase. Segundo os mesmos investigadores, esta observação teria como consequência uma redução na síntese de glicosfingolípido e um aumento do nível de ceramida. Deste modo, os níveis reduzidos de S1P e o aumento dos níveis de ceramida deverão ter um papel importante na patogénese da DA, que é potenciado pela relevância dos esfingolípido ao nível da fisiologia neuronal, ao nível da regulação da actividade e localização dos receptores de membrana. Assim, estratégias terapêuticas que sejam baseadas não só em agentes farmacológicas, como também nutricionais, poderão representar uma estratégia promissora para a prevenção e tratamento deste tipo de doenças neurodegenerativas (Haughey *et al.*, 2010).

Por último, não se sabe concretamente se a regulação genética de citocinas e de proteínas envolvidas na resposta inflamatória afectará a longevidade. Contudo, a inflamação crónica, que apresenta níveis elevados de citocinas e de proteínas de resposta inflamatória, tem sido associada a diversas patologias que interferem com a esperança de vida, nomeadamente a doença de Alzheimer, a aterosclerose ou o cancro (Pinto *et al.*, 2009).

2.3 – Cancro

Uma das mais importantes funções dos esfingolípido é o seu papel no destino celular, regulando quer o crescimento quer a morte celular. Este papel é extremamente complexo e depende do equilíbrio existente entre a ceramida, os seus precursores e os derivados metabólicos.

Como referido anteriormente, através da sua capacidade de indução da apoptose nas células tumorais, a ceramida tem um papel muito relevante na progressão tumoral. Por sua vez, os metabolitos da ceramida regulam efeitos diferentes e, por vezes, até opostos aos das próprias ceramidas. Dentro dos metabolitos das ceramidas encontramos alguns dos compostos referidos anteriormente: esfingosina, ceramida 1-fosfato, glucosilceramida e galactosilceramida. (Posse de Chaves, 2006). A ceramida é um mediador de inúmeras respostas celulares, tais como a apoptose e a senescência e, por

Um exemplo da influência das alterações dos esfingolípidos no cancro é-nos dado por Nicolae *et al.* (2011) que, ao realizarem um estudo sobre a influência da quantidade de gangliosídeos no crescimento tumoral de indivíduos com melanoma, observaram que a quantidade de gangliosídeos totais era superior em pacientes com melanoma comparativamente ao nível detectado em pacientes com lesões pré-malignas. Estes investigadores demonstraram também que a sobrevivência dos pacientes sujeitos a tratamento para melanoma dependia da quantidade de gangliosídeos, estando aumentada em pacientes com níveis de gangliosídeos inferiores e diminuída em pacientes com níveis aumentados de gangliosídeos.

Ainda, Bansode *et al.* (2011) estudaram o efeito da ceramida-C6 na inibição de células cancerígenas. Estes autores demonstraram que a ceramida é um potente anti-angiogénico, por indução da apoptose, regulando a angiogénese induzida pelo crescimento tumoral.

2.4 - Esclerose Múltipla

A Esclerose múltipla é uma doença auto-imune caracterizada pela desmielinização do SNC, em que os oligodendrócitos - células que se enrolam à volta do axónio formando uma estrutura conhecida por bainha de mielina e que é particularmente rica em esfingolípidos – são os alvos da doença.

Wheeler *et al.* (2008), sugerem que a manutenção do equilíbrio do padrão lipídico celular é um factor crítico para uma função neural normal uma vez que alterações subtis do conteúdo lipídico podem ter repercussões funcionais, podendo até contribuir para a degradação quer da mielina, quer dos axónios. Estes investigadores identificaram e quantificaram diversos tipos de lípidos em amostras de cérebro de indivíduos com e sem esclerose múltipla e verificaram que na esclerose múltipla activa há uma alteração na composição lipídica que é representada por uma maior quantidade de fosfolípidos e uma menor quantidade de esfingolípidos, sugerindo uma alteração metabólica. Por outro lado, a apoptose dos oligodendrócitos pode ser um dos eventos patogénicos mais importantes, seguido pela activação glial e pela infiltração dos linfócitos e macrófagos (Jana *et al.* 2010).

O trabalho publicado por Jana e Pahan, em 2010, sugere que alterações na produção de S1P e de ceramida deverão contribuir para a desmielinização observada na esclerose múltipla. De facto, estes autores observaram que a produção de ceramida, derivada da acção da esfingomielinase, em resposta a factores indutores de stress oxidativo induz a apoptose dos oligodendrócitos e dos neurónios, que a S1P regula a entrada de linfócitos na circulação e ainda que o medicamento, FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol) - composto descoberto através da modificação de um produto natural, a miriocina, oralmente activo e que funciona como um modulador do receptor da S1P (Chiba e Adachi, 2012), bloqueia um receptor da S1P (S1Pr1) reduzindo a progressão da doença. De referir que a interacção de S1P com o receptor S1Pr1 é necessária para a migração das células auto-imunes dos órgãos linfáticos. Assim, estes resultados sugerem que os inibidores farmacológicos da esfingomielinase e os antagonistas dos receptores de S1P, poderão representar, no futuro, novas vias terapêuticas para a neuroinflamação e a desmielinização que caracterizam a esclerose múltipla. Corroborando os resultados obtidos por estes autores, o trabalho publicado por Van Doorn *et al.*, (2010) demonstra que os astrócitos activados presentes nas lesões de doentes com esclerose múltipla, quando colocados em cultura sob condições pro-inflamatórias, aumentam muito a expressão dos receptores 1 e 3 da S1P, o que sublinha, mais uma vez, o papel dos esfingolípido nesta patologia. A visão actual sobre o papel da S1P na etiopatologia molecular da esclerose múltipla está esquematizada na Figura 6.

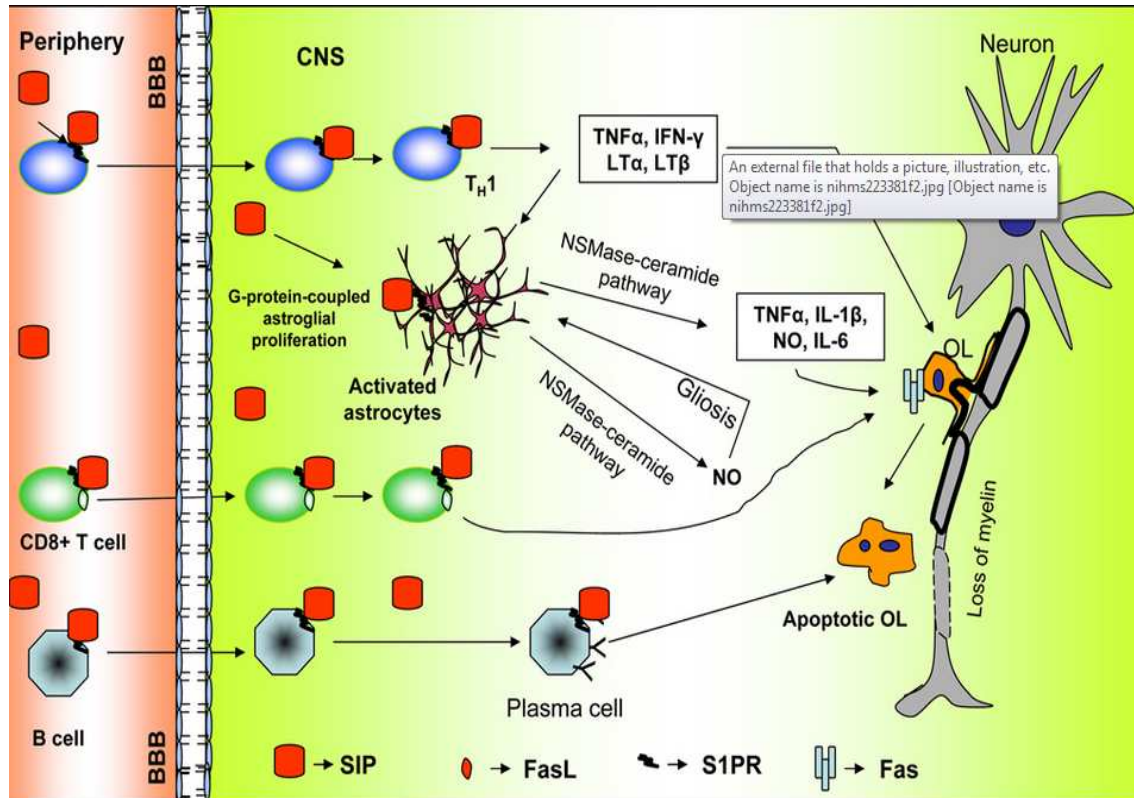


Figura 6. Papel da S1P na Esclerose Múltipla. As células T activadas (Th1), expressam o receptor da S1P, que interage com a S1P encontrada no sangue durante a inflamação e entra no SNC, onde são produzidos produtos citotóxicos pró-inflamatórios que promovem a morte e desmielinização dos oligodendrócitos. Enquanto que as células T CD8 + matam diretamente os oligodendrócitos através da interação pela via do metabolismo das ceramidas, as células B que expressam S1PR entram no SNC, diferenciam-se em plasmócitos e originam a morte dos oligodendrócitos através da via ADCC (anticorpo dependente de citotoxicidade mediada por células). Os astrócitos que expressam a S1PR, utilizam a mesma via para libertar mais produtos citotóxicos pró-inflamatórios. Figura extraída de Jana *et al.*(2010).

2.5 Patologias cardiovasculares

Diversos autores, nomeadamente Alewijnse e Peters (2008), referem o papel dos esfingolípido na patologia cardiovascular, designadamente na regulação da angiogénese, ou seja, na formação de novas redes capilares, função esta importantíssima para a cicatrização, desenvolvimento uterino e para o desenvolvimento de algumas patologias, como retinopatia diabética e cancro.

Saba e Hla (2004), observaram que a administração de S1P a modelos animais sujeitos a isquemia/reperfusão exerce um efeito cardioprotector, diminuindo o batimento cardíaco, a pressão arterial e a contração ventricular. Adicionalmente, a S1P poderá ter um importante efeito na regulação do óxido nítrico e consequente vasoconstrição.

No caso das lesões ateroscleróticas, também é observada uma acumulação de ceramidas e de esfingomielina, que foi associada à apoptose celular bem como a arritmias e até falência cardíaca. Dentro dos esfingolípidos, é também de salientar que existem evidências experimentais de que a ceramida, a lactosilceramida a esfingosina-1-fosfato, promovem a adesão e migração dos monócitos, tendo como consequência um processo inflamatório, que estará na base da doença aterosclerótica. Apesar da maioria das moléculas esfingolípídicas identificadas nas placas ateroscleróticas isoladas de humanos e de animais parecerem ser resultantes da síntese *de novo*, estudos recentes sugerem que poderão ser originários do plasma, nomeadamente a esfingomielina (Hoff e Morton, 1985; Jeong *et al.*, 1998).

Está documentado que o nível de ceramida, maioritariamente proveniente da hidrólise da esfingomielina por acção de esfingomielinases, está aumentado na aterosclerose e em lesões provocadas por isquemia/reperfusão. Vários factores de risco da patologia cardiovascular associados à produção de ceramida têm sido descritos tais como alterações do nível de citocinas específicas, da forma oxidada da LDL e da homocisteína (Figura 7) (revisto em Bismuth *et al.*, 2008; Yeboaha *et al.*, 2010).

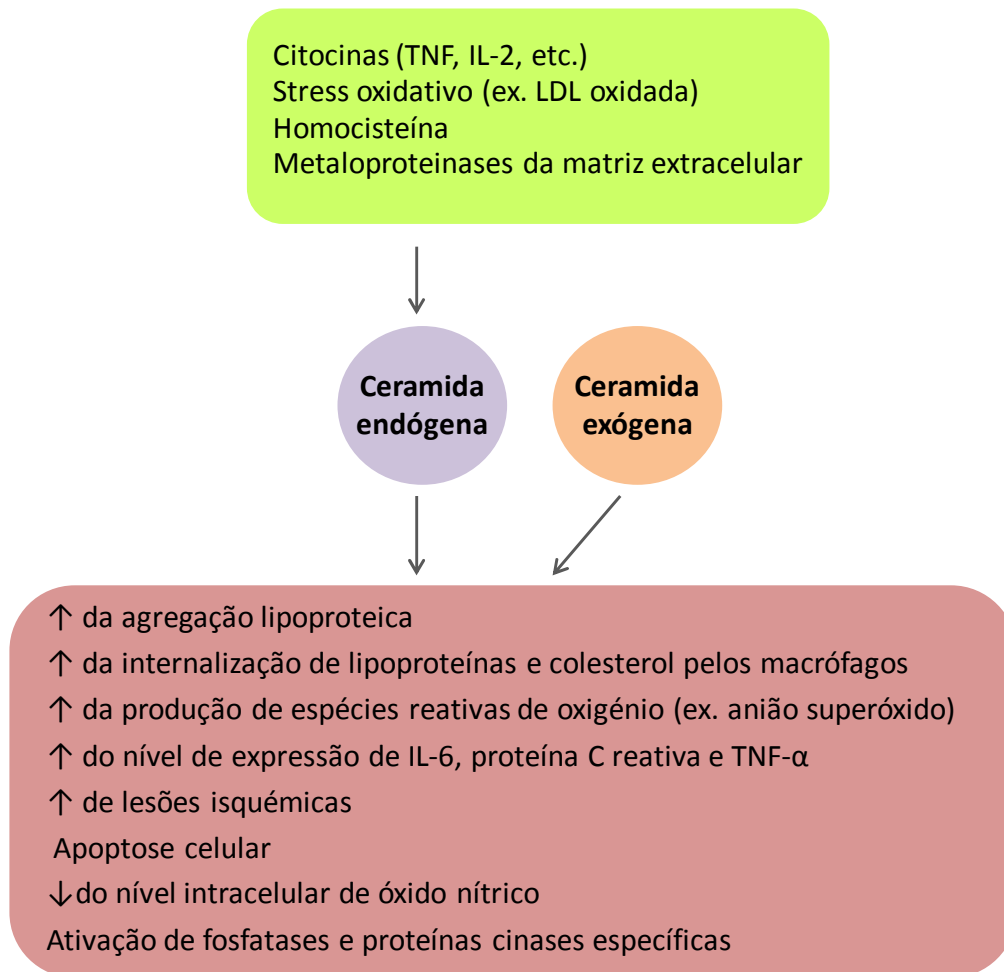


Figura 7. Relação da ceramida com a patologia cardiovascular. Figura adaptado de Bismuth *et al.* (2008).

A ceramida têm sido associada à activação de várias moléculas sinalizadoras incluindo a proteína cinase C, proteínas Ras, Rac1, Rho, e cinase N-terminal Jun (JNK)/cinases p38 (p38-K) (revisto em Bismuth *et al.*, 2008). Por conseguinte, conhecer as vias moleculares induzidas pela ceramida que estão associadas à patologia vascular deverá ser útil na identificação de novos alvos terapêuticos. De facto, as SMases têm sido consideradas potenciais alvos terapêuticos também no tratamento da aterosclerose e do enfarte do miocárdio e vários inibidores têm sido testados, especialmente *in vitro*. Pelo facto de serem de natureza muito diversa e alguns actuarem selectivamente sobre

os diferentes tipos de SMases, este tópico não será explorado no âmbito do presente trabalho, mas sugere-se a revisão de Pavoine e Pecker (2009) para um conhecimento mais aprofundado sobre esta matéria. Por último, relativamente à esfingomiélin, presentemente não é consensual que se trate de um factor de risco da doença coronária.

3. Potencialidade terapêutica da modulação do metabolismo esfingolípido

Tendo por base a informação apresentada nas secções anteriores, pretende-se nesta secção sublinhar a importância da regulação do metabolismo esfingolípido como um alvo terapêutico potencialmente promissor numa ampla gama de doenças de etiologia muito diversa, algumas das quais exploradas no âmbito do presente trabalho.

Mutações nos genes que codificam as enzimas que catalisam algumas reacções do catabolismo dos esfingolípidos causam doenças de sobrecarga lisossomal conhecidas por Esfingolipidoses. Estas doenças apresentam, geralmente, envolvimento neurológico e conduzem a uma morte prematura sublinhando, por isso, a importância de um nível regulado de SLs para o normal funcionamento das células. A sequência de eventos desencadeados pela sobrecarga lisossomal de SLs ainda não é bem conhecida. No entanto, vários mecanismos fisiopatológicos têm sido sugeridos, muitos deles comuns a diversas esfingolipidoses como é o caso da inflamação e da apoptose (Tardy *et al.*, 2004). De facto, apesar da morte celular programada ser essencial para o normal desenvolvimento do sistema nervoso, quer central quer periférico, a desregulação deste processo deverá ser determinante para o início e/ou desenvolvimento destas patologias.

Várias abordagens terapêuticas têm sido propostas para o tratamento das Esfingolipidoses: terapia génica, terapia por *chaperones*, reposição enzimática, transplante de medula óssea, correção cruzada mediada por células, e terapia de privação de substrato (como acontece com a inibição da glucosilceramidase, enzima que sintetiza a glucoceramida e cuja inibição reduz a quantidade de glucosilceramida no lisossoma) (revisto em Beck, 2010). Assim, em doenças relacionadas com a acumulação de esfingolípidos, a ideia base de praticamente todas estas estratégias

terapêuticas consiste na depleção dos lípidos acumulados, através do aumento da capacidade degradativa do lisossoma e/ou diminuição do nível de substrato que atinge as células e/ou compartimento alvo. Neste contexto, uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia molecular será importante para a identificação de novas abordagens terapêuticas para estas doenças.

No caso das doenças neurodegenerativas progressivas, como a Doença de Alzheimer, estão documentadas alterações no metabolismo dos SLs que sugerem que a acumulação de ceramida e esfingosina podem ser fatores causais da extensão anormalmente elevada de apoptose que ocorre na doença de Alzheimer.

Ainda no que se refere a doenças neurológicas, é importante também mencionar que a esfingosina-1-fosfato poder ter um papel relevante na regulação da secreção de neurotransmissores e, subsequentemente, a modulação do seu nível metabólico representar uma potencial abordagem terapêutica neste tipo de doenças.

No caso do cancro, sendo a apoptose um mecanismo de morte celular programada que permite o correto desenvolvimento dos organismos, a sua desregulação pode potenciar a proliferação celular e o desenvolvimento da patologia. Considerando que a esfingosina-1-fosfato, a ceramida-1-fosfato, a lactosilceramida e a glactosilceramida são “promotores de tumores”, induzindo a proliferação celular e que a ceramida, a esfingosina e alguns gangliosídeos são denominados supressores tumorais por promoverem a indução da apoptose, o balanço dinâmico entre a esfingomielina e a ceramida, bem como entre a ceramida e a esfingosina-1-fosfato, deve ser cuidadosamente estudado uma vez que ele pode fornecer informação relevante sobre a adequação da regulação do metabolismo dos SLs como opção terapêutica. Comparativamente às Esfingolipidoses, no cancro é observada a situação inversa, isto é, um défice patológico de esfingolípido apoptóticos. Segundo Özbayraktar e Ulgen (2010), que efectuaram a comparação matemática das várias vias biológicas para obtenção de fármacos mais eficientes na terapêutica anti-cancerígena, estes fármacos devem ter como alvos duas ou mais enzimas, e a utilização conjunta de fármacos que inibam simultaneamente o catabolismo da ceramida (Figura 8) e a sua produção (Figura 9), poderá ter benefícios terapêuticos.

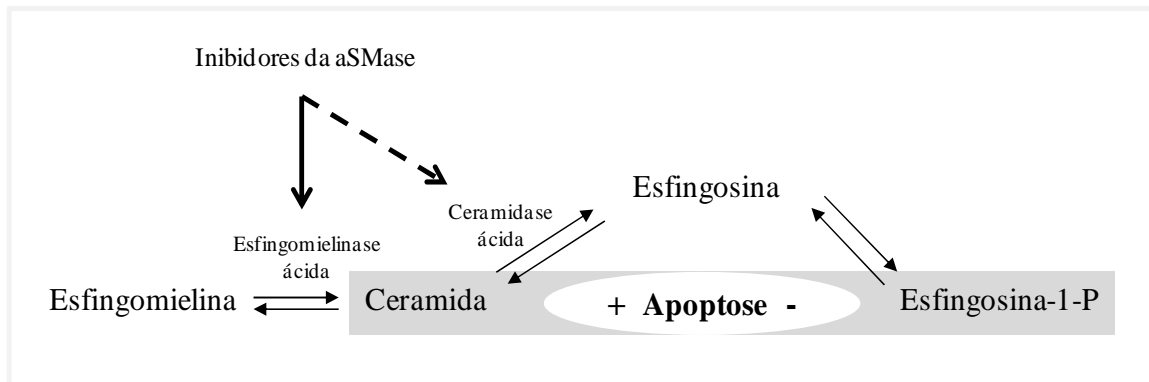


Figura 8. Regulação do reóstato ceramida/esfingosina-1-fosfato. Figura adaptada de Kornhuber *et al.*, 2010.

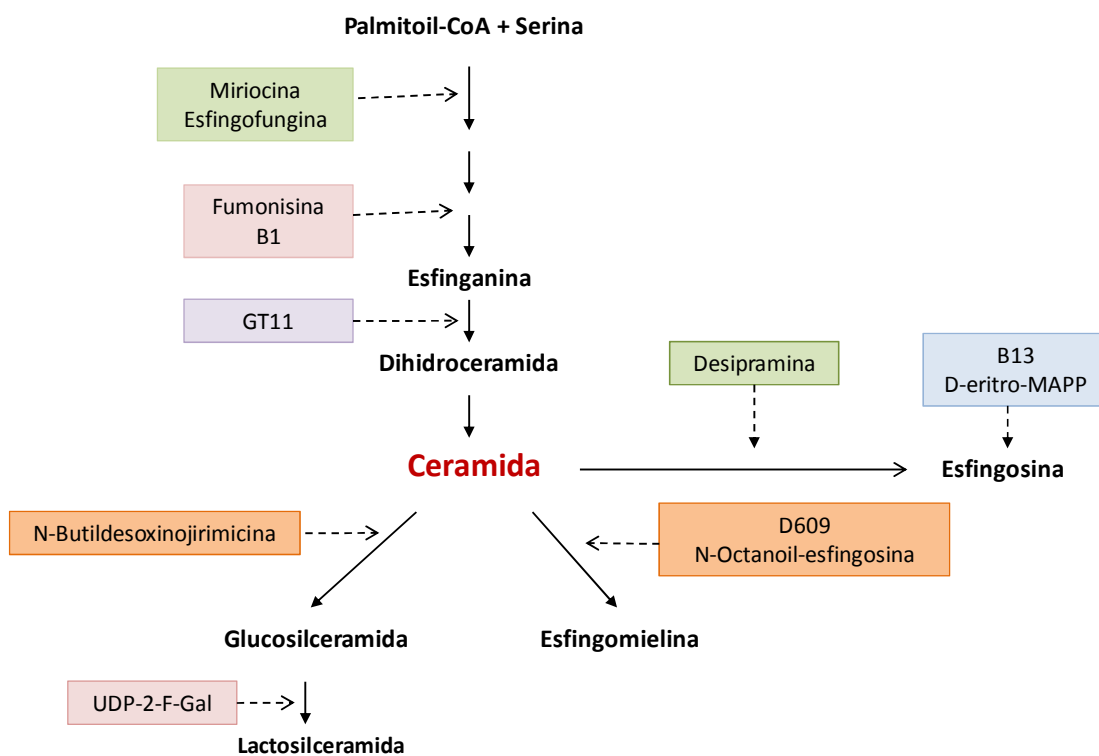


Figura 9. Via biossintética esfingolípídica e potenciais inibidores (Kornhuber *et al.*, 2010).

Relativamente às patologias cardiovasculares, o envolvimento dos SLs está particularmente documentado em situações de isquemia/reperfusão e aterosclerose. Neste contexto, a regulação do metabolismo dos esfingolípido poderá representar uma nova abordagem terapêutica nas doenças cardiovasculares que representam actualmente a principal causa de morte a nível mundial.

Assim, de um modo geral pode afirmar-se que relativamente às patologias de etiologia complexa abordadas no âmbito do presente trabalho, os inibidores farmacológicos da esfingomielinase (Figura 8), os antagonistas dos receptores da esfingosina 1-fosfato e os inibidores da síntese *de novo* da ceramida (Figura 9), em especial a miriocina, são aqueles que têm merecido especial atenção em termos terapêuticos. Globalmente, estas novas abordagens moleculares de modulação farmacológica do metabolismo dos SLs visam a regulação de processos celulares específicos, tais como proliferação, apoptose, senescência ou inflamação, e a sua aplicabilidade, no futuro, dependerá do conhecimento sobre os mecanismos moleculares desencadeados pelas alterações esfingolípídicas que ocorrem nessas patologias, os quais provavelmente merecerão a melhor atenção nos próximos anos.

CAPÍTULO III: Conclusões e perspectivas futuras

Apesar das dificuldades inerentes ao estudo de moléculas esfingolípídicas, quer pela sua natureza química quer pela complexidade das metodologias usadas no seu estudo, nas últimas décadas a investigação nesta área tem vindo a intensificar-se, permitindo uma melhor clarificação sobre o seu papel na sinalização celular e, subsequente, na regulação de processos celulares vitais, tais como a morte ou sobrevivência celular.

O conteúdo celular em moléculas esfingolípídicas é controlado por enzimas envolvidas no seu metabolismo. Deste modo, a compreensão do complexo mecanismo de regulação do nível intracelular dos esfingolípido requer um profundo conhecimento da forma como estas moléculas são sintetizadas, degradadas ou inter-convertidas. A descoberta de substâncias químicas capazes de modificar a actividade destas enzimas de uma forma selectiva representa uma oportunidade de regulação da sua acção celular e, subsequentemente, de identificação de novas estratégias terapêuticas para as doenças em que estas moléculas esfingolípídicas têm sido implicadas.

Através deste trabalho, foi possível constatar que alterações, mesmo que aparentemente subtis, no metabolismo dos esfingolípido podem originar patologias tão graves como as Esfingolipidoses, o cancro ou a doença de Alzheimer. Também foi possível verificar que existe uma linha de investigação que, tendo como ponto de partida as alterações que são observadas no metabolismo dos esfingolípido, visa a identificação de alvos terapêuticos para essas patologias. De facto, frequentemente, estas doenças representam bons modelos para a identificação e caracterização de etapas celulares fisiologicamente relevantes, contribuindo deste modo para um melhor conhecimento sobre a biologia celular e, subsequentemente, para a identificação de novas e eficazes estratégias terapêuticas.

Contudo, e apesar de ser já evidente que os esfingolípido mais simples, como a ceramida, têm um papel importante no desenvolvimento de patologias diversas, sabe-se que o mesmo esfingolípido pode desencadear acções distintas dependendo por exemplo do tipo de célula, do comprimento do ácido gordo ou do compartimento celular em que se encontra localizado, o que sugere que haverá, ainda, um caminho longo a percorrer até ser esclarecida a função exacta de cada uma destas moléculas e, subsequentemente, a sua relevância para a disfunção celular observada nas diversas situações patológicas em que têm sido implicados.

Bibliografia

ALEWIJNSE AE, PETERS SL (2008) Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: Good, bad or both?. *European Journal of Pharmacology* 585:292-302.

AULD DS, KORNECOOK TJ, BASTIANETTO S, QUIRION R (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition and treatment strategies. *Prog Neurobiol.* 68:209-45.

BANSODE RR, AHMEDNA M, SVOBODA KR, LOSSO JN (2011) Coupling in vitro and in vivo paradigm reveals a dose dependent inhibition of angiogenesis followed by initiation of autophagy by C6-ceramide. *Int. J. Biol. Sci.* 7 (5):629-44.

BECK M (2010) Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* 62:33-40.

BISMUTH J, LIN P, YAO Q, CHEN C (2008) Ceramide: a common pathway for atherosclerosis? *Atherosclerosis.* 196 (2):497-504.

BOLLINGER CR, TEICHGRABER V, GULBINS E (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim, Biophys. Acta* 1746:284-294.

CHIBA K, ADACHI K (2012) Discovery of fingolimod, the sphingosine 1-phosphate receptor modulator and its application for the therapy of multiple sclerosis. *Future Med Chem.* 4(6):771-81.

CONSTANTINI C, KOLASANI R, PUGLIELLI L (2005) Ceramide and Cholesterol: Possible Connections Between Normal Aging of the Brain and Alzheimer's Disease. Just hypotheses or molecular pathways to be identified? *Alzheimer's & Dementia* 1: 43-50.

DICKSON RC, SUMANASEKERA C, LESTER RL (2006) Functions and metabolism of sphingolipids in *saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Lipid. Res.* 45 (6):447-65.

FERRANTE M, MELIB R, RASOB J, ESPOSITO E, SEVERINO L, CARLO G, LUCISANO A (2002) Effect of fumonisin B1 on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicology Letters*, 129 (3):181–187.

FURUYA H, SHIMIZU Y, KAWAMORI T (2011) Sphingolipids in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30(3-4):567-76..

GINZBURG L, KACHER Y, FUTERMAN AH (2004) The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15:417 – 431.

HARDY J, SELKOE DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297 (5580):353-356.

HAUGHEY NJ, BANDARU VV, BAE M, MATTSON MP (2010) Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1801(8):878-886.

HEINRICH M, WICKEL M, WINOTO-MORBACH S, SCHNEIDER-BRACHERT W, WEBER T, BRUNNER J, SAFTIG P, PETERS C, KRONKE M, SCHUTZE S (2000) Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477:305-315.

HOFF HF, MORTON RE (1985) Lipoproteins containing apo B extracted from human aortas. Structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 454:183–94.

HUWILER A, KOLTER T, PFEILSCHIFTER J, SANDHO K (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1485:63-99.

JANA A, PAHAN K (2010) Sphingolipids in multiple sclerosis. *Neuromolecular Med.* 12 (4):351-361.

JEONG T, SCHISSEL SL, TABAS I, et al. (1998) Increased sphingomyelin content of plasma lipoprotein E knockout mice reflects combined production and catabolic defects and enhances reactivity with mammalian sphingomyelinase. *J. Clin. Invest.* 101:905-912

JENKINS RW, CANALS D, HANNUN YA (2009) Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular Signalling* 21 (6): 836–846.

KOLTER T, SANDHOFF T (2006) Sphingolipid metabolic disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758:2057-2059.

Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, Groemer TW, Gulbins E (2010) Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem* 26:09-20.

KREUTZBERG GW, ENGEL AK, TETZLAFF W (1988) Axonal transport of 16S acetylcholinesterase is increased in regenerating peripheral nerve in guinea-pig, but not in rat. *Neuroscience* 24 (2):729-738.

LAHIRI S, FUTERMAN AH (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids, *Cell. Mol. Life Sci.* 64:2270-2284.

LEVADE T, MALAGARIE-CAZENAVE S, GOUAZÉ V, SÉGUI B, TARDY C, ET AL (2002) Ceramide in Apoptosis: A Revisited Role. *Neurochemical Research* 27 (7-8):601-607.

LEVADE T, ANDRIEU-ABADIE N, SÉGUI B, AUGÉ N, CHATELUT M, JAFFRÉZOU JP, SALVAYRE R. (1999) Sphingomyelin-degrading pathways in human cells role in cell signalling. *Chem. Phys. Lipids* 102(1-2):167-78.

MAO C, OBEID LM (2008) Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1781:424–434.

MANSO C (1977) *Bioquímica Humana*. 2ª Edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

MERRILL A. H., SCHMELZ E. M., WANG E., DILLEHAY D. L., RICE L. G., MERIDITH F., RILEY R. T. (1997) Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets. *J. Nutr.* 127:830S–833S.

MERRILL AH (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* 277:25843-25846.

NICOLAE I, NICOLAE CD, COMAN OA, ȘTEFĂNESCU M, COMAN L, ARDELEANU C (2011) Serum total gangliosides level: clinical prognostic implication. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 52(4):1277-81.

OZBAYRAKTAR F, ULGEN K (2009) Molecular facets of sphingolipids: Mediators of diseases. *Biotechnol. J.* 4(7):1028-41.

ÖZBAYRAKTAR F, ÜLGEN K (2010) Drug target identification in shingolipid metabolism by computational systems. *Biologic tools: Metabolic Control Analysis and Metabolic Pathway analysis. J. Biom. Inf.* 43:537-549.

PATTON JL, LESTER RL (1991) The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* 174 (22):7180–7184.

PAVOINE C, PECKER F (2009) Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res.* 82 (2):175–183.

PINTO MF, BARBOSA DA, FERRETI C, SOUZA L, FRAM D, BELASCO A. (2009) Qualidade de vida de cuidadores de idosos com doença de Alzheimer. *Acta Paul. Enferm.* 22 (5):652-7.

PINTO R, CASEIRO C, LEMOS M, LOPES L, FONTES A, RIBEIRO H, PINTO E, SILVA E, ROCHA S, MARCÃO A, RIBEIRO I, LACERDA L, RIBEIRO MG, AMARAL O, SÁ MIRANDA MC (2004) The prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur. J. Hum. Genet.* 12:87-92.

POSSE DE CHAVES EI (2006). Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:1995–2015.

RUVOLO PP. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.* 47, 383-392.

SABA JD, HLA T (2004) Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ. Res.* 94:724-734.

SÉGUI B, ANDRIEU-ABADIE N, JAFFRÉZOU JP, BENOIST H, LEVADE T (2006) Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (12):2104-20.

SILLENCE DJ, PLATT FM (2004) Glycosphingolipids in endocytic membrane transport. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (4):409-16.

TARDY C, ANDRIEU-ABADIE N, SALVAYRE R, LEVADE T (2004) Lysosomal storage diseases: is impaired apoptosis a pathogenic mechanism? *Neurochem. Res.* 29 (5):871-880.

TURNER PC, NIKIEM P, WILD CP (1999) Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research.* 44:81-93.

VAN DER REST ME, KAMMINGA AH, NAKARRO A, ANRAKU Y, POOLMAN B, KONINGS WN (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59:304-322.

VAN DOORN R, VAN HORSSSEN J, VERZIIL D, WITTE M, RONKEN E, VAN HET HOF B, LAKEMAN K, DIJKSTRA CD, VAN DER VALK P, REIJERKERK A, ALEWIJNSE AE, PETERS SL, DE VRIES HE (2010) Sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 3 are upregulated in multiple sclerosis lesions. *Glia.* 58 (12):1465-76.

WHEELER D, BANDARU VV, CALABRESI PA, NATH A, HAUGHEY NJ (2008) A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 131:3092-102.

XINGXUAN HE, YU HUANG, BIN LI, CHENG-XING GONG, AND EDWARD H. SCHUCHMAN (2010) Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 31 (3): 398-408.

Y. D. VANKAR, R. R. SCHMID (2000) Chemistry of Glycosphingolipids. *Chem. Soc. Rev.* 29:201-216