

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**EFEITOS DOS ÁCIDOS PROPIÔNICO E METILMALÔNICO
SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DA SUBUNIDADE DE ALTO PESO
MOLECULAR DOS NEUROFILAMENTOS EM FATIAS DE CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS**

Lilian Vivian

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur

Co-Orientador:

Prof. Dr. Moacir Wajner

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

Porto Alegre

2005

**“Limitações
SÃO CRIADAS
apenas pela nossa mente.”**
(PROVÉRPIO CHINÊS)

***Dedico esse trabalho à sociedade brasileira
e peço que acredite e valorize seus pesquisadores.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela benção de cada dia e de Ter colocado em meu caminho pessoas que nomeei AMIGOS.

Um agradecimento especial a grande amiga Regina, pela oportunidade que me deu de amar a pesquisa e pelos exemplos de generosidade e criatividade.

Obrigada às amigas e amigos do Laboratório 31: Priscila, Rodrigo, Cláudia, Lúcia Maria, Ariane, Beatriz, Luana, André, Francielle, Patrícia, Aline, Sabrina, Nádia, Sofia, Carenina e Lilian. Um obrigado especial à Samanta por todo tipo de parceria.

Obrigada aos amigos dos demais laboratórios: Alexandre Tavares, Dioginho, Lúcia Martini, Patrícia, Cíntia, Melissa, Daniel, Juliana, Janine, Guilian, Carina, Marcelo.

Obrigada aos professores amigos: Moacir, Clóvis, Carmem e Vera.

Obrigada aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Cléia e a sua santa paciência.

Obrigada aos inúmeros amigos da Faculdade de Farmácia.

Obrigada às amigas do PCN.

Obrigada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

Finalmente, agradeço com todo meu carinho àqueles que, desde o início da minha vida, me ensinaram o sentido da palavra AMOR: à minha mãe Zenaide, ao meu pai Elói, aos meus irmãos Luciane, Elisandra e Elói Júnior; aos meus avós

Gentília e Mário; à minha tia avó Irmã Terezinha; às minhas madrinhas Carmem e Dolores; ao meu padrinho Valdeliro; às minhas tias e tios, em especial à Zairene e à Edite; às minhas primas e primos. Também agradeço àqueles que estão me ensinando novos sentidos para a palavra AMOR: ao Diogo e aos seus pais Neuza e Hildo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
I – INTRODUÇÃO.....	1
1. ACIDEMIAS PROPIÔNICA E METILMALÔNICA.....	1
2. CITOESQUELETO.....	3
2.1. Filamentos de Actina.....	4
2.2. Microtúbulos.....	5
2.3. Filamentos Intermediários.....	7
2.3.1. Neurofilamentos.....	9
3. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	11
3.1 Fosforilação dos Neurofilamentos.....	13
4. GLUTAMATO.....	15
5. GABA.....	18
II – OBJETIVOS.....	21
III – MÉTODO EXPERIMENTAL.....	22
IV – RESULTADOS.....	27
V – DISCUSSÃO.....	41
VI – CONCLUSÕES.....	49
VII – PERSPECTIVAS.....	50
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Detalhes enzimáticos da principal rota catabólica para propionil-CoA e metilmalonil-CoA.....	1
Figura 2.	Representação esquemática dos constituintes do citoesqueleto.....	4
Figura 3.	(A) Micrografias eletrônicas e as representações esquemáticas correspondentes de um filamento de microtúbulo; (B) crescimento e retração de um conjunto de microtúbulos.....	6
Figura 4.	Modelo atual da formação de um filamento intermediário.....	8
Figura 5.	Micrografias eletrônicas de filamentos intermediários em neurônios e uma representação esquemática de um neurofilamento.....	10
Figura 6.	Representação esquemática de um sistema fosforilante.....	12
Figura 7.	Sub-domínios das proteínas dos neurofilamentos e seus sítios de fosforilação.....	13
Figura 8.	Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA e NMDA.....	16
Figura 9.	Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos.....	17
Figura 10.	A ligação de drogas ao receptor GABA _A que modulam a ação do neurotransmissor GABA.....	20
Figura 11.	<i>Immunoblotting</i> da proteína NF-H marcada com os anticorpos monoclonais anti NF-200 clone N52 e anti NF-200 clone NE14.....	27
Figura 12.	Efeitos do PA 2,5 mM sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) durante o desenvolvimento.....	28
Figura 13.	Efeitos do MMA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) durante o desenvolvimento.....	29
Figura 14.	Imunoconteúdo da NF-H presente em três frações: homogeneizado, precipitado e sobrenadante.....	30
Figura 15.	Efeitos do PA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade.....	32

Figura 16. Efeitos do MMA sobre o imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade.....	33
Figura 17. Efeitos do PA sobre o imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade.....	34
Figura 18. Efeitos do MMA sobre o imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade.....	35
Figura 19. Efeitos do PA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre o imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade.....	36
Figura 20. Efeitos do MMA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre o imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade.....	37
Figura 21. Efeitos do PA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre a imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade.....	39
Figura 22. Efeitos do MMA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre a imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AdoCbl = adenosilcobalamina

AMPA = ácido (*R,S*)- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

Ca⁺² = íon cálcio

cdk5 = proteína quinase 5 dependente de ciclina

CKI = caseína quinase I

Cl⁻ = íon cloreto

COMT = centro organizador de microtúbulo

DXB = Doença do Xarope do Bordo

EIM = erros inatos do metabolismo

ELA = esclerose lateral amiotrófica

Erk1/2 = quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2

FI = filamento intermediário

GABA = ácido γ -aminobutírico

GAD = ácido glutâmico descarboxilase

GFAP = proteína glial fibrilar ácida

GluRs = receptores glutamatérgicos

GSK3 = quinase glicogênio sintase 3

iGluRs = receptores glutamatérgicos ionotrópicos

K⁺ = íon potássio

KIC = ácido α -cetoisocapróico

KMV = ácido α -ceto- β -metilvalérico

KSP = seqüências dos aminoácidos lisina-serina-prolina

KSPXK = seqüência dos aminoácidos lisina-serina-prolina-X-lisina

KSPXXXK = seqüência dos aminoácidos lisina-serina-prolina-X-X-X-lisina

MAP = *mitogen-activated protein*

mGluRs = receptores glutamatérgicos metabotrópicos

MMA = ácido metilmalônico

MT = microtúbulo

Na⁺ = íon sódio

NF = neurofilamento

NF-H = neurofilamento de alto peso molecular

NF-L = neurofilamento de baixo peso molecular

NF-M = neurofilamento de médio peso molecular

NMDA = N-metil-D-aspartato

PA = ácido propiônico

PKA = proteína quinase dependente de AMP cíclico

PKC = proteína quinase C

PKCaMII = proteína quinase II dependente de Ca^{+2} /calmodulina

proteínas G = proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina

SAPK = proteína quinase ativada por estresse

SDS = dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE 10% = eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em presença de SDS

SNC = sistema nervoso central

TAC = tampão de amostra concentrado

TBS = *tris-buffered saline*

RESUMO

As acidemias orgânicas são desordens metabólicas caracterizadas, bioquimicamente, pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos e, clinicamente, por disfunções neurológicas graves. Os ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MMA) são metabólitos presentes, em altas concentrações, nos tecidos e fluídos biológicos de pacientes afetados pelas acidemias propiônica e metilmalônica, respectivamente. Os neurofilamentos (NFs) são proteínas do citoesqueleto neuronal formados pela polimerização de três subunidades, denominadas: NF de alto peso molecular (NF-H), NF de médio peso molecular (NF-M) e NF de baixo peso molecular (NF-L), com pesos moleculares aparentes de 200, 150 e 68 kDa, respectivamente. Essas proteínas são amplamente fosforiladas, sendo que seu nível de fosforilação está relacionado com a polimerização dos NFs e com a regulação das interações entre os constituintes do citoesqueleto. Neste trabalho fizemos um estudo ontogenético dos efeitos *in vitro* do PA e do MMA 2,5 mM sobre a imunorreatividade da subunidade NF-H em fatias de córtex cerebral de ratos de 9, 12, 17, 21 e 60 dias de idade. Para tanto utilizamos uma abordagem metodológica baseada na imunodeteção da NF-H com dois anticorpos diferentes: o anticorpo monoclonal anti NF-200 clone NE14 que se liga somente a epítopos fosforilados da NF-H e, portanto, reconhece a NF-H fosforilada; e o anticorpo monoclonal anti NF-200 clone N52 que reconhece a NF-H total, independentemente do nível de fosforilação. Nossos resultados mostraram que os metabólitos induzem alterações na imunorreatividade da NF-H presente na fração citoesquelética de maneira dependente do estágio de desenvolvimento do animal. Considerando o conjunto de dados obtidos com os anticorpos NE14 e N52 na fração citoesquelética, podemos dizer que o tratamento das fatias de córtex cerebral de ratos de 9 dias aumentou o nível de fosforilação sem alterar o imunoconteúdo total; em ratos de 12 e 17 dias de vida levou a um acúmulo da subunidade NF-H na fração citoesquelética e que esta proteína está na forma fosforilada; e finalmente, em ratos de 21 e 60 dias de vida os metabólitos não alteraram os parâmetros estudados. Mostramos, também, que o acúmulo da NF-H provocado pelos metabólitos em ratos de 12 e 17 dias de vida não decorreu de um aumento na síntese da proteína, mas, provavelmente devido a um desequilíbrio na relação NF-H solúvel/NF-H

polimerizada, que favoreceu a forma polimerizada. Finalmente, mostramos um possível envolvimento de mecanismos de neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica para os efeitos observados em ratos de 12 e 17 dias de idade, respectivamente. Considerando que a fosforilação é um mecanismo importante para a regulação da dinâmica de polimerização dos NFs e das interações com outros componentes do citoesqueleto, sugerimos que uma desorganização na sua homeostase possa causar uma neurodegeneração, que é característica dos pacientes portadores das acidemias propiônica e metilmalônica.

I - INTRODUÇÃO

1. ACIDEMIAS PROPIÔNICA E METILMALÔNICA

A acidemia propiônica e a acidemia metilmalônica são doenças de herança autossômica recessiva, classificadas como as acidemias orgânicas de mais alta frequência (1:40.000 à 1:50.000 cada) (Wajner *et al*, 2001). Ambas desordens foram conhecidas durante a década de 60 através de estudos com neonatos e crianças que apresentavam acidose metabólica severa ou letal, sem causa definida. Em 1964, Kaziro e Ochoa definiram os passos para o catabolismo do propionato em tecidos animais e caracterizaram as enzimas envolvidas (Kaziro e Ochoa *apud* Fenton e Rosenberg, 2001). A partir do conhecimento das rotas metabólicas a sintomatologia bioquímica característica foi definida, ou seja, o acúmulo de propionato e metilmalonato nos fluidos biológicos. A figura 1 mostra parte destas vias:

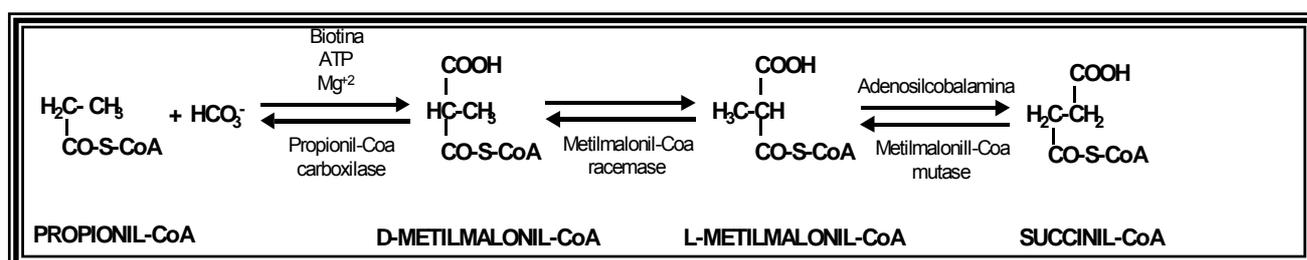


Figura 1. Detalhes enzimáticos da principal rota catabólica para propionil-CoA e metilmalonil-CoA. Adaptado de Fenton e Rosenberg, 2001.

De acordo com a figura anterior o intermediário metabólico propionil-CoA – produto do catabolismo de vários aminoácidos essenciais (isoleucina, valina, metionina, treonina), de ácidos graxos de cadeia ímpar e colesterol – é principalmente metabolizado a metilmalonil-CoA, que é isomerizado a succinil-CoA (Fenton e Rosenberg, 2001). Na acidemia propiônica ocorre uma deficiência na atividade da propionil-CoA carboxilase, provocando um acúmulo de propionil-CoA que é hidrolisado a ácido propiônico (PA). Na acidemia metilmalônica ocorre uma

deficiência na atividade da L-metilmalonil-CoA mutase, o que leva ao acúmulo do ácido metilmalônico (MMA) e, secundariamente, do PA.

Propionil-CoA carboxilase e L-metilmalonil-CoA mutase são enzimas oligoméricas. A holoenzima propionil-CoA carboxilase é composta por seis subunidades α , ligadas, cada uma, a uma molécula de biotina e seis subunidades β ($\alpha_6\beta_6$). As subunidades α são codificadas por um gene no cromossomo 13 humano e as subunidades β por um gene no cromossomo 3. A L-metilmalonil-CoA mutase é um dímero de subunidades idênticas (α_2) codificadas por um gene no cromossomo 6 e está associada a coenzima adenosilcobalamina (AdoCbl) (Fenton e Rosenberg, 2001). Como observado, para que as atividades enzimáticas sejam totalmente asseguradas é exigido uma coordenação de grande complexidade estrutural, por isso, é fácil perceber que os defeitos genéticos podem acarretar diferentes graus de deficiência enzimática. Portanto, as acidemias propiônica e metilmalônica apresentam sintomatologia variada, porém esta, em geral, é grave e pode levar a morte ou deixar seqüelas irreversíveis. Entre os danos mais comuns estão complicações neurológicas como: retardo no desenvolvimento, lesões focais ou gerais, atrofia cerebral e anormalidades no EEG (Fenton e Rosenberg, 2001). Outros sintomas muito freqüentes incluem: acidose metabólica, vômitos, letargia e hipotonia.

Apesar do quadro clínico comum a várias desordens, o quadro laboratorial é conclusivo, mostrando altas concentrações dos metabólitos acumulados nos fluídos corporais e tecidos, especialmente durante os episódios agudos. Os níveis séricos de PA em crianças com acidose neonatal letal apresentam uma grandeza de 400mg/dL (5,4 mM), um valor maior que cem vezes àqueles reportados para crianças normais (Hommes *et al apud* Fenton e Rosenberg, 2001). Outras análises de fluídos corporais em pacientes graves mostraram que o acúmulo de propionato no sangue e na urina ocorre regularmente e sua magnitude está diretamente relacionada a severidade do curso clínico (Fenton e Rosenberg, 2001). Em relação aos níveis do MMA sabe-se que crianças normais e adultos excretam menos que 0,04 mmol (5 mg) de metilmalonato diariamente, enquanto que crianças com acidemia metilmalônica excretam de 2,1 a 49,0 mmol (240 a 5700 mg) num período de 24 horas (Fenton e Rosenberg, 2001). As concentrações plasmáticas de

metilmalonato, quase indetectáveis em indivíduos normais, alcançam de 0,22 a 2,9mM (2,6 a 34,0 mg/dL). Sendo que em um número pequeno de pacientes em que foi medido, a concentração de metilmalonato no fluido cerebrospinal equivaleu a do plasma (Fenton e Rosenberg, 2001).

Apesar da caracterização do defeito metabólico, ainda na década de 60, a patofisiologia destes erros inatos é especulativa e merece estudos sérios, visto que os pacientes ainda sofrem muito com as seqüelas da doença. O tratamento mais eficaz ainda é a restrição alimentar, que diminui os ataques de acidose, mas não necessariamente os previne ou permite o desenvolvimento normal em todos pacientes.

2. CITOESQUELETO

A capacidade que as células eucarióticas possuem de adotar uma variedade de formas e de executar movimentos coordenados e direcionados depende de uma rede complexa de filamentos de proteínas filamentosas que se estendem por todo o citoplasma. Esta rede é chamada de citoesqueleto embora seja, ao contrário, de um esqueleto ósseo, uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, se divide ou responde ao seu ambiente. De fato, o citoesqueleto poderia ser denominado “citomusculatura”, pois ele é o responsável direto por movimentos tais como o deslocamento das células sobre um substrato, a contração muscular e muitas das alterações na forma de um embrião de vertebrado em desenvolvimento; ele também fornece a maquinaria necessária para movimentos intracelulares tais como o transporte de organelas de um lugar a outro no citoplasma e a segregação dos cromossomos na mitose (Alberts *et al*, 2002). Além disso, as mudanças citoesqueléticas são essenciais para a transmissão de sinais que levam a uma resposta celular apropriada. As interações entre as proteínas de membrana e as proteínas do citoesqueleto são a chave para o desencadear dessa sinalização. O citoesqueleto também está envolvido na organização e reorganização dos receptores da membrana plasmática (Carraway, 2000).

Essas e outras inúmeras funções do citoesqueleto dependem de três diferentes tipos de filamentos protéicos – filamentos de actina, microtúbulos e filamentos

intermediários. Cada tipo é formado a partir de uma subunidade protéica diferente: actina nos filamentos de actina, tubulina nos microtúbulos e uma família de proteínas fibrosas nos filamentos intermediários (Alberts *et al*, 2002).

Cada um dos três tipos principais de filamentos protéicos que formam o citoesqueleto consiste de um polímero helicoidal que apresenta um arranjo diferente na célula (Figura 2) e funções distintas (Alberts *et al*, 2002).

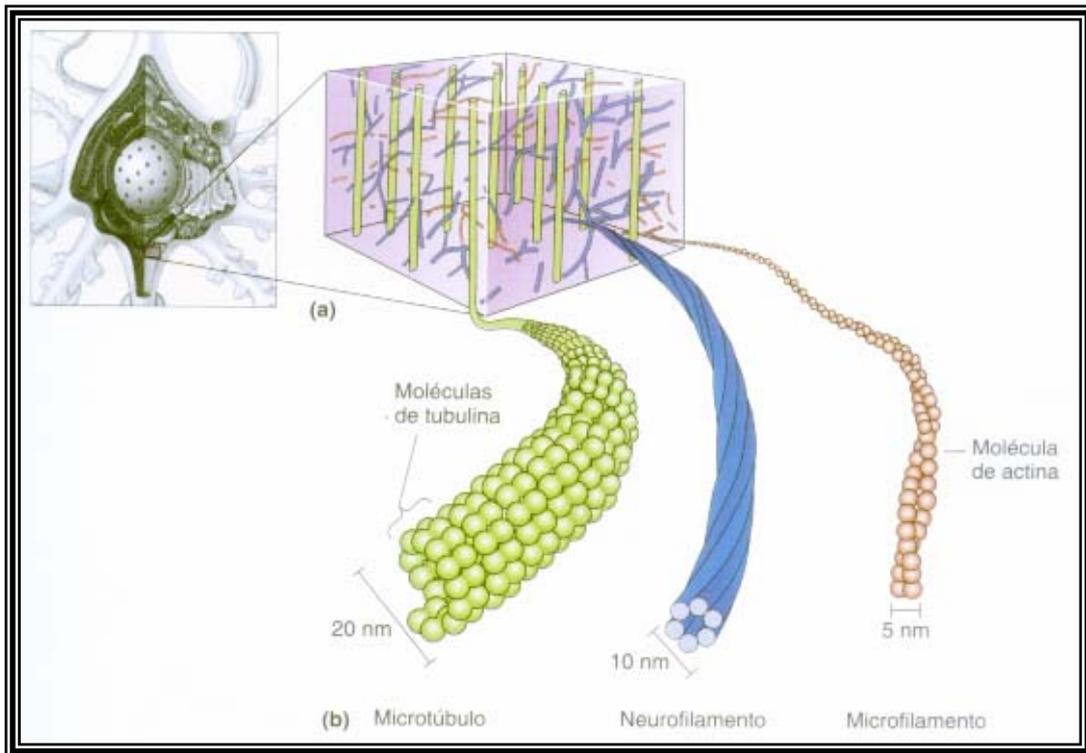


Figura 2. Representação esquemática dos constituintes do citoesqueleto. Adaptado de Bear *et al*, 2002.

2.1. FILAMENTOS DE ACTINA

Os filamentos de actina (também chamados de microfilamentos) são polímeros helicoidais de duas cadeias. São estruturas flexíveis, com diâmetro de 5 a 9 nm, organizados na forma de feixes lineares, redes bidimensionais e géis tridimensionais. Embora os filamentos de actina estejam distribuídos por toda a célula, eles estão mais concentrados no córtex celular, logo abaixo da membrana plasmática (Alberts *et al*, 2002). Portanto, os sinais extracelulares que chegam a uma determinada região da superfície celular podem induzir uma reorganização local

do córtex de actina sob a região correspondente na membrana plasmática. Reciprocamente, a organização do córtex de actina pode ter uma grande influência no comportamento da membrana plasmática acima dele.

Os mecanismos baseados nos filamentos corticais de actina, por exemplo, podem empurrar a membrana para fora, formando finas e longas *microespículas*, ou formações semelhantes a folhas, chamados *lamelipódios*, ou eles podem ainda puxar a membrana plasmática para dentro da célula como, por exemplo, no processo de divisão celular (Alberts *et al*, 2002). Nas células nervosas, os filamentos de actina têm importante papel no crescimento de neuritos (Lin e Forscher, 1995) e na liberação de neurotransmissores (Marinovich *et al*, 1997; Small *et al*, 1999).

2.2. MICROTÚBULOS

Os microtúbulos (MTs) são filamentos longos e ocos formados pela polimerização de dímeros de α e β tubulina. Possuem um diâmetro externo de 25nm e são muito mais rígidos do que os filamentos de actina (Alberts *et al*, 2002). Suas subunidades estruturais, as tubulinas α e β , são proteínas globulares que formam uma estrutura linear chamada protofilamento. Treze protofilamentos se dispõem lado a lado formando um MT (Figura 3A). Este tem uma estrutura polar, uma vez que os protofilamentos estão paralelamente alinhados com a mesma polaridade (Díaz *et al*, 1998; Dowing, 2000). Os MTs têm uma extremidade ligada a um único centro organizador de microtúbulo (COMT) chamado centrossomo. A partir desta estrutura os MTs emanam por toda a célula. Periodicamente, várias centenas de MTs crescem a partir do centrossomo, alguns se estendendo por muitos micrômetros, de tal forma que sua extremidade “mais” está na borda da célula. Cada um desses MTs consiste de uma estrutura altamente dinâmica que pode diminuir ou aumentar de comprimento: depois de crescer por muitos minutos por adição de subunidades, a extremidade “mais” pode sofrer uma transição súbita causando a perda de subunidades e, como conseqüência, o MT encolhe rapidamente podendo desaparecer. A rede de MTs que amana do centrossomo em forma de estrela, está formando constantemente novos MTs para substituir os velhos que sofreram despolimerização (Alberts *et al*, 2002) (Figura 3B).

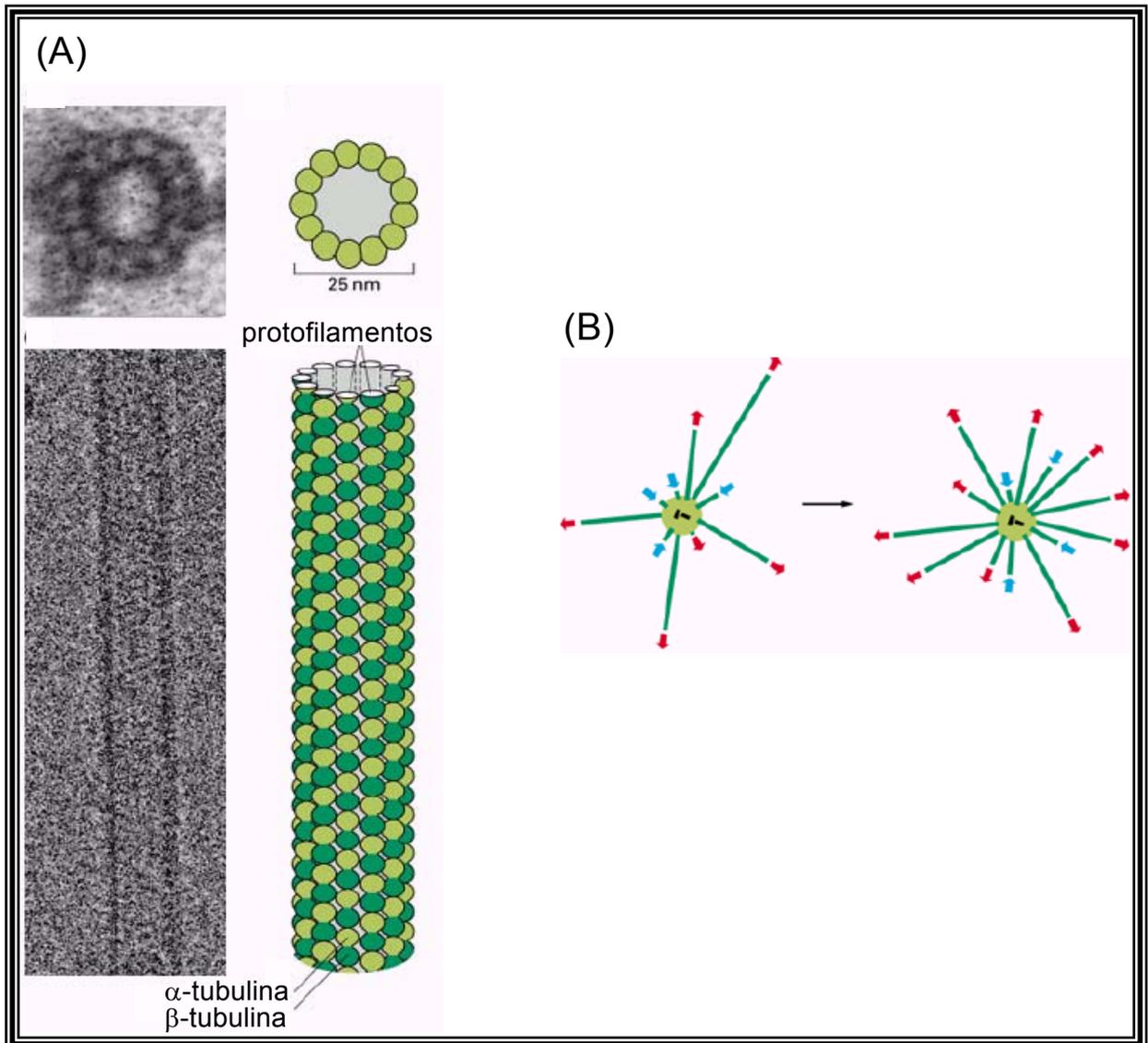


Figura 3. (A) Micrografias eletrônicas e as representações esquemáticas correspondentes de um filamento de MT. Os quadros esquemáticos mostram a organização das moléculas de tubulinas (α e β) formando a parede cilíndrica do MT. (B) Crescimento e retração de um conjunto de MTs. O conjunto de MTs ancorado no centrossomo está sendo alterado continuamente, pelo crescimento de novos MTs (flechas vermelhas) e retração dos velhos (flechas azuis). Adaptado de Alberts *et al*, 2002.

Os MTs possuem uma variedade de funções em diferentes células. Eles têm papel fundamental nos movimentos celulares, transporte intracelular de organelas e formação do fuso mitótico durante a divisão celular (Schulze *et al*, 1987; Nogales, 2000; Sánchez *et al*, 2000). No cérebro, estão envolvidos em várias funções celulares, incluindo transporte axonal, sinaptogênese (Vale *et al*, 1985), crescimento e alongação de neuritos (Rieder *et al*, 1997).

2.3. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os filamentos intermediários (FIs) são fibras protéicas e têm esta denominação porque, em micrografia eletrônica, seu diâmetro aparente (8-10 nm) está entre o dos filamentos de actina e o dos MTs (Alberts *et al*, 2002).

A formação de um FI ocorre a partir de monômeros que se organizam para formar uma estrutura polimerizada. Esta organização pode ser melhor compreendida observando-se a Figura 4.

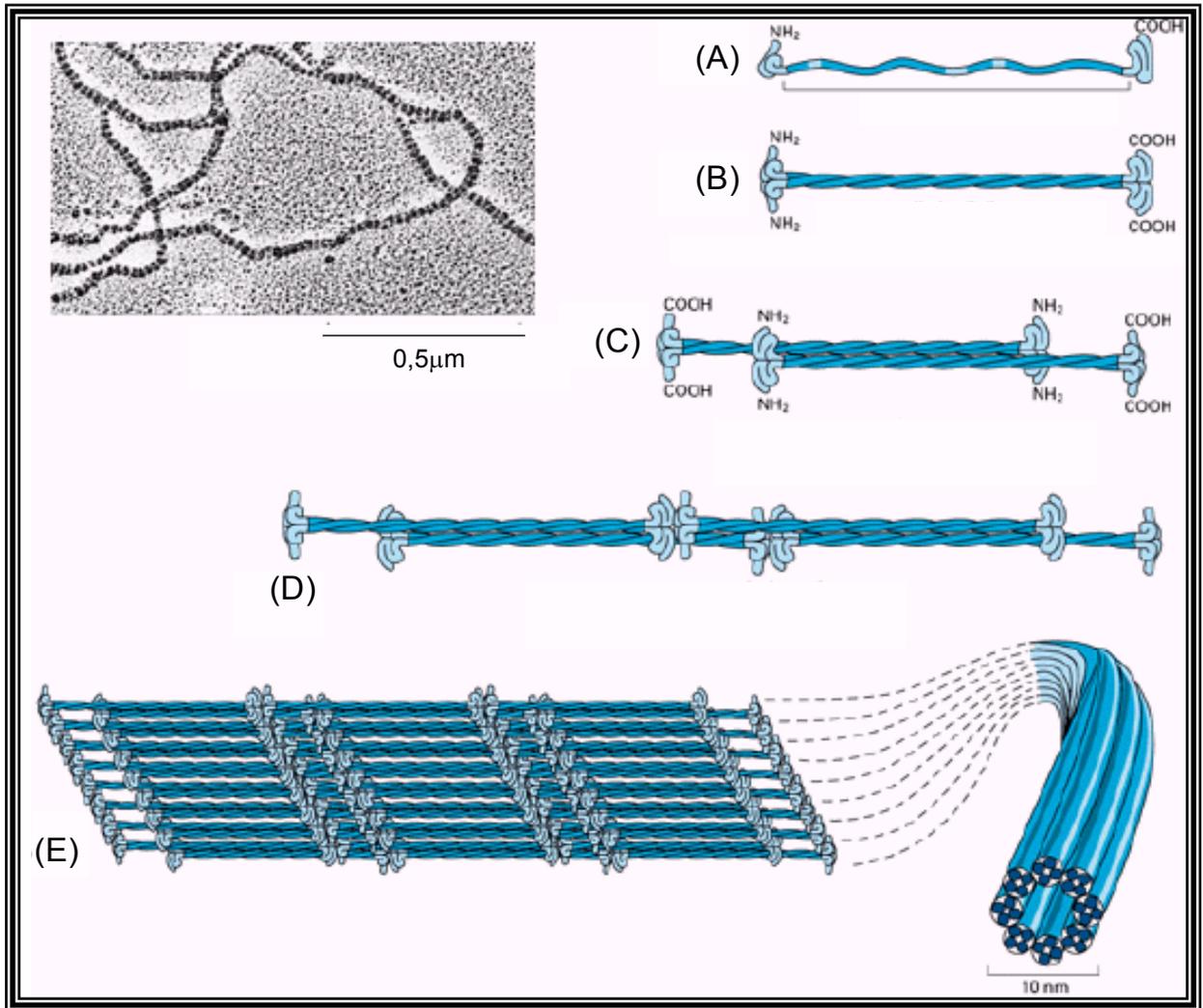


Figura 4. Modelo atual da formação de um FI. O monômero em (A) pareia com um monômero idêntico para formar um dímero (B), no qual os domínios centrais em forma de bastão se alinham paralelamente e se enrolam em uma estrutura torcida. Dois dímeros se alinham lado a lado para formar um tetrâmero antiparalelo com quatro cadeias polipeptídicas (C). Os dímeros se dispõem de modo desencontrado dentro de cada tetrâmero, permitindo assim a associação com outro tetrâmero, como está mostrado em (D). Oito tetrâmeros enrolam-se para formar a estrutura do FI com 10nm de diâmetro (E). No canto superior, à esquerda, uma micrografia eletrônica mostra a estrutura final do FI. Adaptado de Alberts *et al*, 2002.

O padrão estrutural dos FIs deve-se ao fato de suas proteínas constituintes apresentarem um domínio central, em forma de α -hélice, altamente conservado. Entretanto, as regiões amino-terminal e carboxiterminal são muito variáveis, o que permite uma classificação dos FI em seis subtipos diferentes: subtipo I – queratinas ácidas; subtipo II – queratinas básicas e neutras; subtipo III – desmina, vimentina, periferina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP); subtipo IV – neurofilamentos; subtipo V – lamininas nucleares e subtipo VI – nestina (Fuchs e Weber, 1994; Elder *et al*, 1999; Inada *et al*, 2000; Herrmann e Aebi, 2000; Lariviere e Julien, 2004).

Os diferentes subtipos de FI são característicos de tipos celulares distintos. Assim, destacamos um tipo celular, o qual é objeto do nosso estudo, os neurônios. Nosso sistema nervoso possui uma variedade de FI exclusivos que são expressos nas diferentes regiões ou em estágios específicos do desenvolvimento. Os neurofilamentos são os mais abundantes, especialmente nas células nervosas maduras (Alberts *et al*, 2002).

2.3.1. NEUROFILAMENTOS

Os neurofilamentos (NFs) constituem o principal tipo de FI em neurônios adultos (Lee e Cleveland, 1996). Eles são formados pela polimerização de três subunidades denominadas: NF de alto peso molecular (NF-H), NF de médio peso molecular (NF-M) e NF de baixo peso molecular (NF-L), com pesos moleculares aparentes de 200, 150 e 68 kDa, respectivamente, determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida. As três subunidades são homólogas nos 310 aminoácidos do domínio central e diferem entre si pelos seus domínios carbóxi e amino-terminais (Betts *et al*, 1997; Li *et al*, 1999^a; Ackerley *et al*, 2000; Al-Chalabi e Miller, 2003).

Para formar um NF as três subunidades copolimerizam, entretanto a NF-L é a mais abundante delas e foi descrita como sendo a responsável, juntamente com sua extremidade amino-terminal, pela formação do filamento propriamente dito (Geisler e Weber, 1981). As subunidades NF-M e NF-H possuem domínios carboxi-terminais maiores que formam projeções laterais a partir do eixo do NF e contribuem para sua disposição regular no axônio (Figura 5).

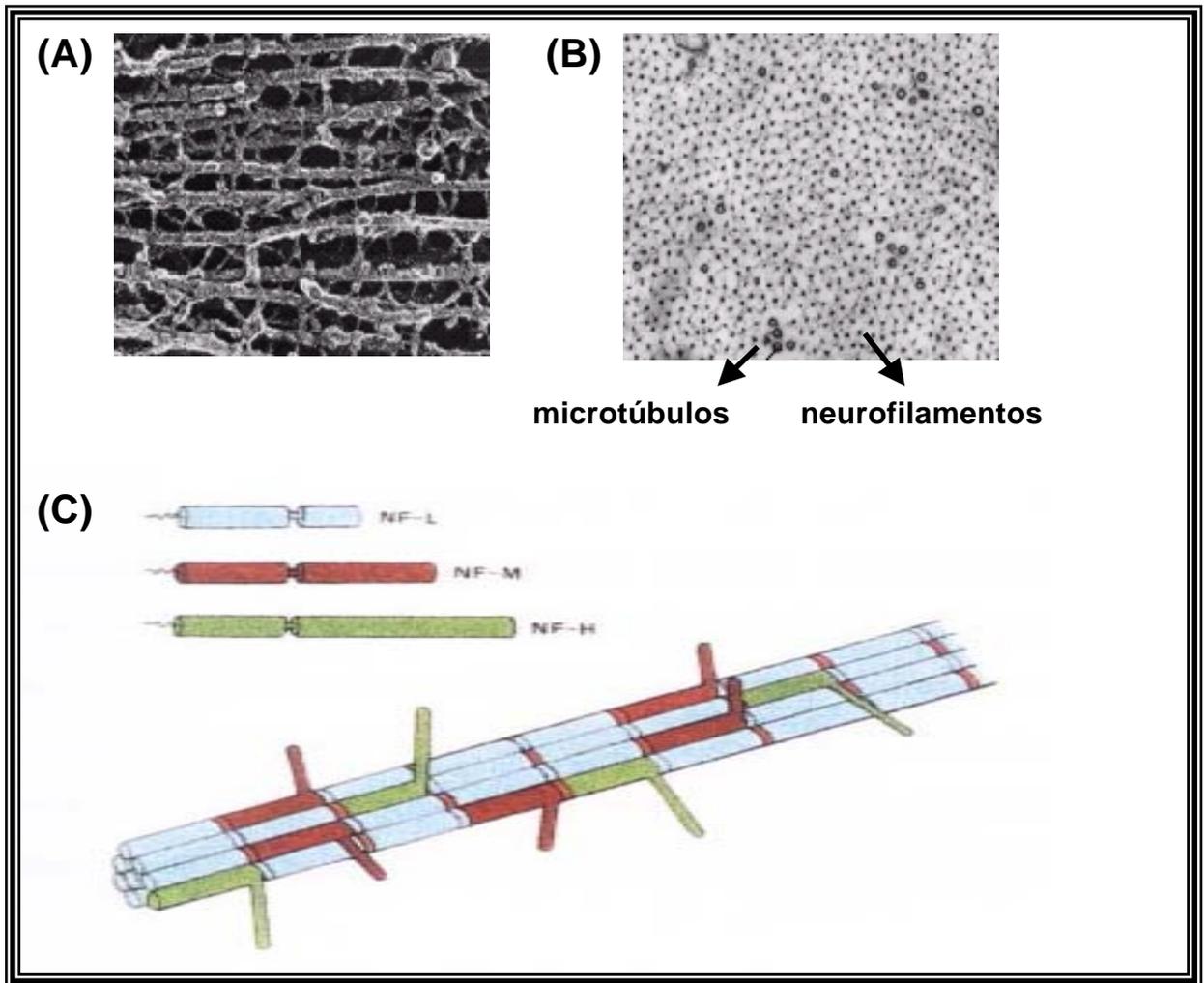


Figura 5. Micrografias eletrônicas de FI em neurônios e uma representação esquemática de um NF. (A) Imagem por criafatura de NFs de um axônio mostrando as extensas ligações cruzadas formadas pelas extremidades carbóxi das subunidades NF-M e NF-H. (B) Micrografia eletrônica convencional de um corte transversal de uma axônio mostrando a disposição regular dos NFs, que são mais numerosos do que os MTs. (C) Representação esquemática de um NF. Adaptado de Alberts *et al*, 2002 e Nixon e Sihag, 1991.

Com o intuito de compreender os fatores que regulam a dinâmica de polimerização dos NFs, muitas técnicas diferentes foram utilizadas. Experimentos com camundongos transgênicos mostraram uma expressão coordenada das subunidades NF-L e NF-M e sugerem que elas respondem aos mesmos sinais de transcrição, enquanto que a NF-H pode ser regulada separadamente. Entretanto a ausência de uma subunidade pode afetar tanto a transcrição quanto a tradução de outras proteínas dos NFs, assim como as interações de *feedback* dos níveis pós-transcricional e pós-traducional também são reguladas pela expressão de genes dos NFs (Grant e Pant, 2000). Entre os fatores que regulam a polimerização dos NFs tem-se destacado sua fosforilação pós-traducional, que será discutida em maiores detalhes no item 3.1.

Apesar de haverem muitas controvérsias a respeito dos fatores que determinam a dinâmica de polimerização dos NFs, muitas funções importantes são aceitas e conferidas aos NFs. Entre elas destacam-se: a manutenção do calibre axonal e da morfologia neuronal e o transporte axonal de metabólitos do corpo celular até a sinapse (Kirkpatrick e Brady, 1999; Elder *et al*, 1999). Juntamente com os MTs e as proteínas associadas, os NFs mantêm o padrão da arborização dendrítica e do axônio e promovem o espessamento e o crescimento axonal (Hoffman *et al*, 1987; Leterrier *et al*, 1996). Os NFs também participam da dinâmica do citoesqueleto axonal durante a diferenciação neuronal, crescimento e orientação do axônio (Nixon e Shea, 1992).

3. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A fosforilação de proteínas é um processo molecular reversível que desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo utilizado no processo de transdução de sinal (Hunter, 1995). Comum a todos os organismos eucariontes, o mecanismo de fosforilação protéica envolve pelo menos três elementos: (1) proteína quinase; (2) proteína fosfatase; (3) substrato protéico, o qual tem suas propriedades conformacionais e funcionais alteradas em decorrência de seu estado fosforilado/desfosforilado (Walaas e Greengard, 1991; Rodnight *et al*, 1997). As proteínas quinases são fosforiltransferases que catalisam a transferência do fosfato γ do ATP ou GTP para o grupo hidroxila de resíduos serina,

treonina ou tirosina do substrato protéico. As proteínas fosfatases são fosforiltransferases que catalisam a reação inversa, ou seja, a hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico (Nestler e Greengard, 1999) (Figura 6). Então, a fosforilação de uma determinada proteína ocorre em sítios específicos, pela ação de uma ou mais quinases e a desfosforilação pela atividade específica de fosfatases. Deste modo, o processo de fosforilação depende de uma ação coordenada de atividades quinásicas e fosfatásicas, ambas sujeitas à regulação por diversos mensageiros celulares (Hubbard e Cohen, 1993; MacKintosh e MacKintosh, 1994; Hunter, 1995).

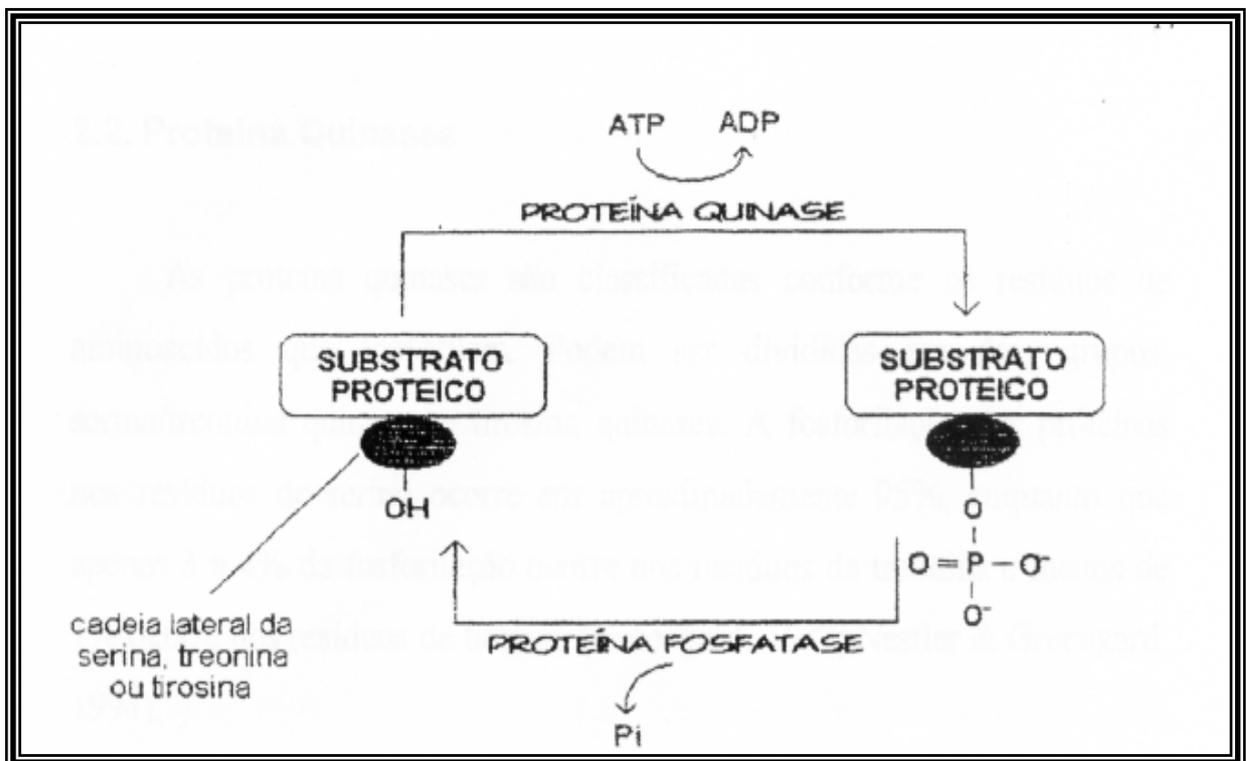


Figura 6. Representação esquemática de um sistema fosforilante. A reação de fosforilação é catalisada por uma quinase que transfere o grupo fosfato de uma molécula de ATP para o grupo hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. A remoção do grupo fosfato é catalisada por uma fosfatase. Adaptado de Alberts *et al*, 2002.

3.1. FOSFORILAÇÃO DOS NEUROFILAMENTOS

A atividade do citoesqueleto neuronal é regulada por reações de fosforilação e de desfosforilação mediadas pela associação de várias quinases, fosfatases e seus reguladores (Grant e Pant, 2000). Especificamente, o nível de fosforilação está relacionado com a polimerização dos NFs (Kirkpatrick e Brady, 1999) e define a natureza das interações dos NFs com outros NFs e com os demais componentes do citoesqueleto (Grant e Pant, 2000).

Nesse contexto, é importante salientar a organização dos subdomínios das proteínas dos NFs, destacando seus sítios de fosforilação (Figura 7). Podemos observar que a principal característica que diferencia as subunidades dos NFs é a composição do seus domínios carbóxi-terminais, onde temos a presença de numerosas repetições KSP (seqüências dos aminoácidos lisina-serina-prolina) (regiões bastante fosforiladas) na NF-H (52 repetições) enquanto que a NF-M apresenta algumas destas repetições intercaladas por regiões ricas em resíduos de ácido glutâmico (regiões de pouco potencial acceptor de grupos fosfato) (Grant e Pant, 2000).

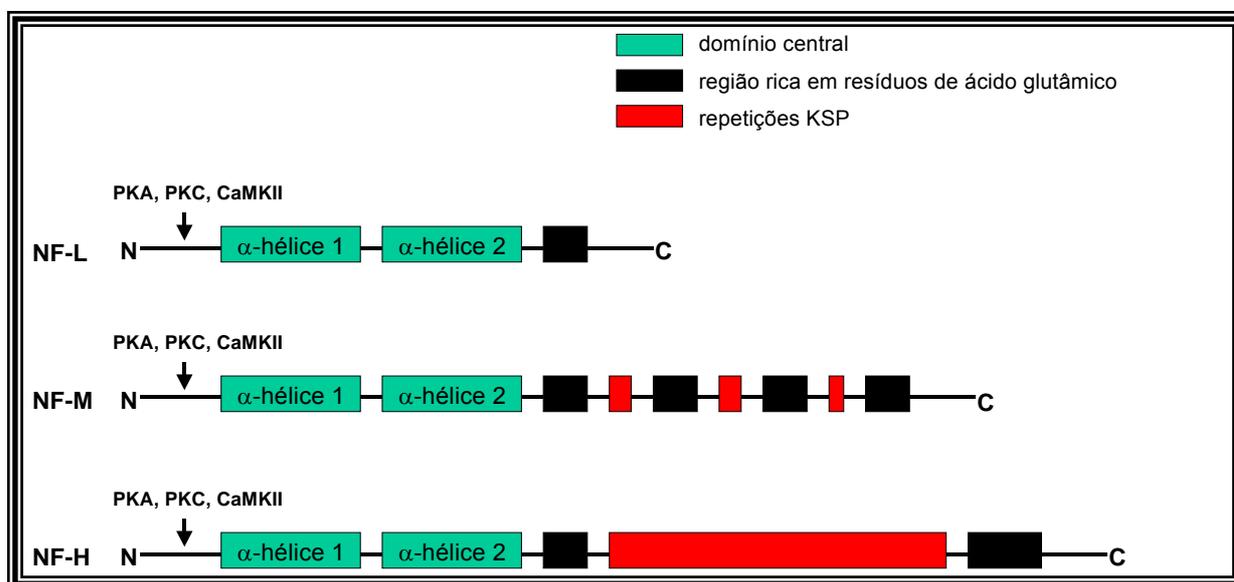


Figura 7: Sub-domínios das proteínas dos NF e seus sítios de fosforilação. Adaptado de Grant e Pant, 2000.

Sabe-se que os domínios amino e carbóxi-terminais das subunidades dos NFs são sítios em potencial de fosforilação (Grant e Pant, 2000), entretanto quinases distintas são capazes de fosforilar um ou outro domínio. O domínio aminoterminal das três subunidades é fosforilado por quinases dependentes de segundos mensageiros como a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA), a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase II dependente de Ca^{+2} /calmodulina (PKCaMII) (Sihag e Nixon, 1999; Grant e Pant, 2000). O domínio carbóxi-terminal das subunidades NF-M e NF-H são fosforilados por diferentes quinases, como as quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (Erk1/2) (Li *et al*, 1999^b e 2001), a proteína quinase ativada por estresse (SAPK) (O’Ferrall *et al*, 2000), a proteína quinase 5 dependente de ciclina (cdk5), a quinase glicogênio sintase 3 (GSK3) (Guidato *et al*, 1996), a caseína quinase I (CKI) (Fu *et al*, 1999), entre muitas outras que ainda merecem mais estudos. É importante lembrar que os domínios carbóxi-terminais das subunidades NF-M e NF-H são considerados os sítios de interação entre NFs, microtúbulos e outras organelas (Nixon e Sihag, 1991; Jung *et al*, 2000^a).

Em relação as fosfatases específicas que agem nos NFs pouco tem-se estudado ou comprovado, mas sabe-se que são tão importantes quanto as quinases no processo da dinâmica de polimerização do citoesqueleto neuronal.

Compreendendo, então, que a fosforilação de proteínas é um processo altamente dinâmico e organizado, cabe citar algumas evidências para o entendimento específico do processo de polimerização/despolimerização dos NFs. É descrito que a fosforilação do domínio aminoterminal da NF-L inibe a polimerização do filamento ou induz a sua despolimerização (Hisanaga e Hirokawa, 1990; Hisanaga *et al*, 1994). Também, é conhecido que a maioria das repetições KSP é fosforilada no domínio carbóxi-terminal da NF-H (Lee *et al*, 1988; Jaffe *et al*, 1998^a, 1998^b). Por essa razão, tem-se sugerido que a fosforilação regulada das repetições KSP do domínio carbóxi-terminal pode alterar a densidade das projeções laterais e então modular o espaçamento dos filamentos mais próximos por interações repulsivas de sítios carregados negativamente (Grant e Pant, 2000). Por exemplo, a fosforilação dos NF (como determinado por anticorpos fosfo-específicos) é mais intensa na região internodal dos axônios mielinizados e mínima nos nodos de Ranvier onde o calibre axonal é muito reduzido (Mata *et al*, 1992). Finalmente, a fosforilação das

repetições KSP nas subunidades NF-M e NF-H protege os NFs e, presumivelmente o citoesqueleto, da degradação de proteases; NFs desfosforilados são facilmente degradados por calpaína, uma protease ativada por cálcio encontrada em axônios (Goldstein *et al*, 1987; Pant *et al*, 1988).

4. GLUTAMATO

L-glutamato é descrito como o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, estando presente na maioria das sinapses (Ozawa *et al*, 1998) de diferentes regiões cerebrais. O glutamato apresenta uma grande diversidade funcional como neurotransmissor devido à existência de uma variedade de receptores glutamatérgicos (GluR) que coexistem em uma única sinapse. Estes receptores podem ser classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e funcionais em receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluR) (Monaghan *et al*, 1988; Nakanishi, 1994; Pin e Duvoisin, 1995; Ozawa *et al*, 1998).

Os iGluR são canais iônicos que, quando ativos, tornam-se permeáveis a cátions como sódio, cálcio e potássio; podendo, ainda, ser subdivididos em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido (*R,S*)- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e cainato, sendo os dois últimos freqüentemente chamados receptores não-NMDA (Ozawa *et al*, 1998) (Figura 8).

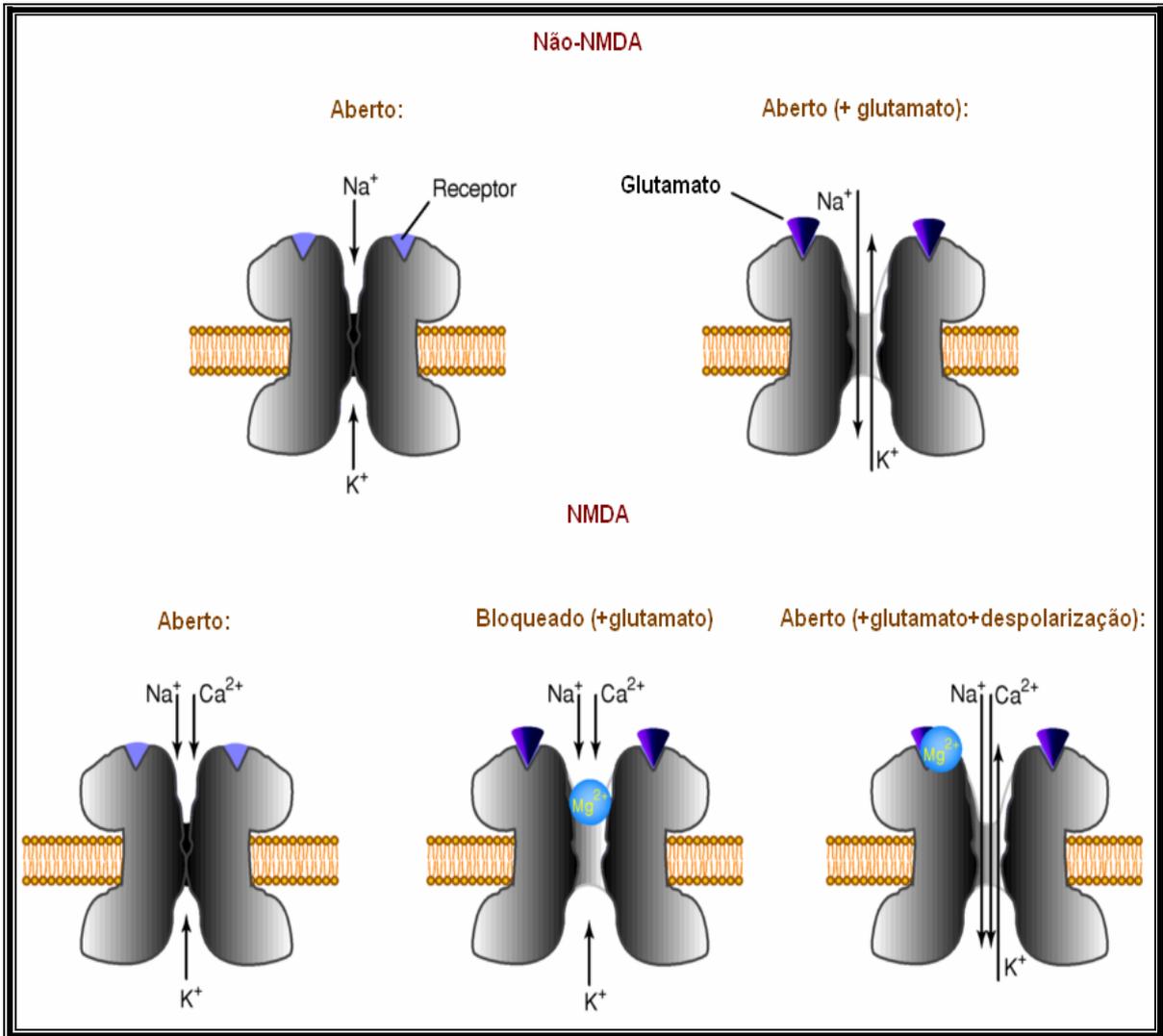


FIGURA 8. Representação esquemática dos iGluR não-NMDA e NMDA. Adaptado de Waxham, 1999.

Os receptores não-NMDA medeiam a transmissão sináptica excitatória rápida e estão associados primariamente a canais independentes de voltagem, sendo permeáveis principalmente aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+), com baixa permeabilidade ao íon cálcio (Ca^{+2}) (Cotman *et al*, 1981). A ativação dos receptores não-NMDA produz despolarização da membrana, ativando assim, indiretamente os canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem (Cotman *et al*, 1981, Ozawa *et al*, 1998).

Os receptores NMDA medeiam a transmissão sináptica lenta, são altamente permeáveis a sódio, potássio e cálcio (Lipton e Rosenberg, 1994; Ozawa *et al*, 1998), dependentes de voltagem e possuem glicina como co-agonista (Johnson e Ascher,

1992). Estes receptores estão normalmente bloqueados por magnésio em potenciais de repouso, sendo que a liberação do canal NMDA depende da despolarização da membrana (Edmonds *et al*, 1995). Há evidências de que a ativação excessiva destes receptores desfaz a homeostase dos íons cálcio, levando à neurotoxicidade e ao dano neuronal causado pelo aumento do seu influxo. Existem mecanismos de lesão celular e subsequente morte por apoptose e/ou necrose que ocorrem como resultado do acúmulo intracelular de Ca^{+2} (Arundine e Tymianski, 2003).

Os mGluR pertencem à família dos receptores acoplados às proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G) e, portanto, promovem a modulação de efetores intracelulares (segundos mensageiros), os quais ativam e/ou inibem diversos eventos de transdução do sinal celular (Pin e Duvoisin, 1995; Ozawa *et al*, 1998) (Figura 9).

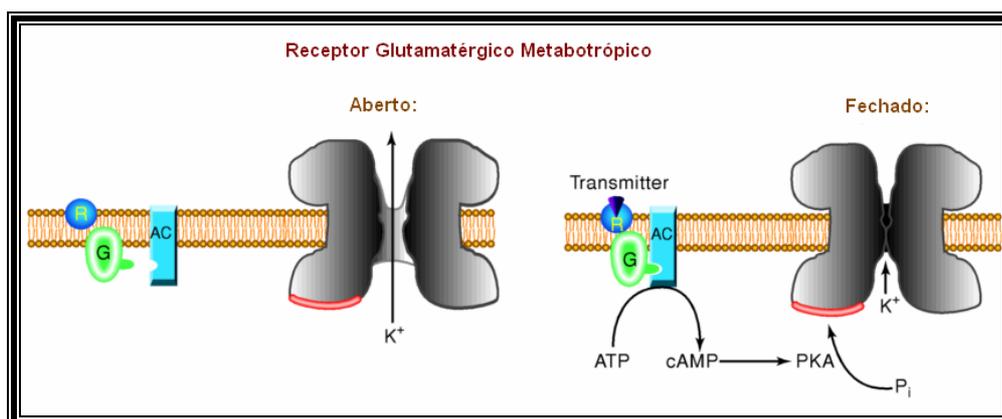


FIGURA 9. Representação esquemática dos mGluR. Adaptado de Waxham, 1999.

A extensão da estimulação dos receptores glutamatérgicos é determinada pela concentração de glutamato no espaço extracelular. É de grande importância para as células que o glutamato seja mantido em baixas concentrações, pois a excessiva liberação e o conseqüente aumento dos seus níveis extracelulares o torna tóxico em decorrência da excessiva estimulação de seus receptores ionotrópicos ou mGluR1 (Lipton e Rosenberg, 1994; Nicoletti *et al*, 1999; Meldrum, 2000). Esta excitotoxicidade tem sido relacionada a diversas doenças agudas e crônicas do SNC, como isquemia, hipoglicemia, hipóxia, trauma (Choi, 1988; Ikonomidou *et al*, 1989), doença de Huntington, doença de Alzheimer e *status epilepticus* (Brewer,

2000; Danbolt, 2001; Ingram *et al*, 2001). Desde que não há evidências da presença de uma enzima que degrade o glutamato extracelular, o sistema de transporte de glutamato é a via mais rápida para a remoção deste neurotransmissor do meio externo, possibilitando que seja armazenado em vesículas citoplasmáticas no neurônio e, conseqüentemente, interrompendo a sua ação nos receptores (Rosenberg *et al*, 1992). Os transportadores de glutamato estão presentes na membrana celular de neurônios e em astrócitos, sendo os transportadores gliais considerados os mais importantes (Schousboe, 1981).

O envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica, mediando respostas no sistema de fosforilação de proteínas do citoesqueleto neural, é demonstrado em muitas pesquisas. Por exemplo, estudos mostram que a fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo é estimulada via mGluR (Wofchuck e Rodnight, 1994). Em modelos animais da Doença do Xarope do Bordo (DXB), uma desordem neurometabólica inata como as acidemias orgânicas, um dos seus metabólitos acumulados aumenta a fosforilação de proteínas dos FIs (NF-L, NF-M, vimetina e GFAP) em córtex cerebral através de iGluR (Funchal *et al*, 2002). Relacionado as acidemias propiônica e metilmalônica, Mattos-Dutra *et al* (2000), mostram que os ácidos acumulados aumentam a incorporação de ³²P nas proteínas NF-L, NF-M e tubulinas de córtex cerebral de ratos através de iGluR do tipo NMDA. Portanto, parece que a ativação de receptores diferentes possa provocar respostas distintas na fosforilação de proteínas do citoesqueleto.

5. GABA

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é considerado um aminoácido transmissor, classificado dentro do mesmo grupo que contém glicina e glutamato. Como o GABA não é um dos vinte aminoácidos usados na construção de proteínas, ele é sintetizado somente por aqueles neurônios que o utilizam como neurotransmissor. O precursor do GABA é o glutamato, e a enzima-chave na sua síntese é a ácido glutâmico descarboxilase (GAD). A GAD, portanto, é um bom marcador de neurônios GABAérgicos. Estudos imunocitoquímicos têm mostrado que neurônios GABAérgicos estão amplamente distribuídos no encéfalo e que eles são as principais fontes de inibição sináptica no sistema nervoso (Bear *et al*, 2002).

O GABA liberado na fenda sináptica pode ativar dois tipos de receptores inibitórios: o receptor ionotrópico GABA_A, o qual forma um canal permeável a íons cloreto (Cl⁻) e o receptor metabotrópico GABA_B, o qual está acoplado a proteína G e que aumenta a permeabilidade ao K⁺ e inibe a abertura de canais de Ca⁺² voltagem dependentes (Kandel e Siegelbaum, 2000).

A ação sináptica do GABA é cessada pela captação seletiva até o interior do terminal pré-sináptico e de células gliais, através de transportadores específicos. Também, o neurotransmissor pode ser inativado no terminal ou na célula glial, pela enzima GABA transaminase (Bear *et al*, 2002).

A inibição sináptica deve se muito bem regulada no encéfalo. Muita inibição causa perda da consciência; pouca inibição, ao contrário, leva à convulsão (Bear *et al*, 2002). Pensando como controlar o grau de inibição surge uma hipótese relacionada a estrutura dos receptores GABA_A. Nesse ponto, lembramos que o receptor GABA_A é um canal de estrutura pentamérica composta por duas subunidades α , duas subunidades β e uma subunidade γ . A ativação deste canal se dá pela ligação de duas moléculas de GABA, cada uma ligando a uma subunidade α (Kandel e Siegelbaum, 2000). Assim, as demais subunidades que não ligam GABA podem ligar outras moléculas que por sua vez modulam a ligação GABA-receptor. Por exemplo, fármacos das classes dos benzodiazepínicos (tais como os tranqüilizantes Diazepam ou Valium) e dos barbitúricos (incluindo o fenobarbital e outros sedativos e anticonvulsivantes) ligam-se a tais sítios gerando uma corrente de Cl⁻ inibitória aumentada. Outra droga comum que causa grande aumento à função do receptor GABA_A é o etanol. Ainda, atualmente, surgiram evidências substanciais que ligantes endógenos possam agir como moduladores naturais da ação do GABA sobre seu receptor GABA_A. Esses ligantes tem sido chamados *neuroesteróides*, pois são metabólitos naturais dos hormônios esteróides sintetizados a partir do colesterol, principalmente nas gônadas e nas glândulas adrenais, mas também em células gliais no encéfalo. Embora alguns neuroesteróides suprimam a função inibitória, outros a aumentam e parecem fazê-lo por meio da ligação a sítios próprios no receptor GABA_A, distintos dos sítios das outras drogas mencionadas (Bear *et al*, 2002) (Figura 10).

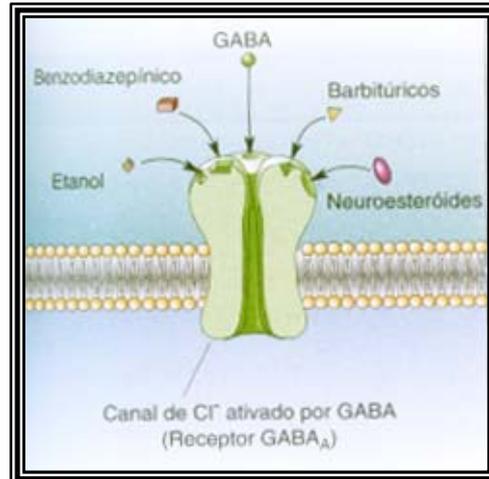


Figura 10. A ligação de drogas ao receptor GABA_A que modulam a ação do neurotransmissor GABA. Adaptado de Bear *et al*, 2002.

Portanto, o receptor GABA_A tem comprovada importância na ação de drogas utilizadas em doenças neurológicas. Estudos em nosso laboratório mostraram que determinado metabólito, acumulado em uma doença neurodegenerativa grave, tem seus efeitos mediados por receptores GABA_A e GABA_B. Neste caso específico, o metabólito KMV (ácido α -ceto- β -metilvalérico) aumentou a fosforilação *in vitro* de proteínas dos FIs (NF-L, NF-M, vimetina e GFAP) de córtex cerebral de ratos através do sistema GABAérgico (Funchal *et al*, 2004).

II - OBJETIVOS

1. Fazer um estudo ontogenético dos efeitos dos ácidos propiônico (PA) 2,5 mM e metilmalônico (MMA) 2,5 mM sobre a imunocidade da NF-H total (fosforilada e não fosforilada) e fosforilada em córtex cerebral de ratos.
2. Estudar os efeitos do PA 2,5 mM e do MMA 2,5 mM sobre o imunocidade da NF-H total e fosforilada, na sua forma solúvel, na sua forma associada ao citoesqueleto e no homogeneizado de fatias de córtex cerebral de ratos.
3. Verificar o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica sobre a imunocidade da NF-H total e fosforilada em fatias de córtex cerebral de ratos, tratadas com PA 2,5 mM e com MMA 2,5 mM.

III - MÉTODO EXPERIMENTAL

Animais. Ratos da linhagem *wistar* de diferentes idades (9, 12, 17, 21 e 60 dias) foram retirados do ratário do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Todos animais incluídos nos experimentos provinham de ninhadas de 8 filhotes que foram mantidas em condições de temperatura constante (22°C) e de um ciclo artificial de iluminação (12 horas de claridade e 12 horas de escuridade). Após o desmame, no 21º dia, os filhotes receberam *ad libitum* água e ração de 20% (p/p) de proteína.

Reagentes. Os reagentes foram comprados da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, salvo se especificado de outra forma. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa com animais da UFRGS que atende aos *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH nº 85-23, revisado em 1985).

Soluções e tampões:

Solução de Krebs: NaCl 124 mM; KCl 4 mM; MgSO₄ 1,2 mM; Na-HEPES 25 mM (pH 7,4); glicose 12 mM; CaCl₂ 1 mM; pH 7,2 a 7,4; inibidores de proteases: benzamidina 1 mM; leupeptina 0,1 µM; pepsstatina 0,1 µM; quimostatina 0,7 µM e antipaína 0,7 µM.

Solução de NaF: NaF 150 mM; EDTA 5 mM; EGTA 5 mM; Tris-HCl 50 mM (pH 6,8); inibidores de proteases: benzamidina 1 mM; leupeptina 0,1 µM; pepsstatina 0,1 µM; quimostatina 0,7 µM e antipaína 0,7 µM.

Solução de *stripping*: tris 62,5 mM; EDTA 2 mM; β-mercaptoetanol 0,7%; pH 6,8.
Solução fixadora: álcool metílico 40% e ácido acético 10%.

Tampão bjerrum: tris 48 mM; glicina 39 mM; álcool metílico 20% e SDS 0,25%.

Tampão de amostra concentrado (TAC): 2 mL de glicerol, 1 mL de β-mercaptoetanol, 3 mL de SDS 10%, 20 µL de NaOH 10N.

Tampão de extração: KH₂PO₄ 5 mM; KCl 600 mM; MgSO₄ 10 mM; EGTA 2 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1%; pH 7,1; inibidores de proteases: benzamidina 1 mM; leupeptina 0,1 µM; pepsstatina 0,1 µM; quimostatina 0,7 µM e antipaína 0,7 µM.

TBS (*tris-buffered saline*): NaCl 0,5 M; tris 20 mM; pH 7,5.

Preparação das fatias de tecido e tratamento *in vitro*. Os ratos foram decapitados e, rapidamente, seus cérebros foram retirados. O córtex cerebral foi dissecado sobre placa de Petri, esta colocada sobre o gelo, e mantido em solução de Krebs gelada até ser fatiado. Utilizou-se fatiador *McIlwain* para obter-se fatias de córtex cerebral de 400 μm . Dependendo da idade do animal foram selecionadas de 1 a 5 fatias que foram, inicialmente, pré-incubadas em solução de Krebs por 10 minutos a 30°C. Ao meio de incubação foi adicionada solução de Krebs, no caso do controle (C), ou soluções do PA 2,5 mM (concentração final de incubação) ou MMA 2,5 mM (concentração final de incubação), diluídos em solução de Krebs. Essa incubação procedeu-se por mais 30 minutos, observando-se a manutenção da temperatura em 30°C. No caso dos animais de 12 e 17 dias também foram preparadas fatias de córtex cerebral para a incubação com GABA (GB) 1 mM ou glutamato (Glu) 1 mM na presença ou ausência de PA ou MMA. Abaixo segue o esquema que compôs a incubação para um experimento de rotina:

Tubo 1: C

Tubo 2: PA

Tubo 3: MMA

Tubo 4: GB

Tubo 5: Glu

Tubo 6: PA+GB

Tubo 7: PA+Glu

Tubo 8: MMA+GB

Tubo 9: MMA+Glu

Obtenção da fração citoesquelética enriquecida em FIs a partir de fatias de córtex cerebral. A extração da fração citoesquelética foi baseada na descrição de *Funchal et al.* (2003), considerando algumas modificações. Após a obtenção das fatias de tecido, como descrito acima, as fatias contidas em cada tubo foram homogeneizadas em 400 μL de tampão de extração gelado, durante 2 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a uma velocidade de 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Em alguns experimentos o sobrenadante foi descartado (no caso dos ratos de 12 e 17 dias de idade também aplicou-se o procedimento descrito no próximo item) e

o material insolúvel foi ressuspendido em 400 μ L do mesmo tampão de extração e submetido, novamente, ao processo recém descrito. A fração assim obtida constitui a fração citoesquelética enriquecida em Fis ou fração insolúvel em Triton X-100 1% e alta força iônica. A concentração protéica dos sedimentos foi determinada pelo método de Lowry *et al* (1951), após serem dissolvidos em 30 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%.

Obtenção das frações homogeneizado e sobrenadante. Essas frações foram separadas somente para os ratos de 12 e 17 dias de idade.

Obtenção do homogeneizado: logo após a homogeneização das fatias em tampão de extração, uma alíquota de 50 μ L foi separada e adicionada de 500 μ L de acetona P.A. gelada. Decorridos 10 minutos, no mínimo, do processo de desnaturação no gelo, seguiu-se a centrifugação a uma velocidade de 10000 rpm durante 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo as proteínas totais da fatia de tecido, foi mantido em local arejado e seco durante 12 horas. Após a completa evaporação do solvente, o precipitado foi dissolvido em 50 μ L de SDS 1% para posterior dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al* (1951).

Obtenção do sobrenadante: Todo material solúvel no tampão de extração (800 μ L) foi adicionado de 8 mL de acetona P.A. gelada. É importante ressaltar que o material solúvel inclui os sobrenadantes obtidos após a primeira e a segunda centrifugações para a extração da fração citoesquelética. Decorridos 10 minutos, no mínimo, seguiu-se a centrifugação a uma velocidade de 3000 rpm durante 10 minutos em centrífuga (RC 5B Plus, Sorvall) refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido em local arejado e seco durante 12 horas. Após a completa evaporação do solvente, o resíduo, o qual é constituído da fração solúvel em Triton X-100 e alta força iônica, foi dissolvido em 400 μ L de SDS 1% para posterior dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al* (1951).

Conservação das amostras. Após a dosagem de proteínas das frações, as amostras foram adicionadas de 20% (v/v) de TAC e homogeneizadas em agitador de

tubos (AP 56, Phoenix). Após, foram incubadas durante 3 minutos em banho de água fervente e conservadas em refrigerador a 10°C negativos.

Análise das proteínas em gel de poliacrilamida. As frações obtidas como descrito acima foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em presença de SDS (SDS-PAGE 10%). As quantidades aplicadas de proteínas totais, dosadas pelo método de Lowry *et al* (1951), foram diferentes para cada fração, como segue: fração insolúvel em alta força iônica, 25 µg, sobrenadante em alta força iônica, 60 µg e homogeneizado total, 35 µg de proteínas. Decorrida a migração eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas (Trans-blot SD, Bio-Rad) em tampão bjerrum para membranas de nitrocelulose (GibcoBRL, Life Technologies) durante 1 hora a 15V. Após a transferência, as membranas foram incubadas durante 5 minutos em solução fixadora e lavadas com água destilada.

Imunodeteccção: análise por immunoblotting. As membranas de nitrocelulose foram incubadas sob agitação constante (P-60, Presvac) nas seguintes condições (quando não especificado, considerar temperatura ambiente em torno de 25°C): durante 10 minutos com TBS; 2 horas com solução de bloqueio MTBS (TBS adicionado de 5% de leite em pó desnatado); por 2 vezes de 5 minutos cada com TTBS (TBS adicionado de 5% de Tween-20); 15 horas a 4°C com solução de bloqueio MTBS adicionada de um primeiro anticorpo monoclonal (1:2000) – anti NF-200 clone NE14 (o anticorpo NE14 liga-se a epítomos fosforilados da NF-H, reconhecendo, portanto, a fração de NF-H fosforilada) ou anti NF-200 clone N52 (o anticorpo N52 liga-se a epítomos da NF-H independente se fosforilada ou não, reconhecendo, portanto, a NF-H total); novamente, por 2 vezes durante 5 minutos cada com TTBS; 2 horas com solução de bloqueio adicionada do segundo anticorpo (IgG anti-mouse conjugado a peroxidase tipo VI, Sigma) (1:4000) por 2 vezes durante 5 minutos cada com TTBS e, finalmente, por 2 vezes durante 5 minutos cada com TBS. As membranas de nitrocelulose foram, então, incubadas durante 5 minutos com os reagentes do kit ECL (Amersham Biosciences UK Limited, England) para produzir a reação de quimioluminescência e, assim, impressionar os filmes de raio-X (XK-1, Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda.). O tempo de exposição das

membranas contra os filmes foi variável, dependendo da quantidade de NF-H que imunorreagiu em cada fração extraída. Os filmes marcados foram revelados em sala fotográfica.

Reaproveitamento das membranas de nitrocelulose. A fim de reutilizar as membranas de nitrocelulose para uma análise com diferentes anticorpos, elas foram submetidas a uma incubação de 30 minutos a 50°C com solução de *stripping*. Após, foram incubadas durante 10 minutos com TBS e o protocolo do *immunoblotting* foi reiniciado.

Quantificação e análise estatística. Os *immunoblots* revelados nos filmes foram escaneados (ColorPage Vivid III, Genius, KYE Systems Corp.) e a densidade óptica das bandas determinada através do software OptiQuant versão 02.00 (Packard Instrument Co.). Para cada amostra, o valor obtido do controle foi normalizado como 100% e as alterações percentuais para os diferentes tratamentos foram calculadas. Os dados foram analisados pelo programa de estatística ANOVA que utilizou o pós-teste de Tukey quando as diferenças entre os diferentes tratamentos e o controle apresentava $P < 0,05$. As diferenças estatisticamente significativas estão assim representadas: * quando $p < 0,05$; ** quando $p < 0,01$ e *** quando $p < 0,001$.

IV - RESULTADOS

Neste estudo, foi analisado o efeito do tratamento *in vitro* de fatias de córtex cerebral de ratos de diferentes idades com PA ou MMA 2,5 mM sobre o imunoconteúdo da subunidade NF-H dos neurofilamentos. Para tanto utilizamos o anticorpo monoclonal N52, que reconhece a NF-H total, independentemente do nível de fosforilação, o qual gerou nas nossas amostras duas bandas de pesos moleculares distintos (Figura 11). A banda superior (de maior peso molecular) corresponde aos epítomos fosforilados da NF-H e a banda inferior, correspondente aos epítomos da NF-H não fosforilados. Para a análise dos efeitos dos tratamentos utilizados sobre o nível de fosforilação da NF-H utilizou-se o anticorpo monoclonal NE14, que reconhece apenas epítomos fosforilados da subunidade NF-H. Na maioria das amostras analisadas este anticorpo gerou apenas uma banda.

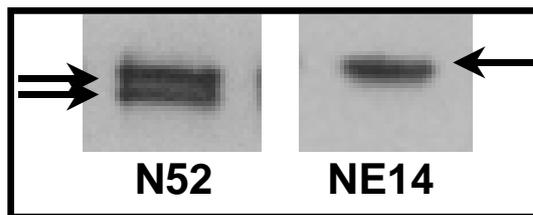


Figura 11. *Immunoblotting* da proteína NF-H marcada com os anticorpos monoclonais anti NF-200 clone N52 (o anticorpo N52 liga-se a epítomos da NF-H independente do nível de fosforilação, reconhecendo, portanto, o imunoconteúdo total da NF-H) e anti NF-200 clone NE14 (o anticorpo NE14 liga-se a epítomos fosforilados da NF-H, reconhecendo, portanto, somente a fração de NF-H fosforilada).

Num primeiro momento fez-se um estudo ontogenético no qual foi analisado o efeito do tratamento de fatias de córtex cerebral com PA 2,5 mM ou MMA 2,5 mM em ratos de 9, 12, 17, 21 e 60 dias de idade. Observou-se que ambos metabólitos induziram alterações na imunorreatividade da NF-H presente na fração citoesquelética de forma dependente do estágio de desenvolvimento do animal. Essas alterações foram verificadas numa comparação com controles para cada

idade e calculadas em percentagem em relação ao controle que foi considerado 100%. A Figura 12 mostra os efeitos do PA sobre a imunorreatividade da NF-H ao NE14 e N52 durante o desenvolvimento do animal. Nós observamos que o PA aumentou significativamente a imunorreatividade dos epítomos da NF-H fosforilados (NE14) nos ratos mais jovens, de 9, 12 e 17 dias de idade e que não alterou a imunorreação da NF-H nos animais de 21 e 60 dias. Entretanto, o tratamento com esse metabólito (PA) aumentou significativamente a imunorreatividade da NF-H ao anticorpo N52 apenas nos ratos de 12 e 17 dias de idade.

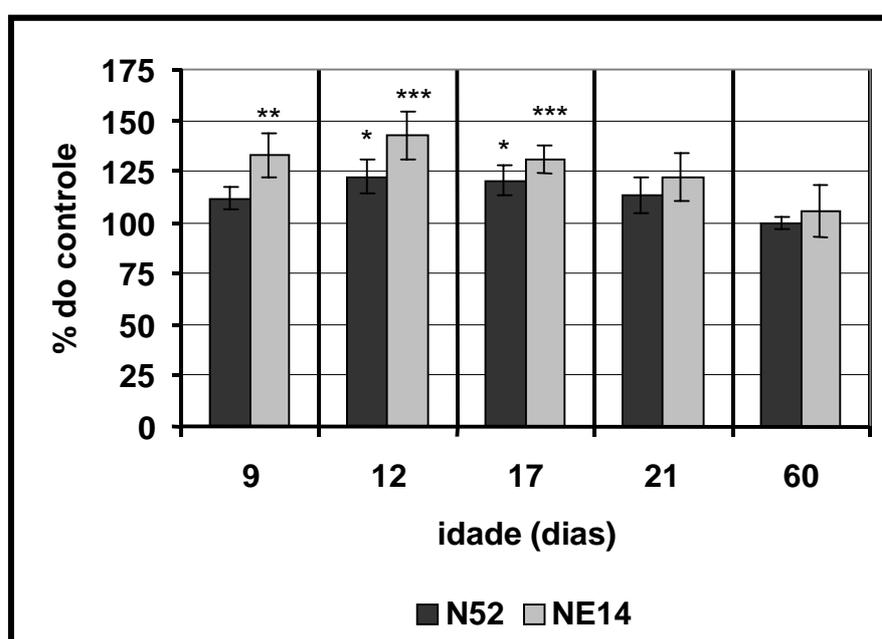


Figura 12. Efeitos do PA 2,5 mM sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) durante o desenvolvimento. Fatias de córtex cerebral de ratos de 9, 12, 17, 21 e 60 dias de idade foram tratadas *in vitro* com PA 2,5 mM durante 30 minutos a 30°C. A fração citoesquelética enriquecida em FI foi extraída e procedeu-se a análise por *immunoblotting* da proteína, como descrito no “Método Experimental”. A intensidade das bandas reveladas (de 4 a 10 amostras independentes para cada idade) foi quantificada e comparada com os controles de cada idade. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle de cada animal, que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada idade são os seguintes: controle (sem tratamento), N52 e NE14 (tratamentos com PA). As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas em relação

ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão representadas da seguinte forma: * quando $p < 0,05$; ** quando $p < 0,01$ e *** quando $p < 0,001$.

Em relação ao MMA, observamos efeitos similares àqueles induzidos pelo PA: aumento significativo da imunorreatividade para o NE14 nas idades de 9, 12 e 17 dias e para o N52 nas idades intermediárias (12 e 17 dias) (Figura 13).

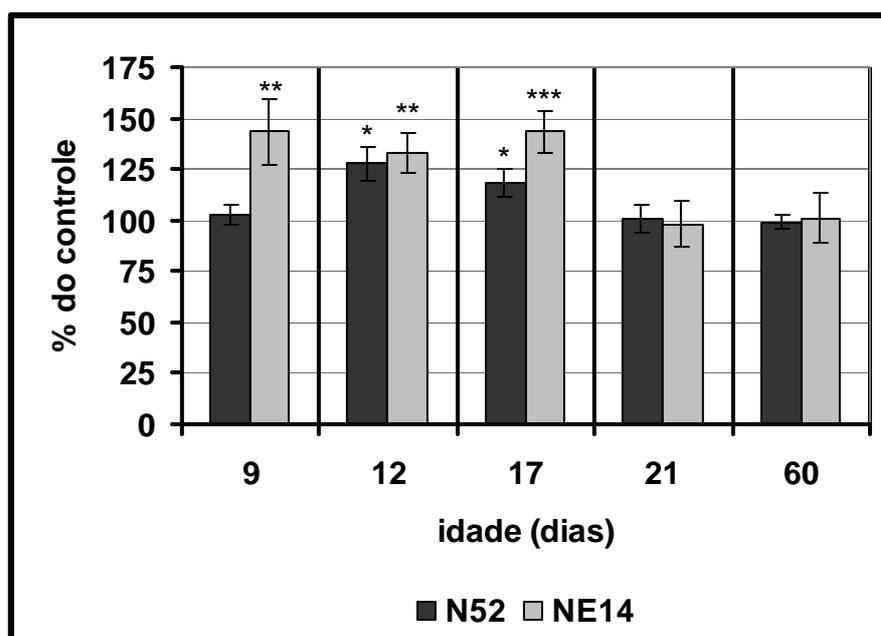


Figura 13. Efeitos do MMA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) durante o desenvolvimento. Fatias de córtex cerebral de ratos de diferentes idades foram tratadas *in vitro* com MMA 2,5 mM durante 30 minutos a 30°C. A fração citoesquelética enriquecida em FI foi extraída e procedeu-se a análise por *immunoblotting* da proteína como descrito no “Método Experimental”. A densidade óptica das bandas reveladas (de 4 a 10 amostras independentes para cada idade) foi quantificada e comparada com os controles de cada idade. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle de cada animal que foi considerado 100%. Os grupos comparados são os seguintes: controle (sem tratamento), N52 e NE14 (tratamentos com MMA). As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e

pós-teste de Tukey, estão representadas da seguinte forma: * quando $p < 0,05$; ** quando $p < 0,01$ e *** quando $p < 0,001$.

O estudo ontogenético possibilitou distinguir a fase do desenvolvimento do rato em que o PA e o MMA foram capazes de causar alterações no imunoconteúdo total e da forma fosforilada da NF-H na fração citoesquelética. É descrito na literatura que as subunidades dos FIs recuperadas na fração insolúvel em Triton X-100 correspondem a suas formas agregadas ou polimerizadas (Funchal *et al*, 2003). A seguir, numa tentativa de compreender melhor os efeitos do PA e do MMA sobre a NF-H através de sua imunorreatividade aos anticorpos utilizados, estendemos nosso estudo para uma análise do imunoconteúdo desta proteína no homogeneizado total do tecido, antes da centrifugação, no sobrenadante que contém a NF-H solúvel e no precipitado insolúvel em Triton X-100. A Figura 14 é representativa do imunoconteúdo da NF-H nas três frações estudadas em uma fatia controle de tecido.

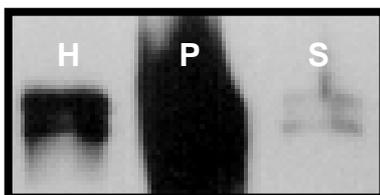


Figura 14. Imunoconteúdo da NF-H presente em três frações: homogeneizado, precipitado e sobrenadante. Figura representativa das três frações utilizadas neste trabalho. O homogeneizado total da fatia de tecido foi centrifugado como descrito em “Método Experimental” obtendo-se o sobrenadante e a fração insolúvel. Alíquotas de 35µg de proteínas, dosadas pelo método de Lowry *et al* (1951), para cada fração, foram aplicadas em SDS-PAGE 10%. Procedeu-se a análise por *immunoblotting* como descrito no “Método Experimental”, utilizando-se o anticorpo N52.

H = homogeneizado, P = precipitado, S = sobrenadante.

Nota-se que praticamente todo o imunoconteúdo do NF-H detectado com o anticorpo N52 encontra-se na fração insolúvel em Triton X-100. Inicialmente, essa observação dificultou uma comparação direta entre as três frações, pois o sobrenadante contém quantidades muito pequenas desta proteína. Entretanto, essa

dificuldade foi contornada alterando-se a quantidade total de proteínas das diferentes frações (homogeneizado total, fração citoesquelética e sobrenadante) analisadas em eletroforese. Deste modo, 35 μg para o homogeneizado, 25 μg para a fração insolúvel e 60 μg para a fração solúvel em Triton X-100 foram quantidades de proteína consideradas adequadas para estudarmos os efeitos do tratamento com PA ou MMA sobre a imunorreatividade do NF-H no homogeneizado total, na fração citoesquelética e no sobrenadante, respectivamente. No entanto, mesmo utilizando-se altas concentrações de proteína (60 μg) a ínfima imunorreatividade do NF-H fosforilado detectado pelo anticorpo NE14 no sobrenadante, ou seja, na fração solúvel não permitiu sua quantificação pelos nossos métodos.

A Figura 15 mostra os efeitos do PA sobre a imunorreatividade da NF-H com os anticorpos N52 e NE14 em homogeneizado de tecido, fração insolúvel em Triton X-100 e sobrenadante de fatias de córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade. Observamos que nem o imunoconteúdo total da NF-H nem o imunoconteúdo da NF-H fosforilada, presentes no homogeneizado, foram alterados significativamente com o tratamento. Porém, na fração insolúvel em Triton X-100 ocorreu um aumento significativo da imunorreatividade da NF-H frente a ambos anticorpos, confirmando os resultados do estudo ontogenético. No entanto, o conteúdo total da NF-H solúvel (sobrenadante) não apresentou alteração. Lembramos que o imunoconteúdo da NF-H fosforilada não foi avaliado na fração solúvel pelas razões expostas acima. O MMA apresentou efeitos similares aos do PA nas três frações estudadas (Figura 16).

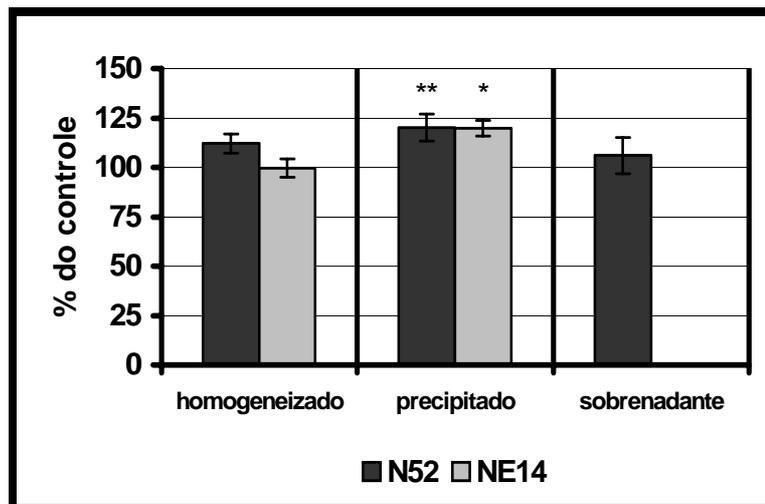


Figura 15. Efeitos do PA sobre o imunocontéudo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com PA 2,5 mM como descrito no “Método Experimental”. Uma alíquota do homogeneizado do tecido foi separada antes da centrifugação e constitui a fração denominada “homogeneizado”. Após a centrifugação obtiveram-se mais duas frações: a fração insolúvel em Triton X-100 1% denominada “precipitado” e a fração solúvel denominada “sobrenadante”. As amostras foram analisadas por *immunoblotting* e a densidade óptica das bandas reveladas foi quantificada. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle de cada fração que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada fração são os seguintes: controle (sem tratamento), N52 e NE14 (tratamentos com PA). As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 12) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,01$.

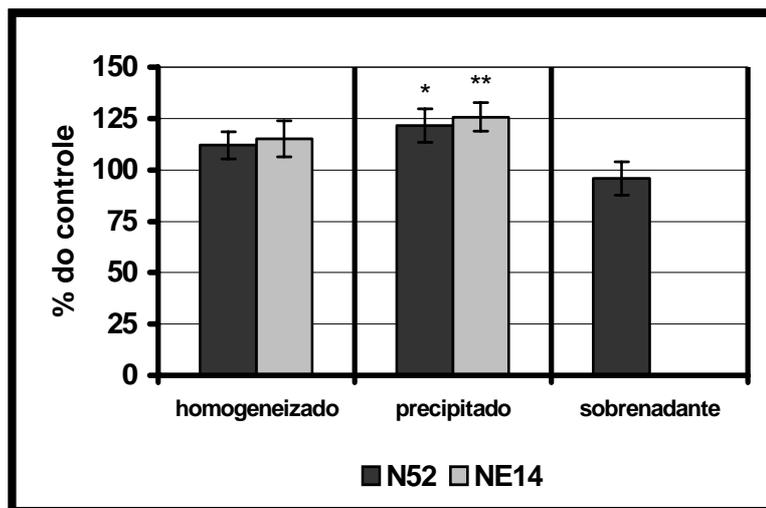


Figura 16. Efeitos do MMA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com MMA 2,5 mM como descrito no “Método Experimental”. Uma alíquota do homogeneizado do tecido foi separada antes da centrifugação e constitui a fração denominada “homogeneizado”. Após a centrifugação obteve-se mais duas frações: a fração insolúvel em Triton X-100 1% denominada “precipitado” e a fração solúvel denominada “sobrenadante”. As amostras foram analisadas por *immunoblotting* e a densidade óptica das bandas reveladas foi quantificada. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle de cada fração que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada fração são os seguintes: controle (sem tratamento), N52 e NE14 (tratamentos com MMA). As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 12) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,01$.

Em relação aos ratos de 17 dias de idade, os resultados foram semelhantes àqueles obtidos nos animais de 12 dias de idade: aumento significativo da imunorreatividade da NF-H frente aos anticorpos N52 e NE14 apenas na fração insolúvel em Triton X-100, tanto em fatias tratadas com PA (Figura 17) quanto com MMA (Figura 18).

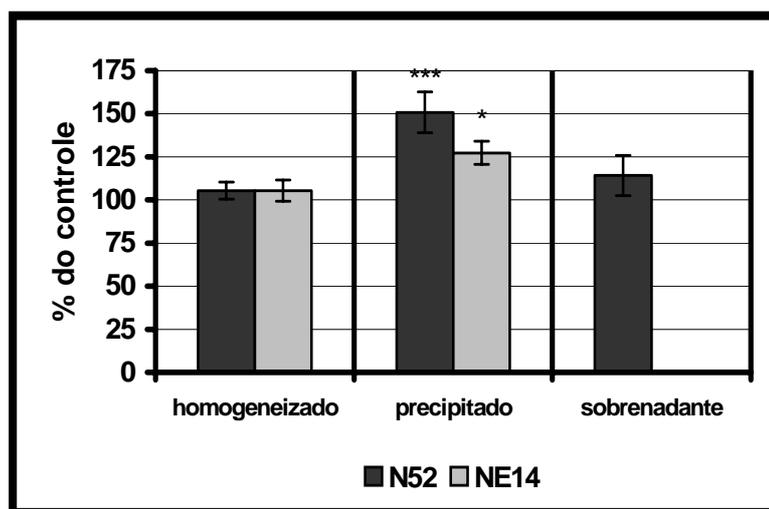


Figura 17. Efeitos do PA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com PA 2,5 mM como descrito no “Método Experimental”. Uma alíquota do homogeneizado do tecido foi separada antes da centrifugação e constitui a fração denominada “homogeneizado”. Após a centrifugação obteve-se mais duas frações: a fração insolúvel em Triton X-100 1% denominada “precipitado” e a fração solúvel denominada “sobrenadante”. As amostras foram analisadas por *immunoblotting* e a densidade óptica das bandas reveladas foi quantificada. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle de cada fração que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada fração são os seguintes: controle (sem tratamento), N52 e NE14 (tratamentos com PA). As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 7) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e *** quando $p < 0,001$.

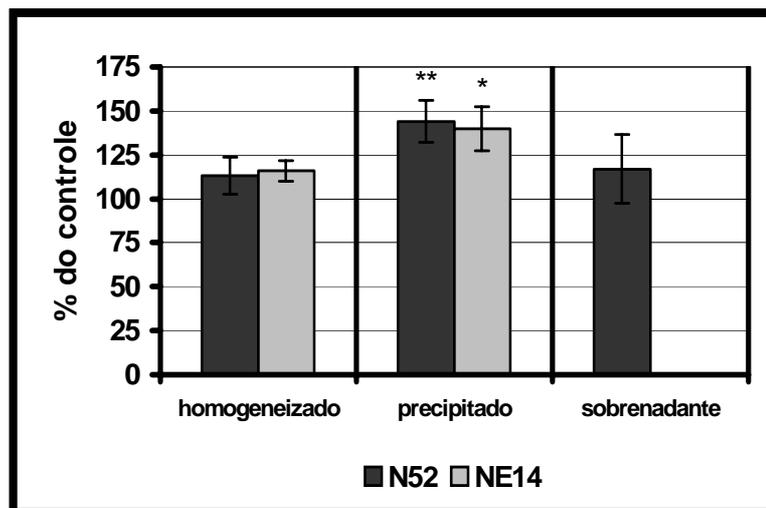


Figura 18. Efeitos do MMA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) nas três frações (homogeneizado, precipitado e sobrenadante) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com MMA 2,5 mM como descrito no “Método Experimental”. Uma alíquota do homogeneizado do tecido foi separada antes da centrifugação e constitui a fração denominada “homogeneizado”. Após a centrifugação obteve-se mais duas frações: a fração insolúvel em Triton X-100 1% denominada “precipitado” e a fração solúvel denominada “sobrenadante”. As amostras foram analisadas por *immunoblotting* e a densidade óptica das bandas reveladas foi quantificada. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle de cada fração que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada fração são os seguintes: controle (sem tratamento), N52 e NE14 (tratamentos com MMA). As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 6) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,01$.

Nosso próximo passo foi tentar compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos observados. Para tanto, lançamos mão dos dois principais neurotransmissores do SNC: o glutamato, o principal neurotransmissor excitatório e o GABA, o principal neurotransmissor inibitório. Diversos estudos demonstram o envolvimento de mecanismos mediados por receptores glutamatérgicos e GABAérgicos modificando o equilíbrio de fosforilação de proteínas do citoesqueleto (Wofchuck e Rodnight, 1994; Mattos-Dutra *et al* 2000; Funchal *et al*, 2002 e 2004). O presente trabalho avaliou o efeito dos neurotransmissores glutamato e GABA no modelo das acidemias propiônica e metilmalônica analisando sua participação na alteração de imunorreatividade da subunidade NF-H.

A Figura 19 mostra os efeitos do PA e dos neurotransmissores em fatias de córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade. Observamos que o PA sozinho manteve seus efeitos, como verificado em experimentos anteriores. No entanto, os neurotransmissores apresentaram efeitos distintos: o glutamato 1 mM não alterou a imunorreatividade da NF-H enquanto que o GABA 1 mM aumentou o parâmetro avaliado de uma forma semelhante ao efeito produzido pelo PA. Contudo a co-incubação com PA e GABA não apresentou efeito somatório.

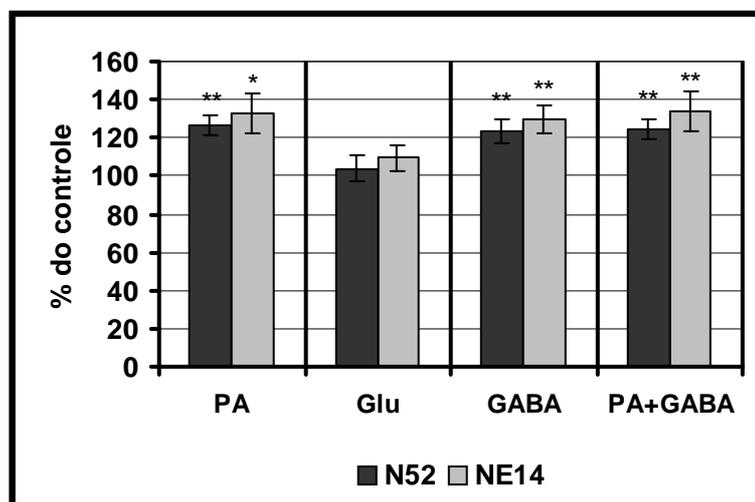


Figura 19. Efeitos do PA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com PA 2,5 mM ou glutamato 1 mM ou GABA 1 mM ou, ainda, co-incubando PA 2,5 mM e GABA 1 mM.

A fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 1% foi extraída e procedeu-se a análise por *immunoblotting* da proteína, como descrito no “Método Experimental”. A densidade óptica das bandas foi quantificada. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controle de cada animal, que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada tratamento são os seguintes: controle, N52 e NE14. As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 5) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,01$.

A Figura 20 mostra os efeitos do MMA, e dos neurotransmissores, também em ratos de 12 dias de idade. Notamos que, de forma semelhante ao que aconteceu com o PA, o neurotransmissor GABA aumentou o imunoconteúdo da proteína estudada, enquanto o glutamato não apresentou efeito. Porém, surpreendentemente a co-incubação das fatias de tecido com MMA e GABA produziu uma inibição significativa do imunoconteúdo da NF-H total e fosforilada.

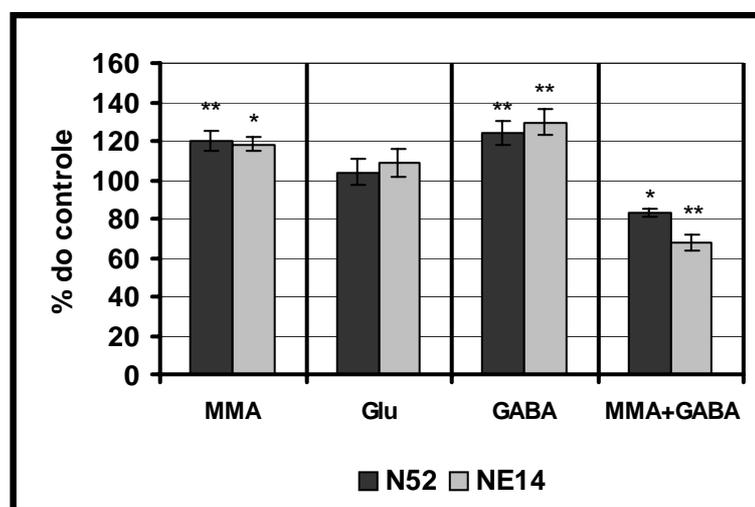


Figura 20. Efeitos do MMA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre o imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com MMA 2,5 mM ou glutamato 1 mM ou GABA 1 mM ou, ainda, co-incubando MMA 2,5 mM e GABA 1mM. A fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 1% foi extraída e procedeu-se a análise por *immunoblotting* da proteína como descrito no “Método

Experimental”. A densidade óptica das bandas foi quantificada. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controle de cada animal, que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada tratamento são os seguintes: controle, N52 e NE14. As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 5) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,01$.

Avaliamos em seguida os mesmos parâmetros em animais cujo sistema nervoso central (SNC) está mais desenvolvido, ou seja, ratos de 17 dias de idade. Obtivemos resultados que mostram o envolvimento de mecanismos dependentes do desenvolvimento do animal. A Figura 21 mostra que o PA sozinho manteve seus efeitos, como verificado em experimentos anteriores: aumento do imunoconteúdo da NF-H total (N52) e aumento do imunoconteúdo da NF-H fosforilada (NE14). O neurotransmissor glutamato apresentou efeitos semelhantes aos do PA e quando as fatias de tecido foram co-incubadas com glutamato 1 mM e PA 2,5 mM esses efeitos não se somaram. Por outro lado, o neurotransmissor GABA não teve efeito sobre a imunorreatividade da NF-H com os dois anticorpos utilizados. Os resultados obtidos com MMA, GABA e glutamato foram semelhantes, como mostra a Figura 22.

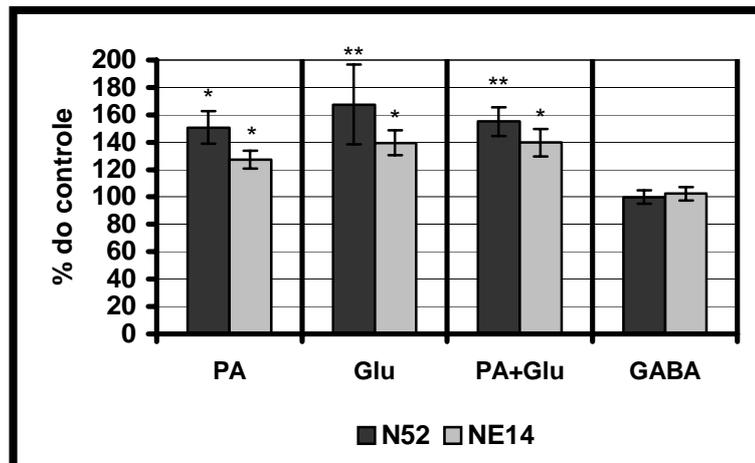


Figura 21. Efeitos do PA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre a imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com PA 2,5 mM ou glutamato 1 mM ou GABA 1 mM ou, ainda, co-icubando PA 2,5 mM e glutamato 1mM. A fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 1% foi extraída e procedeu-se a análise por *immunoblotting* da proteína, como descrito no “Método Experimental”. A densidade óptica das bandas foi quantificada. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controle de cada animal, que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada tratamento são os seguintes: controle, N52 e NE14. As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 5) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,01$.

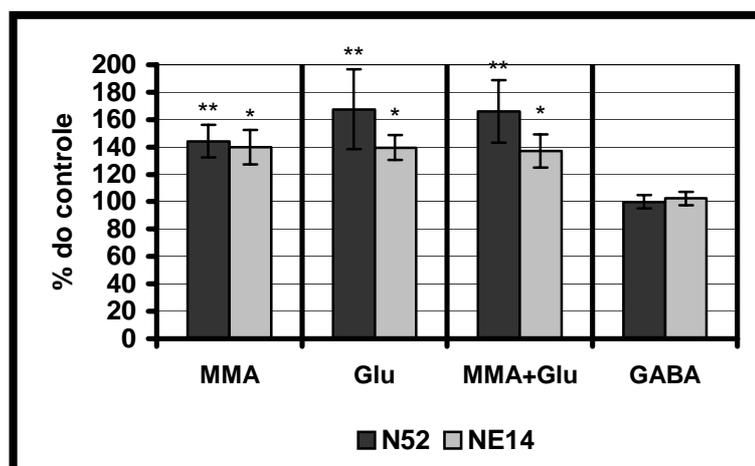


Figura 22. Efeitos do MMA e dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre a imunoconteúdo da NF-H total (N52) e fosforilada (NE14) em córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade. Fatias do tecido foram tratadas *in vitro* com MMA 2,5 mM ou glutamato 1 mM ou GABA 1 mM ou, ainda, co-incubando MMA 2,5 mM e glutamato 1 mM. A fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 1% foi extraída e procedeu-se a análise por *immunoblotting* da proteína, como descrito no “Método Experimental”. A densidade óptica das bandas foi quantificada. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controle de cada animal, que foi considerado 100%. Os grupos comparados dentro de cada tratamento são os seguintes: controle, N52 e NE14. As diferenças estatisticamente significativas das amostras tratadas (n = 5) em relação ao controle, avaliadas por ANOVA e pós-teste de Tukey, estão assim representadas: * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,01$.

V - DISCUSSÃO

A acidemia propiônica e a acidemia metilmalônica são erros inatos do metabolismo (EIM), descritas como deficiências enzimáticas distintas, porém, que compartilham de uma rota metabólica comum. Os pacientes portadores dessas desordens apresentam crises metabólicas agudas, durante as quais verificam-se níveis plasmáticos muito altos dos ácidos orgânicos PA e MMA, respectivamente (Fenton e Rosenberg, 2001). Apesar dos sintomas neurológicos serem os principais achados das acidemias propiônica e metilmalônica e as anormalidades estruturais do SNC, como a atrofia cerebral, serem frequentemente observadas nos pacientes afetados, muito pouco é conhecido da patofisiologia das disfunções neurológicas nestas desordens.

O presente trabalho mostra um estudo ontogenético dos efeitos do PA e do MMA sobre a imunorreatividade da NF-H em fatias de córtex cerebral de ratos de 9, 12, 17, 21 e 60 dias de idade e faz também uma abordagem sobre o equilíbrio de polimerização e a participação de mecanismos glutamatérgicos e GABAérgicos nestes efeitos. Para tanto, utilizamos dois tipos de anticorpos monoclonais, o anticorpo NE14 que se liga somente a epítomos fosforilados na molécula da NF-H e, portanto, reconhece NF-H fosforilada; e o anticorpo N52 que se liga a um epítomo do domínio carbóxi-terminal da NF-H, o qual está presente tanto na forma fosforilada quando na forma não fosforilada da subunidade e portanto, reconhece a NF-H total, independentemente do nível de fosforilação.

Nossos resultados mostraram alterações na imunorreatividade da NF-H insolúvel em Triton X-100 ao longo do desenvolvimento em resposta à exposição de fatias de córtex cerebral dos animais ao PA e MMA 2,5 mM durante 30 minutos. Esta concentração foi escolhida por corresponder aos níveis atingidos por esses ácidos durante as crises metabólicas (Fenton e Rosenberg, 2001) em pacientes com acidemia propiônica e metilmalônica. Além disso, resultados prévios de nosso laboratório sobre efeitos do PA e do MMA em outras proteínas do citoesqueleto foram obtidos com a concentração de 2,5 mM (Mattos-Dutra *et al*, 2000; de Almeida *et al*, 2003; Oliveira-Loureiro *et al*, 2005).

Os dados do presente estudo mostram que PA e MMA são capazes de aumentar a imunorreatividade da NF-H fosforilada (NE14) e associada à fração

citoesquelética de córtex cerebral de ratos lactantes dos 9 até os 17 dias de vida. Interessantemente, os metabólitos não afetaram a fosforilação da NF-H na fração citoesquelética de fatias corticais dos animais de 21 e 60 dias de idade. Inúmeros fatores poderiam sustentar uma explicação para essas observações, porém, ainda não conhecemos a resposta correta. Sabemos, entretanto, que a maturação do córtex cerebral não está completa nas idades estudadas e que sistemas complexos modulam a dinâmica do citoesqueleto ao longo do desenvolvimento (Shea *et al*, 1997; Lariviere e Julien, 2004). Nesse contexto, é interessante notar que as crianças afetadas pelas acidemias propiônica e metilmalônica apresentam os sinais neurológicos mais severos no início da vida (Fenton e Rosenberg, 2001). Por outro lado, a imunorreatividade aumentada do epítipo fosforilado da NF-H pelos ácidos orgânicos poderia levar a uma desestabilização do citoesqueleto, pois é descrito que a fosforilação desta subunidade regula as interações entre a NF-H e outros NFs (Hirokawa *et al*, 1984), bem como com os MTs (Hisanaga *et al*, 1991). Também, é descrito que a fosforilação da NF-H regula o diâmetro axonal (Hoffmann *et al*, 1984), o transporte axonal (Archer *et al*, 1994) e a proteólise desta proteína por ação da calpaína (Greenwood *et al*, 1993). Tudo isso pode, potencialmente, levar à degeneração neuronal e explicar parcialmente as anormalidades estruturais do SNC características dos pacientes afetados pelas desordens onde esses metabólitos se acumulam.

Nós também mostramos que a imunorreatividade da NF-H para o N52 (fosforilada e não-fosforilada) estava significativamente aumentada na fração citoesquelética, obtida de fatias de córtex cerebral de ratos de 12 e 17 dias de idade, após a exposição ao PA e MMA, porém, esse parâmetro não se alterou nas demais idades. Levando em consideração o conjunto de dados obtidos com os anticorpos NE14 e N52 na fração citoesquelética, podemos dizer que a incubação das fatias de córtex cerebral de ratos de 9 dias aumentou o nível de fosforilação sem alterar o imunoconteúdo total; em ratos de 12 e 17 dias de vida levou a um acúmulo da subunidade NF-H na fração citoesquelética e que esta proteína está na forma fosforilada; e finalmente, em ratos de 21 e 60 dias de vida os metabólitos não alteraram os parâmetros estudados. Estes resultados sugerem a existência de

mecanismos dependentes do desenvolvimento regulando os efeitos do PA e do MMA sobre o imunoconteúdo da NF-H na fração citoesquelética, em córtex cerebral.

É descrito que o produto da extração de um tecido com tampão de alta força iônica contendo Triton X-100 1% é uma fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários e que estas proteínas encontram-se fisicamente associadas com o citoesqueleto celular (Domingo *et al*, 1992; Funchal *et al*, 2003). Por isso, consideramos que o aumento concomitante da imunorreatividade da NF-H aos anticorpos N52 e NE14 corresponde a um aumento da subunidade agregada ou polimerizada, constituindo o esqueleto celular.

Para explicar o aumento do imunoconteúdo da NF-H associada ao citoesqueleto, nos ratos de 12 e 17 dias, surgem as seguintes hipóteses: (1) aumento da expressão da subunidade NF-H, (2) diminuição da proteólise desta subunidade associada à fração citoesquelética e (3) deslocamento do equilíbrio NF-H solúvel \leftrightarrow NF-H polimerizada, favorecendo a forma polimerizada.

Enfocamos inicialmente a possibilidade de um aumento da expressão da NF-H. Para isso realizamos outra série de experimentos e analisamos o imunoconteúdo da NF-H no homogeneizado total do tecido, antes da centrifugação, bem como na fração insolúvel em Triton X-100 1%. Neste estudo utilizamos animais de 12 e 17 dias de idade. A análise dos dados revelou que nem o imunoconteúdo total da NF-H (fosforilada e não fosforilada) nem o imunoconteúdo da NF-H fosforilada, presentes no homogeneizado do tecido, foram alterados significativamente com o tratamento. Esse resultado exclui a hipótese de que os metabólitos aumentariam a expressão da subunidade NF-H nas nossas condições experimentais.

Uma segunda tentativa de explicação para o aumento do imunoconteúdo da NF-H na fração citoesquelética, seria uma inibição da proteólise da NF-H anormalmente fosforilada e associada à fração citoesquelética. Essa possibilidade é baseada na evidência de que a calpaína, uma protease dependente de cálcio, degrada ativamente as subunidades dos neurofilamentos na sua forma polimerizada. No entanto, a enzima só é capaz de reconhecer substratos não fosforilados. Isto significa que a fosforilação de determinados resíduos de serina impede o reconhecimento do substrato e, portanto a ação da calpaína (Pant, 1988).

Uma terceira possibilidade sugere o deslocamento do equilíbrio de polimerização NF-H solúvel \leftrightarrow NF-H polimerizada, favorecendo a forma polimerizada. Embora a imunorreatividade da NF-H frente a ambos anticorpos tenha aumentado significativamente na fração insolúvel em Triton X-100, como já havia sido demonstrado anteriormente, o conteúdo total da NF-H solúvel (sobrenadante) não apresentou diminuição, como seria de se esperar. Apesar de não termos uma explicação exata para estes resultados, ainda acreditamos que o aumento da imunorreatividade da NF-H na fração citoesquelética esteja, de alguma maneira, relacionada com o deslocamento do equilíbrio NF-H solúvel \leftrightarrow NF-H polimerizada.

Para justificar esta opinião, consideramos que a fração citoesquelética insolúvel em Triton é uma fração compartimentalizada no axônio, onde os NFs encontram-se principalmente polimerizados, com poucas subunidades solúveis em equilíbrio (Grant e Pant, 2000). O corpo celular do neurônio é considerado um compartimento de síntese dos NFs, onde suas subunidades encontram-se relativamente hipofosforiladas e monoméricas ou oligoméricas (Jung *et al*, 2000^b; Grant e Pant, 2000). Portanto, o fato de não detectarmos a diminuição esperada do imunoconteúdo da NF-H solúvel poderia ser um reflexo da metodologia utilizada, na qual não analisamos somente as poucas subunidades que participavam do equilíbrio no compartimento axonal, mas, também, aquelas presentes no corpo celular. Como não podemos segregar estes compartimentos, pois trabalhamos com o homogeneizado do tecido, nossos resultados não expressam as verdadeiras variações do imunoconteúdo da NF-H solúvel que está em equilíbrio com o citoesqueleto axonal. Considerando como possível esta avaliação metodológica, não podemos excluir a possibilidade de um deslocamento do equilíbrio de polimerização da NF-H.

Entretanto, reforçando nossa tendência por esta hipótese, consideramos que o acúmulo da NF-H na fração citoesquelética, observado nos animais de 12 e 17 dias, foi acompanhado pelo aumento da imunorreatividade da NF-H fosforilada. Esse dado mostra que o aumento da fosforilação desta subunidade poderia ter contribuído para sua agregação na fração citoesquelética. A relação entre a fosforilação das proteínas dos NFs e a sua polimerização, porém, não está totalmente esclarecida. A exceção faz-se para a NF-L. Para esta subunidade a fosforilação na extremidade

aminoterminal favorece sua dissociação ou não incorporação no NF, porém, a fosforilação na extremidade carbóxi-terminal não interfere nessa dinâmica (Sihag e Nixon, 1989, 1991; Guan *et al*, 1992; Nakamura *et al*, 2000). No entanto, com relação a NF-H não existem evidências diretas do envolvimento da fosforilação com a capacidade de associação desta subunidade aos NFs. Nesse contexto, algumas evidências merecem destaque.

As subunidades NF-M e NF-H são as que possuem o maior número de sítios de fosforilação, especialmente, nas repetições KSP, encontradas no domínio carbóxi-terminal. Entre as principais quinases que fosforilam esses sítios estão duas famílias de quinases direcionadas à prolina: as ciclinas quinases que incluem a cdk5 e as MAP (*mitogen-activated protein*) quinases que por sua vez incluem as Erk 1 e 2 (Grant e Pant, 2000). Apesar da generalização muito comum de que essas quinases fosforilam repetições KSP, é relevante considerar que elas têm preferência por seqüências diferentes de aminoácidos, o que lhes confere funções distintas. As Erk 1 e 2 fosforilam, preferencialmente, seqüências KSPXXXK (Pant *et al*, 1997) e sua ativação está implicada no crescimento de neuritos (Traverse *et al*, 1992). Já a cdk5 requer um resíduo básico adjacente, tendo alta afinidade por seqüências KSPXK (Pant *et al*, 1997), que quando fosforilada na NF-H impede sua ligação com os MTs (Miyasaka *et al*, 1993).

Como podemos notar a fosforilação em condições fisiológicas é muito importante para a funcionalidade neuronal. Porém, em doenças neurodegenerativas é descrita uma fosforilação anormal das proteínas do citoesqueleto como é o caso dos feixes fibrilares de proteína tau, característicos da Doença de Alzheimer (Viana, 1999). Ainda, em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica (ELA), o transporte de NFs anormalmente fosforilados está seriamente obstruído, talvez como resultado da formação prematura e anormal de polímeros dentro do corpo celular, o que impede sua associação com os MTs (Marszalek *et al*, 1996; Julien, 1999).

Concebendo a existência de diversos sítios de fosforilação nas subunidades dos NFs que, por sua vez, são alvo de inúmeras quinases, ativadas por estímulos variados, modulando diferentemente a dinâmica do citoesqueleto, torna-se evidente a complexidade dos mecanismos que regulam a polimerização dos NFs.

Remetendo aos nossos resultados, provavelmente uma combinação de fosforilação anormal da NF-H, com aumento de sua polimerização, acompanhado por diminuição da degradação proteolítica da proteína associada ao neurofilamento seja uma explicação para os resultados obtidos. No entanto mais experimentos serão necessários para esclarecer este mecanismo.

Finalmente avaliamos a participação dos neurotransmissores glutamato e GABA nos efeitos do PA e do MMA sobre o imunoconteúdo da NF-H, numa tentativa de compreender os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações observadas. Nossos resultados mostraram o envolvimento de ambos neurotransmissores, mediando os efeitos do PA e do MMA, provavelmente através de diferentes mecanismos regulados durante o desenvolvimento.

Com relação aos animais de 12 dias de idade, apenas o neurotransmissor GABA (1 mM) teve efeito sobre o imunoconteúdo da NF-H, mimetizando o efeito dos ácidos. No entanto, quando GABA e PA ou GABA e MMA foram co-incubados, observamos resultados diferentes. Quando GABA foi co-incubado com o PA, o efeito sobre o imunoconteúdo da NF-H foi igual ao observado para cada substância isoladamente. Mas, quando o GABA foi co-incubado com o MMA, o efeito foi inverso, isto é: ocorreu uma significativa diminuição do imunoconteúdo da NF-H. Com estas observações podemos dizer que PA e GABA agem através do mesmo mecanismo, pois a co-incubação não teve efeito somatório. Mas o MMA tem um mecanismo de ação diferente, o qual permanece incompreendido. Estudos em nosso laboratório já mostraram um comportamento semelhante para a co-incubação com os aminoácidos fenilalanina e alanina, onde separados tem efeitos estimulatórios sobre a incorporação de ^{32}P em FIs de córtex cerebral de ratos, mas quando juntos não tem efeito. Nesta situação foi descrito um mecanismo inibitório complexo dos dois aminoácidos sobre enzimas do sistema fosforilante dos FIs, sugerindo que os aminoácidos agem em dois sítios diferentes da mesma enzima ou em enzimas diferentes, nesse caso uma do sistema fosforilante e a outra do sistema desfosforilante (Dick *et al*, 2002).

Avaliando as respostas em animais de 17 dias de idade, notamos que a neurotransmissão GABAérgica cede importância à glutamatérgica em seus efeitos sobre o imunoconteúdo da NF-H. Os dados mostram que apenas o

neurotransmissor glutamato alterou os parâmetros estudados, e que este efeito não é significativamente diferente dos efeitos dos ácidos sozinhos. Assim, a co-incubação do glutamato com o PA ou com o MMA mostra que seus efeitos individuais não se somam e concluiu que estes metabólitos, nas condições apresentadas, agem através de mecanismos glutamatérgicos.

É muito interessante conceber que a variedade de resultados expressos nesse estudo apenas reforça o importante papel do desenvolvimento do SNC, orquestrado por infinitos sistemas de sinalização celular. Dentro dessa rede complexa de sinais, destacamos a neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica, que mostraram estar envolvidas na dinâmica de fosforilação da NF-H e assim regular a função do citoesqueleto neuronal, pelo menos em alguns estágios do desenvolvimento. Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram o envolvimento de mecanismos glutamatérgicos e GABAérgicos nos efeitos causados pelos metabólitos que se acumulam em diferentes EIM. Podemos citar de Mattos-Dutra *et al* (2000), cujo trabalho mostrou que o PA e o MMA eram capazes de aumentar a fosforilação de outras proteínas do citoesqueleto, como as subunidades de médio e baixo peso molecular dos neurofilamentos (NF-M e NF-L), bem como das α e β tubulinas em fatias de córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade através de iGluR do tipo NMDA; Funchal *et al* (2002) mostraram o envolvimento dos três tipos de iGluR (NMDA, AMPA e cainato) nos efeitos inibitórios do ácido α -cetoisocapróico (KIC) sobre a fosforilação de FI em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade. Por outro lado, em ratos de 17 e 21 dias os efeitos deste metabólito são estimulatórios sobre a fosforilação das mesmas proteínas e envolvem somente os receptores NMDA e AMPA. Em outro trabalho, Funchal *et al* (2004) mostraram que o KMV, outro metabólito que se acumula na DXB, estimulou a fosforilação de subunidades dos FIs em córtex cerebral de ratos de 12 dias de idade através do sistema GABAérgico.

Sabemos que o padrão de expressão de receptores muda durante o desenvolvimento, inclusive é descrita a regulação cruzada entre os sistemas GABAérgico e glutamatérgico (Saransaari e Oja, 2004). Portanto, é possível que a variação na expressão de receptores regulada pelo desenvolvimento possa explicar a diversidade dos resultados observados neste estudo.

Concluindo, este estudo mostrou que os ácidos orgânicos acumulados nas acidemias propiônica e metilmalônica produziram uma alteração do equilíbrio de fosforilação/desfosforilação da NF-H, gerando o acúmulo desta proteína na forma polimerizada. Este efeito poderia ter conseqüências deletérias para o transporte axonal e a função neuronal, o que poderia explicar os danos neurológicos e as anormalidades estruturais do SNC (atrofia cerebral) dos pacientes afetados. Ainda, nossos resultados mostraram que os efeitos do PA e do MMA observados sobre a NF-H são dependentes do estágio de desenvolvimento do animal e dos sistemas de neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica.

VI - CONCLUSÕES

1. Os ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MMA) induzem alterações na imunorreatividade da NF-H em córtex cerebral de maneira dependente do estágio de desenvolvimento do rato. Em ratos de 9 dias os metabólitos aumentam o nível de fosforilação sem alterar o imunoconteúdo total da proteína na fração citoesquelética; em ratos de 12 e 17 dias provocam um acúmulo da subunidade NF-H na fração citoesquelética; e, em ratos de 21 e 60 dias de vida os metabólitos não alteram a imunorreatividade da NF-H.

2. O PA e o MMA alteram o equilíbrio de polimerização da NF-H provocando um acúmulo da proteína fosforilada na sua forma polimerizada sem alterar o imunoconteúdo desta proteína no homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 12 e 17 dias de idade.

3. A neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica estão envolvidas nos efeitos do PA e do MMA sobre o imunoconteúdo da NF-H associada à fração citoesquelética de córtex cerebral de ratos, porém estes sistemas agem somente em fases restritas do desenvolvimento. Em animais de 12 dias de vida o PA têm seus efeitos mediados através de mecanismos de neurotransmissão GABAérgica. Com relação ao MMA, o envolvimento de mecanismos GABAérgicos parece ser mais complexo, dificultando conclusões imediatas. Em animais de 17 dias de idade, tanto o PA quanto o MMA, têm seus efeitos sobre o imunoconteúdo da NF-H mediados por mecanismos de neurotransmissão glutamatérgica.

VII - PERSPECTIVAS

Este trabalho abre algumas oportunidades de novos estudos no modelo experimental das Acidemias Propiônica e Metilmalônica.

Uma perspectiva extremamente pertinente é fazer um estudo com antagonistas dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos, com o objetivo de mostrar os subtipos de receptores envolvidos nos efeitos observados dos ácidos propiônico e metilmalônico em ratos de 12 e 17 dias de idade.

Outra perspectiva, também, prioritária é concluir o envolvimento dos mecanismos de neurotransmissão GABAérgicos nos efeitos do ácido metilmalônico.

Também, pretendemos fazer um novo estudo dos ácidos sobre a morfologia de neurônios. Neste trabalho poderemos focar sobre alguns aspectos morfológicos diretamente relacionados às funções da NF-H, como o diâmetro do calibre axonal e o crescimento de neuritos.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerley, S., Grierson, A.J., Brownlees, J., Thornhiel, P., Anderton, B.H., Leight, P.N., Shew, C.E., Mieler, C.J. (2000). Glutamate slow axonal transport of neurofilament in transfected neurons. **J. Cell Biol.** **150**:165-76.

Alberts, B., Brat, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (2002). The cytoskeleton. In: **Molecular Biology of the Cell**. Alberts, B., Brat, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (eds) 3ed. New York: Garland Publishing, pp. 907-82.

Al-Chalabi, A., Miller, C.C.J. (2003). Neurofilaments and neurological disease. **BioEssays** **25**:346-355.

Archer, D.R., Watson, D.F., Griffin, J.W. (1994). Phosphorylation-dependent immunoreactivity of neurofilaments and the rate of slow axonal transport in the central and peripheral axons of the rat dorsal root ganglion. **J. Neurochem.** **62**:1119-25.

Arundine, M., Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium.** **34**:325-37.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2002). Neurônios e Glia, Sistemas de Neurotransmissores. In: **Neuroriências: desvendando o sistema nervoso**. coord. trad. Quillfeldt, J.A. [et al.]. 2ed. Porto Alegre: Artmed, pp. 22-49, 130-62.

Betts, J.C., Blackstock, W.P., Wards, M.A., Anderton, B.H. (1997). Identification of phosphorylation sites on neurofilament proteins by nanoelectrospray mass spectrometry. **J. Biol. Chem.** **272**:12922-7.

Brewer, G.J. (2000). Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging. **Exp. Gerontol.** **35**:1165-83.

Carraway, C.A.C. (2000). The cytoskeleton in the transduction of signal and regulation of cellular function. In: **Cytoskeleton: signalling and cellular regulation**. Carraway, K.L., Carraway, C.A.C. New York: Oxford University Press, pp. 1-7.

Choi, DW. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron** 1:623-34.

Cotman, C.W., Foster, A., Lanthorn, T. (1981). An overview of glutamate as a neurotransmitter. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** 27:1-27.

Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** 65:1-105.

de Almeida, L.M., Funchal, C., Pelaez, P.L., Pessutto, F.D., Loureiro, S.O., Vivian, L., Wajner, M., Pessoa-Purreur, R. (2003). Effect of propionic and methylmalonic acids on the *in vitro* phosphorylation of intermediate filaments from cerebral cortex of rats during development. **Metab. Brain Dis.**18:207-19.

Díaz, J.F., Valpuesta, J.M., Chacón, P., Diandun, G., Andrew, M. (1998). Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to a easily accessible site. **J. Biol. Chem.** 273:338803-10.

Dick, S., Funchal, C., Pelaez, P.L., Loureiro, S.O., Vivian, L., Pessutto, F.D., Almeida, L.M., Wannmacher, C.M., Pessoa-Purreur, R. (2002). Cytoskeleton of human mononuclear cells as a possible peripheral marker for phenylalanine neurotoxicity in PKU. **Neurochem. Res.** 27:1569-76.

Domingo, A., Sarria, A.J., Evans, R.M., Klymkowsky, M.W. (1992). Studying intermediate filaments. In: **The Cytoskeleton: a practical approach**. Carraway, K.L. and Carraway, C.A.C. New York: Oxford University Press, pp. 223-55.

Downing, K.H. Structural studies on tubulin and microtubules. (2000). In: **Cytoskeleton: signalling and cellular regulation**. Carraway, K.L., Carraway, C.A.C. New York: Oxford University Press, pp. 159-81.

Edmonds, B., Gibb, A.J., Colquhoun, D. (1995). Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. **Ann. Rev. Physiol.** **57**:495-519.

Elder, G.A., Friedrich, V.L., Margita, A., Lazzarine, A. (1999). Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in mid-sized neurofilament subunit. **J. Cell Biol.** **146**:181-92.

Fenton, W.A., Rosenberg, L.E. (2001). Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds) 8ed. New York: McGraw-Hill, pp. 423-1449.

Fu, Z., Green, C.L., Bennett, G.S. (1999). Relationship between casein kinase I isoforms and neurofilament-associated kinase. **J. Neurochem.** **73**:831-38.

Fuchs, E., Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. **Ann. Rev. Biochem.** **63**:345-82.

Funchal, C., Almeida, L.M.V., Loureiro, S.O., Vivian, L., de Lima-Pelaez, P., Pessutto, F.D.B., Rosa, A.M., Wajner, M., Pureur, R.P. (2003). In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. **Brain Res. Protocols** **11**:111-118.

Funchal, C., de Lima-Pelaez, P., Loureiro, S.O., Vivian, L., Pessutto, F.D.B., Almeida, L.M.V., Wofchuk, S.T., Wajner, M., Pureur, R.P. (2002). α -ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rats cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. **Dev. Brain Res.** **139**:267-76.

Funchal, C., Pessutto, F.D.B., Almeida, L.M.V., de Lima-Pelaez, P., Loureiro, S.O., Vivian, L., Wajner, M., Pureur, R.P. (2004). α -keto- β -methylvaleric acid increases the *in vitro* phosphorylation of intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. **J. Neurol. Sci.** **217**:17-24.

Geisler, N., Weber, K. (1981). Self assembly *in vitro* of 68,000MW triplet protein into intermediate-sized filaments. **J. Mol. Biol.** **151**:565-71.

Goldstein, M.E., Cooper, H.S., Bruce, J., Carden, M.J., Lee, V.M., Schlaepfer, W.W. (1987). Phosphorylation of neurofilament proteins and chromatolysis following transection of rat sciatic nerve. **J. Neurosci.** **7**:1586-94.

Grant, P., Pant, H.C. (2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. **J. Neurocyt.** **29**:843-72.

Greenwood, J.A., Troncoso, J.C., Costello, A.C., Johnson, G.V.W. (1993). Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of the 200 kDa and 160 kDa neurofilament proteins. **J. Neurochem.** **61**:191–9.

Guan, R.J., Hall, F.L., Cohlberg, J.A. (1992). Proline-directed protein kinase (p34cdc2/p58cyclin A) phosphorylates bovine neurofilaments. **J. Neurochem.** **58**:1365–71.

Guidato, S., Tasi, L.H., Woodgett, J., Miller, C.C.J. (1996). Differential cellular phosphorylation of neurofilament heavy side-arms by glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinase-5. **J. Neurochem.** **66**:1698-706.

Herrmann, H., Aebi, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talent structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. **Curr. Opin. Cell. Biol.** **12**:79-90.

Hirokawa, N., Glicksman, M.A., Willard, M.B. (1984). Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. **J. Cell Biol.** **98**:1523–36.

Hisanaga, S., Hirokawa, N. (1990). Molecular architecture of the neurofilament. II. Reassembly process of neurofilament L protein *in vitro*. **J. Mol. Biol.** **211**:871-82.

Hisanaga, S., Kusubata, M., Okumura, E., Kishimoto, T. (1991). Phosphorylation of neurofilament H subunit at the tail domain by the CDC 2 kinase dissociates the association to microtubules. **J. Biol. Chem.** **266**:21798–803.

Hisanaga, S., Matsuoka, Y., Nishizawa, K., Saito, T., Inagaki, M., Hirokawa, N., Hisanaga, S., Yasugawa, S., Yamakawa, T., Miyamoto, E., Ikebe, M., Uchiyama, M., Kishimoto, T. (1994). Phosphorylation of native and reassembled neurofilaments composed of NF-L, NF-M and NF-H by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. Dephosphorylation of microtubule-binding sites at the neurofilament-H tail domain by alkaline, acid, and protein phosphatases. **Mol. Biol. Cell** **5**:705-9.

Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J., Price, D.L. (1987). Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**:3472-6.

Hoffmann, P.N., Griffin, J.W., Price, D.L. (1984). Control of axonal caliber by neurofilament transport. **J. Cell Biol.** **99**:705–14.

Hommes, F.A., Kuipers, J.R.G., Elema, J.D., Janse, J.F., Jonxis, J.J.P. (1968). Propionic acidemia, a new inborn error of metabolism. **Pediatr. Res.** **2**:519.

Hubbard, M., Cohen, P. (1993). On the target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. **Trends Biochem. Sci.** **18**:172-7.

Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell** **80**:225-36.

Ikonomidou, C., Mosinger, J.L., Olney, J.W. (1989). Hypothermia enhances protective effect of MK-801 against hypoxic/ischemic brain damage in infant rats. **Brain Res.** **487**:184-7.

Inada, H., Nagata, K.I., Goto, H., Inagaki, M. (2000). Regulation of intermediate filament dynamics: a novel approach using site and phosphorylation state specific antibodies. In: **Cytoskeleton: signalling and cellular regulation**. Carraway, K.L., Carraway, C.A.C. New York: Oxford University Press, pp. 183-207.

Ingram, E.M., Wiseman, J.W., Tessler, S., Emson, P.C. (2001). Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of the EL mouse. **Neurochem.** **79**:564-75.

Jaffe, H., Veeranna, Pant, H.C. (1998^a). Characterization of serine and threonine phosphorylation sites in beta-elimination/ethanethiol addition-modified proteins by electrospray tandem mass spectrometry and database searching. **Biochemistry** **37**:16211-24.

Jaffe, H., Veeranna, Shetty, K.T., Pant, H.C. (1998^b). Characterization of the phosphorylation sites of human high molecular weight neurofilament protein by electrospray ionization tandem mass spectrometry and database searching. **Biochemistry** **37**:3931-40.

Johnson, J.W., Ascher, P. (1992). Equilibrium and kinetic study of glycine action on the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured mouse brain neurons. **Physiol.** **455**:339-65.

Julien, J.P. (1999). Neurofilament functions in health and disease. **Curr. Opin. Neurobiol.** **9**:554–60.

Jung, C. Yabe, J.T., Shea, T.B. (2000^a). C-terminal phosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit correlates with decrease neurofilament axonal transport velocity. **Brain Res.** **856**:12-9.

Jung, C., Yabe, J.T., Lee, S., Shea, T.B. (2000^b). Hypophosphorylated neurofilament subunits undergo axonal transport more rapidly than more extensively phosphorylated subunits in situ. **Cell Motil. Cytoskel.** **47**:120–9.

Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A. (2000). Synaptic Integration. In: **Principles of neural science**. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. 4ed. New York: McGraw-Hill, pp. 207-28.

Kaziro, Y., Ochoa, S. (1964). The metabolism of propionic acid. **Adv. Enzymol.** **26**:283.

Kirkpatrick, L.L., Brady, S.T. (1999). Cytoskeleton of neurons and glia. In: **Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspects**. Siegel, G., Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Fisher, S.K., Ulher, M.D. (eds) 6ed. New York: Lippincott-Raven Publishers, pp. 155-73.

Lariviere, R.C., Julien, J.P. (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. **J. Neurobiol.** **58**:131-48.

Lee, M.K., Cleveland, D.W. (1996). Neuronal intermediate filaments. **Ann. Rev. Neurosc.** **19**:187-217.

Lee, V.M., Otvos, L., Jr., Carden, M.J., Hollosi, M., Dietzschold, B., Lazzrini, R.A. (1988). Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**:1998-2002.

Leterrier, J.F., Hartwig, J., Kas, J., Vergners, R., Janmey, P. (1996). Mechanical effects of neurofilament crossbridges: modulation by phosphorylation, lipids and interactions with F-actin. **J. Biol. Chem.** **271**:15687-94.

Li, B.S., Daniels, M.P., Pant, H.C. (2001). Integrins stimulate phosphorylation on neurofilament NF-M subunit KSP repeats through activation of extracellular regulated-kinases (Erk1/Erk2) in cultured motoneurons and transfected NIH 3T3 cells. **J. Neurochem.** **76**:703-10.

Li, B.S., Grant, V.P., Pant, H.C. (1999^a). Calcium influx and membrane depolarization induce phosphorylation of neurofilament (NF-M) KSP repeats in PC12 cells. **Mol. Brain Res.** **70**:84-91.

Li, B.S., Veeranna, J.G., Grant, P., Pant, H.C. (1999^b). Activation of mitogen-activated protein kinases (Erk1 and Erk2) cascade results in phosphorylation of NF-M tail domains in transfected NIH 3T3 cells. **Eur. J. Biochem.** **262**:211-7.

Lin, C.H., Foscher, P. (1995). Growth cone advance is inversely proportional of retrograde F-actin flow. **Neuron** **14**:763-71.

Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N. Engl. J. Med.** **330**:613-22.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**:265-7.

Mackintosh, C., Mackintosh, R.W. (1994). Inhibitors of protein kinases and phosphatases. **Trends Biochem. Sci.** **19**:444-8.

Marinowich, M., Viviani, B., Galli, C.L. (1997). Actin modifications and calcium homeostasis in neurotoxicity. The case of organotin salts. **Toxicol. in vitro** **11**:499-503.

Marszalek, J.R., Williamson, T.L., Lee, M.K., Xu, Z., Hoffman, P.N., Becher, M.W., Crawford, T.O., Cleveland, D.W. (1996). Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. **J. Cell Biol.** **135**:711–24.

Mata, M., Kupina, N., Fink, D.J. (1992). Phosphorylation-dependent neurofilament epitopes are reduced at the node of Ranvier. **J. Neurocytol.** **21**:199-210.

Mattos-Dutra, A., Meirelles, R., Rocha, B.B., Kommers, T., Wofchuk, S.T., Wajner, M., Pureur, R.P. (2000). Methylmalonic and propionic acids increase the *in vitro* incorporation of ³²P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats through NMDA glutamate receptors. **Brain Res.** **856**:111-8.

Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.** **130**:1007S-15S.

Miyasaka, H., Okabe, S., Ishiguro, K., Uchida, T., Hirokawa, N. (1993). Interaction of the tail domain of high molecular weight subunits of neurofilaments with the COOH-terminal region of tubulin and its regulation by tau protein kinase II. **J. Biol. Chem.** **268**:22695–702.

Monaghan, D.T., Olverman H.J., Nguyen, L., Watkins, J.C., Cotman, C.W. (1988). Two classes of N-methyl-D-aspartate recognition sites: differential distribution and differential regulation by glycine. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **85**:9836-40.

Nakamura, Y., Hashinmoto, R., Kashiwagi, Y., Aimoto, S., Fukusho, E., Matsumoto, N., Kudo, T., Takeda, M. (2000). Major phosphorylation site (Ser55) of neurofilament L by cyclic AMP-dependent protein kinase in rat primary neuronal culture. **J. Neurochem.** **74**:949–59.

Nakanishi, S. (1994). Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. **Neuron** **13**:1031-7.

Nestler, E.J., Greengard, P. Serine and threonine phosphorylation. (1999). In: **Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspects**. Siegel, G., Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Fisher, S.K., Ulmer, M.D. (eds) 6ed. New York: Lippincott-Raven Publishers, pp. 471-95.

Nicoletti, F., Bruno, V., Catania, M.V., Battaglia, G., Copani, A., Barbagallo, G., Cena, V., Sanchez-Prieto, J., Spano, P.F., Pizzi, M. (1999). Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. **Neuropharmacology** **38**:1477-84.

Nixon, R.A., Shea, T.B. (1992). Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. **Cell Motil Cytoskeleton** **22**:81-91.

Nixon, R.A., Sihag, R.K. (1991). Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. **Trends Neurosc.** **14**:501-6.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. **Ann. Rev. Biochem.** **69**:277-302.

O'Ferrall, E.K., Robertson, J., Mushynski, W.E. (2000). Inhibition of aberrant and constitutive phosphorylation of the high-molecular-mass neurofilament subunit by CEP-1347 (KT7515), an inhibitor of the stress-activated protein kinase signaling pathway. **J. Neurochem.** **75**:2359-67.

Oliveira-Loureiro, S., Pelaez, P.L., Heimfarth, L., Souza, D.O., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R. (2005). Propionic and methylmalonic acids increase cAMP levels in slices of cortex cerebral of young rats via adrenergic and glutamatergic mechanisms. **BBA - Mol. Basis Dis.** *in press*.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** **54**:581-618.

Pant, A.C., Veeranna, Pant, H.C., Amin, N. (1997). Phosphorylation of human high molecular weight neurofilament protein (hNF-H) by neuronal cyclin-dependent kinase 5 (cdk5). **Brain Res.** **765**:259–66.

Pant, H.C. (1988). Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. **Biochem. J.** **256**:665-8.

Pant, H.C., Krinks, M.H., Klee, C.B., Pant, H.C., Gainer, H. (1988) Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. Identification and quantification of calcium-binding proteins in squid axoplasm. **Biochem. J.** **256**:2172-82.

Pin, J.P., Duvoisin, R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology** **34**:1-26.

Rieder, B.M., Pellier, V., Antonsson, B., Di Paolo, G., Stimpson, S.A., Lütjens, R., Catsicas, S., Grenningloh, G. (1997). Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG 10. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94**:741-5.

Rodnight, R., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S.T., Leal, R. (1997). Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Braz. Med. Biol. Res.** **30**:325-38.

Rosenberg, P.A., Amin, S., Leitner, M. (1992). Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. **J. Neurosci.** **12**:56-61.

Sánchez, I., Hassinger, L., Sihag, R.K., Cleveland, D.W., Mohan, P., Nixon, R.A. (2000). Local control of neurofilament accumulation during radial growth of

myelinating axons *in vivo*: selective role of site-specific phosphorylation. **J. Cell Biol.** **151**:1013-24.

Saransaari, P., Oja, S.S. (2004). Metabotropic glutamate receptors modulate ischemia-induced GABA release in mouse hippocampal slices. **Neurochem. Res.** **29**:1511-18.

Schousboe, A. (1981). Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. **Int. Rev. Neurobiol.** **22**:1-45.

Schulze, E., Asai, D.J., Bulinski, J.C., Kirschner, M. (1987). Post-translational modification and microtubule stability. **J. Cell Biol.** **105**:2167-77.

Shea, T.B., Dahl, D.C., Nixon, R.A., Fisher, I. (1997). Triton-soluble phosphovariants of the heavy neurofilament subunit in developing and mature mouse central nervous system. **J. Neurosci. Res.** **48**:515-23.

Sihag, R.K., Nixon, R.A. (1989). *In vivo* phosphorylation of distinct domains of the 70-kilodalton neurofilament subunit involves different protein kinases. **J. Biol. Chem.** **264**:457-64.

Sihag, R.K., Nixon, R.A. (1991). Identification of Ser-55 as a major protein kinase A phosphorylation site on the 70-kDa subunit of neurofilaments. Early turnover during axonal transport. **J. Biol. Chem.** **266**:18861-7.

Sihag, R.K., Nixon, R.A. (1999). Phosphorylation of the amino terminal head domain of the middle molecular mass 145kDa subunit of neurofilaments. **J. Biol. Chem.** **274**:4166-71.

Small, J.V., Rottner, K., Kaverna, I. (1999) Functional design in the actin cytoskeleton. **Curr. Opin. in Cell Biol.** **11**:54-60.

Traverse, S., Gomez, N., Paterson, H., Marshall, C., Cohen, P. (1992). Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. **Biochem. J.** **288**:351–5.

Vale, R.D., Schnmapp, B.J., Mitehison, T., Steven, E., Ruse, T.S., Sheetz, M.P. (1985). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules *in vitro*. **Cell** **43**:623-32.

Viana, G.S.B. (1999). Doenças Neurodegenerativas. In: **Neurobiologia das doenças mentais**. Graef, F.G., Brandão, M.L. (eds) 5ed. São Paulo: Lemos, pp. 223-50.

Wajner, M., Vargas, C.R., Burin, M., Giugliani, R., Coelho, J.C. (2001). Investigação de erros inatos do metabolismo. **Revista HCPA.** **3**:343-60.

Wallas, S.T., Greengard, P. (1991). Protein phosphorylation and neuronal function. **Pharmacol. Rev.** **43**:299-349.

Waxham, M.N. (1999). Neurotransmitter Receptors. In: **Fundamental Neuroscience**. Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. (eds) San Diego: Academic Press, pp. 235-67.

Wofchuk, S.T., Rodnight, R. (1994). Glutamate stimulates the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of immature hippocampus via a metabotropic receptor. **Neurochem. Int.** **24**:517-23.