

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**

**BIOQUÍMICA**

**EFEITOS DA HIPERAMONEMIA SOBRE A HOMEOSTASE DO  
CITOESQUELETO EM CÉLULAS NEURAIS DE RATOS JOVENS**

**Rônan Vivian Carvalho**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Regina Pessoa Pureur

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a  
obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

**Porto Alegre, julho de 2015.**

## CIP - Catalogação na Publicação

Vivian Carvalho, Rônan

Efeitos da hiperamonemia sobre a homeostase do citoesqueleto em células neurais de ratos jovens / Rônan Vivian Carvalho. -- 2015.

88 f.

Orientadora: Regina Pessoa Pureur.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Hiperamonemia. 2. Citoesqueleto. 3. Filamentos intermediários. 4. Fosforilação. I. Pessoa Pureur, Regina, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“O aprender é uma metáfora de  
conspirações do universo”.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Juarez e Lionete companheiros fiéis que sempre se dedicaram para que eu tivesse a oportunidade de estudar pelo incentivo, apoio, compreensão, e pelo imenso amor e carinho o tempo todo. Dedico esta dissertação a vocês.

Ao meu irmão Bruno um grande amigo por todos os momentos de diversão, apoio e compreensão.

A Regui, por todos os ensinamentos, pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, pela orientação e ajuda no crescimento dos meus conhecimentos científicos. Por, além de ser uma grande professora, ser amiga e tratar todos os seus orientandos com muito respeito e carinho, serei sempre grato.

A Luana, Paula, Karina, Fernanda, Bárbara e a Natália por terem me recebido no laboratório 31 muito bem. A Fernanda pela grande ajuda neste trabalho. Obrigado a todas vocês pelos ensinamentos sobre a fosforilação de proteínas, a dinâmica do laboratório, a bioquímica, pelos momentos compartilhados e pela amizade.

Ao lab. 31M, da professora Marina, que divide o laboratório conosco.

A minha turma de formandos da Faculdade de Farmácia.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial, a Verlaine nos ajudando na manutenção do laboratório e aos funcionários do biotério sempre prestativos as solicitações de animais.

Ao CNPQ, por fazer possível a pesquisa e a formação de cientistas neste país.

A Deus por tudo.

# Índice

<b>PARTE I</b>	<b>1</b>
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
1.1.    AMÔNIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	6
1.2.    HIPERAMONEMIA	8
1.2.1.    MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERAMONEMIA	10
1.2.2.    MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE DA AMÔNIA	12
1.3.    CITOESQUELETO	14
1.3.1.    FILAMENTOS DE ACTINA	15
1.3.2.    MICROTÚBULOS	16
1.3.3.    FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS	16
1.4.    FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SNC	22
1.4.1.    FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO	24
<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
2.1.    OBJETIVO GERAL	25
2.2.    OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<b>PARTE II - CAPÍTULO I</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
	V

<b>3.1.</b>	<b>ANIMAIS</b>	<b>28</b>
<b>3.2.</b>	<b>SUBSTÂNCIAS RADIOATIVAS E REAGENTES</b>	<b>28</b>
<b>3.3.</b>	<b>MODELOS DE HIPERAMONEMIA AGUDA</b>	<b>29</b>
3.3.1.	MODELO 1 – <i>IN VIVO</i>	29
3.3.2.	MODELO 2 – <i>IN VITRO</i>	29
<b>3.4.</b>	<b>PREPARAÇÃO E MARCAÇÃO DAS FATIAS DE TECIDO CEREBRAL</b>	<b>29</b>
3.4.1.	PRÉ-INCUBAÇÃO	29
3.4.2.	INCUBAÇÃO	30
3.4.3.	FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA ENRIQUECIDA EM FIs	30
<b>3.5.</b>	<b>DOSAGEM DE PROTEÍNAS</b>	<b>31</b>
<b>3.6.</b>	<b>ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)</b>	<b>31</b>
3.6.1.	QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DOS FIs	32
<b>3.7.</b>	<b>INTEGRIDADE CELULAR</b>	<b>32</b>
<b>3.8.</b>	<b>VIABILIDADE CELULAR</b>	<b>32</b>
<b>3.9.</b>	<b>PREPARAÇÃO DE HOMOGEINIZADO TOTAL DE PROTEÍNAS</b>	<b>33</b>
3.9.1.	ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i>	33
<b>3.10.</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>34</b>
<b>PARTE II - CAPÍTULO II</b>		<b>35</b>
<b>RESULTADOS</b>		<b>36</b>
<b>4.1.</b>	<b>MODELO 1 – <i>IN VIVO</i></b>	<b>36</b>
4.1.1.	TRATAMENTO AGUDO COM ACETATO DE AMÔNIO E O SISTEMA FOSFORILANTE ASSOCIADO AO CITOESQUELETO EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS	36

4.1.2.	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE INTEGRIDADE E VIABILIDADE CELULAR <i>IN VIVO</i>	38
<b>4.2.</b>	<b>MODELO 2 – <i>IN VITRO</i></b>	<b>39</b>
4.2.1.	TRATAMENTO COM NH <sub>4</sub> Cl E O SISTEMA FOSFORILANTE DOS FIs EM FATIAS DE CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS	39
4.2.2.	IMUNOCONTEÚDO DOS FIs HIPOFOSFORILADOS EM FATIAS DE CÓRTEX DE ANIMAIS DE 21 DIAS	41
4.2.3.	PARTICIPAÇÃO DAS SERINA/TREONINA FOSFATASES SOBRE A HIPOFOSFORILAÇÃO CAUSADA PELO NH <sub>4</sub> Cl	43
4.2.4.	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA E DE CANAIS DE Ca <sup>2+</sup> DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VDCC) SOBRE A HIPOFOSFORILAÇÃO CAUSADA PELO NH <sub>4</sub> Cl	44
4.2.5.	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE INTEGRIDADE E VIABILIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	46
	<b>PARTE III</b>	<b>48</b>
	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>5.1.</b>	<b>MODELO 1 – <i>IN VIVO</i></b>	<b>51</b>
5.1.1.	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DO ACETATO DE AMÔNIO SOBRE O CITOESQUELETO DE RATOS JOVENS	51
<b>5.2.</b>	<b>MODELO 2 – <i>IN VITRO</i></b>	<b>54</b>
5.2.1.	EFEITOS DO NH <sub>4</sub> Cl SOBRE O CITOESQUELETO DE FATIAS DE TECIDO CEREBRAL DE RATOS JOVENS	54
5.2.2.	A HIPOFOSFORILAÇÃO DOS FIs ASTROCITÁRIOS É MEDIADA PELA PP1 E PELA PP2B (CALCINEURINA)	58
5.2.3.	A HIPOFOSFORILAÇÃO DOS FIs ASTROCITÁRIOS É MEDIADA POR RECEPTORES NMDA	59

<b>5.3. GLUTAMATO PODERIA SER O RESPONSÁVEL POR RETOMAR OS NÍVEIS NORMAIS DE FOSFORILAÇÃO DO CITOESQUELETO <i>IN VIVO</i> APÓS HIPERAMONEMIA AGUDA?</b>	<b>62</b>
<b>RESUMO DOS RESULTADOS</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>68</b>



## **PARTE I**

## RESUMO

Uma elevação da concentração de amônia no sangue é tóxica e pode levar a convulsões, coma e morte. A suscetibilidade do cérebro em desenvolvimento a alterações neurológicas é maior do que no adulto. O citoesqueleto e, em particular, os filamentos intermediários (FIs) são um alvo de neurotoxinas e metabólitos tóxicos. No SNC temos os FIs neuronais, representados pelos neurofilamentos de alto, médio e baixo peso molecular (NF-H, NF-M, NF-L), e os astrocitários, proteína glial fibrilar ácida e vimentina (GFAP e VIM), entre outros. A fosforilação é uma modificação pós-traducional bem descrita como um dos principais mecanismos de regulação da dinâmica dos FIs. No presente trabalho, estudamos os efeitos de concentrações tóxicas de amônia sobre o citoesqueleto, com ênfase na homeostase do sistema fosforilante direcionado para os FIs e alguns mecanismos moleculares envolvidos nesses efeitos. Para tanto, utilizamos dois modelos experimentais de hiperamonemia aguda em animais de 10 e 21 dias de idade: *in vivo* e *in vitro*. No modelo *in vivo*, os animais foram injetados intraperitonealmente com acetato de amônio (7 mmol/Kg) e o nível de fosforilação das proteínas do citoesqueleto foi analisado no córtex cerebral e no hipocampo. No modelo *in vitro*, fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos nas mesmas idades foram incubadas com diferentes concentrações de NH<sub>4</sub>Cl. Nos dois modelos experimentais utilizados as alterações no sistema fosforilante foram dependentes da idade e da estrutura cerebral. A injeção de acetato de amônio não alterou o nível de fosforilação dos FIs no córtex cerebral de ratos de 10 dias, 30 e 60 min após a injeção. No entanto, observamos hipofosforilação dos FIs astrocitários (GFAP e VIM) e neuronais (NF-L, NF-M e NF-H) 30 min após a injeção, sendo que esse efeito foi revertido 60 min após a injeção. O sistema fosforilante associado aos FIs das células neurais de hipocampo não foi alterado com relação aos controles nas duas idades e nos dois tempos estudados. No modelo *in vitro* a resposta ao NH<sub>4</sub>Cl foi estrutura-dependente e dose-dependente para as concentrações de 0,5, 1 e 5 mM. Fatias de hipocampo de ratos de 10 dias de idade apresentaram hipofosforilação de GFAP, VIM e NFL em resposta à incubação com 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl, sem alteração na homeostase do citoesqueleto nas células neurais de córtex cerebral. Por outro lado, fatias de córtex cerebral de ratos de 21 dias de idade apresentaram hipofosforilação dos FIs astrocitários (GFAP e VIM) sem alteração no sistema fosforilante direcionado aos FIs de hipocampo. A hipofosforilação em resposta a sinais celulares está frequentemente associada à ativação de proteínas fosfatases. Portanto, em uma tentativa de estudar as vias de sinalização buscamos identificar as fosfatases envolvidas no efeito do NH<sub>4</sub>Cl, utilizando fatias de córtex cerebral. As proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2B (PP2B) foram ativadas em resposta a 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl aos 30 min e esse evento envolveu alterações nos níveis intra e extracelulares de Ca<sup>2+</sup> via ativação do sistema glutamatérgico por receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). O conjunto dos nossos dados evidenciam a neurotoxicidade da amônia por meio de um desequilíbrio no sistema fosforilante direcionado para os FIs tanto neuronais quanto astrocitários e de uma desregulação nos mecanismos de sinalização celular envolvidos na homeostase do citoesqueleto de astrócitos. Essas alterações podem ser parte integrante dos danos neurológicos associados à hiperamonemia aguda, principalmente no cérebro em desenvolvimento, como retardo mental e paralisia cerebral. Acreditamos que esses resultados são relevantes para a compreensão das bases moleculares envolvidas com a toxicidade da amônia no SNC.

## ABSTRACT

High ammonia levels in the blood are toxic to brain and can lead to seizures, coma and death. The susceptibility of the developing brain to neurological abnormalities is greater than in adults. The cytoskeleton and, in particular, the intermediate filaments (IFs) are a target of neurotoxins and toxic metabolites. The intermediate filaments (IFs) in the CNS are mainly represented by neurofilaments of high, medium and light molecular weight (NF-H, NF-M, NF-L) in neurons, glial fibrillary acidic protein and vimentin (GFAP and VIM), in astrocytes. Phosphorylation is a post-translational modification described as one of the major mechanisms regulating the dynamics of IFs. In the present work, we studied the effects of toxic concentrations of ammonia on the cytoskeleton, with emphasis in the homeostasis of the phosphorylating system directed to the IFs and we focused in some molecular mechanisms involved in these effects. For this, we use two experimental models of acute hyperammonemia in animals of 10 and 21 days of age: *in vivo* and *in vitro* models. In the *in vivo* model, animals were injected intraperitoneally with ammonium acetate (7 mmol/Kg) and the phosphorylation level of the cytoskeletal proteins was analyzed in the cerebral cortex and hippocampus. The injected acetate did not alter the phosphorylation level of IFs in the cerebral cortex of 10 day-old rats, 30 and 60 min after injection. However, we noted hypophosphorylation of the astrocytic (GFAP and VIM) as well as neuronal IFs (NF-L, NF-M and NF-H) 30 min after injection, and this effect was reversed 60 min after injection. The phosphorylating system associated with IFs of neural cells of the hippocampus was not altered as compared with controls at both ages and in the two studied times. In the *in vitro* model, the response to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was structure-dependent and dose-dependent at the concentrations of 0.5, 1 and 5 mM. Hippocampal slices of 10-day-old rats showed hypophosphorylation of GFAP VIM and NFL in response to incubation with 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and unaltered homeostasis of the phosphorylating system directed to the cytoskeleton in the neural cells of the cerebral cortex. On the other hand, slices of cerebral cortex of 21-day-old rats showed hypophosphorylation of astrocytic IFs (GFAP and VIM) without altering the phosphorylating system directed to hippocampal IFs. The hypophosphorylation in response to cellular signals is often associated with activation of protein phosphatases. Therefore, in an attempt to study the signaling pathways we seek identify phosphatases involved in the effect of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , using cerebral cortex slices. The protein phosphatases 1 (PP1) and 2B (PP2B) were activated in response to 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  30 min after injection and this event was associated with in intra and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels via activation of glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Taken together, our data show that the neurotoxicity of ammonia is directed to the phosphorylating imbalance of both neuronal as astrocytic IFs through disruption of the homeostasis of the NMDA-mediated signaling mechanisms of cortical astrocytes of 21-day-old rats. These changes may be part of the neurological damage associated with acute hyperammonemia, in the developing brain, as mental retardation and cerebral palsy. We believe that these results are relevant for understanding the molecular basis involved in the toxicity of ammonia in the CNS.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ATP	Adenosina trifosfato
BAPTA-AM	1,2-bis (2-aminofenoxi)etano – N, N, N', N' - ácido tetraacético – acetoximetil éster
EAAT2	Transportador de aminoácido excitatório tipo 2
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
FIs	Filamentos intermediários
FK-506	Tacrolimus
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetase
GTP	Guanosina trifosfato
HE	Encefalopatia hepática
LDH	Lactato desidrogenase
MAP	Proteína associada a microtúbulo
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MK-801	Maleato de hidrogênio
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
nAChR	Receptor neuronal nicotínico de acetilcolina

NCX	Transportador de sódio/cálcio
NF-H	Neurofilamento de alto peso molecular
NF-L	Neurofilamento de baixo peso molecular
NF-M	Neurofilamento de médio peso molecular
NFs	Neurofilamentos
NKCC	Cotransportador de sódio-potássio-cloro
NMDA	N-metil-D-aspartato
OTC	Ornitina carbamoiltransferase
P2X1	Receptor purinérgico P2 ionotrópico (P2X) subtipo 1
P2X2	Receptor purinérgico P2 ionotrópico (P2X) subtipo 2
PAG	Glutaminase ativada por fosfato
PKC	Proteína cinase C
PP1	Proteína fosfatase 1
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PP2B	Proteína fosfatase 2B (calcineurina)
SNC	Sistema nervoso central
UCDs	Desordens do ciclo da ureia
VIM	Vimentina

# INTRODUÇÃO

---

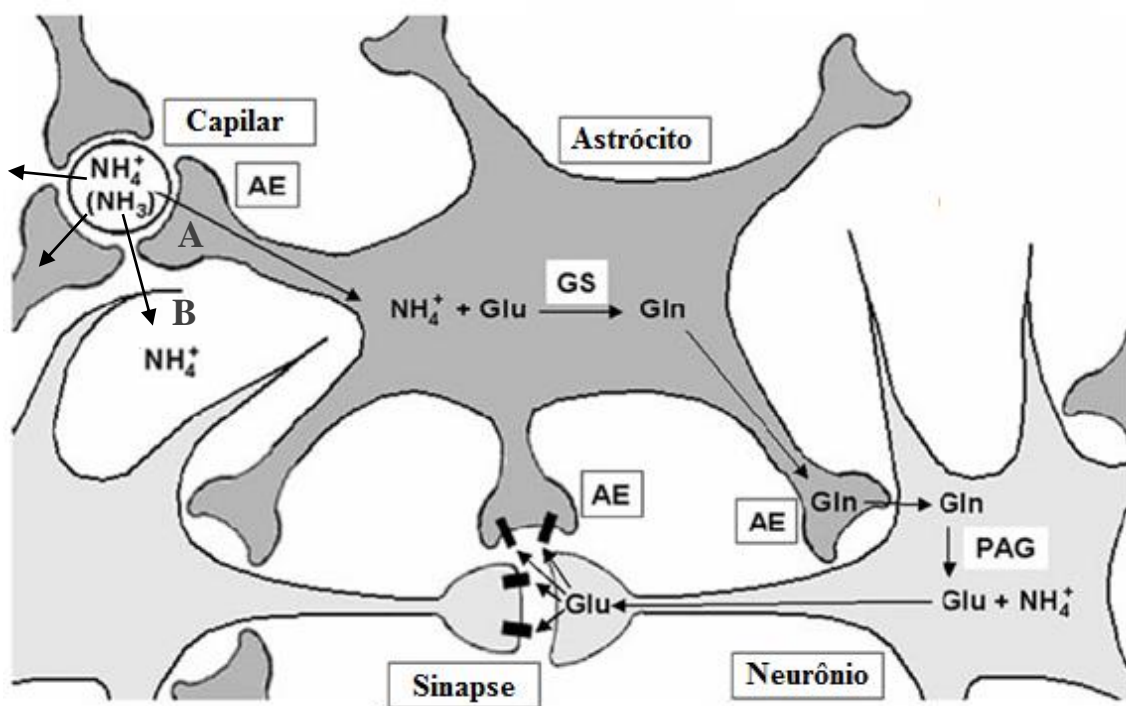
## 1.1. AMÔNIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A amônia ( $\text{NH}_3$ ) é uma pequena molécula que em solução aquosa está em equilíbrio com o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). O equilíbrio depende do pH. O pKa da reação a  $37^\circ\text{C}$  é 9,15. Em condições fisiológicas, portanto, está presente principalmente (aproximadamente 98%) como  $\text{NH}_4^+$  (Felipo, 2009). Principalmente por convenção o termo “amônia” é utilizado neste trabalho para se referir ao equilíbrio  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ .

As concentrações de amônia no fluido cérebro-espinhal encontradas em humanos, conforme revisão de Marcaggi e Coles (2001) são de 0,023 mM (Bromberg et al., 1960), 0,013 mM (Caesar, 1962), e 0,016 mM (Ferraro e Hare 1984). Em estudos mais recentes, em uma população de 23 pacientes neurológicos que não sofrem de doenças do fígado os valores de referência de amônia variaram de 0,008 a 0,026 mM, com uma média de 0,018 mM (Huizenga et al., 1998). Já em ratos, segundo Cooper (2013), os valores normais de amônia no cérebro estão em torno de 0,18 mM (corrigidos para o teor de água de 80%) e valores acima de 2 mM, frequentemente usados em experimentos *in vitro* podem, portanto, serem suprafisiológicos. Segundo Felipo (2009) em experimentos de intoxicação aguda com altas doses de amônia os níveis não alcançam mais do que 3-5 mM.

O principal mecanismo para manter a concentração de amônia no sangue e conseqüentemente no cérebro em níveis baixos é a detoxificação por incorporação na ureia, que é eliminada na urina, esse processo é realizado exclusivamente no fígado. Nos humanos a amônia é produzida pelo metabolismo de aminoácidos e bactérias intestinais urease-positivas (Braissant et al., 2012). Uma das mais importantes vias de produção no cérebro é a glutamato desidrogenase, a qual catalisa a desaminação

oxidativa reversível do glutamato. Foi proposto que tanto em condições normais como hiperamonêmicas, a glutamato desidrogenase é produtora de amônia, particularmente, em astrócitos, fornecendo uma via para a remoção do excesso de nitrogênio do catabolismo de certos aminoácidos (Cooper e Plum, 1987). Embora o cérebro não possa converter a amônia à ureia, ela é mantida em níveis baixos no sistema nervoso central (SNC) pela glutamina sintetase, enzima presente em astrócitos (Felipo e Butterworth, 2002, Cagnon e Braissant, 2007). O principal mecanismo para detoxificação da amônia no cérebro é a reação com glutamato para formar glutamina (Kosenko et al., 2003). A glutamina sintetase dos astrócitos capta amônia para formar glutamina, a qual é transportada aos neurônios, onde a glutamina é desaminada pela glutaminase, formando glutamato (Figura 1). Nos neurônios GABAérgicos o glutamato pode ser convertido ao ácido gama-aminobutírico (GABA), um importante neurotransmissor inibitório do SNC, através da descarboxilase do ácido glutâmico (Bak et al., 2006). Em condições normais o cérebro é um tecido significativamente importante na utilização e detoxificação da amônia (Lockwood et al., 1979).



**Figura 1.** Entrada e metabolismo da amônia no SNC. As extremidades dos astrócitos (AE) englobam os capilares cerebrais – formando a barreira hemato-encefálica - em um terminal e corpos neuronais e sinapses na outra extremidade formam uma zona de transmissão para metabólitos, e uma zona tampão, entre o leito vascular cerebral e os neurônios. Em pH fisiológico cerca de 2% da amônia no sangue está na forma de  $\text{NH}_3$ , que rapidamente entra no cérebro, tanto nos processos astrocíticos perivasculares (A) quanto no espaço extracelular (B). Nos astrócitos a amônia pode ser neutralizada no corpo celular pela reação da glutamina sintetase (GS), convertendo glutamato (Glu) em glutamina (Gln). A glutamina é, então, transferida para os neurônios e degradada pela glutaminase ativada por fosfato (PAG) a glutamato e amônia. Uma porção do glutamato alimenta o *pool* de neurotransmissores, sendo liberada para a fenda sináptica e interage com receptores (retângulos preenchidos) localizados nas sinapses e em astrócitos. Adaptado de Albrecht (2007) e Eid e Lee (2013).

## 1.2. HIPERAMONEMIA

Uma elevação da concentração de amônia na circulação sanguínea é denominada hiperamonemia sendo tóxica e levando a distúrbios funcionais no SNC podendo conduzir ao coma e morte (Felipo, 2009). A amônia tem efeitos potencialmente prejudiciais para o SNC e o cérebro em desenvolvimento (Tuchman et al., 2008b) que é mais suscetível à hiperamonemia aguda ou crônica, quando comparado ao cérebro de adultos (Felipo e Butterworth, 2002). Dependendo da severidade e duração da exposição, esses efeitos podem incluir convulsões, déficits cognitivos levando ao coma e no caso do cérebro em desenvolvimento ao retardo mental e paralisia cerebral (Gropman et al., 2007, Enns, 2008, Braissant, 2010). Estudos neuropatológicos em síndromes hiperamonêmicas revelam, predominantemente, alterações astrocíticas consistindo de inchamento celular no caso da hiperamonemia aguda e astrocitose compatível com Alzheimer tipo II, na hiperamonemia crônica. O cérebro exposto a altas concentrações de amônia apresenta a expressão alterada de várias proteínas astrocitárias, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), o transportador de aminoácido excitatório tipo 2 (EAAT-2), alguns tipos de receptores benzodiazepínicos e aquaporina IV (Felipo e Butterworth, 2002).



Na hiperamonemia experimental as concentrações de amônia no sangue situam-se na faixa de 0,1 a 0,3 mM (Mans et al., 1994, Rose et al., 1998). Contudo, concentrações de amônia no cérebro da ordem de 1 a 5 mM foram descritas no estágio de coma devido à encefalopatia em animais com insuficiência hepática aguda (Swain et al., 1992).

A situação mais comum em que hiperamonemia pode conduzir à alteração da função cerebral é a doença hepática (principalmente, cirrose do fígado). Como a alteração da função cerebral e as alterações neurológicas associadas a essa situação são consequência de uma falência hepática anterior ela é chamada de encefalopatia hepática (HE). Essa é uma síndrome complexa que abrange uma ampla gama de distúrbios neuropsiquiátricos que vão desde alterações mínimas na personalidade ou alterações no ritmo circadiano (ciclo sono-vigília) até alterações na função intelectual, personalidade, consciência e coordenação motora (Felipo, 2009). Na ausência de edema cerebral irreversível, sintomas da HE em adultos são largamente reversíveis quando a amônia retorna a níveis normais (Flint Beal e Martin, 1998, Braissant et al., 2012).

Em crianças, a hiperamonemia pode ser causada por desordens inerentes ou adquiridas sendo que a mais frequente causa de hiperamonemia em crianças está relacionada com desordens do ciclo da ureia (UCDs) (Cagnon e Braissant, 2007), a qual tem uma prevalência total estimada de 1:8200 nos Estados Unidos (Gropman e Batshaw, 2004). Ressalta-se que a hiperamonemia pode provocar danos irreversíveis ao SNC em desenvolvimento levando à atrofia cortical, dilatação ventricular e desmielinização, responsáveis pelo dano cognitivo, convulsões e paralisia cerebral (Braissant et al., 2012). A extensão do dano depende do estágio de maturação e da magnitude e duração da exposição à amônia. O dano pode ser irreversível em caso de hiperamonemia prolongada ou quando os níveis sanguíneos elevam-se entre 0,2 e 0,5

mM durante os dois primeiros anos de vida (Msall et al., 1984, Uchino et al., 1998, Bachmann, 2003, Enns, 2008).

A hiperamonemia aguda em UCDs pode ser precipitada por qualquer fator que afete o balanço metabólico - incluindo a dieta - e aumente o próprio catabolismo de proteínas devido à excessiva restrição dietética ou infecção. Infecção intercorrente é a mais comum precipitante de hiperamonemia aguda em UCDs, sendo responsável por 34% dos episódios, com os vírus respiratórios sendo uma das principais causas (Summar et al., 2008, Tuchman et al., 2008a, Mc Guire et al., 2013). Até o momento, os mecanismos que levam a esses danos cerebrais não estão suficientemente esclarecidos (Cagnon e Braissant, 2007).

Apesar dos inúmeros trabalhos mostrando as consequências metabólicas de concentrações elevadas de amônia no cérebro, bem menos se sabe sobre os efeitos da hiperamonemia sobre a homeostase do citoesqueleto em células neurais. Nesse contexto, Felipo et al.,(1993) descreveu o aumento da interação de microtúbulos com a proteína associada a microtúbulo (MAP) 2 em ratos hiperamonêmicos. A fosforilação *in vitro* usando homogenatos cerebrais mostrou diminuição da fosforilação da MAP2, mediada pela proteína cinase C (PKC). Ainda, ratos tornados hiperamonêmicos pela ingestão de dieta contendo acetato de amônio apresentaram aumento de polimerização da tubulina, sugerindo um desequilíbrio na homeostase dos microtúbulos em resposta à amônia (Felipo et al., 1990).

### **1.2.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERAMONEMIA**

Ratos *sparse-full* (spf) constituem um importante modelo animal para estudar os efeitos da hiperamonemia hereditária. Esses animais possuem um único ponto de substituição no gene da ornitina carbamoiltransferase (OTC; EC 2.1.3.3.), com uma transmissão ligada ao cromossomo X. Dois modelos têm sido descritos: *sparse full* (spf)

e *sparse full* com pele e pêlo anormais (*spf<sup>ash</sup>*) (DeMars et al., 1976, Qureshi et al., 1979, Veres et al., 1987, Cagnon e Braissant, 2007). O modelo *spf* é ideal para estudar os efeitos neurotóxicos da amônia em síndromes hiperamonêmicas crônicas (Ratnakumari et al., 1992, Qureshi e Rao, 1997).

Efeitos em longo prazo da hiperamonemia crônica têm sido estudados na hiperamonemia congênita com a alimentação de ratas grávidas com acetato de amônio até o desmame (dia 21 pós-natal) seguindo com uma dieta contendo altas doses de amônia nos filhotes (Aguilar et al., 2000). Exceto para a OTC todas as outras UCDs são inerentes em um padrão autossômico recessivo existindo modelos animais para cada um dos distúrbios do ciclo da ureia (com a exceção da deficiência da N-acetilglutamato sintetase), e para quase todos eles os seus fenótipos clínicos e bioquímicos assemelham-se aos fenótipos observados em pacientes humanos (Deignan et al., 2008).

Adicionalmente, a hiperamonemia aguda têm sido estudada em vários modelos em que hiperamonemia está presente ou pode ser provocada utilizando cultura de células e ou animais com o intuito de compreender os mecanismos fisiopatológicos da disfunção neuronal (Murthy et al., 2001, Bélanger et al., 2002, Bjerring et al., 2015). *In vitro*, os efeitos tóxicos da amônia têm sido estudados em cultura de astrócitos (Schliess et al., 2002, Andersson et al., 2009) ou neurônios (Raabe, 1993, Rao et al., 2005) e em fatias cerebrais de ratos (Chepkova et al., 2012, Haack et al., 2014) com a adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; e *in vivo*, através da injeção intraperitoneal de acetato de amônio (Kosenko et al., 1997, Rangroo Thrane et al., 2013, Klose et al., 2014) ou infusão com urease (Robinson et al., 1992).

A contribuição da hiperamonemia nas alterações encontradas em HE pode ser estudada apenas usando modelos animais adequados que possam discernir quais efeitos são devidos à hiperamonemia e quais são devidos a outros fatores associados com

insuficiência hepática (Felipo, 2009). Holecek (2015) descreve os efeitos de diversas variáveis levando à encefalopatia. No entanto, até agora, poucos estudos foram realizados para estudar as alterações neurológicas em modelos de hiperamonemia “pura”. Os estudos realizados em modelos animais de insuficiência hepática (anastomose porto-cava, injeção de tioacetamida, etc) não permitem discernir quais efeitos são devidos à hiperamonemia ou à lesão hepática (Felipo, 2009).

### **1.2.2. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE DA AMÔNIA**

Segundo Felipo (2009), uma complicação grave em insuficiência hepática aguda é o edema cerebral. Watson et al.,(1985) e Brusilow e Traystman (1986) propuseram o papel potencial da glutamina no mecanismo do edema cerebral em HE/hiperamonemia. A glutamina acumulando-se pode atuar como um osmólito causando aumento na pressão osmótica nos astrócitos que resulta em seu inchamento (Brusilow et al., 2010).

Estudos mais recentes, porém, tem questionado a hipótese glutamina-osmólito. Em ratos, com falência aguda no fígado, submetidos à leve hipotermia o edema cerebral é prevenido sem, entretanto, haver correlação com os níveis de glutamina (Chatauret et al., 2003). O edema se manifesta com um aumento do fluxo sanguíneo e consumo de oxigênio que pode ser diminuído com leve hipotermia, sem afetar as concentrações de glutamina (Cordoba et al., 1999). O efeito benéfico da hipotermia é mediado via mecanismos que reduzem a passagem de amônia na barreira hematoencefálica e a concentração de glutamato extracelular (Rose et al., 2000).

Outra hipótese é a do “Cavalo de Tróia” proposta por Albrecht e Norenberg (2006) sugerindo um importante papel tanto da glutamina quanto da amônia no desenvolvimento de inchaço dos astrócitos e edema cerebral. A glutamina sintetizada em excesso nos astrócitos é transportada para a mitocôndria onde é metabolizada pela PAG à amônia e glutamato. A glutamina “O Cavalo de Tróia”, portanto, carrega a

amônia para a mitocôndria, onde seu acúmulo leva ao estresse oxidativo e finalmente ao inchamento dos astrócitos (Scott et al., 2013).

O estresse oxidativo na intoxicação aguda por amônia foi prevenido por bloqueio de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Kosenko et al., 1999). A injeção de altas doses de amônia também pode levar à depleção de adenosina trifosfato (ATP) via receptores NMDA (Kosenko et al., 1994). Evidências experimentais sugerem uma inter-relação estreita entre o inchaço de astrócitos, a sinalização glutamatérgica através do receptor de NMDA, estresse oxidativo e acúmulo de óxido nítrico, contribuindo, assim, para os efeitos tóxicos da hiperamonemia (Trout et al., 1995, Häussinger e Schliess, 2005, Norenberg et al., 2005, Scott et al., 2013).

Diferentes regiões do cérebro expressam padrões diferentes de neurotransmissores e receptores, com expressão diferencial de subunidades que resultam em propriedades específicas e modulações nas diferentes áreas. Por conseguinte, ressalta-se que os resultados obtidos em uma área específica do cérebro não podem ser extrapolados para outras áreas ou para todo o cérebro (Llansola et al., 2013). Por exemplo, o tônus GABAérgico é aumentado em cerebelo de ratos com hiperamonemia crônica, mas é reduzido no córtex cerebral do mesmo animal (Cauli et al., 2009).

A hiperamonemia altera a transdução de sinais associada aos receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo NMDA no cerebelo (EIMlili et al., 2010) e metabotrópicos (mGluRs) na substância nigra (Cauli et al., 2006). Sabe-se que distúrbios na sinalização da célula funcionam com desencadeadores (*upstream*) de numerosos mecanismos (*downstream*) que regulam padrões de desenvolvimento ou morte celular no cérebro (Mielke e Herdegen, 2000, Stanciu et al., 2000). Por outro lado, inúmeros trabalhos realizados em nosso laboratório mostram que a homeostase do

citoesqueleto de células neurais é alterada em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas e neurotoxinas (Loureiro et al., 2010, Heimfarth et al., 2012b, Pierozan et al., 2012), através da modulação de vias de sinalização iniciadas em receptores glutamatérgicos, causando aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e ativação da proteína G trimérica. Esses sinais são transmitidos através da ativação de cascatas de cinases e fosfatases causando uma resposta celular ao dano.

### **1.3. CITOESQUELETO**

A conotação da palavra “esqueleto” sugere uma estrutura rígida, no entanto, o citoesqueleto não é uma estrutura fixa cuja função possa ser entendida de forma isolada. Pelo contrário, é uma estrutura extremamente complexa, dinâmica e adaptável cujos polímeros e proteínas reguladoras estão em constante fluxo (Fletcher e Mullins, 2010). Para as células funcionarem adequadamente elas devem organizar-se no espaço e interagir com seu ambiente externo. Elas devem adotar a morfologia mais adequada e mais robusta, bem como organizar-se internamente de maneira a poder exercer suas funções da maneira mais eficiente possível. Muitas células precisam mudar de forma e deslocar-se no meio para exercer suas funções. Todas as células devem ser capazes de rearranjar seus componentes internos na medida em que elas crescem, dividem e se adaptam a circunstâncias variáveis. As células eucarióticas desenvolveram todas essas funções espaciais e mecânicas em alto grau e elas dependem de um sistema muito complexo capaz de exercê-las. Esse sistema é o esqueleto celular, ou citoesqueleto (Alberts et al., 2002).

Três tipos de proteínas filamentosas compõem o citoesqueleto: microtúbulos ( $\emptyset$ : ~25 nm), microfilamentos ( $\emptyset$ : ~7 nm) e filamentos intermediários (FIs;  $\emptyset$ : ~10 nm) (Omary, 2009).

A estrutura do citoesqueleto é altamente dinâmica permitindo se organizar de forma rápida e adaptável em resposta a sinais, tanto fisiológicos como patológicos. Embora as subunidades proteicas constituintes das fibras do citoesqueleto pertençam às três famílias de filamentos descritas anteriormente, as funções do citoesqueleto são célula-específicas (Huber et al., 2013).

A importância da complexidade e da dinâmica do citoesqueleto para o funcionamento adequado da célula é crítica e isso se torna evidente quando consideramos que muitas doenças têm sido relacionadas a anormalidades do citoesqueleto e suas proteínas associadas. Essas doenças incluem síndromes cardiovasculares, neurodegeneração, câncer (invasão), cirrose do fígado, fibrose pulmonar, epidermólise bolhosa, entre outras (Ramaekers e Bosman, 2004).

### **1.3.1. FILAMENTOS DE ACTINA**

A actina monomérica é o principal componente dos filamentos de actina ou microfilamentos. Os filamentos de actina são responsáveis pelo movimento celular, contração muscular, citocinese, força mecânica e, mais especificamente no SNC, crescimento axonal e plasticidade sináptica (Braissant, 2007). Esses filamentos são curtos, flexíveis e altamente dinâmicos. Apesar de distribuírem-se por todo o citoplasma da célula, eles são mais concentrados no córtex celular, abaixo da membrana plasmática, onde funcionam como parte do sistema de transdução de sinal a partir da membrana plasmática. Os filamentos de actina não possuem importância fisiológica quando considerados isoladamente, mas eles são extremamente importantes coletivamente, isto é, formando grandes organizações que podem ser em feixes ou redes (Cooper, 2000b). Essas organizações só são possíveis graças à presença de elevadas concentrações de proteínas associadas que promovem a interação dos microfilamentos

entre si e com outras estruturas celulares regulando a sua dinâmica (Fletcher e Mullins, 2010).

### **1.3.2. MICROTÚBULOS**

Assim como os microfilamentos, os microtúbulos são estruturas polarizadas compostas de subunidades de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina formando protofilamentos lineares. Um único microtúbulo é composto de 10-15 protofilamentos que se associam lateralmente para formar um cilindro maior (Conde e Caceres, 2009). Os microtúbulos estão envolvidos na manutenção da forma celular, na mitose (formação de fibras do fuso) e no movimento intracelular de organelas ou vesículas (Braissant, 2007).

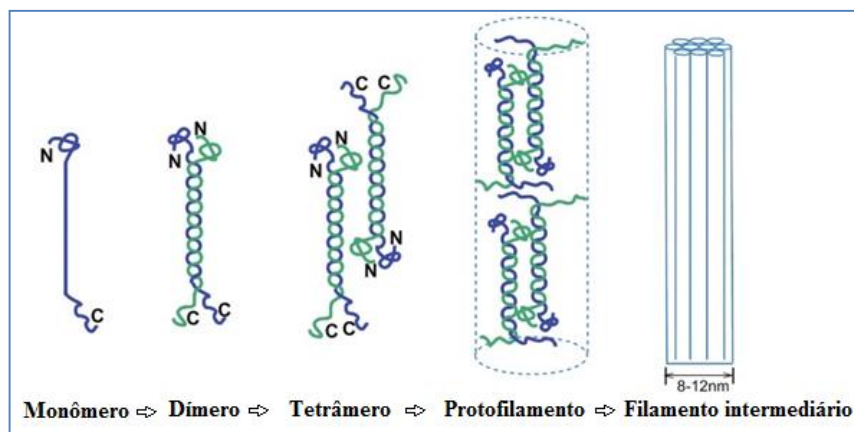
A tubulina tem atividade GTPásica e as moléculas de guanosina trifosfato (GTP) associadas com as moléculas de  $\beta$ -tubulina são hidrolisadas logo após a incorporação da  $\beta$ -tubulina no microtúbulo. A hidrólise do GTP altera a conformação das moléculas de tubulina e impulsiona o comportamento dinâmico dos microtúbulos (Horio e Murata, 2014). Muitos componentes estão envolvidos em sua regulação incluindo fatores promotores de associação de microtúbulos (MAPs), estabilizantes, desestabilizantes, proteínas de rompimento dos microtúbulos ou proteínas motoras da superfamília das dineínas e cinesinas (Conde e Caceres, 2009).

### **1.3.3. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS**

Enquanto os filamentos de actina e os microtúbulos são polímeros de um único tipo de proteína (actina ou tubulina, respectivamente), os FIs são compostos por uma variedade de proteínas (subunidades) (Cooper, 2000a) cujos padrões de expressão são célula e tecido específicos fornecendo a cada tipo celular uma relativa “impressão digital” das proteínas dos FIs (Helfand et al., 2004).



Estruturalmente, os FIs consistem em um dímero enrolado em espiral pela junção de dois monômeros formando, posteriormente, um tetrâmero (unidade de polimerização) via interação lateral e protofilamentos via contato cabeça-cauda (Figura 2). Projeções desordenadas nos domínios de filamentos maduros fornecem uma plataforma para melhor interação com proteínas acessórias e para a ocorrência de modificações pós-traducionais (Guharoy et al., 2013).



**Figura 2.** Organização estrutural dos FIs. Adaptado de Guharoy (2013).

Primeiramente, os FIs foram considerados integrantes mecânicos do espaço celular (Oshima, 2007). De fato, o papel dos FIs na proteção ao estresse mecânico ou não mecânico distingue essas estruturas dos outros elementos do citoesqueleto (Omary et al., 2006). Apesar da relevante habilidade dos FIs em fornecer resistência mecânica à célula e o fato de que a perda dessa função possa estar relacionada com doenças envolvendo a fragilidade celular (Fuchs e Cleveland, 1998, Omary et al., 2004, Herrmann et al., 2007, Omary, 2009), nos últimos anos as funções atribuídas aos FIs têm ampliado drasticamente (Oshima, 2007), pois os mesmos têm sido relacionados a uma variedade de eventos celulares (Coulombe e Wong, 2004, Kim e Coulombe, 2007, Snider e Omary, 2014).

Os FIs estão envolvidos na transdução de sinais interagindo com um grande número de proteínas. Estímulos extracelulares determinam sua reorganização, colapso e solubilização (Paramio e Jorcano, 2002) participando de processos de motilidade (Helfand et al., 2004), adesão e migração (Ivaska et al., 2007). Estão envolvidos em alterações de forma, função e distribuição modificando o comportamento celular (Fletcher e Mullins, 2010) em resposta a estímulos de estresse metabólico e mecânico, patógenos, toxinas, radiação, osmolaridade entre outros (Toivola et al., 2010). Os FIs têm papel importante na definição e manutenção do posicionamento de organelas (Toivola et al., 2005) e apresentam capacidade de agir como proteínas adaptadoras em vias de sinalização, além de estarem envolvidos no crescimento e regeneração celular (DePianto e Coulombe, 2004, Kim e Coulombe, 2007, Snider e Omary, 2014). Tem aumentado o número de trabalhos descrevendo alterações desses em resposta a danos e envolvimento em processos de reparo tecidual, câncer e outras doenças (DePianto e Coulombe, 2004, Izawa e Inagaki, 2006, Omary, 2009, Kidd et al., 2014).

Mais do que 50 diferentes proteínas pertencentes à grande família dos FIs têm sido identificadas e classificadas em seis grupos com base nas similaridades entre sequências de seus aminoácidos (Cooper, 2000a). Os tipos I-IV são encontrados no citoplasma, os tipos V no núcleo, e aqueles classificados como tipo VI são encontrados exclusivamente na retina – Tabela 1 (Omary, 2009).

**Tabela 1:** Filamentos intermediários, padrão de expressão e envolvimento em doenças humanas (Snider e Omary, 2014).

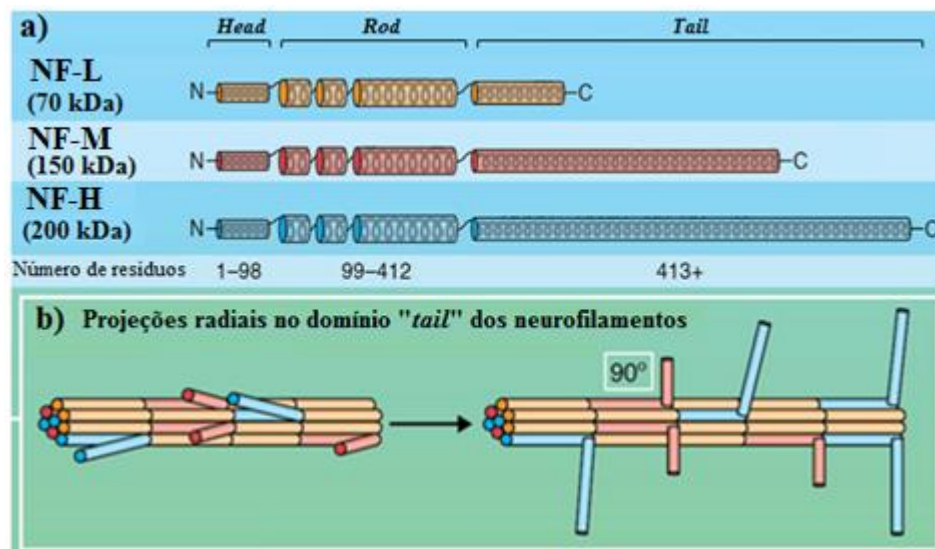
<b>Tipo celular</b>	<b>FI</b>	<b>Doença associada</b>
<b>Todas as células nucleadas (V)</b>	Lâmina (lâmina A, lâmina B e lâmina C).	Cardiomiopatia, distrofia muscular, lipodistrofia, leucodistrofia e síndrome progeróide (por exemplo, síndrome progéria Hutchinson-Gilford).
<b>Células epiteliais (I e II)</b> (Tipo I: *K9-K28, K31-K40) (Tipo II: K1-K8, K71-86)	Queratinas (cabelo, epidérmica e epitelial simples).	Fragilidade da pele (por exemplo, epidermólise bolhosa simples) e outras desordens da pele, desordens de cabelo e unha, distrofia corneana e predisposição a doenças do fígado.
<b>Células mesenquimais (III)</b>	Vimentina (VIM).	Catarata.
<b>Células gliais (III)</b>	GFAP.	Doença de Alexander.
<b>Neurônios (III e IV)</b>	Neurofilamentos (NFs), periferina e $\alpha$ -internexina.	Doença de Charcot-Marie-Tooth, predisposição a esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson.
<b>Miócitos (III e IV)</b>	Desmina, sinemina e sincoilina.	Miopatia e distrofia muscular.
<b>Desenvolvimento e regeneração de células (IV)</b>	Nestina.	Não relatado.
<b>Cristalino (VI ou órfão)</b>	Filensina e facinina.	Catarata.

\*K do termo em inglês “*keratin*”.

## NEUROFILAMENTOS

Os NFs são heteropolímeros formados por três diferentes subunidades (conforme a massa molecular em gel de poliacrilamida SDS): de baixo peso molecular (NF-L ~ 70 kDa), médio (NF-M ~ 150 kDa) e alto (NF-H ~ 200 kDa). Os NFs assim como outros FIs apresentam três subunidades: um domínio “*rod*” central altamente conservado, um domínio “*head*” amino-terminal, e um domínio “*tail*” carboxi-terminal (Figura 3a) (Nixon e Sihag, 1991, Yuan et al., 2012). Suas propriedades podem ser alteradas tanto

por mutação em seus genes ou por modificações pós-traducionais, particularmente a fosforilação (Braissant, 2007). O núcleo dos neurofilamentos é composto principalmente do domínio “rod”. A extensão dos domínios “tail” de NF-H e NF-M distingue esses NFs que quando fosforilados são creditados serem projetados radialmente do núcleo dos heteropolímeros formados por esses filamentos (Figura 3b) (Nixon e Sihag, 1991).



**Figura 3.** a) Estrutura dos NFs e seus domínios (note o número de resíduos de aminoácidos de cada domínio). b) Interação dos NFs: projeções radiais no domínio “tail” de NF-M (em vermelho) e NF-H (em azul) estão envolvidas em eventos celulares como a fosforilação. Adaptado de Yuan et al., (2012).

O acúmulo anormal de NFs tem sido observado em muitas doenças neurodegenerativas (Tabela 1). Alterações de expressão e fosforilação também estão sendo mostradas em doenças metabólicas afetando o SNC tanto durante o desenvolvimento como na idade adulta tais como encefalopatia hepática devido à hiperamonemia, acidemias propiônica e metilmalônica e neuropatia diabética (Braissant, 2007).

## PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA E VIMENTINA

Os astrócitos podem expressar três tipos de FIs: GFAP, VIM e nestina (Eliasson et al., 1999). Durante a maturação dos astrócitos há uma mudança na prevalência dessas proteínas (Middeldorp e Hol, 2011). A composição dos FIs de astrócitos altera-se durante o desenvolvimento. VIM e nestina são as principais proteínas dos FIs em células astrogliais imaturas, enquanto astrócitos maduros e adultos contém principalmente GFAP (uma proteína com massa molecular de aproximadamente 50 kDa) (Eliasson et al., 1999) podendo certos astrócitos coexpressarem GFAP e VIM no animal adulto (Lazarides, 1982, Middeldorp, 2010).

Devido a sua expressão específica em astrócitos, a GFAP é considerada marcador astrocitário e é importante na modulação da motilidade e forma celular por fornecer estabilidade estrutural a essas células. Esse FI é importante para a interação entre neurônios e astrócitos (McCall et al., 1996, Eliasson et al., 1999), participando do sofisticado sistema de comunicação intercelular, o qual pode regular a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Middeldorp e Hol, 2011).

A GFAP desempenha também uma importante função durante o dano astrocitário quando os astrócitos se tornam reativos, ou seja, sofrem modificação morfológica e funcional em resposta a várias doenças neurológicas, como neurotrauma, acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas. Os astrócitos reativos afetam tanto a progressão da doença como o processo de recuperação, mostrando a expressão alterada de muitos genes, sendo que a superexpressão de GFAP é comumente usada como marcador de astrócitos reativos (Hol e Pekny, 2015).

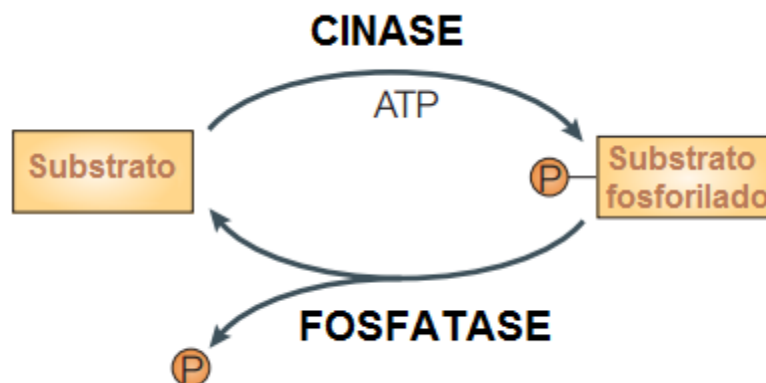
A VIM é uma proteína de 57 kDa (Satelli e Li, 2011) que tem sido demonstrada participar em um número de funções críticas frequentemente relacionadas a organização

de proteínas que estão envolvidas em adesão, migração e sinalização celular (Ivaska et al., 2007).

#### 1.4. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SNC

A fosforilação de proteínas é a modificação pós-traducional mais amplamente difundida e utilizada na transdução de sinais. Ela afeta processos celulares básicos, incluindo metabolismo, crescimento, divisão, diferenciação, motilidade, tráfego de organelas, aprendizado e memória, regulação do citoesqueleto entre outros (Ubersax e Ferrell Jr, 2007).

A fosforilação de proteínas é um processo dinâmico e reversível executado por proteínas cinases e fosfatases. Cinases adicionam a proteínas um grupo fosfato, geralmente, proveniente do ATP e as fosfatases o removem liberando fosfato inorgânico para o meio (Figura 4).



**Figura 4.** Proteínas são fosforiladas, adição de um grupo fosfato (P), por proteínas cinases e desfosforiladas por proteínas fosfatases em resposta a sinais celulares. Adaptado de Mustelin et al., (2005) e Ubersax e Ferrell Jr, (2007).

Em eucariotos, a fosforilação de proteínas tipicamente ocorre em três resíduos de aminoácidos: serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) (Sun e Wang, 2012). O genoma humano codifica aproximadamente 500 proteínas cinases, das quais ~400 são

Ser/Thr, e em torno de 200 proteínas fosfatases, porém dessas apenas ~40 Ser/Thr (Alonso et al., 2004, Moorhead et al., 2007). O número de tirosinas cinases e fosfatases é semelhante ~90 e 100, respectivamente, e as restantes apresentam dupla especificidade. A discordância entre o número de Ser/Thr fosfatases (~40) e Ser/Thr cinases (~400) eleva a uma interessante questão sobre a especificidade e regulação. A especificidade parece aumentar, principalmente, através da associação de domínios catalíticos de fosfatases com subunidades regulatórias particulares. As subunidades regulatórias fornecem uma miríade de oportunidades de regulação, embora nosso conhecimento de quando e como reações de desfosforilação são reguladas, geralmente, esteja muito aquém da nossa compreensão da regulação de cinases (Ubersax e Ferrell, 2007).

Uma vez que as propriedades de muitos componentes enzimáticos das vias de transdução de sinal são alteradas por fosforilação, a capacidade de resposta de uma célula a sinais extracelulares depende, em parte, do estado de fosforilação de suas proteínas. Em outras palavras, a célula mantém um registro de sua história recente codificado em seu padrão de fosforilação de proteínas. Assim, a fosforilação de uma proteína permite não só a transdução de sinais extracelulares em reações bioquímicas no interior das células, mas também a “computação” de vários sinais extracelulares e sua integração ao longo do tempo. Portanto, não é surpreendente que a maioria das proteínas cinases e fosfatases sejam altamente expressas em neurônios, que são células especializadas no processamento de informações (Girault, 1993).

### **1.4.1. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO**

A estrutura monomérica dos FIs consiste de um domínio central em alfa-hélice que é flanqueado por um domínio N-terminal não- $\alpha$ -hélice e um carbóxi-terminal semelhante aos NFs (figura 3) (Chang e Goldman, 2004). As modificações pós-traducionais ocorrem tanto no domínio N-terminal como no C-terminal. A fosforilação é a modificação pós-traducional mais estudada nos FIs devido a sua prevalência e implicação funcional (Omary et al., 2006, Sihag et al., 2007, Snider e Omary, 2014), embora outras modificações sejam prováveis de regular, ou serem reguladas por fosforilação (particularmente O-glicosilação com N-acetil-glucosamina que também ocorre em resíduos de serina/treonina (Ser/Thr)) (Omary et al., 2006, Snider e Omary, 2014).

O domínio central é desprovido de qualquer sítio de fosforilação caracterizado até hoje, provavelmente porque essa estrutura mascara o acesso a cinases (Omary et al., 2006). Numerosas propriedades celulares são reguladas pela fosforilação dos FIs, como a dinâmica de associação/desassociação e a interação com outros constituintes do citoesqueleto e estruturas celulares (Snider e Omary, 2014), por exemplo, a formação dos filamentos de GFAP pode ser influenciada pelas modificações pós-traducionais, isoformas da própria GFAP, mutações e por outras proteínas, tais como S100, anexina, VIM e  $\alpha$ -cristalina (Petzold, 2015).



# OBJETIVOS

---

## 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi utilizar modelos experimentais de hiperamonemia aguda para verificar a participação do citoesqueleto, em particular da homeostase do sistema fosforilante direcionado para os FIs, sobre os efeitos de concentrações tóxicas de amônia nas células neurais de córtex cerebral e hipocampo de ratos em desenvolvimento (animais de 10 e 21 dias de idade). Para tanto, utilizamos um modelo experimental de hiperamonemia *in vivo* (modelo 1), no qual os animais foram agudamente injetados com acetato de amônio e um modelo *in vitro* (modelo 2), no qual fatias de tecido foram incubadas com diferentes concentrações de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl).

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar os efeitos do acetato de amônio na fosforilação dos FIs (GFAP, VIM, NF-L, NF-M e NF-H) de células neurais de córtex cerebral e hipocampo em um modelo *in vivo* de hiperamonemia, com injeção intraperitoneal (IP) de acetato de amônio 7 mmol/Kg, utilizando ratos de 10 e 21 dias de idade.

b) Avaliar os efeitos do tratamento *in vitro* com cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) sobre a fosforilação dos FIs (GFAP, VIM, NF-L, NF-M e NF-H) de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 10 e 21 dias de idade.

c) Em uma tentativa de estudar as vias de sinalização pretendemos, utilizando o modelo *in vitro*, identificar as cinases ou fosfatases envolvidas nesse efeito em fatias de tecido cerebral.

d) Verificar a participação do sistema glutamatérgico e do  $\text{Ca}^{2+}$  intra e extracelular nos efeitos do  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , utilizando o modelo *in vitro*, sobre a homeostase dos FIs em fatias de tecido.

e) Analisar as alterações do imunoconteúdo no modelo *in vitro* dos FIs responsivos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*.

f) Avaliar a integridade e viabilidade celular das células neurais de córtex cerebral e hipocampo, tanto no tratamento *in vivo* como no *in vitro*, nas diferentes idades.

## **PARTE II - CAPÍTULO I**

# MATERIAIS E MÉTODOS

---

## 3.1. ANIMAIS

Ratos da linhagem Wistar de 10 e 21 dias de idade obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, foram utilizados nos experimentos. Os ratos foram mantidos em um ciclo artificial de iluminação 12 horas claro/12 horas escuro a uma temperatura constante ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) com alimento e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFRGS. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008, as diretrizes da Federação de Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da UFRGS, bem como o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do “Canadian Council on Animal Care” (CCAC).

## 3.2. SUBSTÂNCIAS RADIOATIVAS E REAGENTES

O [ $^{32}\text{P}$ ]Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> foi obtido da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), São Paulo, Brasil. Acetato de amônio, FK-506 monohidratado (tacrolimus), caliculina A, maleato de hidrogênio (MK-801), 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano – N, N, N', N' - ácido tetraacético – acetoximetil éster (BAPTA-AM), ácido etilenoglicol tetracético (EGTA), nifedipina, benzamidina, leupeptina, antipaína, pespstatina, quimostatina, acrilamida e bis-acrilamida foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). NH<sub>4</sub>Cl foi obtido da Dinâmica (Diadema, SP, BR). Fostriecina foi obtida da Tocris Biosciences, UK. Todos os outros reagentes tinham grau analítico e foram obtidos de um fornecedor comercial padrão.

### **3.3. MODELOS DE HIPERAMONEMIA AGUDA**

#### **3.3.1. MODELO 1 – *IN VIVO***

No modelo *in vivo* de hiperamonemia aguda ratos Wistar de 10 e 21 dias foram agudamente injetados intraperitonealmente com 7 mmol/Kg de acetato de amônio (Kosenko et al., 1994) utilizando como veículo soro fisiológico. Os controles foram injetados com soro fisiológico.

#### **3.3.2. MODELO 2 – *IN VITRO***

Para o modelo *in vitro* de hiperamonemia foram utilizadas fatias cerebrais de animais normais expostos a NH<sub>4</sub>Cl em concentrações de 0,5, 1 e 5 mM, como previamente descrito (Bodega et al., 2007, Butterworth et al., 2009, Back et al., 2011).

### **3.4. PREPARAÇÃO E MARCAÇÃO DAS FATIAS DE TECIDO CEREBRAL**

Os ratos foram eutanasiados por decapitação sendo o córtex cerebral e o hipocampo dissecados em placas de Petri sobre gelo e cortados em fatias de 400 µm de espessura com um fatiador de tecido McIlwain. Utilizamos o córtex cerebral e o hipocampo de cada rato. Foram utilizadas 3 fatias de córtex/tubo e a metade de um hipocampo/tubo ou um hipocampo inteiro/tubo no caso dos animais de 10 dias. As fatias foram inicialmente pré-incubadas em solução de Krebs-Hepes, posteriormente, foi realizada a incubação e obtenção da fração citoesquelética conforme descrito abaixo.

#### **3.4.1. PRÉ-INCUBAÇÃO**

A pré-incubação foi realizada tanto no modelo *in vitro* quanto no *in vivo*. Fatias de tecido foram inicialmente pré-incubadas a 30°C por 20 min em tampão Krebs-Hepes contendo 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM Na-HEPES (pH 7,4), 12

mM glicose, 1 mM CaCl<sub>2</sub> com os seguintes inibidores de proteases: 1 mM benzamidina, 0,1 μM leupeptina, 0,7 μM antipaína, 0,7 μM pespstatina e 0,7 μM quimostatina. No modelo *in vitro*, posteriormente, para investigar o mecanismo de sinalização celular, as fatias foram pré-incubadas na presença ou ausência de 10 μM de nifedipina, 50 μM BAPTA-AM, 1 mM EGTA, 50 μM MK-801, 100 μM FK-506, 0,2 μM caliculina A e 1 μM fostriecina.

### **3.4.2. INCUBAÇÃO**

Após a pré-incubação as fatias de tecido provenientes tanto do modelo *in vitro* quanto do *in vivo* foram submetidas à incubação propriamente dita. Para tanto, o tampão de pré-incubação foi retirado e a incubação foi conduzida a 30°C com 100 μL do tampão básico de incubação contendo 80 μCi de [<sup>32</sup>P] ortofosfato (modelo *in vivo*) ou adicionando também a esse tampão NH<sub>4</sub>Cl 0,5, 1 ou 5 mM (modelo *in vitro*). Na investigação do mecanismo de sinalização celular com ou sem adição de 100 μM FK-506 (Kameyama et al., 1998, Heimfarth et al., 2012b), 1 μM fostriecina, 0,2 μM caliculina A, 50 μM MK-801, 50 μM BAPTA-AM, 1 mM EGTA ou 10 μM nifedipina. A reação de incorporação de fosfato radioativo ocorreu por 30 min a 30°C e foi parada com 1 ml de um tampão usado para interromper a atividade enzimática (150 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6,5 e os inibidores de proteases descritos acima). As fatias foram, então, lavadas duas vezes com o mesmo tampão para remover o excesso de radioatividade.

### **3.4.3. FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA ENRIQUECIDA EM FIs**

Após a incubação das fatias do córtex cerebral e hipocampo de ratos de 10 ou 21 dias a fração citoesquelética enriquecida em FIs foi obtida conforme descrito por Funchal et. al., (2003). Resumidamente, após a reação de marcação, as fatias foram

homogeneizadas em 400 µl de tampão de alta força iônica contendo 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,1), 600 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, e os inibidores de proteases descritos acima. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C, em centrífuga Eppendorf, o sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado com o mesmo volume do tampão de alta força iônica. Esse homogeneizado foi centrifugado, como descrito, e o sobrenadante descartado. O sedimento insolúvel em Triton X-100, enriquecido em FIs das células neurais (subunidades dos NFs, VIM e GFAP), foi dissolvido em 1% de SDS e a concentração de proteínas foi determinada como descrito abaixo.

### **3.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) usando albumina bovina como padrão.

### **3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

A análise das proteínas da fração citoesquelética foi realizada por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli (1970). Para tanto, as amostras foram levadas à concentração final de 2 mg/ml em uma solução contendo 40 % glicerol, 5 % mercaptoetanol, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8 e fervidas por 3 min. As concentrações de proteína foram igualmente aplicadas em gel de poliacrilamida a 7,5 % e analisadas por SDS-PAGE. Após a migração eletroforética, os géis foram corados com Coomassie Brilliant blue R (Coomassie Brilliant blue R 0,2 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %, H<sub>2</sub>O qsp) durante 30 min para controle da quantidade de amostra aplicada e da qualidade da migração na placa de eletroforese. Após, os géis foram descorados na mesma solução, porém sem o corante, até as bandas ficarem suficientemente visíveis. Os géis descorados, então, foram colocados em uma solução de secagem (glicerol 1 %,

metanol 50 %, H<sub>2</sub>O qsp) e, posteriormente, expostos durante 30 dias a filmes de raio-X (Kodak T-Mat) a -70°C com os intensificadores de radioatividade para a obtenção do perfil autorradiográfico.

### **3.6.1. QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DOS FIs**

Os filmes de autorradiografia foram quantificados por digitação com uma leitora Hewlett-Packard Scanjet 6100C e a densidade óptica determinada com o software AlphaEaseFC<sup>TM</sup> software (Alpha Innotech, Cell Biosciences). Os valores de densidade óptica, correspondentes aos níveis de fosforilação, foram obtidos por escaneamento da autorradiografia das bandas de cada proteína estudada.

### **3.7. INTEGRIDADE CELULAR**

A integridade celular foi determinada pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) usando um *kit* comercial colorimétrico (de Doles, Brasil) (Whitaker e Mckay, 1969). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

### **3.8. VIABILIDADE CELULAR**

A atividade da desidrogenase mitocondrial para reduzir o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi utilizada para determinar o dano mitocondrial (Liu et al., 1997). O anel tetrazolium do MTT é clivado por várias enzimas desidrogenases na mitocôndria ativa e precipita como um produto formazan azul. As fatias do córtex cerebral e do hipocampo foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL) em tampão Krebs-Ringer (KRB), pH 7,4 (122 mM gluconato de Na<sup>+</sup>, 5 mM gluconato de K<sup>+</sup>, 2 mM HEPES, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9 mM gluconato de Ca<sup>2+</sup>, 1mM L-glutamina, 5 mM glicose; tampão KRB) por 30 min a 30°C. O meio foi, então, aspirado e o precipitado formazan foi solubilizado com



dimetilsulfóxido e as células viáveis foram quantificadas espectrofotometricamente em comprimentos de onda de 540 e 620 nm.

### **3.9. PREPARAÇÃO DE HOMOGEINIZADO TOTAL DE PROTEÍNAS**

Fatias de tecido de córtex cerebral foram pré-incubadas a 30°C por 20 min com meio Krebs-Hepes 300 µl. Após pré-incubação o meio foi trocado e incubação foi conduzida a 30°C por 30 min na presença ou ausência de 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl. Fatias de tecido foram, então, homogeneizadas em 300 µl de uma solução de lise contendo EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, 4 % (p/v). Para análise eletroforética proteínas foram dissolvidas em 25 % (v/v) de uma solução contendo 40 % glicerol, 5 % mercaptoetanol, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8 e fervidas por 3 min.

#### **3.9.1. ANÁLISE POR WESTERN BLOT**

O homogeneizado de proteína foi analisado por SDS-PAGE e transferido para membranas de nitrocelulose (Trans-blot SD semi-dry transfer cell, BioRad) por 1 h a 15 V em tampão de transferência (48 mM Trizma, 39 mM glicina, 20 % metanol e 0,25 % SDS). A membrana de nitrocelulose foi lavada por 10 min em tampão Tris-salina (TBS; 0,5 M NaCl, 20 mM Trizma, pH 7,5), seguido por 2 h de incubação em solução bloqueadora (TBS mais 5 % de albumina de soro bovina e 0,1 % Tween 20). Após incubação o blot foi lavado duas vezes por 5 min com TBS mais 0,05 % Tween-20 (T-TBS) e então incubado “*overnight*” a 4°C em solução bloqueadora contendo os seguintes anticorpos monoclonais: anti-GFAP diluído 1:1000, anti-VIM diluído 1:1000 e anti-actina diluído 1:1000. O blot foi lavado duas vezes por 5 min com T-TBS e incubado por 2 h em solução bloqueadora contendo um anticorpo secundário conjugado com peroxidase, anti-mouse IgG, diluído 1:2000. Novamente esse foi lavado duas vezes por 5 min com T-TBS e duas vezes por 5 min com TBS. O *blot* foi, então, desenvolvido

usando um quimioluminescente ECL kit. *Imunoblots* foram quantificados por escaneamento dos filmes como descrito acima. Valores de densidade óptica foram obtidos para as proteínas estudadas.

### **3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos estatisticamente à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida por teste de comparação múltiplo Tukey-Kramer quando o teste F foi significativo ou pelo Teste *t* de Students quando necessário. Um  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas usando o GraphPad Prism (®) 5 (Version 5.01, GraphPad Software, Inc., USA).

## **PARTE II - CAPÍTULO II**

# RESULTADOS

---

## 4.1. MODELO 1 – *IN VIVO*

### 4.1.1. TRATAMENTO AGUDO COM ACETATO DE AMÔNIO E O SISTEMA FOSFORILANTE ASSOCIADO AO CITOESQUELETO EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS

Analizamos o efeito *in vivo* através da injeção intraperitoneal de acetato de amônio em animais de 10 e 21 dias de idade sobre a fosforilação dos FIs em células neurais de córtex cerebral e hipocampo. O estudo *in vivo* utilizou a dose de 7 mmol/Kg de acetato de amônio, conforme descrito por Kosenko et al., (1994). Observamos que cerca de 40 % dos animais injetados apresentavam convulsões mioclônicas e espasmos, sendo que alguns animais não resistiram a essa dose. A dose de 10 mmol/Kg foi letal para todos os animais.

Os ratos agudamente injetados com acetato de amônio 7 mmol/Kg que apresentaram recuperação dos sinais de toxicidade em até 10 min foram eutanasiados 30 ou 60 min após a injeção. A fração citoesquelética do córtex cerebral e hipocampo foi extraída e processada como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados para o córtex cerebral são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2. Efeito da injeção de acetato de amônio sobre a fosforilação dos FIs de córtex cerebral de ratos\***

<b>Córtex</b>	<b>GFAP</b>	<b>VIM</b>	<b>NF-L</b>	<b>NF-M</b>	<b>NF-H</b>
<b>t 30'</b>					
Ratos de 10 dias	107,70 ± 10,31	108,00 ± 9,47	110,20 ± 11,11	104,20 ± 4,08	104,70 ± 5,34
Ratos de 21 dias	79,94* ± 9,62	77,20** ± 8,04	76,62** ± 7,08	71,76*** ± 9,45	71,14*** ± 10,51
<b>t 60'</b>					
Ratos de 10 dias	89,36 ± 14,49	89,74 ± 17,59	93,34 ± 19,67	91,39 ± 10,90	92,56 ± 11,90
Ratos de 21 dias	97,28 ± 14,15	94,66 ± 15,47	95,58 ± 14,23	96,87 ± 7,12	97,14 ± 7,28

\* Ratos agudamente injetados foram eutanasiados 30 (t 30') ou 60 min (t 60') após a administração. As fatias obtidas foram, então, incubadas na presença de <sup>32</sup>P-ortofosfato durante 30 min, conforme descrito em Materiais e Métodos. Dados foram expressos como média ± desvio padrão (D.P.) de 5-7 animais em cada grupo e expressos como % do grupo controle. Diferenças significativas ao grupo controle foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer sendo \*P<0,05; \*\*P< 0,01, \*\*\*P< 0,001.

Podemos observar que a injeção intraperitoneal aguda de acetato de amônio causou hipofosforilação tanto dos FIs gliais como neuronais de córtex cerebral nos animais de 21 dias em 30 min para todas as subunidades testadas. No entanto, não houve diferenças significativas entre os demais grupos.

Por outro lado, é interessante salientar que o sistema fosforilante associado ao citoesqueleto das células neurais de hipocampo foi menos sensível aos efeitos do acetato de amônio, pois os animais agudamente injetados não tiveram alteração significativa nos níveis de fosforilação dos FIs nas diferentes idades e tempos analisados (Tabela 3).

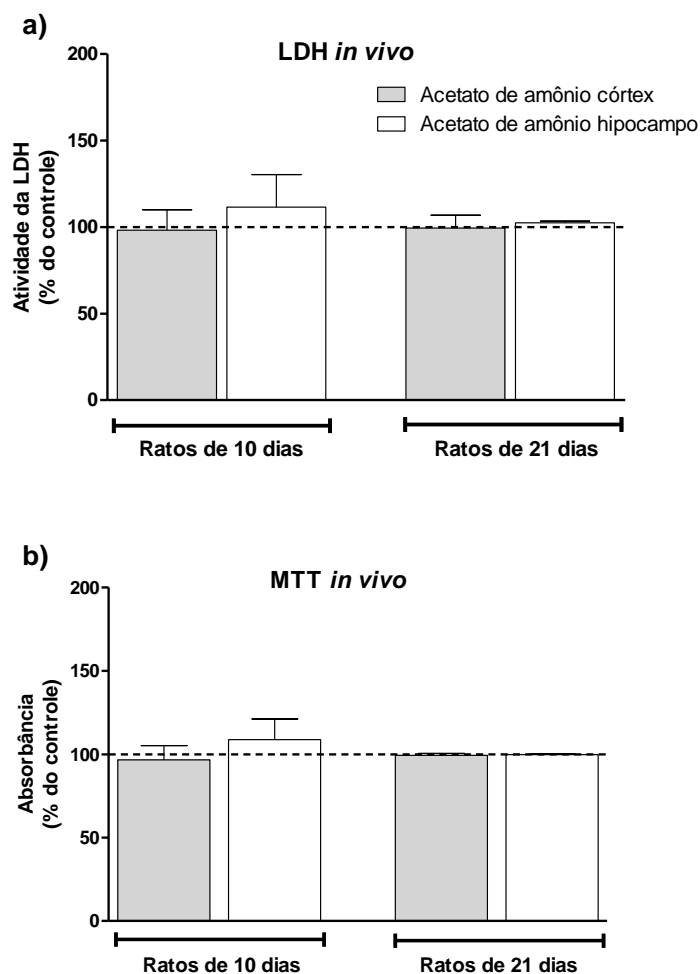
**Tabela 3. Efeito da injeção de acetato de amônio sobre a fosforilação dos FIs de hipocampo de ratos\***

<i>Hipocampo</i>	<b>GFAP</b>	<b>VIM</b>	<b>NF-L</b>	<b>NF-M</b>	<b>NF-H</b>
t 30'					
Ratos de 10 dias	99,12 ± 10,09	98,09 ± 10,77	98,00 ± 10,71	94,74 ± 11,74	93,11 ± 12,31
Ratos de 21 dias	96,46 ± 16,53	97,68 ± 14,20	100,4 ± 14,58	104,7 ± 10,20	103,4 ± 8,34
t 60'					
Ratos de 10 dias	93,39 ± 10,99	92,50 ± 13,70	93,09 ± 12,94	90,75 ± 24,51	91,57 ± 25,77
Ratos de 21 dias	102,6 ± 6,24	103,50 ± 7,03	100,30 ± 5,88	100,3 ± 9,73	105,2 ± 13,44

\* Protocolo utilizado vide tabela 1. Dados foram expressos como média ± D.P. de 5-7 animais em cada grupo e expressos como % do grupo controle. Não houve diferenças significativas ao grupo controle determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer.

#### **4.1.2. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE INTEGRIDADE E VIABILIDADE CELULAR *IN VIVO***

A integridade celular 60 min após a injeção de acetato de amônio foi avaliada pela medida da atividade da LDH no meio de incubação, indicando a liberação dessa enzima citosólica em decorrência de um dano à membrana plasmática. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT, o qual indica dano mitocondrial. Os resultados mostraram que os animais injetados com 7 mmol/Kg e sacrificados 1 h após a injeção não apresentaram perda de integridade celular nem dano mitocondrial significativamente diferentes dos animais controles (animais injetados com soro fisiológico). Esses resultados estão apresentados na Figura 5.



**Figura 5.** Efeito do acetato de amônio na integridade e viabilidade celular. Os animais injetados com 7 mmol/Kg foram decapitados 1 h após a injeção e as estruturas cerebrais removidas. A) A integridade celular foi determinada pela medida da atividade da LDH e os resultados expressos em % do controle. B) A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados foram obtidos por absorbância e expressos como % do controle. Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  D.P. (n = 3-4 em duplicata). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e seus controles determinados pelo Teste *t* de Students Pareado.

## 4.2. MODELO 2 – *IN VITRO*

### 4.2.1. TRATAMENTO COM NH<sub>4</sub>Cl E O SISTEMA FOSFORILANTE DOS FIS EM FATIAS DE CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS

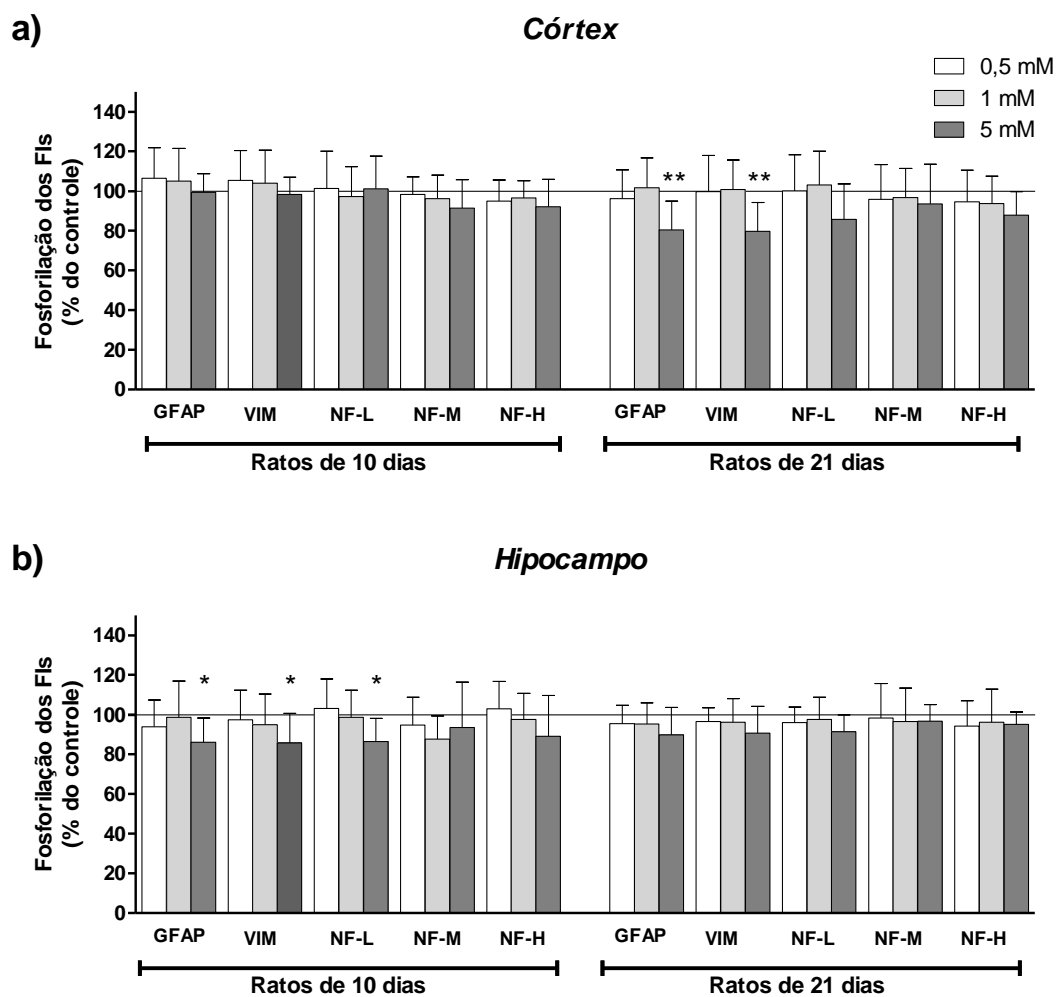
Realizamos também um estudo *in vitro* verificando o efeito de diferentes concentrações de NH<sub>4</sub>Cl (0,5, 1 e 5 mM) sobre a fosforilação da fração citoesquelética

enriquecida em FIs de córtex cerebral e hipocampo de ratos jovens. As fatias de tecido foram submetidas à incorporação de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato de  $\text{Na}^+$  durante 30 min, como descrito em Materiais e Métodos. Considerando que as vias de sinalização direcionadas para o citoesqueleto são reguladas diferentemente durante o desenvolvimento (Heimfarth et al., 2012b, Pierozan et al., 2014a), o nosso estudo foi realizado em animais de 10 e 21 dias de vida pós-natal.

Os resultados obtidos mostraram que no córtex cerebral dos animais mais jovens (10 dias) não ocorreu alteração estatisticamente significativa nos níveis de fosforilação dos FIs em comparação com as fatias controles, enquanto nos ratos de 21 dias a maior concentração (5 mM) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induziu hipofosforilação dos FIs astrocitários GFAP e VIM (Figura 6a). Em contraste, quando as fatias de hipocampo foram expostas a diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ocorreu hipofosforilação da GFAP e VIM bem como da NF-L, uma subunidade dos FIs de neurônios, em resposta à concentração de 5 mM (Figura 6b). Além disso, para o hipocampo esse efeito foi observado apenas nos animais de 10 dias, sem alteração na incorporação de ortofosfato radioativo nas proteínas do citoesqueleto dos animais de 21 dias de idade.

Devido ao fato de o córtex cerebral ser uma estrutura bastante adequada ao estudo do sistema fosforilante associado ao citoesqueleto e também devido à grande vulnerabilidade do córtex cerebral aos efeitos da hiperamonemia (Takanashi et al., 2003, Cagnon e Braissant, 2007, Gropman et al., 2007, U-King-Im et al., 2011, Choi et al., 2013) escolhemos estudar as vias de sinalização envolvidas na ação do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre os FIs de astrócitos do córtex cerebral de ratos de 21 dias de idade. Porém, antes foi necessário avaliar o imunoconteúdo das proteínas dos FIs afetados nessa estrutura.



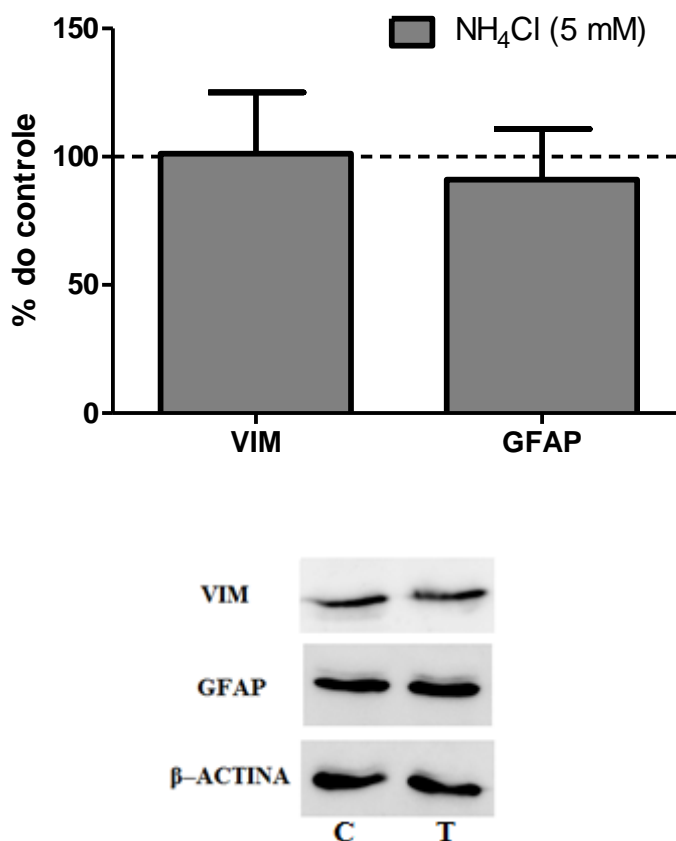


**Figura 6.** Efeito de diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre a fosforilação das subunidades dos filamentos intermediários na fração citoesquelética enriquecida em FIs das fatias de córtex cerebral (A) e hipocampo (B) em ratos de 10 e 21 dias de vida. Fatias foram incubadas na presença de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato durante 30 min. A fração insolúvel do citoesqueleto foi extraída e a radioatividade incorporada às subunidades NF-H, NF-M, NF-L, GFAP e VIM foi medida conforme descrito em Materiais e Métodos. Dados foram relatados como média  $\pm$  D.P. de 12 animais em cada grupo e expressos como % do grupo controle. Diferenças significativas ao grupo controle foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer sendo \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.2.2. IMUNOCONTEÚDO DOS FIs HIPOFOSFORILADOS EM FATIAS DE CÓRTEX DE ANIMAIS DE 21 DIAS

As alterações fosforilantes observadas, em especial, no córtex cerebral podem ser em decorrência de outros eventos celulares que estejam promovendo diminuição no

conteúdo dos FIs afetados GFAP e VIM e, conseqüentemente, refletindo em um menor nível fosforilante. Nesse sentido, avaliamos o imunocônteuído dos FIs das fatias cerebrais dos ratos de 21 dias tratados com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM (Figura 7).



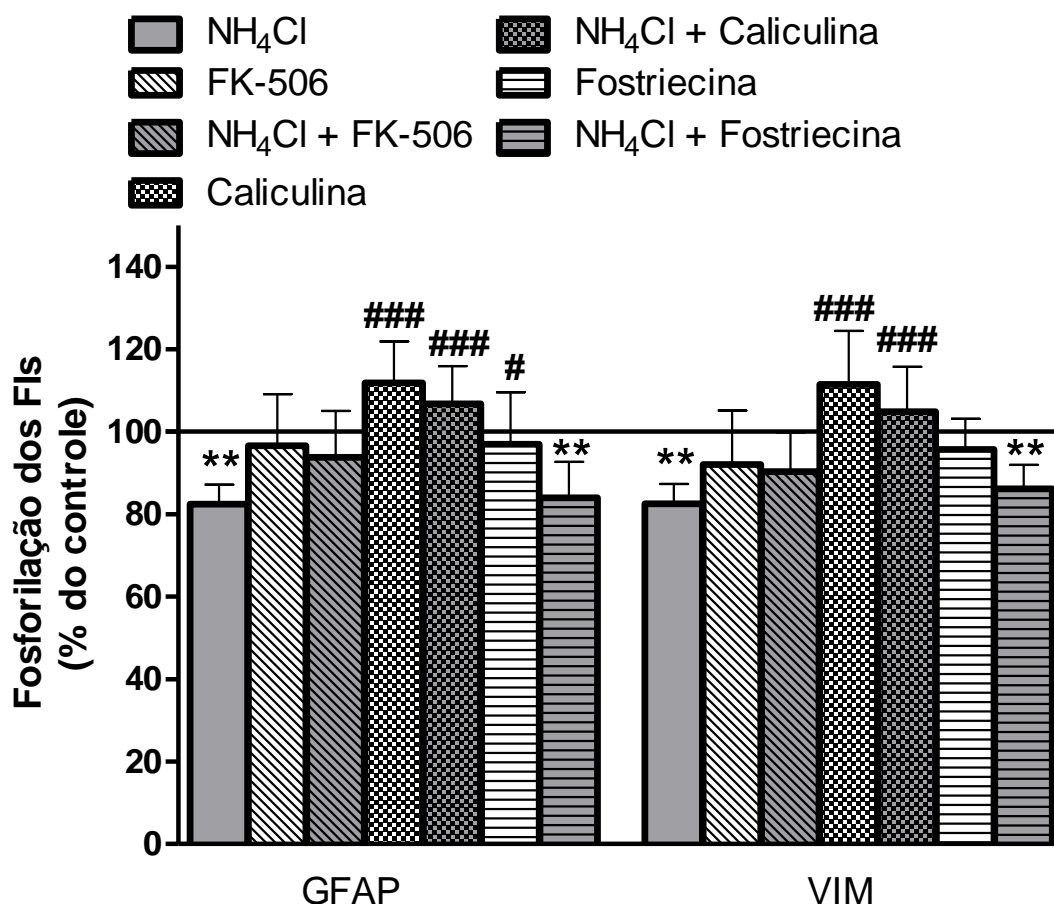
**Figura 7.** Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM sobre o imunocônteuído de GFAP e VIM em fatias de córtex cerebral de ratos de 21 dias *in vitro*. Os níveis foram medidos conforme descrito em Materiais e Métodos. *Western blot* representativos das proteínas testadas são mostrados controle (C) e tratado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM (T). *Western blot* da proteína  $\beta$ -actina foi usado como controle de carregamento. Dados são relatados como média  $\pm$  D.P. de 5 animais e expressos como % do grupo controle. Análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer. Resultados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos testados e seus controles.

A ausência de diferenças significativas entre o grupo tratado e o controle no tempo de 30 min *in vitro*, na quantificação do *Western Blot*, sugerem que a hipofosforilação apresentada pelos FIs seja em resposta a um mecanismo de sinalização celular decorrente da exposição ao  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

### **4.2.3. PARTICIPAÇÃO DAS SERINA/TREONINA FOSFATASES SOBRE A HIPOFOSFORILAÇÃO CAUSADA PELO NH<sub>4</sub>Cl**

A hipofosforilação em resposta a sinais celulares está mais frequentemente associada à ativação de proteínas fosfatases do que à inibição de proteínas cinases (Heimfarth et al., 2012b). As fosfatases de resíduos de Ser-Thr frequentemente relacionadas a alterações no nível de fosforilação dos FIs pertencem às três subfamílias de Ser-Thr fosfatases: proteína fosfatase 1 (PP1), proteína fosfatase 2A (PP2A) e proteína fosfatase 2B (PP2B), também chamada de calcineurina (Vinadé e Rodnight, 1996, Cheng et al., 2000, Andreeva e Kutuzov, 2001, de Almeida et al., 2003).

Por isso, investigamos a participação das proteínas fosfatases citadas acima com a perspectiva de verificar alguns mecanismos através dos quais o NH<sub>4</sub>Cl induz a hipofosforilação dos FIs de astrócitos em fatias de córtex cerebral de ratos de 21 dias. Os resultados da pré-incubação e incubação com inibidores específicos para as diferentes fosfatases (descrito em Materiais e Métodos) demonstraram que o FK-506 (100µM) - um inibidor específico da PP2B (Thomson et al., 1995) – foi efetivo em prevenir a hipofosforilação mediada pelo NH<sub>4</sub>Cl 5 mM. Da mesma forma, a calciculina A (0,2 µM) – um potente inibidor da PP1 e PP2A (Song e Lavin, 1993) - foi capaz de prevenir essa hipofosforilação. Com o objetivo de distinguir entre as fosfatases PP1 e PP2A, o composto fostriecina (1µM) – um inibidor altamente seletivo para PP2A (Walsh et al., 1997) - foi utilizado. Porém, mesmo na presença desse inibidor a hipofosforilação continuou a ocorrer, sugerindo a participação da PP1 juntamente com a PP2B na ação do NH<sub>4</sub>Cl sobre as vias de sinalização direcionadas ao citoesqueleto de astrócitos corticais de ratos de 21 dias (Figura 8).



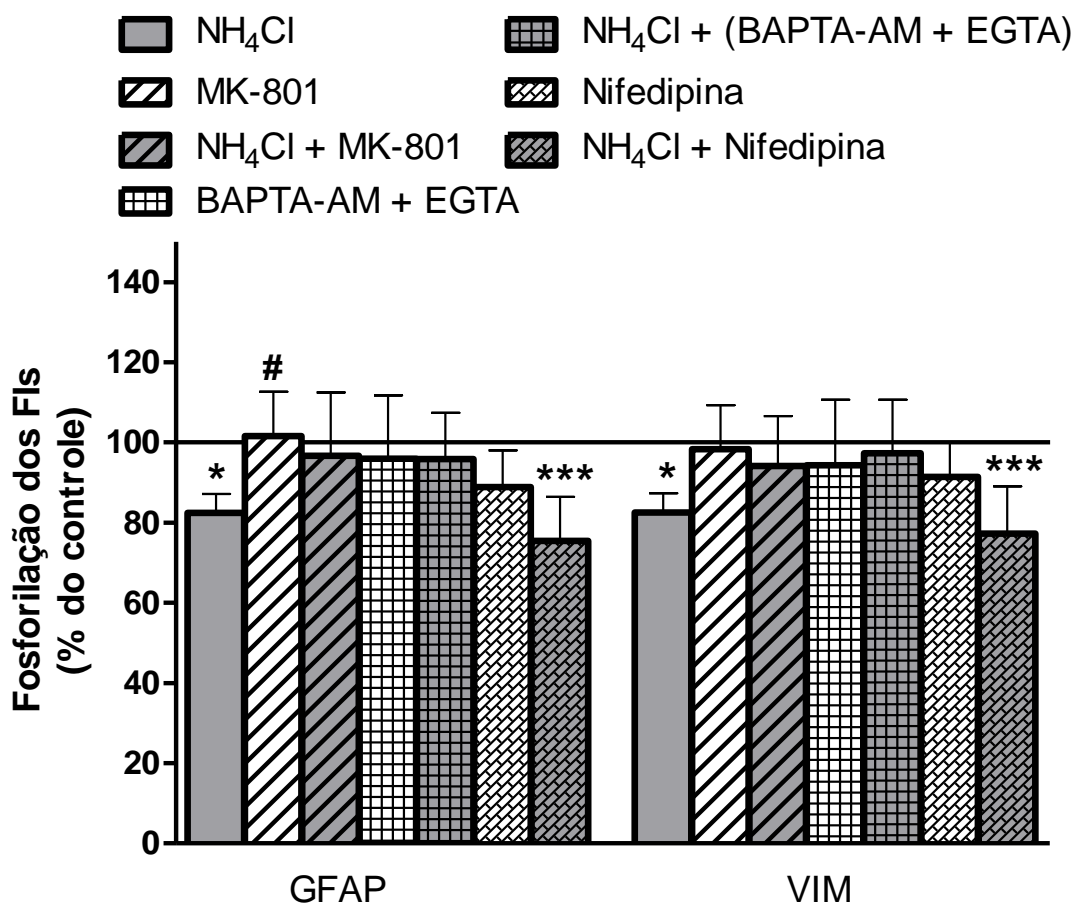
**Figura 8.** Efeito dos inibidores das fosfatases PP2B, PP1 e PP2A na hipofosforilação dos FIs induzida por NH<sub>4</sub>Cl 5 mM. Fatias de córtex cerebral de ratos com 21 dias foram pré-incubadas na presença ou ausência de 100 μM de FK-506 (inibidor da PP2B); 1 μM de Fostriecina (inibidor da PP2A) ou 0,2 μM de Caliculina A (inibidor da PP1 e PP2A). Pré-incubação foi seguida por incubação com [<sup>32</sup>P]-ortofosfato de Na<sup>+</sup> na presença ou ausência dos inibidores de fosfatases como descrito em Materiais e Métodos. A fração citoesquelética foi extraída e a radioatividade incorporada na GFAP e VIM foi medida. Dados foram expressos como média ± D.P. de 12 animais em cada grupo e apresentados como % do grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla comparação Tukey-Kramer sendo indicadas por \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle; #P<0,05 e ### P<0,001 comparado com o grupo NH<sub>4</sub>Cl.

#### 4.2.4. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA E DE CANAIS DE Ca<sup>2+</sup> DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VDCC) SOBRE A HIPOFOSFORILAÇÃO CAUSADA PELO NH<sub>4</sub>Cl

As alterações na homeostase do Ca<sup>2+</sup> estão envolvidas em inúmeros eventos intracelulares que regulam a função da célula, sendo os FIs um dos alvos dessa

sinalização (Heimfarth et al., 2012b, Pierozan et al., 2012, Zanatta et al., 2012). Receptores NMDA são canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por glutamato (Blanke e VanDongen, 2009) que por um longo tempo foram pensados ser expressos exclusivamente em neurônios, porém, estudos recentes propõem sua presença em astrócitos (Verkhatsky e Kirchhoff, 2007). Outra potencial contribuição para a sinalização através do  $\text{Ca}^{2+}$  envolve os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) em especial os canais tipo L (D'Ascenzo et al., 2004).

Desse modo, investigamos a participação tanto dos receptores NMDA quanto dos L-VDCC nas ações do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM sobre a atividade das fosfatases. Os resultados mostraram que o antagonista dos receptores NMDA (MK-801-50 $\mu\text{M}$ ) preveniu a hipofosforilação mediada pelo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . De modo similar, observamos que em fatias de córtex cerebral incubadas concomitantemente com os quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ) e extracelular EGTA (1 mM) houve prevenção da hipofosforilação tanto da GFAP quanto da VIM. Em contraste, a nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ) – um bloqueador dos canais L-VDDC - não foi efetivo em prevenir a hipofosforilação da GFAP e da VIM (Figura 9). Esses resultados constituem uma evidência da importância do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos receptores NMDA na sinalização celular direcionada para os FIs de astrócitos sob ação do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM.

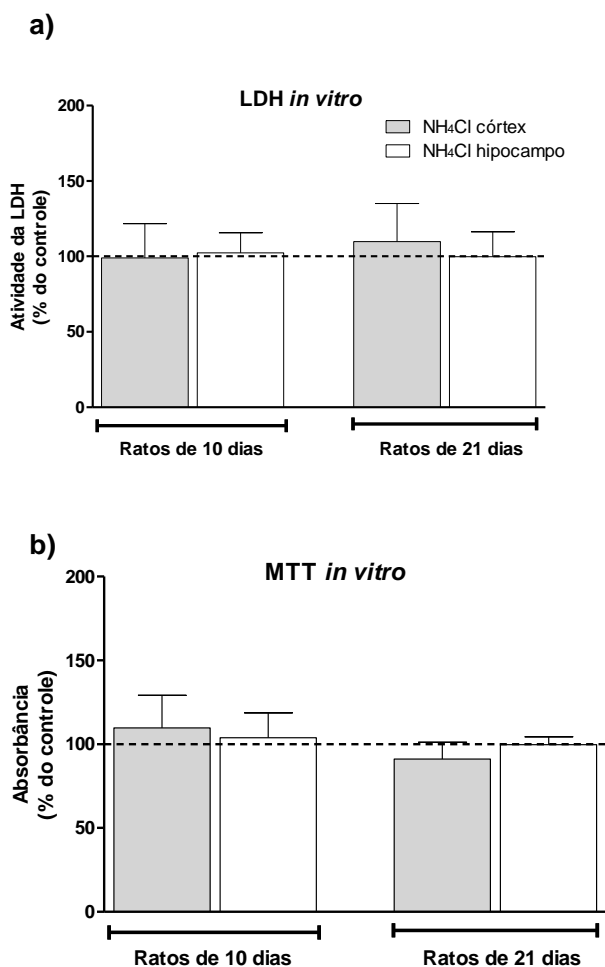


**Figura 9.** Efeitos do antagonista de receptores NMDA (MK801), dos quelantes de cálcio (BAPTA-AM e EGTA) e do bloqueador de L-VDCC (nifedipina) na hipofosforilação desencadeada pelo NH<sub>4</sub>Cl 5 mM. Fatias de córtex cerebral de ratos com 21 dias foram pré-incubadas na presença ou ausência de 50 μM de MK-801; 50 μM de BAPTA-AM + 1 mM EGTA ou 10 μM de nifedipina. A pré-incubação foi seguida por incubação com [<sup>32</sup>P]-ortofosfato na presença ou ausência dos inibidores de fosfatases conforme descrito em Materiais e Métodos. A fração citoesquelética foi extraída e a radioatividade incorporada na GFAP e VIM foi medida. Dados foram expressos como média ± D.P. de 12 animais em cada grupo e expressos como % do grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla comparação Tukey-Kramer sendo indicadas por \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 comparado com o grupo controle e #P<0,05 comparado com o grupo NH<sub>4</sub>Cl.

#### 4.2.5. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE INTEGRIDADE E VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO*

A integridade celular foi avaliada pela medida da atividade da LDH e o dano mitocondrial foi avaliado pelo teste do MTT em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos incubadas com 5 mM NH<sub>4</sub>Cl. Os resultados, expressos na Figura 10, mostram

que não houve diferenças significativas nos parâmetros de morte celular e dano mitocondrial nas fatias tratadas com  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , em comparação com as fatias controles.



**Figura 10.** Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  na integridade e viabilidade celular. Fatias de córtex cerebral e hipocampo foram incubadas por 30 min com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM. A) A integridade celular foi determinada pela medida da atividade da LDH e os resultados expressos em % do controle. B) A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados foram obtidos por absorbância e expressos como % do controle. Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  D.P. ( $n = 6$  em duplicata). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e seus controles determinados pelo Teste  $t$  de Students Pareado.

### **PARTE III**



# DISCUSSÃO

---

A hiperamonemia é o principal fator que contribui para as alterações cerebrais na HE (Felipo, 2009). O córtex cerebral e o hipocampo são estruturas alvo dos efeitos neurotóxicos provocados pela amônia (Monfort et al., 2002, Cagnon e Braissant, 2007, Chen et al., 2014). Tanto a hiperamonemia quanto a doença hepática afetam a neurotransmissão glutamatérgica (Felipo, 2006) sendo que a hiperamonemia aguda induz a ativação excessiva dos receptores NMDA, os quais são responsáveis pela morte de ratos na intoxicação aguda com amônia, que por sua vez, é prevenida pelo bloqueio dos receptores NMDA (Hermenegildo et al., 1996). O bloqueio dos receptores NMDA também previne ou retarda a morte na falência hepática aguda (Rodrigo et al., 2009). Muitos efeitos dos receptores glutamatérgicos e suas vias de transdução de sinal associadas têm sido descritos tanto na hiperamonemia aguda como na crônica (Monfort et al., 2000, Llansola et al., 2007, Felipo, 2009).

Estudos prévios de nosso laboratório já demonstraram que a homeostase dos FIs é alvo da ação de vários metabólitos (de Almeida et al., 2003, Loureiro et al., 2010, Pierozan et al., 2012) e neurotoxinas (Heimfarth et al., 2011, 2012b, Pessoa-Pureur et al., 2014) e que a ação desses compostos sobre a rede complexa de filamentos proteicos é dependente da estrutura cerebral (Heimfarth et al., 2008). O rompimento da homeostase do citoesqueleto neural tem sido relacionado à neurodegeneração (O'Callaghan, 1993) e modificações no nível de fosforilação de proteínas do citoesqueleto são consideradas eventos críticos na patologia do sistema nervoso central (Koliatsos et al., 1989, Miller et al., 2002), podendo levar as células neuronais à morte, causando disfunção neurológica. Várias doenças neurodegenerativas humanas, como Doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, Pick e Demência com corpos de Lewy, são caracterizadas pelo acúmulo de agregados de FIs relativamente insolúveis em

células neurais (Goedert et al., 1998, Julien e Mushynski, 1998, Julien, 1999, DiProspero et al., 2004).

Por outro lado, o desenvolvimento do SNC também é um ponto chave na ação de toxinas. Desordens do desenvolvimento podem envolver lesões por um agente tóxico, resultando em processos destrutivos que afetam o rápido crescimento cerebral e diferenciação das células neurais (Giordano e Costa, 2012). Além disso, a via de administração da droga, bem como a estrutura cerebral afetada também interfere nas características neurotóxicas de um composto.

Considerando que existem poucos relatos recentes na literatura sobre as consequências de altas concentrações de amônia sobre a dinâmica do citoesqueleto e em especial dos FIs, bem como da participação dos receptores NMDA e suas vias de sinalização nesses efeitos, verificamos no presente trabalho o efeito da amônia em concentrações consideradas tóxicas para o SNC sobre o citoesqueleto de células neurais do hipocampo e córtex cerebral de ratos em desenvolvimento, com 10 e 21 dias de idade. Evidenciamos também a participação dos receptores NMDA e seus mecanismos de sinalização na ação da amônia sobre a homeostase dos FIs. Para isso, utilizamos dois modelos de administração da amônia, tentando entender os efeitos desencadeados pela mesma. O primeiro modelo utilizou uma injeção intraperitoneal de acetato de amônio em ratos de 10 e 21 dias, mimetizando a hiperamonemia sistêmica. Esse modelo foi chamado de modelo 1 *in vivo* e nos permitiu avaliar a influência de todo o organismo na resposta do citoesqueleto cerebral à alta concentração de amônia. O segundo modelo baseou-se na incubação de fatias de tecido cerebral com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , caracterizando um modelo *in vitro*. O modelo *in vitro* nos permitiu investigar mais profundamente as vias de sinalização que participam da ação do composto.

## **5.1. MODELO 1 – *IN VIVO***

### **5.1.1. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DO ACETATO DE AMÔNIO SOBRE O CITOESQUELETO DE RATOS JOVENS**

Neste modelo buscamos identificar as alterações na fosforilação dos FIs em decorrência da exposição ao acetato de amônio. Nós observamos que dentre os animais injetados, alguns apresentavam convulsões nos primeiros minutos após a injeção e outros não apresentavam esse efeito. Kosenko et al., (1997) já haviam demonstrado que ratos apresentavam diferentes suscetibilidades à amônia classificando-os em sensíveis (mostrando convulsões) ou resistentes (sem convulsões) após injeções intraperitoneais de acetato de amônio (7 mmol/Kg). Entre os diversos efeitos da hiperamonemia está a desinibição neuronal com a presença de convulsões (Rangroo Thrane et al., 2013). Os nossos experimentos foram realizados com os animais classificados como resistentes ao acetato de amônio e com aqueles que apresentaram recuperação após as convulsões.

Inicialmente, nossos resultados indicaram a existência de hipofosforilação dos FIs de astrócitos (GFAP e VIM) bem como das 3 subunidades dos NFs (NF-L, NF-M e NF-H) em córtex cerebral de ratos de 21 dias de idade, 30 min após a injeção de acetato de amônio (7 mmol/Kg). Interessantemente, esse desequilíbrio do sistema fosforilante direcionado aos FIs não foi detectado 60 min após a injeção, sugerindo uma recuperação da homeostase do sistema.

Com relação ao hipocampo nossos resultados mostraram que não houve alteração no sistema fosforilante associado aos FIs tanto em animais de 10 quanto de 21 dias de idade, 30 e 60 min após a injeção. O conjunto desses resultados mostra que cada estrutura cerebral responde de maneira diferente ao insulto com esse metabólito e que podem existir janelas de suscetibilidade do sistema fosforilante associado ao citoequeleto em uma determinada estrutura cerebral. Esses resultados suportam

trabalhos anteriores de nosso laboratório mostrando diferentes suscetibilidades do citoesqueleto das estruturas cerebrais submetidas ao estresse de altas concentrações de metabólitos (Pierozan et al., 2014b) ou neurotoxinas (Heimfarth et al., 2012b) durante o desenvolvimento.

A hipofosforilação dos FIs está de acordo com evidências prévias mostrando que as proteínas fosfatases são altamente concentradas no cérebro de mamíferos (Strack et al., 1997) e enfatizando o citoesqueleto como um alvo preferencial da ação de fosfatases tanto em condições fisiológicas como patológicas (Liu et al., 2008). As subunidades dos FIs são fosforiladas nos seus domínios N-terminal e C-terminal e a dinâmica de fosforilação/desfosforilação desempenha uma função importante na organização e função estrutural dos FIs de maneira célula e tecido específicas (Nixon e Sihag, 1991, Helfand et al., 2004, Omary et al., 2006).

A fosforilação adequada das subunidades dos NFs está também relacionada com a sinaptogênese e a mielinização à medida que o citoesqueleto axonal começa a ser estabelecido (Grant et al., 2001). Também, foi sugerido que a regulação da fosforilação de sítios no domínio C-terminal do NF-H e do NF-M desempenha uma função importante no espaçamento dos NFs e conseqüentemente no calibre axonal (Fuchs e Cleveland, 1998).

Com respeito às conseqüências da hipofosforilação dos FIs, está bem descrito que a hipofosforilação dos NFs os torna mais suscetíveis à quebra proteolítica e o seu conseqüente acúmulo nos axônios pode romper o transporte axonal de organelas e compostos intracelulares (Goldstein et al., 1987, Pant, 1988). Por essa razão, os NFs hipofosforilados foram associados com a neurotoxicidade do ácido quinolínico e do telúrio (Heimfarth et al., 2012a, Heimfarth et al., 2012b, Heimfarth et al., 2013, Pierozan et al., 2014b).

Por outro lado, considerando que a desmielinização diminui a fosforilação dos NFs, o transporte axonal e o diâmetro dos axônios (de Waegh et al., 1992) e que a hiperamonemia pode conduzir a atrofia cortical, aumento ventricular e desmielinização que levam a prejuízo cognitivo, convulsão e paralisia cerebral (Braissant et al., 2012) nossas observações sugerem que a hipofosforilação dos NFs no modelo *in vivo* (30') possa estar associado a um sinal desmielinizante com efeitos no transporte e calibre axonal mimetizando, portanto, as alterações observadas em pacientes com hiperamonemia. Todavia, esse efeito não foi observado em 60' sugerindo uma recuperação dos animais. De fato, logo após a injeção de acetato de amônio os animais que apresentaram um quadro convulsivo agudo e resistiram a ele, melhoraram com o decorrer do tempo. Isso é consistente com o fato de que a presença do acetato de amônio é neurotóxica e sua rápida eliminação pode suprimir o efeito.

Observamos também a maior resistência da homeostase dos FIs nos animais de 10 dias injetados com acetato de amônio. Embora no presente trabalho não sejamos capazes de estabelecer as bases moleculares dessa diferente suscetibilidade nos animais em desenvolvimento, podemos especular que o mesmo sinal possa desencadear diferentes intensidades de resposta, como reflexo da maturação temporal das vias de sinalização no SNC. Nesse contexto, Lohmann e Kessels (2014) descreveram que os receptores e canais iônicos do SNC desenvolvem-se sequencialmente durante o desenvolvimento. Em particular, os receptores NMDA são tetrâmeros formados por quatro subunidades, duas subunidades GluN1 e duas subunidades GluN2. Essas subunidades são diferentemente expressas nas diferentes regiões cerebrais e nos sucessivos estágios de desenvolvimento, gerando uma diversidade em suas funções que tem como consequência características próprias da plasticidade sináptica ao longo do desenvolvimento.

Embora a literatura não apresente evidências experimentais da suscetibilidade dos NFs às altas concentrações de amônia *in vivo*, Braissant et al., (2002) mostraram que agregados de células neurais de rato em cultura (agregados de astrócitos e neurônios) apresentaram crescimento axonal de neurônios colinérgicos diminuído, níveis diminuídos de NF-M e inibição da fosforilação dessa subunidade. Esses resultados suportam as nossas presentes evidências, de que a perda da homeostase dos NFs faz parte da resposta neuronal ao dano causado pela intoxicação pela amônia.

## **5.2. MODELO 2 – *IN VITRO***

### **5.2.1. EFEITOS DO NH<sub>4</sub>Cl SOBRE O CITOESQUELETO DE FATIAS DE TECIDO CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

Considerando que altas concentrações de amônio rompem a homeostase do citoesqueleto neural no córtex cerebral de ratos jovens *in vivo* e que esse efeito pode estar relacionado com os efeitos tóxicos da amônia, procuramos entender um pouco melhor como esse metabólito em concentrações tóxicas age nas células neurais. Para tanto, estudamos algumas das vias de sinalização envolvidas na ação da amônia verificando o efeito de uma exposição *in vitro* ao NH<sub>4</sub>Cl sobre a fosforilação dos FIs neuronais e gliais em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 10 e 21 dias de idade. Além disso, identificamos também alguns dos mecanismos de ação pelos quais essa droga altera a homeostase do citoesqueleto.

Os resultados mostraram que o NH<sub>4</sub>Cl adicionado diretamente sobre uma fatia de córtex cerebral ou hipocampo causou hipofosforilação dos FIs nas duas estruturas cerebrais de maneira dose-dependente, ou seja, o efeito foi observado com 5 mM NH<sub>4</sub>Cl, mas não com as concentrações menores utilizadas (0,5 e 1 mM).

A comparação dos resultados *in vivo* e *in vitro* mostrou a preservação da suscetibilidade do citoesqueleto do córtex cerebral, o qual foi sensível à amônia no vigésimo primeiro dia pós-natal tanto *in vivo* como *in vitro*. No hipocampo verificamos uma diminuição de fosforilação dos FIs gliais e também da subunidade de baixo peso molecular dos NFs (NF-L) em animais de 10 dias, não apresentando alteração desse parâmetro em ratos de 21 dias. Comparativamente, fatias de hipocampo de animais de 10 dias de vida foram mais sensíveis que o hipocampo *in vivo* nessa mesma idade. Ainda, no córtex cerebral observou-se que o NH<sub>4</sub>Cl causou hipofosforilação apenas dos FIs gliais em animais de 21 dias, não alterando o sistema fosforilante associado ao citoesqueleto em animais de 10 dias. Esses resultados são interessantes porque mostram a complexidade dos mecanismos de sinalização direcionados para o citoesqueleto e, principalmente, enfatizam a importância da preservação das conexões entre as diferentes regiões cerebrais no processamento dos sinais e, conseqüentemente, nas respostas ao estresse causado pelo desequilíbrio metabólico no SNC. Por outro lado, esses resultados confirmam de certo modo a evidência de que a vulnerabilidade do citoesqueleto das diferentes regiões cerebrais a um dado agente estressante está relacionada à ontogenia do sistema de sinalização.

É importante salientar que no córtex cerebral de animais de 21 dias os NFs foram hipofosforilados *in vivo*, mas não *in vitro*. A presente abordagem experimental não permite acessar as bases moleculares da diferente vulnerabilidade do nível de fosforilação nos dois modelos experimentais. Uma possibilidade é que as alterações no sistema fosforilante direcionado aos NFs sejam decorrentes de perturbações desencadeadas pela amônia na barreira hematoencefálica (Skowrońska e Albrecht, 2012). Além disso, os animais de 21 dias foram agudamente injetados e decapitados 30 min após, sendo suas estruturas removidas e em seguida fosforiladas (aproximadamente

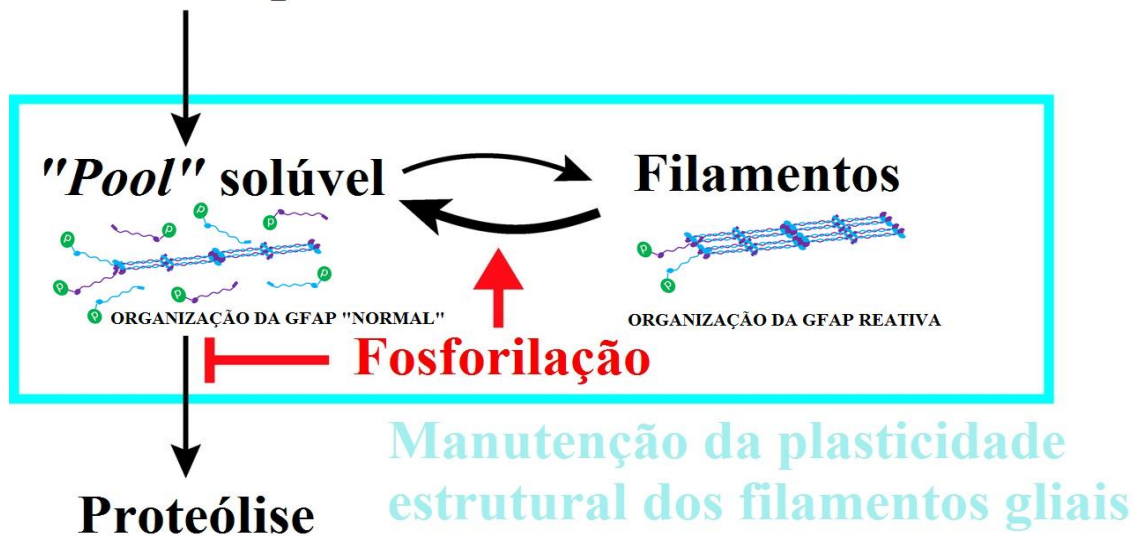
mais 30 min). No modelo *in vitro* a fosforilação ocorre logo após o tratamento, portanto, o tempo pode não ter sido suficiente para detectarmos alterações nos NFs. Não podemos excluir também a possibilidade de que no modelo *in vitro* a perda das interconexões do cérebro intacto tenha causado uma alteração no “*crosstalk*” das vias de sinalização direcionadas à fosforilação dos NFs no córtex cerebral.

A hipofosforilação foi observada também nos FIs astrocitários, ou seja, na GFAP e VIM de córtex cerebral *in vivo* e *in vitro*, bem como no hipocampo *in vitro*. A GFAP é a principal proteína dos FIs de astrócitos maduros no SNC (Eng, 1985, Hol e Pekny, 2015). É bem conhecido que a GFAP pode ser fosforilada/desfosforilada por uma variedade de Ser/Thr cinases e ou fosfatases, em um mecanismo fundamental para a regulação do equilíbrio entre a forma associada ao citoesqueleto e a forma solúvel dessa proteína. A fosforilação desloca o equilíbrio no sentido da despolimerização dos filamentos em subunidades solúveis, um evento associado com a mitose (Murphy e Pearce, 2005). Ao contrário, a desfosforilação está relacionada com o aumento da forma insolúvel do FI, associado ao citoesqueleto. Para a GFAP, seis diferentes sítios de fosforilação foram identificados: Thr-7, Ser-8, Ser-13, Ser-17 e Ser-34 no domínio “*head*” e Ser-389 no domínio “*tail*” (Nakamura et al., 1992, Inagaki et al., 1994, Tsujimura et al., 1994, Sekimata et al., 1996, Middeldorp e Hol, 2011).

Nossos resultados indicam que a hipofosforilação em decorrência da exposição à amônia desloca o equilíbrio para um maior “*pool*” filamentoso, tornando com isso a GFAP mais susceptível à eventual proteólise. A síntese da proteína pode também ser afetada havendo diminuição do mRNA de GFAP após 3 h de início do tratamento com NH<sub>4</sub>Cl (Neary et al., 1994). Um modelo para o papel da fosforilação da GFAP na dinâmica desses filamentos é apresentado na Figura 11 (Takemura et al., 2002).



## Síntese de proteínas



**Figura 11.** Fosforilação da GFAP pode desempenhar um papel duplo. A fosforilação protege da proteólise e contribui para alterar o equilíbrio entre o *pool* solúvel/filamentoso deslocando-o para a esquerda. O maior *pool* de subunidades solúveis e a parcial despolimerização de subunidades filamentosas desencadeada pela fosforilação irá sinergicamente acelerar a plasticidade estrutural dos filamentos gliais. Adaptado de Takemura et al., (2002) e Clairembault et al., (2014).

Outros fatores poderiam contribuir para a hipofosforilação da GFAP, como o aumento na secreção da proteína S100B observado na hiperamonemia (Leite et al., 2006). Frizzo et al., (2004) mostraram que a S100B é capaz de se ligar a sítios de fosforilação na GFAP bloqueando o acesso de proteínas cinases a esses sítios e inibindo a fosforilação.

É descrito que a expressão da GFAP é aumentada em situações relacionadas à astrocitose, tal como em lesões cerebrais, infecção no sistema nervoso central, encefalopatias espongiiformes e na doença de Alzheimer (Takemura et al., 2002). Porém, apesar do nível de GFAP aumentar em numerosas condições neurológicas sua expressão diminuiu na encefalopatia hepática (Neary et al., 1994, Bélanger et al., 2002).

No entanto, no presente estudo não observamos alteração no nível da GFAP *in vitro* em resposta ao  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no tempo de estudo utilizado, porém não descartamos que

uma alteração na imunodeteção da GFAP possa ocorrer em uma exposição mais prolongada ao composto de amônio. A diminuição da fosforilação neste estudo parece representar uma resposta à neurotoxicidade da amônia agindo diretamente sobre as vias de sinalização direcionadas para o sistema fosforilante dos FIs (Figura 11).

### **5.2.2. A HIPOFOSFORILAÇÃO DOS FIs ASTROCITÁRIOS É MEDIADA PELA PP1 E PELA PP2B (CALCINEURINA)**

Através da utilização de inibidores específicos para as diferentes Ser/Thr fosfatases, nossos resultados mostraram que a hipofosforilação dos FIs astrocitários em fatias de córtex cerebral foi mediada pela PP2B (calcineurina) e PP1. A calcineurina (PP2B) é uma proteína fosfatase de resíduos de serina e treonina dependente de  $Ca^{2+}$  e calmodulina (Bodega et al., 2007). A ativação da calcineurina foi previamente relacionada aos efeitos de concentrações tóxicas de amônia. Dethloff et al., (2004) descreveram que a inibição da PP2B com FK506 melhora os sintomas em ratos com anastomose porto-cava e hiperamonemia. Ainda, Bodega et al., (2007) relataram um aumento na expressão da calcineurina em cultura de astrócitos expostos à amônia. A ativação simultânea da PP2B e da PP1 observada em nossos resultados é suportada pela evidência de que a ativação da PP2B desfosforila e inativa um inibidor de outra fosfatase, a PP1, tendo como consequência o aumento na atividade da enzima PP1 (Mulkey et al., 1994). Trabalhos anteriores de nosso grupo e de outros mostram que a GFAP e a VIM são substratos preferenciais tanto da PP1 como da PP2B (Vinadé e Rodnight, 1996, Heimfarth et al., 2012b).

### **5.2.3. A HIPOFOSFORILAÇÃO DOS FIs ASTROCITÁRIOS É MEDIADA POR RECEPTORES NMDA**

Nossos resultados mostraram que a hipofosforilação da GFAP e da VIM em astrócitos de córtex cerebral dos ratos de 21 dias de idade é dependente da sinalização iniciada em receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Os receptores NMDA funcionam como canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por glutamato ou agonistas glutamatérgicos, levando ao aumento transitório de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (VanDongen, 2008). Neste sentido, os nossos resultados, mostrando que a hipofosforilação da GFAP e VIM foi prevenida pelo antagonista NMDA e por quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intra (BAPTA) e extracelular (EGTA), reforçam a dependência dos mecanismos desencadeados pelos receptores NMDA sobre a homeostase do citoesqueleto na toxicidade da amônia. O envolvimento de receptores NMDA nas ações da amônia é largamente descrito na literatura em diferentes modelos experimentais (Felipo e Butterworth, 2002). Em um estudo recente, Haack et al., (2014) evidenciaram que a amônia causa um aumento sustentável no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em astrócitos *in situ*. Esse aumento não foi mimetizado por mudanças no pH, mas sim dependente da ativação de receptores NMDA e da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares. Os autores observaram que a inibição do cotransportador de sódio-potássio-cloro (NKCC), do transportador de sódio/cálcio (NCX), do receptor do ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) ou do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) não atenuaram o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado pela amônia. Em cultura de astrócitos a amônia induz oxidação do mRNA do transportador de glutamato/aspartato (GLAST) sendo reversível e sensível a MK-801 e BAPTA-AM (Görg et al., 2008).

Receptores NMDA em astrócitos têm sido descritos em muitos trabalhos (Conti et al., 1997, SCHIPKE et al., 2001, Lalo et al., 2006, Verkhratsky e Kirchhoff, 2007,

Dzamba et al., 2013). Entretanto, eles exibem propriedades distintas dos receptores NMDA dos neurônios. Os receptores astrocitários não parecem ser sensíveis ao bloqueio por  $Mg^{2+}$  e apresentam uma composição de subunidades diferentes. A permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  é menor comparado aos receptores NMDA de neurônios, porém é próxima a de outros receptores ionotrópicos, como o receptor neuronal nicotínico de acetilcolina (nAChR), P2X1, P2X2 e é maior que a dos receptores kainato e AMPA. A contribuição dos receptores NMDA para o influxo de  $Ca^{2+}$ , em astrócitos corticais, provocada pelo glutamato foi significativa e representou em torno de 50-55% do transiente aumento de  $Ca^{2+}$  (Palygin et al., 2011).

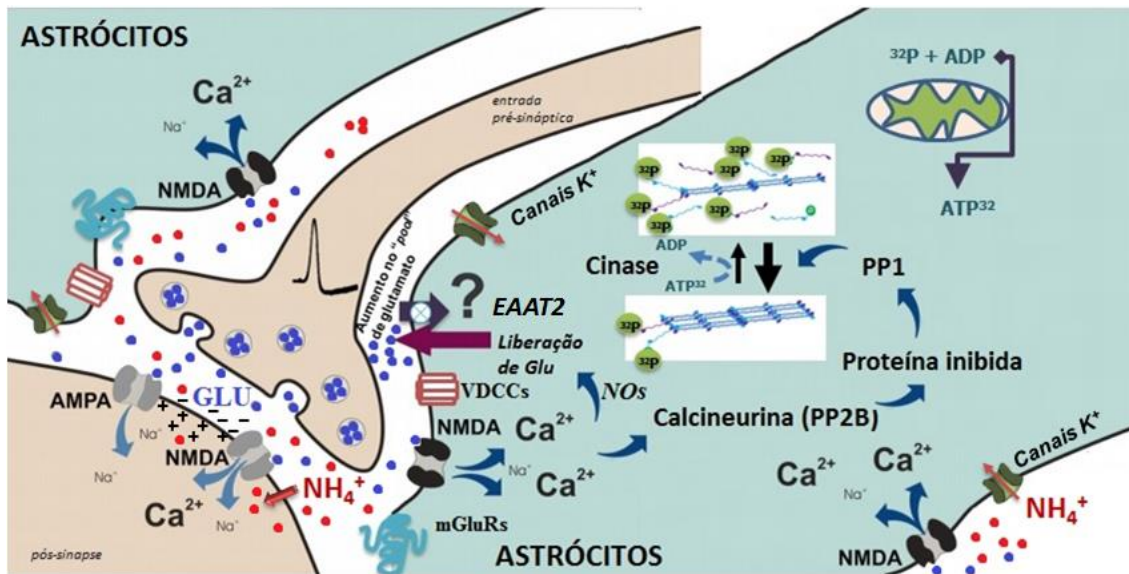
Nos últimos anos têm se estabelecido que a GFAP desempenha um importante papel na modulação do transporte de glutamato astrocítico e neuronal e na função e controle da produção de glutamina (Middeldorp e Hol, 2011). Sullivan et al., (2007) propõem que a GFAP estabiliza as projeções citoplasmáticas de astrócitos e permite a retenção de GLAST na membrana plasmática via uma série de intermediários e proteínas de ligação. Os autores sugerem que qualquer alteração na expressão ou localização intracelular de GFAP poderia influenciar na homeostase do glutamato.

Alterações glutamatérgicas são descritas estar envolvidas nos mecanismos da hiperamonemia. Hermenegildo et al., (2000) observaram que a amônia induz ativação de receptores NMDA. Foi proposto que o aumento de glutamato não é o responsável pela amônia induzir a ativação desses receptores, mas sim a despolarização neuronal provocada pela alta concentração de amônia (Raabe, 1990). Nesse sentido, com a despolarização é possível liberar o  $Mg^{2+}$  do bloqueio de receptores NMDA neuronais e esse evento levaria a sua ativação em concentrações normais de glutamato extracelular. Em cultura de astrócitos o tratamento prolongado com amônia desregula a liberação de

glutamato aumentando-a. A inibição com MK-801, BAPTA-AM e compostos antioxidantes suprimiu o efeito (Ohara et al., 2009).

O desbalanço nas concentrações de  $K^+$  também tem sido relacionado aos efeitos da hiperamonemia. O  $NH_4^+$  acumula intracelularmente em astrócitos via canais de  $K^+$  e uma baixa despolarização foi associada a esse efeito em concentrações muito elevadas de amônia (Allert et al., 1998). Teoricamente, a atividade de receptores de glutamato neuronais pode provocar mudanças na concentração de  $K^+$  extracelular contribuindo para uma corrente interna nos astrócitos por estimulação de vias sinápticas. Entretanto, Palygin et al, (2011) utilizando inibidores específicos demonstrou que os efeitos da corrente sináptica glial envolvem receptores NMDA astrocitários. Uma pequena atividade residual foi atribuída à redistribuição de  $K^+$  extracelular.

Extrapolando os nossos resultados em fatias de córtex cerebral para o cérebro *in vivo* podemos propor que a ação do  $NH_4Cl$  está relacionada à ativação de receptores NMDA por uma despolarização neuronal inicial (desbloqueio íons  $Mg^{2+}$ ) resultando em aumento do impulso nervoso e liberação de glutamato na fenda pré-sináptica. Os receptores NMDA dos astrócitos respondem rapidamente a variações glutamatérgicas por não serem muito sensíveis a  $Mg^{2+}$  ocasionando um aumento no  $Ca^{2+}$  intracelular. Além disso, o  $NH_4^+$  pode entrar via canais de  $K^+$  no astrócito e contribuir para o sinal de elevação de  $Ca^{2+}$ . Decorre que a entrada do  $Ca^{2+}$  ativa a participação de fosfatases como a calcineurina e, posteriormente, a PP1 resultando em hipofosforilação dos FIs. Essa resposta aumentaria o “*pool*” filamentoso e reativo. Somado às conclusões de Hughes et al., (2004) sobre o possível efeito em EAAT2 da GFAP afetando o “*pool*” de glutamato, além de efeitos oxidativos na liberação de glutamato em astrócitos (Görg et al., 2010) propomos um modelo para explicar esses efeitos (Figura 12).



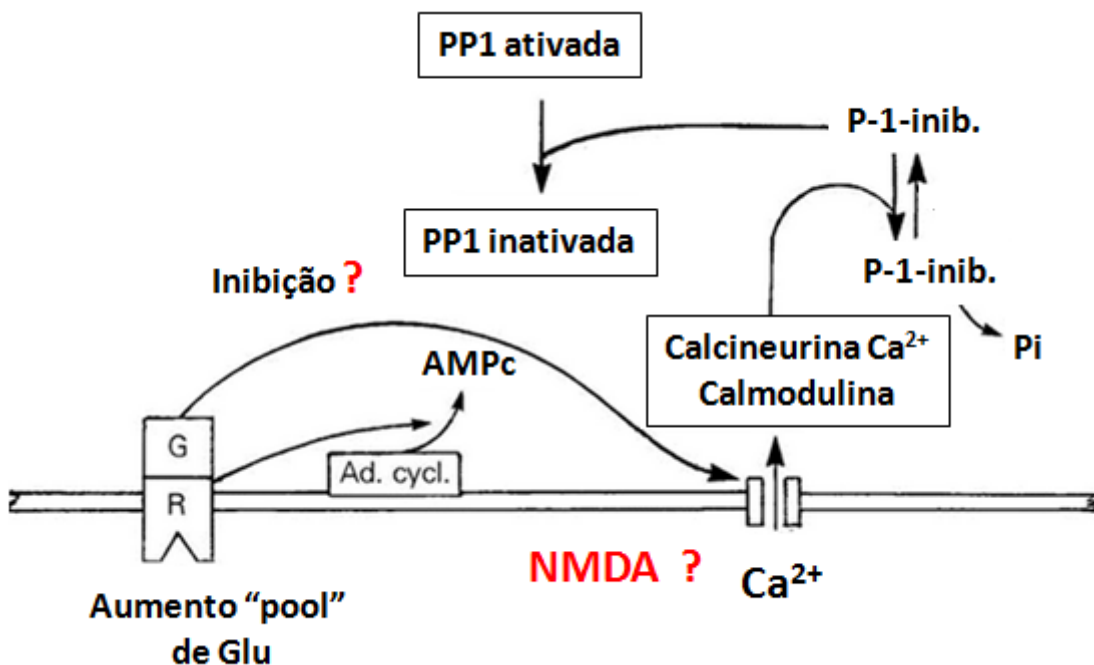
**Figura 12.** O aumento nos níveis de amônio permite o desbloqueio de receptores NMDA neuronais (pela retirada de íons  $Mg^{2+}$ ) provocando ativação desses em concentrações normais de glutamato. Como resultado a um aumento na intensidade do impulso nervoso e uma maior liberação de glutamato pré-sináptica. Receptores NMDA astrocitários são pouco sensíveis ao bloqueio com  $Mg^{2+}$ , portanto, respondem rápido a pequenas variações glutamatérgicas. A ativação induz elevação nos níveis de  $Ca^{2+}$ . Fosfatases sensíveis a essa elevação, como a PP2B e indiretamente PP1, promovem a hipofosforilação dos FIs. Espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (NOs), liberação de glutamato, comprometimento da função EAAT2 e envolvimento de canais de  $K^+$  são apresentados em itálico por terem sido observadas em outros trabalhos. Adaptado de SCHIPKE et al., (2001) e Clairembault et al., (2014).

### 5.3. GLUTAMATO PODERIA SER O RESPONSÁVEL POR RETOMAR OS NÍVEIS NORMAIS DE FOSFORILAÇÃO DO CITOESQUELETO *IN VIVO* APÓS HIPERAMONEMIA AGUDA?

A injeção de acetato de amônio causa inicialmente hipofosforilação (tempo 30 min) possivelmente via receptores NMDA *in vivo* na GFAP e VIM, porém, por um mecanismo de defesa compensatório a fosforilação foi retomada no tempo de 1 h. Uma redução em receptores NMDA e não-NMDA em modelos de falência aguda no fígado pode sugerir um efeito compensatório (Chan e Butterworth, 2003).

Outros receptores podem estar envolvidos nos eventos que desencadeiam a fosforilação dos FIs como receptores mGluR5 que são capazes de aumentar os níveis de

Ca<sup>2+</sup> em astrócitos, porém, tem sua expressão regulada pelo desenvolvimento sendo indetectáveis após a terceira semana pós-natal. Todavia, receptores mGluR3 são expressos em todos os estágios de desenvolvimento (Sun et al., 2013). Estudos com glutamato sobre o estado fosforilante da GFAP em fatias de hipocampo de ratos no período pós-natal 12-16 dias demonstraram haver hiperfosforilação via mGluRs do grupo II (subtipo mGluR3). Foi proposto que a ativação desse receptor inibe a entrada de Ca<sup>2+</sup> em astrócitos e diminui a cascata dependente de Ca<sup>2+</sup> para desfosforilação (Figura 13) (Rodnight et al., 1997).



**Figura 13.** O mecanismo foi proposto por Rodnight et al., (1997). Receptores metabotrópicos do subtipo mGluR3 ativados por glutamato inibem a entrada de Ca<sup>2+</sup> através dos canais de Ca<sup>2+</sup> resultando em inibição de fosfatases (calcineurina e PP1) e hiperfosforilação. Aqui propomos os receptores NMDA sendo inibidos (inibição? NMDA? em vermelho). Isso explicaria porque o aumento na liberação de glutamato na fenda pré-sináptica, posteriormente, retoma os níveis fosforilantes “*in vivo*”.

O mGluR3 é um receptor metabotrópico negativamente acoplado à adenilato-ciclase. A utilização de um agonista de mGluR3 não provoca aumentos de Ca<sup>2+</sup> em astrócitos. Além disso, o mGluR3 induz a expressão das proteínas GLAST e GLT 1

(Aronica et al., 2003) reforçando a idéia de uma neuroproteção ao excesso de glutamato (Durand et al., 2011).

Portanto, o aumento na ativação de receptores NMDA ocorre em concentrações de glutamato inicialmente normais promovendo descarga glutamatérgica que sensibiliza facilmente receptores astrocitários e hipofosforila os FIs astrocitários de forma aguda no córtex cerebral em 30 min. O resultado desse evento é um provável aumento no “*pool*” de glutamato (Figura 12) que pode conduzir a convulsões, coma e morte. Receptores NMDA astrogliais são 25 vezes mais sensíveis ao glutamato que receptores AMPA respondendo de forma rápida (Verkhratsky e Kirchhoff, 2007). O aumento de glutamato na fenda promove excitotoxicidade que, posteriormente, é inibida via NMDA pela ativação de mGluR3 retomando os níveis de fosforilação em 1 h no modelo *in vivo*.



# RESUMO DOS RESULTADOS

---

Os modelos *in vitro* e *in vivo* de hiperamonemia aguda utilizados demonstraram envolvimento do citoesqueleto e, em especial, do sistema fosforilante direcionado para os FIs sobre os efeitos de concentrações tóxicas de amônia no cérebro de ratos em desenvolvimento.

a) O modelo experimental de hiperamonemia aguda (modelo 1) em diferentes tempos, no qual ratos foram agudamente injetados com acetato de amônio (7 mmol/Kg) e sacrificados 30 ou 60 min após a injeção, apresentou alterações nos níveis de fosforilação dos FIs apenas em 30 min. O córtex cerebral apresentou hipofosforilação das proteínas GFAP, VIM, NF-L, NF-M e NF-H em ratos de 21 dias. Por outro lado, o córtex cerebral de animais de 10 dias e o hipocampo em ambas as idades não foram afetados. Os efeitos do acetato de amônio sobre os FIs são, portanto, dependentes de fatores como idade, estrutura cerebral e tempo de recuperação dos animais no experimento.

b) No modelo 2 *in vitro*, fatias de córtex cerebral de ratos de 21 dias incubadas com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM apresentaram hipofosforilação de GFAP e VIM. Além disso, o hipocampo de animais de 10 dias também apresentou diminuição na fosforilação da GFAP, VIM e NF-L. O sistema fosforilante associado aos FIs de córtex cerebral dos animais de 10 dias e hipocampo de animais de 21 dias não apresentou diferenças significativas com relação às fatias de tecido de animais controles.

c) Através de inibidores específicos de proteínas fosfatases em córtex cerebral de ratos de 21 dias demonstramos que a hipofosforilação dos FIs astrocitários causada pelo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM está associado à ativação das fosfatases PP1 e PP2B, sem envolvimento da fosfatase PP2A.

d) As ações do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM foram dependentes da sinalização glutamatérgica via receptores NMDA e dos níveis intra e extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem tipo L não estão associados aos efeitos do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre o citoesqueleto.

e) O imunocnteúdo dos FIs, analisado por *Western blot* com anticorpos monoclonais dirigidos para GFAP e VIM, mostrou que o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM não causou alteração no nível dessas proteínas nas nossas condições experimentais.

f) Testes de integridade (LDH) e viabilidade (MTT) celular das células neurais de córtex cerebral e hipocampo, tanto no tratamento *in vivo* como no *in vitro*, nas diferentes idades mostraram que não houve alteração nesses parâmetros.

# CONCLUSÃO

---

A toxicidade da amônia no SNC tem sido descrita em inúmeros trabalhos, apesar disso, ainda compreendemos pouco sobre seus efeitos no citoesqueleto. Os FIs demonstraram ser um dos alvos das alterações desencadeadas pela amônia por meio de perturbações na homeostase do seu sistema fosforilante. A hipofosforilação foi a modificação pós-traducional observada neste estudo sendo dependente da idade dos animais, da estrutura cerebral, da concentração de amônia utilizada entre outros fatores que são variáveis dos modelos estudados.

A presença de uma resposta desfosforilante nos FIs, tanto gliais quanto neuronais, afeta suas propriedades bioquímicas resultando em alterações de solubilidade, maior suscetibilidade proteolítica e prejuízo na interação com proteínas. Vias de sinalização como a glutamatérgica, por meio de receptores NMDA, regulam a dinâmica dos FIs no tecido cerebral. Uma disfunção no citoesqueleto pode sublinhar os efeitos da hiperamonemia no cérebro contribuindo assim para os efeitos neurotóxicos da amônia.

# REFERÊNCIAS

---

- Aguilar MA, Miñarro J, Felipo V (Chronic Moderate Hyperammonemia Impairs Active and Passive Avoidance Behavior and Conditional Discrimination Learning in Rats. *Experimental neurology* 161:704-713.2000).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments.2002).
- Albrecht J (2007) 12 Ammonia Toxicity in the Central Nervous System. In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology(Lajtha, A. et al., eds), pp 261-276: Springer US.
- Albrecht J, Norenberg MD (Glutamine: A Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44:788-794.2006).
- Allert N, Köller H, Siebler M (Ammonia-induced depolarization of cultured rat cortical astrocytes. *Brain Research* 782:261-270.1998).
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T (Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* 117:699-711.2004).
- Andersson A, Adermark L, Persson M, Westerlund A, Olsson T, Hansson E (Lactate Contributes to Ammonia-Mediated Astroglial Dysfunction During Hyperammonemia. *Neurochem Res* 34:556-565.2009).
- Andreeva AV, Kutuzov MA (PPP Family of Protein Ser/Thr Phosphatases: Two Distinct Branches? *Molecular Biology and Evolution* 18:448-452.2001).
- Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D (Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *European Journal of Neuroscience* 17:2106-2118.2003).
- Bachmann C (Outcome and survival of 88 patients with urea cycle disorders: a retrospective evaluation. *Eur J Pediatr* 162:410-416.2003).
- Back A, Tupper KY, Bai T, Chirand P, Goldenberg FD, Frank JI, Brorson JR (Ammonia-induced brain swelling and neurotoxicity in an organotypic slice model. *Neurological research* 33:1100-1108.2011).
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry* 98:641-653.2006).
- Bélangier M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF (Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochemistry International* 41:155-160.2002).
- Bjerring P, Dale N, Larsen F (Acute Hyperammonemia and Systemic Inflammation is Associated with Increased Extracellular Brain Adenosine in Rats: A Biosensor Study. *Neurochem Res* 40:258-264.2015).
- Blanke M, VanDongen A (Activation mechanisms of the NMDA receptor.2009).
- Bodega G, Suárez I, Paniagua C, Vacas E, Fernández B (Effect of ammonia, glutamine, and serum on calcineurin, p38MAPK-diP, GADD153/CHOP10, and CNTF in primary rat astrocyte cultures. *Brain Research* 1175:126-133.2007).
- Braissant O (Neurofilament proteins in brain diseases. New research on neurofilament proteins Nova Science Publishers 25-51.2007).
- Braissant O (Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* 100, Supplement:S3-S12.2010).

- Braissant O, Henry H, Villard A-M, Zurich M-G, Loup M, Eilers B, Parlascino G, Matter E, Boulat O, Honegger P, Bachmann C (Ammonium-Induced Impairment of Axonal Growth Is Prevented through Glial Creatine. *The Journal of Neuroscience* 22:9810-9820.2002).
- Braissant O, McLin V, Cudalbu C (Ammonia toxicity to the brain. *J Inherit Metab Dis* 1-18.2012).
- Bromberg PA, Robin ED, Forkner CE (THE EXISTENCE OF AMMONIA IN BLOOD IN VIVO WITH OBSERVATIONS ON THE SIGNIFICANCE OF THE  $\text{NH}_4^+$ — $\text{NH}_3$  SYSTEM \*. *The Journal of Clinical Investigation* 39:332-341.1960).
- Brusilow S, Traystman R (Hepatic encephalopathy. *The New England journal of medicine* 314:786-787; author reply 787.1986).
- Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJL (Astrocyte Glutamine Synthetase: Importance in Hyperammonemic Syndromes and Potential Target for Therapy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7:452-470.2010).
- Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT, Members of the ICoEMoHE (Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International* 29:783-788.2009).
- Caesar J (Levels of glutamine and ammonia and the pH of cerebrospinal fluid and plasma in patients with liver disease. *Clinical science* 22:33-41.1962).
- Cagnon L, Braissant O (Hyperammonemia-induced toxicity for the developing central nervous system. *Brain Research Reviews* 56:183-197.2007).
- Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipo V (Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *Journal of Hepatology* 45:654-661.2006).
- Cauli O, Mansouri MT, Agusti A, Felipo V (Hyperammonemia Increases GABAergic Tone in the Cerebellum but Decreases It in the Rat Cortex. *Gastroenterology* 136:1359-1367.e1352.2009).
- Chan H, Butterworth RF (Cell-selective effects of ammonia on glutamate transporter and receptor function in the mammalian brain. *Neurochemistry International* 43:525-532.2003).
- Chang L, Goldman RD (Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:601-613.2004).
- Chatauret N, Zwingmann C, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF (Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: A  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 125:815-824.2003).
- Chen J-R, Wang B-N, Tseng G-F, Wang Y-J, Huang Y-S, Wang T-J (Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. *BMC neuroscience* 15:15.2014).
- Cheng T-J, Lin Y-L, Chiang A-S, Lai Y-K (Association of protein phosphatase 2A with its substrate vimentin intermediate filaments in 9L rat brain tumor cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 79:126-138.2000).
- Chepkova AN, Selbach O, Haas HL, Sergeeva OA (Ammonia-induced deficit in corticostriatal long-term depression and its amelioration by zaprinast. *Journal of Neurochemistry* 122:545-556.2012).
- Choi JM, Kim YH, Roh SY (Acute Hepatic Encephalopathy Presenting as Cortical Laminal Necrosis: Case Report. *Korean Journal of Radiology* 14:324-328.2013).
- Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, Hol EM, Derkinderen P (Enteric GFAP expression and

- phosphorylation in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 130:805-815.2014).
- Conde C, Caceres A (Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319-332.2009).
- Conti F, Minelli A, DeBiasi S, Melone M (Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol Neurobiol* 14:1-18.1997).
- Cooper AJ, Plum F (1987) *Biochemistry and physiology of brain ammonia*.
- Cooper AL (Possible treatment of end-stage hyperammonemic encephalopathy by inhibition of glutamine synthetase. *Metab Brain Dis* 28:119-125.2013).
- Cooper GM (Intermediate Filaments.2000a).
- Cooper GM (Structure and organization of actin filaments.2000b).
- Cordoba J, Crespin J, Gottstein J, Blei AT (Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 116:686-693.1999).
- Coulombe PA, Wong P (Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6:699-706.2004).
- D'Ascenzo M, Vairano M, Andreassi C, Navarra P, Azzena GB, Grassi C (Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R-(Cav2.3) type Ca<sup>2+</sup> channels in rat cortical astrocytes. *Glia* 45:354-363.2004).
- de Almeida L, Funchal C, Pelaez PL, Pessutto F, Loureiro S, Vivian L, Wajner M, Pessoa-Pureur R (Effect of Propionic and Methylmalonic Acids on the in Vitro Phosphorylation of Intermediate Filaments from Cerebral Cortex of Rats During Development. *Metab Brain Dis* 18:207-219.2003).
- de Waegh SM, Lee VMY, Brady ST (Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68:451-463.1992).
- Deignan JL, Cederbaum SD, Grody WW (Contrasting Features of Urea Cycle Disorders in Human Patients and Knockout Mouse Models. *Molecular Genetics and Metabolism* 93:7-14.2008).
- DeMars R, LeVan SL, Trend BL, Russell LB (Abnormal ornithine carbamoyltransferase in mice having the sparse-fur mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:1693-1697.1976).
- DePianto D, Coulombe PA (Intermediate filaments and tissue repair. *Experimental Cell Research* 301:68-76.2004).
- Dethloff T, Hansen BA, Larsen FS (Tacrolimus ameliorates cerebral vasodilatation and intracranial hypertension in the rat with portacaval anastomosis and hyperammonemia. *Liver Transplantation* 10:922-927.2004).
- DiProspero N, Chen E-Y, Charles V, Plomann M, Kordower J, Tagle D (Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J Neurocytol* 33:517-533.2004).
- Durand D, Carniglia L, Caruso C, Lasaga M (Reduced cAMP, Akt Activation and p65-c-Rel Dimerization: Mechanisms Involved in the Protective Effects of mGluR3 Agonists in Cultured Astrocytes. *PLoS ONE* 6:e22235.2011).
- Dzamba D, Honsa P, Anderova M (NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Current Neuropharmacology* 11:250-262.2013).
- Eid T, Lee T-SW (Reassessing the role of astrocytes in ammonia neurotoxicity. *Nat Med* 19:1572-1574.2013).

- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold C-H, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M (Intermediate Filament Protein Partnership in Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 274:23996-24006.1999).
- ElMili N, Boix J, Ahabrach H, Rodrigo R, Errami M, Felipo V (Chronic hyperammonemia induces tonic activation of NMDA receptors in cerebellum. *Journal of Neurochemistry* 112:1005-1014.2010).
- Eng LF (Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology* 8:203-214.1985).
- Enns GM (Neurologic Damage and Neurocognitive Dysfunction in Urea Cycle Disorders. *Seminars in Pediatric Neurology* 15:132-139.2008).
- Felipo V (Contribution of altered signal transduction associated to glutamate receptors in brain to the neurological alterations of hepatic encephalopathy. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 12:7737-7743.2006).
- Felipo V (2009) Hyperammonemia. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*(Lajtha, A. et al., eds), pp 43-69: Springer US.
- Felipo V, Butterworth RF (Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology* 67:259-279.2002).
- Felipo V, Grau E, Miñana M-D, Grisolia S (Hyperammonemia decreases protein-kinase-C-dependent phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and increases its binding to tubulin. *European Journal of Biochemistry* 214:243-249.1993).
- Felipo V, Miñana M-D, Grisolia S (Hyperammonemia induces polymerization of brain tubulin. *Neurochem Res* 15:945-948.1990).
- Ferraro TN, Hare TA (Triple-column ion-exchange physiological amino acid analysis with fluorescent detection: Baseline characterization of human cerebrospinal fluid. *Analytical Biochemistry* 143:82-94.1984).
- Fletcher DA, Mullins RD (Cell mechanics and the cytoskeleton. *nature* 463:485-492.2010).
- Flint Beal M, Martin J (Major complications of cirrhosis. *Harrison's principles of internal medicine*, 14th edn McGraw-Hill, New-York 2451-2457.1998).
- Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Gonçalves C-A (S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res* 29:735-740.2004).
- Fuchs E, Cleveland DW (A Structural Scaffolding of Intermediate Filaments in Health and Disease. *Science* 279:514-519.1998).
- Funchal C, de Almeida LMV, Oliveira Loureiro S, Vivian L, de Lima Pelaez P, Dall Bello Pessutto F, Rosa AM, Wajner M, Pessoa Pureur R (In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain research protocols* 11:111-118.2003).
- Giordano G, Costa LG (Developmental Neurotoxicity: Some Old and New Issues. *ISRN Toxicology* 2012:12.2012).
- Girault J-A (Protein phosphorylation and dephosphorylation in mammalian central nervous system. *Neurochemistry International* 23:1-25.1993).
- Goedert M, Spillantini MG, Davies SW (Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology* 8:619-632.1998).
- Goldstein ME, Sternberger NH, Sternberger LA (Phosphorylation protects neurofilaments against proteolysis. *Journal of neuroimmunology* 14:149-160.1987).

- Görg B, Morwinsky A, Keitel V, Qvartskhava N, Schrör K, Häussinger D (Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* 58:691-705.2010).
- Görg B, Qvartskhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D (Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48:567-579.2008).
- Grant P, Sharma P, Pant HC (Cyclin-dependent protein kinase 5 (Cdk5) and the regulation of neurofilament metabolism. *European Journal of Biochemistry* 268:1534-1546.2001).
- Gropman AL, Batshaw ML (Cognitive outcome in urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* 81, Supplement:58-62.2004).
- Gropman AL, Summar M, Leonard JV (Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis* 30:865-879.2007).
- Guharoy M, Szabo B, Martos SC, Kosol S, Tompa P (Intrinsic Structural Disorder in Cytoskeletal Proteins. *Cytoskeleton* 70:550-571.2013).
- Haack N, Dublin P, Rose CR (Dysbalance of Astrocyte Calcium under Hyperammonemic Conditions. *PLoS ONE* 9:e105832.2014).
- Häussinger D, Schliess F (Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International* 47:64-70.2005).
- Heimfarth L, Loureiro SO, Dutra MF, Andrade C, Pettenuzzo L, Guma FTCT, Gonçalves CAS, da Rocha JBT, Pessoa-Pureur R (In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: Implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* 264:143-152.2012a).
- Heimfarth L, Loureiro SO, Dutra MF, Petenuzzo L, de Lima BO, Fernandes CG, da Rocha JBT, Pessoa-Pureur R (Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. *NeuroToxicology* 34:175-188.2013).
- Heimfarth L, Loureiro SO, Reis KP, de Lima BO, Zamboni F, Gandolfi T, Narvaes R, da Rocha JoBT, Pessoa-Pureur R (Cross-talk among intracellular signaling pathways mediates the diphenyl ditelluride actions on the hippocampal cytoskeleton of young rats. *Chemical Research in Toxicology* 24:1754-1764.2011).
- Heimfarth L, Loureiro SO, Reis KP, de Lima BO, Zamboni F, Lacerda S, Soska ÂK, Wild L, da Rocha JBT, Pessoa-Pureur R (Diphenyl ditelluride induces hypophosphorylation of intermediate filaments through modulation of DARPP-32-dependent pathways in cerebral cortex of young rats. *Archives of toxicology* 86:217-230.2012b).
- Heimfarth L, Loureiro SO, Zamoner A, Pelaez PdL, Nogueira CW, Rocha JBTd, Pessoa-Pureur R (Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. *NeuroToxicology* 29:40-47.2008).
- Helfand BT, Chang L, Goldman RD (Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *Journal of Cell Science* 117:133-141.2004).
- Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Miñana M-D, Felipo V (NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res* 21:1237-1244.1996).
- Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V (Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: Characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 31:709-715.2000).



- Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U (Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:562-573.2007).
- Hol EM, Pekny M (Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology* 32:121-130.2015).
- Holecek M (Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: Effects of variables leading to hepatic encephalopathy. *Nutrition* 31:14-20.2015).
- Horio T, Murata T (The role of dynamic instability in microtubule organization. *Frontiers in Plant Science* 5:511.2014).
- Huber F, Schnauß J, Rönicke S, Rauch P, Müller K, Fütterer C, Käs J (Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Advances in Physics* 62:1-112.2013).
- Hughes EG, Maguire JL, McMinn MT, Scholz RE, Sutherland ML (Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. *Molecular Brain Research* 124:114-123.2004).
- Huizenga JR, Teelken AW, Tangerman A, Jager AEJ, Gips CH, Jansen PLM (Determination of ammonia in cerebrospinal fluid using the indophenol direct method. *Molecular and Chemical Neuropathology* 34:169-177.1998).
- Inagaki M, Imakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N (Glial Fibrillary Acidic Protein: Dynamic Property and Regulation by Phosphorylation. *Brain Pathology* 4:239-243.1994).
- Ivaska J, Pallari H-M, Nevo J, Eriksson JE (Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental Cell Research* 313:2050-2062.2007).
- Izawa I, Inagaki M (Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science* 97:167-174.2006).
- Julien J-P (Neurofilament functions in health and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 9:554-560.1999).
- Julien J-P, Mushynski WE (Neurofilaments in health and disease. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 61:1-23.1998).
- Kameyama K, Lee H-K, Bear MF, Huganir RL (Involvement of a Postsynaptic Protein Kinase A Substrate in the Expression of Homosynaptic Long-Term Depression. *Neuron* 21:1163-1175.1998).
- Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM (The Role of Vimentin Intermediate Filaments in the Progression of Lung Cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 50:1-6.2014).
- Kim S, Coulombe PA (Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes & development* 21:1581-1597.2007).
- Klose J, Goerg B, Berndt C, Häussinger D, Aktas O, Prozorovski T (Protein oxidative damage in the hippocampus in a mouse model of acute hyperammonemia. *European Journal of Medical Research* 19:S29-S29.2014).
- Koliatsos VE, Applegate MD, Kitt CA, Walker LC, DeLong MR, Price DL (Aberrant phosphorylation of neurofilaments accompanies transmitter-related changes in rat septal neurons following transection of the fimbria-fornix. *Brain Research* 482:205-218.1989).

- Kosenko E, Felipo V, Montoliu C, Grisolia S, Kaminsky Y (Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis* 12:69-82.1997).
- Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V (Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1369-1374.1999).
- Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana M-D, Marcaida G, Grisolia S, Felipo V (Brain ATP Depletion Induced by Acute Ammonia Intoxication in Rats Is Mediated by Activation of the NMDA Receptor and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Neurochemistry* 63:2172-2178.1994).
- Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Sánchez-Perez AM, Felipo V (Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochemistry International* 43:493-499.2003).
- Laemmli UK (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227:680-685.1970).
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A (NMDA Receptors Mediate Neuron-to-Glia Signaling in Mouse Cortical Astrocytes. *The Journal of Neuroscience* 26:2673-2683.2006).
- Lazarides E (Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annual review of biochemistry* 51:219-250.1982).
- Leite MC, Brolese G, de Almeida LMV, Piñero CC, Gottfried C, Gonçalves C-A (Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain research bulletin* 70:179-185.2006).
- Liu R, Zhou XW, Tanila H, Bjorkdahl C, Wang JZ, Guan ZZ, Cao Y, Gustafsson JÅ, Winblad B, Pei JJ (Phosphorylated PP2A (tyrosine 307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12:241-257.2008).
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry* 69:581-593.1997).
- Llansola M, Montoliu C, Cauli O, Hernández-Rabaza V, Agustí A, Cabrera-Pastor A, Giménez-Garzó C, González-Usano A, Felipo V (Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations. *Metab Brain Dis* 28:151-154.2013).
- Llansola M, Rodrigo R, Monfort P, Montoliu C, Kosenko E, Cauli O, Piedrafita B, El Mlili N, Felipo V (NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22:321-335.2007).
- Lockwood AH, McDonald JM, Reiman RE, Gelbard AS, Laughlin JS, Duffy TE, Plum F (The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *The Journal of Clinical Investigation* 63:449-460.1979).
- Lohmann C, Kessels HW (The developmental stages of synaptic plasticity. *The Journal of Physiology* 592:13-31.2014).
- Loureiro S, Heimfarth L, Lacerda B, Vidal L, Soska A, dos Santos N, de Souza Wyse A, Pessoa-Pureur R (Homocysteine Induces Hypophosphorylation of Intermediate Filaments and Reorganization of Actin Cytoskeleton in C6 Glioma Cells. *Cell Mol Neurobiol* 30:557-568.2010).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem* 193:265-275.1951).

- Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA (Metabolic Abnormalities and Grade of Encephalopathy in Acute Hepatic Failure. *Journal of Neurochemistry* 63:1829-1838.1994).
- Marcaggi Pk, Coles JA (Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Progress in Neurobiology* 64:157-183.2001).
- Mc Guire PJ, Lee H-S, members of the Urea Cycle Disorders C, Summar M (Infectious precipitants of acute hyperammonemia are associated with indicators of increased morbidity in patients with Urea Cycle Disorders. *The Journal of pediatrics* 163:1705-1710.e1701.2013).
- McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A (Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6361-6366.1996).
- Middeldorp J (Astrocytes in development, aging and disease: starring GFAP.2010).
- Middeldorp J, Hol EM (GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 93:421-443.2011).
- Mielke K, Herdegen T (JNK and p38 stresskinases — degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 61:45-60.2000).
- Miller C, Ackerley S, Brownlees J, Grierson A, Jacobsen N, Thornhill P (Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 59:323-330.2002).
- Monfort P, Montoliu C, Hermenegildo C, Muñoz Ma-D, Felipe V (Differential effects of acute and chronic hyperammonemia on signal transduction pathways associated to NMDA receptors. *Neurochemistry International* 37:249-253.2000).
- Monfort P, Muñoz M-D, ElAyadi A, Kosenko E, Felipe V (Effects of Hyperammonemia and Liver Failure on Glutamatergic Neurotransmission. *Metab Brain Dis* 17:237-250.2002).
- Moorhead GBG, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A (Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:234-244.2007).
- Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED (Neurologic Outcome in Children with Inborn Errors of Urea Synthesis. *New England Journal of Medicine* 310:1500-1505.1984).
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *nature* 369:486-488.1994).
- MURPHY S, PEARCE BR (16 Second messenger systems. *Neuroglia* 216.2005).
- Murthy CRK, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD (Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of neuroscience research* 66:282-288.2001).
- Mustelin T, Vang T, Bottini N (Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol* 5:43-57.2005).
- Nakamura Y, Takeda M, Aimoto S, Hojo H, Takao T, Shimonishi Y, Hariguchi S, Nishimura T (Assembly regulatory domain of glial fibrillary acidic protein: A single phosphorylation diminishes its assembly-accelerating property. *Journal of Biological Chemistry* 267:23269-23274.1992).

- Neary JT, Whittemore SR, Zhu Q, Norenberg MD (Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *Journal of Neurochemistry* 63:2021-2027.1994).
- Nixon RA, Sihag RK (Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends in Neurosciences* 14:501-506.1991).
- Norenberg MD, Rao KVR, Jayakumar AR (Mechanisms of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. *Metab Brain Dis* 20:303-318.2005).
- O'Callaghan JP (A potential role for altered protein phosphorylation in the mediation of developmental neurotoxicity. *NeuroToxicology* 15:29-40.1993).
- Ohara K, Aoyama M, Fujita M, Sobue K, Asai K (Prolonged exposure to ammonia increases extracellular glutamate in cultured rat astrocytes. *Neuroscience Letters* 462:109-112.2009).
- Omary MB ("IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 119:1756-1762.2009).
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WHI (Intermediate Filament Proteins and Their Associated Diseases. *New England Journal of Medicine* 351:2087-2100.2004).
- Omary MB, Ku N-O, Tao G-Z, Toivola DM, Liao J ('Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends in Biochemical Sciences* 31:383-394.2006).
- Oshima RG (Intermediate filaments: A historical perspective. *Experimental Cell Research* 313:1981-1994.2007).
- Palygin O, Lalo U, Pankratov Y (Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *British Journal of Pharmacology* 163:1755-1766.2011).
- Pant H (Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J* 256:665-668.1988).
- Paramio JM, Jorcano JL (Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *BioEssays* 24:836-844.2002).
- Pessoa-Pureur R, Heimfarth L, Rocha JB (Signaling Mechanisms and Disrupted Cytoskeleton in the Diphenyl Ditelluride Neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014:458601.2014).
- Petzold A (Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain Research* 1600:17-31.2015).
- Pierozan P, Fernandes CG, Dutra MF, Pandolfo P, Ferreira F, de Lima BO, Porciúncula L, Wajner M, Pessoa-Pureur R (Biochemical, histopathological and behavioral alterations caused by intrastriatal administration of quinolic acid to young rats. *FEBS Journal* 281:2061-2073.2014a).
- Pierozan P, Gonçalves Fernandes C, Ferreira F, Pessoa-Pureur R (Acute intrastriatal injection of quinolinic acid provokes long-lasting misregulation of the cytoskeleton in the striatum, cerebral cortex and hippocampus of young rats. *Brain Research* 1577:1-10.2014b).
- Pierozan P, Zamoner A, Soska ÂK, de Lima BO, Reis KP, Zamboni F, Wajner M, Pessoa-Pureur R (Signaling mechanisms downstream of quinolinic acid targeting the cytoskeleton of rat striatal neurons and astrocytes. *Experimental neurology* 233:391-399.2012).
- Qureshi IA, Letarte J, Ouellet R (Ornithine Transcarbamylase Deficiency in Mutant Mice I. Studies on the Characterization of Enzyme Defect and Suitability as Animal Model of Human Disease. *Pediatr Res* 13:807-811.1979).
- Qureshi IA, Rao KVR (1997) Sparse-Fur (spf) Mouse as a Model of Hyperammonemia: Alterations in the Neurotransmitter Systems. In: *Advances in Cirrhosis*,

- Hyperammonemia, and Hepatic Encephalopathy, vol. 420 (Felipo, V. and Grisolia, S., eds), pp 143-158: Springer US.
- Raabe W (1990) Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on the Function of the CNS. In: Cirrhosis, Hepatic Encephalopathy, and Ammonium Toxicity, vol. 272 (Grisolia, S. et al., eds), pp 99-120: Springer US.
- Raabe W (1993) Effects of Hyperammonemia on Neuronal Function: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, IPSP and Cl<sup>-</sup>-Extrusion. In: Cirrhosis, Hyperammonemia, and Hepatic Encephalopathy, vol. 341 (Grisolia, S. and Felipo, V., eds), pp 71-82: Springer US.
- Ramaekers FCS, Bosman FT (The cytoskeleton and disease. *The Journal of Pathology* 204:351-354.2004).
- Rangroo Thrane V, Thrane AS, Wang F, Cotrina ML, Smith NA, Chen M, Xu Q, Kang N, Fujita T, Nagelhus EA, Nedergaard M (Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nat Med* 19:1643-1648.2013).
- Rao KVR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (Astrocytes Protect Neurons from Ammonia Toxicity. *Neurochem Res* 30:1311-1318.2005).
- Ratnakumari L, Qureshi IA, Butterworth RF (Effects of congenital hyperammonemia on the cerebral and hepatic levels of the intermediates of energy metabolism in spf mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184:746-751.1992).
- Robinson MB, Heyes MP, Anegawa NJ, Gorry E, Djali S, Mellits ED, Batshaw ML (Quinolate in Brain and Cerebrospinal Fluid in Rat Models of Congenital Hyperammonemia. *Pediatr Res* 32:483-488.1992).
- Rodnight R, Goncalves C, Wofchuk S, Leal R (Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Brazilian journal of medical and biological research* 30:325-338.1997).
- Rodrigo R, Cauli O, Boix J, ElMlili N, Agusti A, Felipo V (Role of NMDA receptors in acute liver failure and ammonia toxicity: Therapeutical implications. *Neurochemistry International* 55:113-118.2009).
- Rose C, Michalak A, Pannunzio M, Chatauret N, Rambaldi A, Butterworth RF (Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* 31:872-877.2000).
- Rose C, Michalak A, Pannunzio P, Therrien G, Quack G, Kircheis G, Butterworth RF (L-ornithine-L-aspartate in experimental portal-systemic encephalopathy: therapeutic efficacy and mechanism of action. *Metab Brain Dis* 13:147-157.1998).
- Satelli A, Li S (Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 68:3033-3046.2011).
- SCHIPKE CG, OHLEMEYER C, MATYASH M, NOLTE C, KETTENMANN H, KIRCHHOFF F (Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-d-aspartate receptors. *The FASEB Journal* 15:1270-1272.2001).
- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D (Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *The FASEB Journal*.2002).

- Scott TR, Kronsten VT, Hughes RD, Shawcross DL (Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure. *World Journal of Gastroenterology* : WJG 19:9240-9255.2013).
- Sekimata M, Tsujimura K, Tanaka J, Takeuchi Y, Inagaki N, Inagaki M (Detection of protein kinase activity specifically activated at metaphase-anaphase transition. *Journal of Cell Biology* 132:635-641.1996).
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC (Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Experimental Cell Research* 313:2098-2109.2007).
- Skowrońska M, Albrecht J (Alterations of Blood Brain Barrier Function in Hyperammonemia: An Overview. *Neurotoxicity Research* 21:236-244.2012).
- Snider NT, Omary MB (Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:163-177.2014).
- Song QZ, Lavin MF (Calyculin A, a Potent Inhibitor of Phosphatase-1 and -2A, Prevents Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190:47-55.1993).
- Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, Reynolds I, Klann E, Angiolieri MR, Johnson JW (Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *Journal of Biological Chemistry* 275:12200-12206.2000).
- Strack S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ (Differential Inactivation of Postsynaptic Density-Associated and Soluble Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II by Protein Phosphatases 1 and 2A. *Journal of Neurochemistry* 68:2119-2128.1997).
- Sullivan SM, Lee A, Björkman ST, Miller SM, Sullivan RKP, Poronnik P, Colditz PB, Pow DV (Cytoskeletal Anchoring of GLAST Determines Susceptibility to Brain Damage: AN IDENTIFIED ROLE FOR GFAP. *Journal of Biological Chemistry* 282:29414-29423.2007).
- Summar ML, Dobbelaere D, Brusilow S, Lee B (Diagnosis, Symptoms, Frequency and Mortality of 260 Patients with Urea Cycle Disorders from a 21-Year, Multicentre Study of Acute Hyperammonaemic Episodes. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992) 97:1420-1425.2008).
- Sun H, Wang Y (Novel Ser/Thr Protein Phosphatases in Cell Death Regulation. *Physiology* (Bethesda, Md) 27:10.1152/physiol.00034.02011.2012).
- Sun W, McConnell E, Pare J-F, Xu Q, Chen M, Peng W, Lovatt D, Han X, Smith Y, Nedergaard M (Glutamate-Dependent Neuroglial Calcium Signaling Differs Between Young and Adult Brain. *Science* 339:197-200.2013).
- Swain M, Butterworth RF, Blei AT (Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15:449-453.1992).
- Takanashi J-i, Barkovich AJ, Cheng SF, Kostiner D, Baker JC, Packman S (Brain MR Imaging in Acute Hyperammonemic Encephalopathy Arising from Late-Onset Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *American Journal of Neuroradiology* 24:390-393.2003).
- Takemura M, Gomi H, Colucci-Guyon E, Itohara S (Protective Role of Phosphorylation in Turnover of Glial Fibrillary Acidic Protein in Mice. *The Journal of Neuroscience* 22:6972-6979.2002).
- Thomson A, Bonham C, Zeevi A (Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Therapeutic drug monitoring* 17:584-591.1995).

- Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB (Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in Cell Biology* 20:79-91.2010).
- Toivola DM, Tao G-Z, Habtezion A, Liao J, Omary MB (Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in Cell Biology* 15:608-617.2005).
- Trout J, Lu C, Goldstone AD, Sahgal S (Polyamines and NMDA receptors modulate pericapillary astrocyte swelling following cerebral cryo-injury in the rat. *J Neurocytol* 24:341-346.1995).
- Tsujimura K, Tanaka J, Ando S, Matsuoka Y, Kusubata M, Sugiura H, Yamauchi T, Inagaki M (Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein for cdc2 kinase and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Biochemistry* 116:426-434.1994).
- Tuchman M, Lee B, Lichter-Konecki U, Summar ML, Yudkoff M, Cederbaum SD, Kerr DS, Diaz GA, Seashore MR, Lee H-S, McCarter RJ, Krischer JP, Batshaw ML (Cross-sectional multicenter study of patients with urea cycle disorders in the United States. *Molecular Genetics and Metabolism* 94:397-402.2008a).
- Tuchman M, Lee B, Lichter-Konecki U, Summar ML, Yudkoff M, Cederbaum SD, Kerr DS, Diaz GA, Seashore MR, Lee HS, McCarter RJ, Krischer JP, Batshaw ML (Cross-sectional multicenter study of patients with urea cycle disorders in the United States. *Molecular Genetics and Metabolism* 94:397-402.2008b).
- U-King-Im JM, Yu E, Bartlett E, Soobrah R, Kucharczyk W (Acute Hyperammonemic Encephalopathy in Adults: Imaging Findings. *American Journal of Neuroradiology* 32:413-418.2011).
- Ubersax JA, Ferrell Jr JE (Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:530-541.2007).
- Uchino T, Endo F, Matsuda I (Neurodevelopmental outcome of long-term therapy of urea cycle disorders in Japan. *J Inherit Metab Dis* 21:151-159.1998).
- VanDongen AM (2008) *Biology of the NMDA receptor*: CRC Press.
- Veres G, Gibbs R, Scherer S, Caskey C (The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237:415-417.1987).
- Verkhatsky A, Kirchhoff F (NMDA Receptors in Glia. *The Neuroscientist* 13:28-37.2007).
- Vinadé L, Rodnight R (The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. *Brain Research* 732:195-200.1996).
- Walsh AH, Cheng A, Honkanen RE (Fostriecin, an antitumor antibiotic with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases types 1 (PP1) and 2A (PP2A), is highly selective for PP2A. *FEBS Letters* 416:230-234.1997).
- Watson A, Karp J, Gordon Walker W, Chambers T, Risch V, Brusilow S (TRANSIENT IDIOPATHIC HYPERAMMONAEMIA IN ADULTS. *The Lancet* 326:1271-1274.1985).
- Whitaker AN, McKay DG (Studies of catecholamine shock. I. Disseminated intravascular coagulation. *The American Journal of Pathology* 56:153-176.1969).
- Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA (Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science* 125:3257-3263.2012).
- Zanatta L, Goulart PB, Gonçalves R, Pierozan P, Winkelmann-Duarte EC, Woehl VM, Pessoa-Pureur R, Silva FRMB, Zamoner A (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> mechanism of action: Modulation of L-type calcium channels leading to calcium uptake and intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of young

rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*  
1823:1708-1719.2012).