

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

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ETANÓLICA DURANTE A GESTAÇÃO E A
LACTAÇÃO SOBRE O CITOESQUELETO DE CÉLULAS NEURAIS DO
HIPOCAMPO DE RATOS EM DESENVOLVIMENTO**

Karina Pires Reis

Porto Alegre

2013

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

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ETANÓLICA DURANTE A GESTAÇÃO E A
LACTAÇÃO SOBRE O CITOESQUELETO DE CÉLULAS NEURAIS DO
HIPOCAMPO DE RATOS EM DESENVOLVIMENTO**

Karina Pires Reis

Orientadora: Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2013

*"Vou dizer-lhe uma coisa que você nunca esquecerá: a
cada homem são dadas as chaves dos portões do céu.
Mas essas chaves abrem também os portões do inferno.*

E assim é com a ciência."

Richard Feynman, em "A Incerteza da Ciência"

AGRADECIMENTOS

A minha mãe por todo o apoio, o amor incondicional, carinho, preocupação, paciência e por toda a batalha para que eu realizasse meus sonhos. É o meu exemplo e a quem devo tudo que sou. Sem o apoio dela não teria condições de concluir mais essa etapa. Ao meu irmão e a minha avó que também sempre me apoiaram, torceram por mim e estão sempre ao meu lado. Também ao meu pai, onde quer que ele esteja, pois também sempre me incentivou a estudar e se esforçava para que eu tivesse o melhor na vida.

Aos meus amigos “miguxos”: Cláudia, Vanessa, Carolina, Helenita, Márcio, Rafael “Catarina” e também ao Marcelo pela amizade tão especial, pelo companheirismo sem igual, por todos os momentos que passamos juntos, por ouvirem meus desabaços e pelos momentos de diversão e risadas.

Aos colegas e amigos do laboratório: Paula, Bárbara, Carolina, Natália, Fernanda, Rônan, Samanta e às vizinhas do lab 31 pelos momentos diários de aprendizado e diversão que tornavam os momentos difíceis mais leves, também, por toda a ajuda nos experimentos e no andamento desse trabalho. E, em especial, a Luana que com paciência e dedicação me ensinou e me ajudou muito no laboratório, devo a ela o meu crescimento como profissional e também como pessoa, agradeço muito pela amizade verdadeira.

A professora Regina por ter me dado a oportunidade de ingressar na pesquisa, por toda a ajuda e pelos ensinamentos dos quais serei eternamente grata.

Aos demais amigos, colegas e familiares pelo apoio e pelo carinho que sempre dispõem para mim. Obrigada!

ÍNDICE

PARTE I

RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. ETANOL E ALCOOLISMO	5
1.1.1. Síndrome Alcoólica Fetal	7
1.2. CITOESQUELETO CELULAR	9
1.2.1 Filamentos Intermediários	11
1.2.1.1. Neurofilamentos	13
1.2.1.2. Vimentina e Proteína Glial Fibrilar Ácida	14
1.3. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS	16
1.3.1. Fosforilação dos filamentos intermediários	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19

PARTE II

1. ARTIGO - Vulnerability of hippocampal cytoskeleton in a rat model of fetal alcoholic syndrome	21
--	----

PARTE III

1. DISCUSSÃO	60
2. CONCLUSÃO	68
2.1. CONCLUSÃO GERAL	68
2.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	68
3. PERSPECTIVAS	70
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
5. ANEXOS	91
5.1. LISTA DE FIGURAS	91

PARTE I

RESUMO

O consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação e lactação pode provocar uma série de efeitos adversos no feto. Por exemplo, a síndrome alcoólica fetal (SAF) causada pelo consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação e é caracterizada por déficits de crescimento, dismorfia facial e evidências de anormalidades no sistema nervoso central (SNC). No presente estudo, nós investigamos os efeitos da exposição ao etanol administrado cronicamente em ratas durante a gestação e lactação sobre a homeostase do citoesqueleto de neurônios e astrócitos das progenitoras, no final da lactação, e da prole aos 9 e aos 21 dias de idade. Nossos resultados mostraram que os filhotes de ratas expostas ao etanol durante a gestação e lactação apresentaram, aos 21 dias de idade no hipocampo, um aumento na fosforilação das subunidades de baixo e médio peso molecular dos neurofilamentos (NF-L e NF-M) e da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) de neurônios e astrócitos, respectivamente. Este efeito foi mediado pela proteína quinase ativada por sinal extracelular (ERK1/2) que pertence à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). No entanto, esse mesmo efeito não ocorreu no córtex e hipocampo dos filhotes dessa idade. Nas progenitoras, no final do período de amamentação, e na prole aos 9 dias pós-natal não houve uma alteração na homeostase dos filamentos intermediários (FIs) do córtex, hipocampo e cerebelo. Esses dados reforçam a idéia que algumas regiões cerebrais são mais susceptíveis aos efeitos danosos do álcool e, também, que há uma janela de vulnerabilidade para esses danos. Sabendo-se que as crianças com SAF possuem déficits de aprendizado e memória e que o hipocampo está relacionado com essas funções, nossos resultados sugerem que uma alteração no citoesqueleto pode contribuir com os danos hipocampais relacionados à SAF.

ABSTRACT

Maternal drinking during pregnancy and lactation can cause a number of adverse effects on the fetus. For example, the fetal alcohol syndrome (FAS) caused by prenatal exposure to alcohol is characterized by growth deficiency, facial dysmorphism and central nervous system (CNS) disorders. In the present study we investigated the effects of exposure to alcohol chronically administered to rats during pregnancy and lactation on the homeostasis of the cytoskeleton of neurons and astrocytes from dams at the end of lactation, and the offspring at 9 and at 21 days postpartum. Results showed that exposure to ethanol during pregnancy and lactation lead to increased phosphorylation of low and medium molecular weight neurofilament subunits (NF-L and NF-M) and of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes and neurons in the hippocampus of 21-day-old pups. This effect was mediated by extracellular signal regulated protein kinases (ERK1/2) which belongs to the family of mitogen-activated protein kinases (MAPK). However, this effect was not observed in the cerebral cortex and hippocampus of these animals. In dams at the end of the nursing period, and in 9-day-old pups the homeostasis of the intermediate filaments (IFs) of the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum was not altered. These data reinforce the idea that some brain regions are more susceptible to the harmful effects of alcohol and reinforces the window of vulnerability of the hippocampus of immature brain. The children with FAS have deficits in learning and memory and the hippocampus is related to these functions, therefore it is feasible that an disruption of the homeostasis of the cytoskeleton can contribute to hippocampal damage related to ethanol exposure during pregnancy and lactation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ERK1/2	Proteína quinase ativada por sinal extracelular
Eth	Etanol
FIs	Filamentos Intermediários
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MT	Microtúbulo
NFs	Neurofilamentos
NF-H	Subunidade protéica de 200 kDa dos neurofilamentos
NF-L	Subunidade protéica de 68 kDa dos neurofilamentos
NF-M	Subunidade protéica de 150 kDa dos neurofilamentos
SAF	Síndrome Alcoólica Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
Vim	Vimentina

1. INTRODUÇÃO

1.1. ETANOL E ALCOOLISMO

O etanol é um composto orgânico utilizado como combustível, germicida, solvente, na composição de bebidas alcoólicas entre outros produtos. Ao longo da história, na maioria dos países, o álcool tem sido legalmente produzido a partir de uma série de produtos e é consumido para melhorar o bem-estar e as relações sociais. No entanto, uma grande quantidade de indivíduos não consegue manter-se dentro dos limites de segurança do consumo (Enoch, 2012). O abuso de bebidas alcoólicas e a dependência são parte de uma doença crônica, progressiva, recorrente que avança do estágio de experimentação para a dependência, tornando-se uma desordem psiquiátrica (Enoch, 2012; Spanagel, 2009). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) americano classifica o consumo excessivo de álcool como a terceira principal causa de morte evitável (Mokdad et al., 2004). A dependência ao etanol é uma desordem heterogênea já que o consumo de bebidas alcoólicas pode variar tanto na quantidade quanto na frequência (Johnson et al., 2010).

Quando consumido em excesso, o álcool pode interferir no status nutricional do indivíduo alcoólico afetando, por exemplo, o consumo, absorção e utilização de nutrientes pelo organismo (Lieber, 2000). Alcoolistas possuem sinais de deficiência de algumas vitaminas, particularmente, tiamina, riboflavina, piridoxina e ácido ascórbico, bem como o ácido fólico (Lieber, 2003). As complicações clínicas do abuso dessa substância incluem: danos ao sistema imunológico e ao cérebro, câncer, diabetes, desordens neuropsiquiátricas, doenças cardiovasculares, doenças do fígado e do

pâncreas (Spanagel, 2009; Rehm, 2011). O etanol ainda afeta diversos sistemas neurotransmissores: inibe a neurotransmissão glutamatérgica (Rao & Sari, 2012) e aumenta a função do receptor GABA_A (Boehm et al., 2004). Além de tudo, ainda traz sérios problemas sociais e econômicos incluindo, criminalidade, diminuição da produtividade e aumento de gastos médicos (Nutt et al., 2007).

Além disso, o etanol também exerce uma variedade de ações através de seus produtos metabólicos. Por exemplo, o acetaldeído, que é o primeiro produto gerado durante o metabolismo do etanol, pode afetar a atividade de diferentes sistemas de neurotransmissores e, assim contribuir com os efeitos comportamentais causados pelo etanol (Quertemont et al., 2005). Metabólitos não-oxidativos do etanol, tais como etil-ésteres de ácidos graxos exercem efeitos na homeostase intracelular do Ca²⁺ (Pettersen & Sutton, 2006) e, portanto, podem mediar, em parte, as ações do etanol (Spanagel, 2009).

Em relação ao sistema fosforilante, baixos níveis de etanol estimulam e altos níveis inibem a fosforilação da proteína associada aos microtúbulos, MAP2, a qual regula a dinâmica de polimerização dos microtúbulos em cérebro de ratos (Ahluwalia *et al.*, 2000). Também, Rothenfluh *et al.* (2006) e Offenhäuser *et al.* (2006) mostraram que a dinâmica do citoesqueleto de actina pode ser alterada em cérebro de camundongos por efeito do álcool. Ainda, o etanol administrado a culturas de células da linhagem glial B92 foi capaz de causar alteração sobre o citoesqueleto de actina através de vias de sinalização envolvendo a PI3K/AKT e MEK/ERK (Villegas *et al.*, 2006). Além disso, em células C6 (linhagem celular que pode apresentar propriedades de astrócitos) a exposição aguda ao etanol provocou uma reorganização do citoesqueleto de actina (Loureiro *et al.*, 2010). O etanol também prejudica a via secretória de astrócitos e esse processo está envolvido com alterações na atividade dos microtúbulos (Tomás *et al.*,

2005). Em diversos estudos também tem sido relatado que o álcool pode alterar o citoesqueleto de hepatócitos, incluindo os filamentos intermediários (Sanhai *et al*, 1999; Shepard & Tuma, 2010).

Conforme a crença popular, o álcool seria galactogênico, faria o leite “descer”, teria efeito sedativo, relaxando o bebê e diminuindo suas cólicas (Mennella & Beauchamp, 1991; Menella, 1997). A quantidade de etanol presente no leite materno possui uma relação de proporcionalidade com a quantidade dessa substância no sangue, ou seja, o leite apresenta quantidades consideráveis de álcool enquanto os níveis dessa substância são mensuráveis no sangue materno (Lawton 1985; Mennella & Beauchamp 1991). Mas, contrariando a fé popular, estudos demonstraram que as crianças amamentadas consumiam 20% menos leite materno e apresentavam alterações no padrão de sono nas horas imediatamente após a exposição materna ao etanol (Mennella & Beauchamp, 1991, 1993; Menella & Garcia-Gomez, 2001). O álcool, como já foi demonstrado em estudos com ratos, pode ter efeitos adversos sobre a ocitocina e a prolactina, dois hormônios essenciais na lactação normal (Subramanian & Abel, 1988; Subramanian, 1999). Isso, então, poderia explicar, em parte, a redução no consumo de leite pelos filhos de mães que consumiram bebidas alcoólicas.

1.1.1. Síndrome Alcoólica Fetal

Não apenas durante a amamentação, mas em todo o período gestacional, o álcool entra em contato com o feto através da circulação materna, atravessando facilmente a placenta e, assim, causando efeitos adversos na função e no crescimento placentário e, também, no desenvolvimento fetal. Em cerca de uma hora os níveis de etanol no líquido amniótico e no feto são aproximadamente os mesmos encontrados no sangue materno (Burd *et al.*, 2007). A placenta humana tem uma capacidade mínima de metabolização

do etanol - produz acetaldeído que vai em direção ao sangue fetal e pode ser prejudicial ao embrião (Karl et al., 1988) - e a atividade da enzima álcool desidrogenase em lactentes é 80% menor que nos adultos (Burd et al., 2007; Pikkarainen & Rhaia, 1967; Tran, et al. 2007).

O consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação pode acarretar uma gama de efeitos adversos no feto. O termo “desordens do espectro alcoólico fetal” é utilizado para denotar o conjunto de condições causadas pela exposição ao etanol durante o desenvolvimento (Sokol et al., 2003). Os efeitos incluem: déficits cognitivos, de aprendizagem e de memória, anomalias estruturais e comportamentais (Ervolahti et al., 2007). Os diagnósticos clínicos que se enquadram nas desordens do espectro alcoólico fetal incluem: síndrome alcoólica fetal (SAF), síndrome alcoólica fetal parcial, encefalopatia alcoólica e desordens neurocomportamentais da exposição ao álcool (Franklin et al., 2008). A SAF, descrita completamente pela primeira vez em 1973 por Jones e Smith, é a mais severa do espectro e os danos à capacidade cognitiva podem variar e em casos graves chegar à retardo mental severo (Mattson et al., 1998).

A tríade sintomática da SAF é caracterizada por: déficit de crescimento pré e pós-natal, dismorfia craniofacial e evidências de anormalidades no SNC (Lipinsk et al., 2012; Bertrand et al., 2005; Jones e Smith, 1973). Uma das alterações no SNC é a diminuição do volume cerebral que está relacionada à reduzida proliferação celular no SNC (Miller, 1988, 1989) e apoptose induzida pelo etanol em neurônios pós-mitóticos (Ikonomidou et al., 2000). Modelos experimentais de animais expostos ao etanol demonstram que o tipo e a extensão da perda neuronal dependem do período de desenvolvimento onde ocorreu a exposição, bem como das vulnerabilidades inerentes às diferentes regiões do cérebro a exposição do álcool (Maier et al., 1996; Bonthius & West, 1991). Por exemplo, a exposição a essa substância durante o período da

neurogênese resulta em diminuição do número de células piramidais CA1 do hipocampo (Miller, 1995), células de Purkinje do cerebelo (Maier & West, 2001; Maier et al., 1999) e neurônios corticais (Miller, 1986, 1988). O cérebro é, também, vulnerável à exposição ao etanol durante o período da sinaptogênese que ocorre ao longo do terceiro trimestre de gestação em humanos, que equivale aos primeiros dez dias pós-natal nos ratos.

Estudos da exposição ao etanol durante o desenvolvimento em modelos animais são excelentes ferramentas para identificar possíveis mecanismos e intervenções que possam prevenir ou atenuar os efeitos do etanol no cérebro em desenvolvimento (Ieraci & Herrera, 2006). A exposição de roedores ao etanol em períodos sensíveis do desenvolvimento do cérebro induz condições neuropatológicas similares àquelas da SAF humana (Saito et al., 2007) o que nos permite, atualmente, ter algum conhecimento sobre a extensão dos efeitos do álcool sobre a anatomia, fisiologia e comportamento dos filhos de mães alcoólatras a partir dos resultados dos estudos com modelos experimentais em roedores (Maier & West, 2003).

1.2. CITOESQUELETO CELULAR

O citoplasma das células eucarióticas é organizado espacialmente em uma rede de proteínas filamentosas conhecida como citoesqueleto. Essa rede forma uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a sua forma, se divide ou responde ao ambiente. É responsável por movimentos como o deslocamento das células sobre um substrato e a contração muscular. O citoesqueleto também fornece a maquinaria necessária para movimentos intracelulares como, por

exemplo, o transporte de organelas de uma região para outra no citoplasma e a segregação de cromossomos na mitose (Alberts et al., 2008).

Além disso, nas células neurais, as proteínas do citoesqueleto apresentam um papel fundamental na criação e manutenção do calibre axonal, bem como transporte de organelas e substâncias envolvidas na transmissão sináptica (Kirkpatrick & Brady, 1999; Ackerley, 2000). Várias doenças neurodegenerativas e distúrbios psiquiátricos estão associados com alterações no citoesqueleto neuronal (Lariviere, 2004). Nesses casos, o citoesqueleto é anormalmente organizado o que, portanto, diminui a ocorrência das neurotransmissões (Benitez-King et al., 2004).

Essas funções do citoesqueleto dependem de três estruturas distintas: filamentos de actina ou microfilamentos (MFs), microtúbulos (MTs) e filamentos intermediários (FIs) (figura 1). Cada tipo é formado pela associação ou polimerização de monômeros específicos. Os microfilamentos (7 nm de diâmetro) são polímeros de actina globular; os microtúbulos (25 nm de diâmetro), são formados por associações de dímeros de tubulina alfa e beta, produzindo longos e rígidos polímeros (Yoon et al., 2002) e os filamentos intermediários (10 nm de diâmetro), são constituídos por associações de proteínas fibrosas célula-específicas (Alberts et al., 2008; Helfand et al., 2004). Estes três tipos de filamentos, embora com suas características individuais, conectam-se entre si e suas funções são coordenadas, permitindo a participação em inúmeras atividades celulares em conjunto com diversas proteínas acessórias (Alberts et al., 2008). Fornecem estabilidade, polaridade e organização à célula (Yoon et al., 2002), além de garantirem rigidez celular e funcionarem como âncoras intracelulares que mantêm as organelas no lugar (Wettstein et al., 2012). Sua reorganização constante permite os movimentos internos, incluindo o deslocamento dos cromossomos e a deformação da

membrana que permitem, dessa forma, a endocitose e a migração celular (Wettstein et al., 2012).

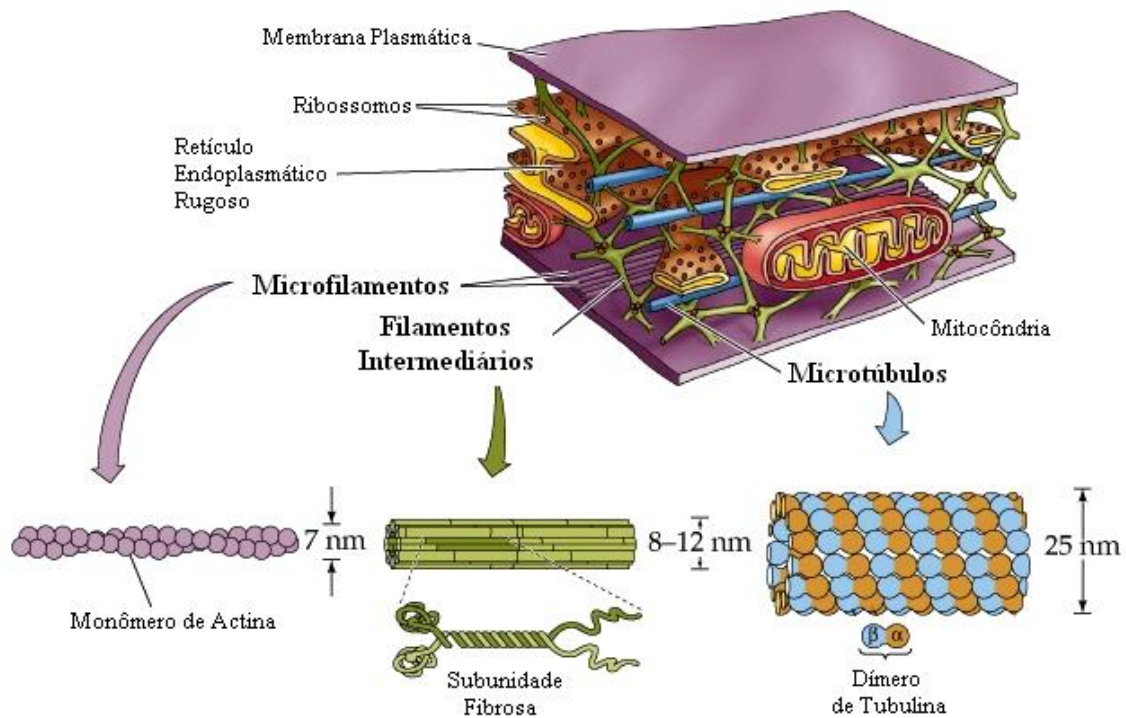


Figura 1. Representação esquemática dos elementos do citoesqueleto celular. Adaptado de <http://course1.winona.edu/kbates/Bio241/images/figure-04-21.jpg> (acesso em 12.03.2013).

1.2.1. Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários (FIs) estão entre as mais insolúveis e resistentes estruturas sólidas do citoesqueleto de células eucarióticas (Nicholl & Quinlan, 1994). São filamentos longos de proteínas fibrosas que possuem subtipos específicos em diferentes tecidos e grande diversidade em sua sequência (Alberts et al., 2008). Essas proteínas apresentam um domínio central em forma de α -hélice altamente conservado e regiões amino-terminal e carbóxi-terminal variáveis (figura 2). Essas últimas duas apresentam diferenças que permitem uma subclassificação em seis diferentes grupos.

Tipos I e II incluem, respectivamente, as queratinas e citoqueratinas (epiteliais). O tipo III compreende a vimentina (expressa em células de origem mesenquimal), a desmina (característica das células musculares), a proteína glial fibrilar ácida - GFAP (nas células gliais) e a periferina (na periferia do sistema nervoso). Já o tipo IV é encontrado nos neurônios e inclui os neurofilamentos e a α -internexina. Por fim, o tipo V são as lâminas que são exclusivamente nucleares e ocorrem em todos os tecidos e o tipo VI inclui a nestina (nas células musculares e neuroepiteliais) (Fuchs & Weber, 1994; Inada et al., 2000; Hermann & Aeb, 2000; Lariviere & Julien, 2004; Szeverenyi et al., 2008).

A principal função intracelular dos FIs é a sustentação da célula conferindo proteção contra o estresse mecânico, portanto mantém a integridade tecidual (Fuchs & Weber, 1994; Eriksson et al., 2004). Além dessa conhecida função, os FIs têm um importante papel na distribuição intracelular de organelas e proteínas (Toivola et al., 2005; Styers et al., 2004), na migração e na divisão celular, estão envolvidos em processos regulatórios, metabólicos e de sinalização da célula e na transdução de sinal da membrana plasmática para o núcleo (Chang & Goldman, 2004; Eriksson et al., 2009; Paramio & Jorcano, 2002).

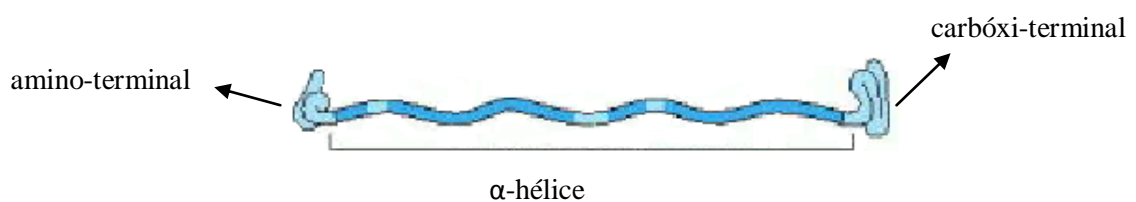


Figura 2. Representação dos domínios dos FIs: amino-terminal, carbóxi-terminal e cadeia em α -hélice. Adaptado de <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/intermediatefilaments/intermediatefilaments.html> (acesso em 17.02.2013).

1.2.1.1. Neurofilamentos

Os neurofilamentos (NFs) são os filamentos intermediários presentes nos neurônios, esses NFs correm em paralelo ao longo do axônio e ocupam uma grande fração do volume do axoplasma (Kumar, et al., 2002). São formados por três subunidades: de alto (NF-H – 200 kDa); médio (NF-M – 150 kDa) e baixo (NF-L - 68 kDa) peso molecular (Alberts et al., 2008) (figura 3). Possuem domínios estruturais similares, incluindo uma região central em α -hélice, um domínio amino-terminal (cabeça) e uma região carboxi-terminal (cauda) (Steinert & Roop, 1988). Essas três proteínas possuem similaridades estruturais na região central e diferem tanto no comprimento quanto na sequência de seus N-terminais e, principalmente, nos seus C-terminais (Chang et al., 2009).

A extremidade N-terminal juntamente com a região em α -hélice da subunidade de baixo peso molecular, NF-L, interagem lateralmente e longitudinalmente formando a estrutura propriamente dita do neurofilamento (Geisler & Weber, 1981), enquanto as regiões C-terminais das subunidades de médio (NF-M) e alto peso molecular (NF-H) são responsáveis pelas projeções laterais, que permitem a interação dos NFs entre si e com os demais constituintes do citoesqueleto (Gotow et al., 1992).

Os NFs são sintetizados dentro do corpo celular e posteriormente transportados para o axônio (Miller et al., 2002) e a principal função é o controle do calibre axonal (Chang et al., 2009; Liem & Messing, 2009; Perrot et al., 2008), sendo que o diâmetro dos axônios está diretamente relacionado com a velocidade de transmissão do impulso elétrico (Cleveland et al., 1991).

Agregados intracelulares de NFs são encontrados em diversas patologias neurodegenerativas como, por exemplo, a esclerose lateral amiotrófica, a doença de

Alzheimer, a doença de Parkinson e a neuropatia diabética (Julien, 1999; Lee & Cleveland, 1996). Múltiplos fatores podem induzir ao acúmulo de NFs, incluindo a desregulação da expressão de genes que codificam as diferentes subunidades dos NFs, defeitos no transporte axonal e, além disso, injúrias físicas ou químicas podem ser responsáveis por esses acúmulos (Troncoso et al., 1985; Griffin et al., 1985; Povlishock et al., 1997; Perrot & Eyer, 2009).

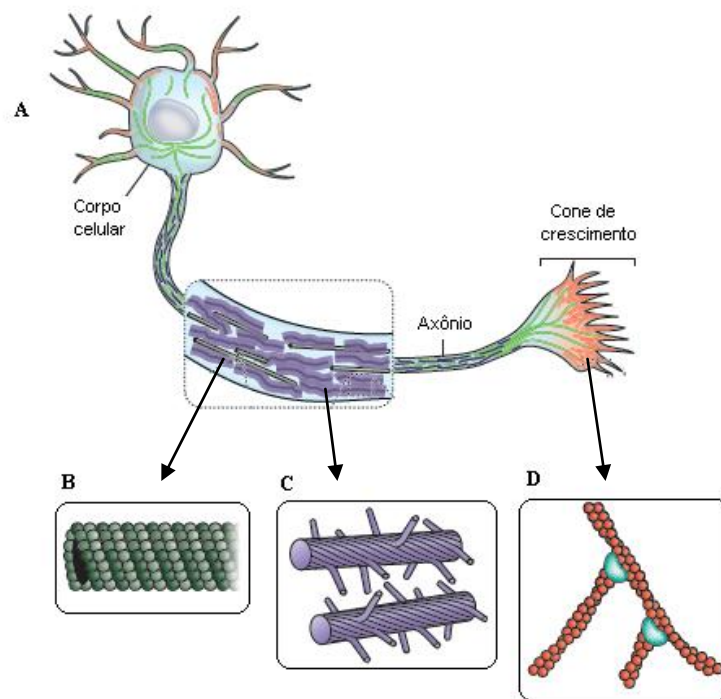


Figura 3. Representação dos elementos do citoesqueleto celular em um neurônio (A). Microtúbulos (B), Neurofilamentos: a região central é formada pelas três subunidades (NF-L, NF-M e NF-H) e as projeções laterais são constituídas pelas regiões carbóxi-terminais das subunidades NF-M e NF-H (C), Filamentos de actina (D). Adaptado de Fletcher & Mullins, 2010.

1.2.1.2. Vimentina e Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)

Entre as proteínas dos filamentos intermediários, a vimentina é a mais amplamente distribuída, ocorrendo em muitas células de origem mesenquimal. Além disso, é expressa de forma transitória durante o desenvolvimento em muitos tecidos

(Alberts et al., 2008). No SNC, é expressa na glia radial, astrócitos imaturos e também na glia de Bergmann no cerebelo. Durante a diferenciação dos astrócitos é substituída progressivamente pela GFAP (Menet et al., 2001).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) pertence ao tipo III de proteínas dos filamentos intermediários e está presente predominantemente em astrócitos maduros. Além disso, é expressa também nas células de Schwann (Bianchini et al., 2002), fibroblastos (Hainfellner et al., 2001), e nas células estreladas do fígado (Carotti et al., 2008; Middeldorp, 2009).

Essa proteína é considerada um marcador de astrócitos e é importante na manutenção da forma e na modulação da motilidade celular. No sistema nervoso central de vertebrados há um rápido aumento na síntese de GFAP nos astrócitos em resposta a injúrias causadas por traumas químicos, físicos e também por determinadas doenças, processo esse chamado astrogliose (Pekny et al., 1999; Eng et al., 2000; Wilhelmsson et al., 2004).

Além disso, a GFAP é importante também para a interação entre astrócito-neurônio (Eliasson, 1999; Potokar et al., 2007), participando do sofisticado sistema de comunicação intercelular recíproca que pode regular a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal, a homeostase do glutamato (Sullivan et al., 2010; Sullivan et al., 2012) a transmissão sináptica (Carmignoto, 2000) e a mobilidade de vesículas nos astrócitos (Potokar et al., 2007).

1.3. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS

A fosforilação de proteínas é um processo molecular reversível que contribui para a homeostase celular, regulando processos como a sinalização, o crescimento, o metabolismo, a proliferação, a diferenciação e a divisão celular (Leung-Pineda et al., 2006; Evans & Hemmings, 1998). A dinâmica da reação de fosforilação/defosforilação se deve à participação de sistemas fosforilantes intracelulares que consistem em uma proteína quinase, um substrato protéico e uma proteína fosfatase. As proteínas quinases catalisam a transferência de um grupamento fosfato do ATP para o grupo hidroxila dos resíduos de serina, treonina ou tirosina de um substrato protéico. As fosfatases catalisam a hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico, permitindo a reversibilidade desse processo (Nestler & Greengard, 1999). A fosforilação de uma proteína altera sua carga, pois grupos fosfato sendo carregados negativamente, determinam uma mudança na sua conformação e conseqüentemente na sua atividade funcional. A relação entre a concentração intracelular e a atividade de quinases e fosfatases determina o estado de fosforilação do substrato (Walaas & Greengard, 1991; Nestler & Greengard, 1999).

Este processo desempenha um papel fundamental nas funções neuronal e glial incluindo: a plasticidade das células neuronais, síntese de neurotransmissores (Schulman, 1995), eventos de aprendizagem e memória (Izquierdo & Medina, 1997; Rosenegger et al., 2008; Silverman-Gavrila et al., 2011) e transdução de sinal, contribuindo também para a eficácia da transmissão sináptica (Wang & Salter, 1994).

1.3.1 Fosforilação dos filamentos intermediários

A organização intracelular dos FIs depende de seu estado de fosforilação e está sobre o controle de proteínas quinases e fosfatases. Os sítios de fosforilação dos FIs

estão localizados nos domínios amino e carboxi-terminal. A fosforilação do domínio N-terminal está relacionada com a capacidade de polimerização e despolimerização dos FIs (Izawa & Inagaki, 2006), já a fosforilação do domínio C-terminal tem implicações na interação com outras estruturas do citoesqueleto (Chou et al., 1996). Esses filamentos são substrato de inúmeras quinases (Chang & Goldman, 2004) e fosfatases que também desempenham uma importante papel na integridade do citoesqueleto (Ceulemans & Bollen, 2004; Sontag, 2001).

A fosforilação dos NFs ocorre primariamente nas regiões ricas em KSP *repeats*, os quais são repetições das sequências lisina-serina-prolina localizadas no domínio C-terminal do NF-M e do NF-H (Julien & Mushynski, 1983; Xu et al., 1992). No entanto, a fosforilação de resíduos de serina “não-KSP” na região N-terminal do NF-L e do NF-M tem sido observadas (Zheng et al., 2003). O nível de fosforilação do domínio C-terminal da NF-H é um importante mecanismo fisiológico regulador do transporte axonal (Jung et al., 2000). Visto a importância dos NFs na manutenção do calibre axonal e, portanto, na velocidade da condução nervosa, um desequilíbrio na atividade das proteínas quinases ou das fosfatases pode causar alterações na função neuronal. Além disso, a hiperfosforilação dos NFs pode estar relacionada com a patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Liu, et al., 2011; Zhou et al., 2010).

Assim como ocorre com os NFs, a homeostase da rede de GFAP no citoplasma de astrócitos é regulada por fosforilação em múltiplos sítios (Takemura et al., 2002): a fosforilação na região N-terminal afeta a polimerização da GFAP, enquanto que a fosforilação na região C-terminal afeta a interação da GFAP com as outras proteínas dos FIs (Inagaki et al., 1994). A fosforilação da GFAP em sítios da região N-terminal causa

a despolimerização do filamento e a defosforilação destes sítios (por fosfatases) restaura essa habilidade de polimerizar (Inagaki et al., 1990).

Entre as proteínas quinases envolvidas na fosforilação dos neurofilamentos, destaca-se a família de proteínas quinases ativadas por mitógeno – MAPKs. Essa família de proteínas intracelulares está envolvida na transdução de sinal, regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Robinson & Cobb, 1997). Uma quinase integrante dessa família a ERK1/2 ou p42/44 MAPK (proteína quinase regulada por sinais extracelulares) pode contribuir na hiperfosforilação de proteínas dos neurofilamentos por fosforilar os KSP repeats dessas proteínas (Veerana et al., 1998). A ativação da ERK1/2 é caracterizada pela ativação inicial da Ras, uma pequena proteína proteína G, que resulta na ativação das proteínas Raf e da quinase MAPK/ERK1/2 (MEK) e a sucessiva fosforilação da ERK1/2 (Thomas & Haganir, 2004). A família das MAPK tem um papel central nos efeitos que o etanol provoca nas células (Aroor & Shukla, 2003). Diversos estudos têm identificado a relação entre a ativação da ERK1/2 e a exposição ao etanol que parece ser dependente da idade, região do cérebro e modelo de tratamento com etanol (Sanna et al., 2002; Kalluri & Ticku, 2003; Chandler & Sutton, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do etanol administrado cronicamente em ratas durante a gestação e lactação sobre a homeostase do citoesqueleto de células neurais da prole.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do etanol sobre o ganho de massa corporal da prole desde o nascimento até os 21 dias de idade.
- Verificar o ganho de massa corporal e o consumo de água/etanol e ração das ratas adultas durante o período do estudo.
- Avaliar os efeitos de um modelo de alcoolismo crônico (etanol 20%) durante a gestação e o aleitamento sobre a fosforilação dos filamentos intermediários (GFAP, NF-L, NF-M e NF-H) de córtex cerebral, hipocampo e cerebelo da prole aos 9 dias e/ou aos 21 dias.
- Avaliar os efeitos de um modelo de alcoolismo crônico (etanol 20%) sobre a fosforilação dos filamentos intermediários (GFAP, NF-L, NF-M e NF-H) de córtex cerebral, hipocampo e cerebelo das ratas adultas (mães) no final do período de lactação.
- Verificar a participação da via das MAPK, através da ERK1/2, nos efeitos do modelo de alcoolismo utilizado, sobre a fosforilação das proteínas dos filamentos intermediários.

PARTE II

1. ARTIGO

O artigo será submetido ao periódico Alcohol and Alcoholism.

Título: Vulnerability of hippocampal cytoskeleton in rat exposure to ethanol during pregnancy and lactation.

Autores: Karina Pires Reis, Luana Heimfarth, , Bárbara Ortiz de Lima, Samanta Oliveira Loureiro, Carolina Fernandes, Paula Pierozan, Ronan Vivian Carvalho, Fernanda Ferreira e Regina Pessoa-Pureur.

PARTE III

2. CONCLUSÃO

2.1. CONCLUSÃO GERAL

O etanol administrado cronicamente em ratas gestantes e lactantes foi capaz de alterar a homeostase do citoesqueleto celular do hipocampo da prole aos 21 dias de idade.

2.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- A prole das ratas expostas ao etanol, durante o período de lactação, apresentou um menor ganho de peso comparado ao grupo controle, diferença que foi significativa a partir do oitavo dia pós-natal.
- O modelo de alcoolismo crônico (etanol 20%) durante a gestação e lactação causou uma hiperfosforilação dos FIs (GFAP, NF-L e NF-M) no hipocampo dos filhotes aos 21 dias pós-natal. Nessa mesma idade não houve alteração na homeostase dos FIs no córtex cerebral e cerebelo. Na prole aos 9 dias de idade também não ocorreu alteração nos níveis de fosforilação dos FIs no córtex cerebral e cerebelo, assim como, nesse período o citoesqueleto do hipocampo também teve sua homeostase alterada.
- As ratas adultas que foram expostas ao etanol durante o período de indução, gestação e lactação não apresentaram alterações nos níveis de fosforilação dos FIs (GFAP, NF-L, NF-M e NF-H) do córtex, hipocampo e cerebelo.
- Não houve alteração no imunocontéudo dos FIs: GFAP, NF-L e NF-M, no hipocampo da prole aos 21 dias de idade. A subunidade NF-H dos neurofilamentos apresentou uma redução no seu imunocontéudo na sua forma total e na forma fosforilada nesse mesmo período e nessa mesma estrutura cerebral.

- A hiperfosforilação, causada pela exposição ao etanol, no hipocampo da prole aos 21 dias de idade foi, em parte, provocada pela via de sinalização da proteína quinase ERK1/2 que estava na sua forma ativa.

3. PERSPECTIVAS

- Identificar outras possíveis quinases envolvidas no efeito do etanol no hipocampo dos filhotes de 21 dias de idade. Como, por exemplo, as outras quinases que pertencem à família das MAPK: a p38 e a JNK.
- Verificar os efeitos do etanol, nesse mesmo modelo de exposição durante a gestação e lactação, aos 15 dias de idade da prole no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo.
- Realizar estudos comportamentais nos filhotes aos 21 de idade para verificar se a alteração da homeostase no citoesqueleto do hipocampo leva a déficits de memória e aprendizado.
- Utilizar agentes antioxidantes nas mães que possam de alguma maneira prevenir ou reduzir os danos que o etanol gera nos filhotes.

4. REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerley, S.; Grierson, A.J.; Brownlees, J.; Thornhill, P.; Anderton, B.H.; Leigh, P.N.; Shaw, C.E. & Miller, C.C. (2000). Glutamate Slows Axonal Transport of Neurofilaments in Transfected Neurons. *The Journal of Cell Biology* 150, 165–175.

Adams, J.P. & Sweatt, J.D. (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42, 135-163.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. The cytoskeleton. In: Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. *Molecular Biology of the Cell.* 5. ed. Nova Iorque: Garland Sciences, 2008.

Aroor, A.R. & Shukla, S. D. (2004). MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life Sci.* 74, 2339-2364.

Ahluwalia, B.; Ahmad, S.; Adeyiga, O.; Wesley, B. & Rajguru, S. (2000). Low levels of ethanol stimulate and high levels decrease phosphorylation in microtubule-associated proteins in rat brain: an in vitro study. *Alcohol Alcohol.* 5, 452–457.

Ballard, M.S.; Sun, M. & Ko, J. (2012). Vitamin A, folate, and choline as a possible preventive intervention to fetal alcohol syndrome. *Med Hypotheses* 78, 489-493.

Baudry, M.; Chou, M.M. & Bi, X. (2013). Targeting calpain in synaptic plasticity. *Expert Opin Ther Targets* [doi:10.1517/14728222.2013.766169].

Benitez-King, G.; Ramírez-Rodríguez, G.; Ortíz, L. & Meza, I. (2004). The neuronal cytoskeleton as a potential therapeutical target in neurodegenerative diseases and schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3, 515–533.

Berman, R.F. & Hannigan, J.H. (2000) Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology and neuroanatomy. *Hippocampus* 10, 94–110.

Bertrand, J.; Floyd, R.L. & Weber, M.K. (2005). Guidelines for identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome. *MMWR Recomm Rep* 54, 1–14.

Bianchini D.; De Martini, I.; Cadoni, A.; Zicca, A.; Tabaton, M.; Schenone, A.; Anfosso, S.; Akkad Wattar, A.S.; Zaccheo, D. & Mancardi, G.L. (1992). GFAP expression of human Schwann cells in tissue culture. *Brain Res* 570, 209–217.

Boehm, S.L. 2nd; Ponomarev, I.; Jennings, A.W.; Whiting, P.J.; Rosahl, T.W.; Garrett, E.M.; Blednov, Y.A. & Harris, R.A. (2004). gamma-Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: new perspectives on alcohol actions. *Biochem Pharmacol.* 68, 1581-1602.

Bonthius D.J. & West, J.R. (1990). Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: Increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 14, 107-118.

Bonthius, D. J. & West, J. R. (1991). Permanent neuronal deficits in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Teratology* 44, 147–163.

Burd, L.; Roberts, D.; Olson, M. & Odendaal, H. (2007). Ethanol and the placenta: A review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 20, 361-75.

Carmignoto, G. (2000). Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Progress in Neurobiology* 62, 561-581.

Ceulemans, H. & Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* 84, 1-39.

Chandler, L.J. & Sutton, G. (2005). Acute ethanol inhibits extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate response element binding protein activity in an age- and brain region-specific manner. *Alcohol Clin Exp Res.* 29, 672-682.

Chang, L. & Goldman, R.D. (2004) Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5, 601-613.

Chen, J.; Ishac, E.J.; Dent, P.; Kunos, G. & Gao, B. (1998). Effects of ethanol on mitogen activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. *Biochem J.* 15;334.

Chou, Y.H.; Quinlan, R.A. & Goldman, R.D. (1996). The relative roles of specific N- and Cterminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filaments in mitotic BHK-21 cells. *Journal of Cell Science* 109, 817-826.

Carloni, S.; Mazzoni, E. & Balduini, W. (2004). Caspase-3 and calpain activities after acute and repeated ethanol administration during the rat brain growth spurt. *J Neurochem* 89, 197-203.

Carotti, S.; Morini, S.; Corradini, S.G.; Burza, M.A.; Molinaro, A.; Carpino, G.; Merli, M.; De Santis, A.; Muda, A.O.; Rossi, M.; Attili, A.F. & Gaudio, E. (2008). Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 14, 806–814.

Chang, R.; Kwak, Y. & Gebremichael, Y. (2009). Structural Properties of Neurofilament Sidearms: Sequence-Based Modeling of Neurofilament Architecture. *J Mol Biol.* 391, 648-660.

Cleveland, D.W.; Monteiro, M.J.; Wong, P.C.; Gill, S.R.; Gearhart, J.D. & Hoffman, P.N. (1991). Involvement of neurofilaments in the radial growth of axons. *Journal of Cell Science*. 15, 85-95.

Eichenbaum, H.; Otto, T. & Cohen, N.J. (1992). The hippocampus – what does it do? *Behav. Neural Biol.* 57, 2–36.

Eliasson, C.; Sahlgren, C.; Berthold, CH.; Stakeberg, J.; Celis, J.E.; Betsholtz, C.; Eriksson, J.E. & Pekny, M. (1999). Intermediate Filament Protein Partnership in Astrocytes. *Journal Biological. Chemistry* 274, 23996-24006.

Eng, L.F.; Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439-1451.

Enoch, M.A. (2012). The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence. *Curr Psychiatry Rep.* 14, 150-158.

Eriksson, J.E.; He, T.; Trejo-Skalli, A.V.; Härmälä-Braskén, A.S.; Hellman, J.; Chou, Y.H. & Goldman, R.D. (2004). Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci.* 117, 919-932.

Eriksson, J.E.; Dechat, T.; Grin, B.; Helfand, B.; Mendez, M.; Pallari, H.M. & Goldman, R.D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest.* 119, 1763-1771.

Ervolahti N. (2007). Relationship between dysmorphic features and general cognitive function in children with fetal alcohol spectrum disorders. *Am J Med Genet A.* 143A, 2916-2923.

Evans, D.R. & Hemmings, B.A. (1998). Signal transduction. What goes up must come down. *Nature* 394, 23-24.

Follesa, P. & Ticku, M. K. (1996). Chronic ethanol-mediated upregulation of the *N*-methyl-D-aspartate in mouse cortical neurons in culture. *J. Biol. Chem.* 271, 13297–13299.

Franklin, L.; Deitz, J.; Jirikowic, T. & Astley, S. (2008). Children with fetal alcohol spectrum disorders: Problem behavior and sensory processing. *Am J Occup Ther.* 62, 265-273.

Fuchs, E. & Weber, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual Review Biochemistry* 63, 345-382.

Geisler, N. & Weber, K. (1981). Self assembly in vitro of 60,000 MW triplet protein into intermediate-sized filaments. *J. Mol. Biol.* 151, 565-571.

Gotow, T.; Takeda, M.; Tanaka, T. & Hashimoto, P.H. (1992). Macromolecular structure of reassembled neurofilaments as revealed by the quick-freeze deep-etch mica method: difference between NF-M and NF-H subunits in their ability to form cross-bridges. *European Journal of Cell Biology* 58, 331-345.

Griffin, J. W.; Parhad, I.; Gold, B.; Price, D.L.; Hoffman, P.N. & Fahnestock, K. (1985). Axonal transport of neurofilament proteins in IDPN neurotoxicity. *Neurotoxicology* 6, 43-53.

Hainfellner J.A.; Voigtländer, T.; Ströbel, T.; Mazal, P.R.; Maddalena, A.S.; Aguzzi, A. & Budka, H. (2001) Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 449–461.

Hannigan, J.H. & Abel, E.L. (1996). Animal models for the study of alcohol-related birth defects. In: Spohr H-L, Steinhaussen H-C, editors. Alcohol pregnancy and child development. *Cambridge: Cambridge University Press.*, 77–102.

Helfand, B.T.; Chang, L. & Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci.* Pt 2, 133-41.

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

Hisanaga, S. & Hirokawa, N. (1989). The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament. *J Neurosci* 9, 959–966.

Ho B.T.; Fritchie, G.E.; Idänpään-Heikkilä, J.E. & McIsaac, W.M. (1972). Placental transfer and tissue distribution of ethanol-1-14C: a radiographic study in monkeys and hamsters. *Q J Stud Alcohol* 33, 485–493.

Holmgren A.; Bouhy D. & Timmerman, V. (2012). Neurofilament phosphorylation and their proline-directed kinases in health and disease. *J Peripher Nerv Syst* 17, 365-76.

Ieraci, A. & Herrera, D.G. (2006). Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *PLoS Med.* 4, e101.

Ikonomidou, C.; Bittigau, P.; Ishimaru, M.J.; Wozniak, D.F.; Koch, C.; Genz, K.; Price, M.T.; Stefovská, V.; Hörster, F.; Tenkova, T.; Dikranian, K. & Olney, J.W. (2000). Ethanol- induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.

Inada, H.; Nagata, K.I.; Goto, H. & Inagaki, M.. Regulation of intermediate filament dynamics: a novel approach using site and phosphorylation state specific antibodies. In: Carraway, K.L.; Carraway, C.A.C. *Cytoskeleton: signaling and cellular regulation*. New York: Oxford University Press: 2000, pp183-207.

Inagaki, M.; Gonda, Y.; Nishizawa, K.; Kitamura, S.; Sato, C.; Ando, S.; Tanabe, K.; Kikuchi, K.; Tsuiki S. & Nishi, Y. (1990) Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a nonalpha- helical head domain. *J Biol Chem* 265, 4722–4729

Inagaki, M.; Nakamura, Y.; Takeda M.; Nishimura, T. & Inagaki, N. (1994) Glial fibrillary acidic protein—dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* 4, 239–243.

Izawa, I. & Inagaki, M. (2006). Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* 97, 167-174.

Izquierdo, I.I. & Medina, J.H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in hippocampus and connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory* 68, 285-316.

Johnson, B.A. (2010). Medication treatment of different types of alcoholism. *Am J Psychiatry* 167, 630-639.

Jones, K.L. & Smith, D.W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 2, 999–1001.

Julien, J. P. (1999). Neurofilament functions in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 554–560.

Julien, J.P. & Mushynski W.E. (1983). The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. *Journal of Biological Chemistry* 258, 4019–4025.

Jung, C.; Yabe, J.T. & Shea, T.B. (2000). C-terminal phosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit correlates with decrease neurofilament axonal transport velocity. *Brain Research* 856, 12-19.

Kalia, M. (2008). Brain development: anatomy, connectivity, adaptive plasticity, and toxicity. *Metabolism Clinical and Experimental* 57, S2-S5.

Kalluri, H.S. & Ticku, M.K. (2003). Regulation of ERK phosphorylation by ethanol in fetal cortical neurons. *Neurochemical Research* 28, 765–769.

Karl, P.I. (1988). Acetaldehyde production and transfer by the perfused human placental cotyledon. *Science.* 242, 273-5.

Kirkpatrick, L.L. & Brady, S.T. (1999). Cytoskeleton of neurons and glia. In siegel, G; Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Fischer, S.K., Ulher, M.D. (eds). *Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspects.* sixth ed. New York, Lippincott-Raven Publishers, p. 155-173.

Kumar, S.; Yin, X.; Trapp, B.D.; Hoh, J.H. & Paulaitis, M.E. (2002). Relating Interactions between Neurofilaments to the Structure of Axonal Neurofilament Distributions through Polymer Brush Models. *Biophys J.* 82, 2360-2372.

- Kodituwakku, P.W. (2009). Neurocognitive profile in children with fetal alcohol spectrum disorders. *Developmental Disabilities Research Reviews* 15, 218–224.
- LaFiette, M.H. (1994). Effects of prenatal alcohol exposure on serial pattern performance in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 16, 41–46.
- Lariviere, R.C. & Julien, J.P. (2004). Function of intermediate filaments in neuronal development and disease. *Journal of Neurobiology* 58, 131-148.
- Lawton, M. E. (1985). Alcohol in breast milk. *Australian Journal of Obstetrics and Gynaecology* 25, 71-73.
- Lee, M. K. & Cleveland, D. W. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 187-217.
- Lee, H.Y.; Yang, B.C.; Lee, E.S.; Chung, J.I.; Koh, P.O.; Park, M.S. & Kim, M.O. (2011). Modulation by the GABAB receptor siRNA of ethanol-mediated PKA- α , CaMKII, and p-CREB intracellular signaling in prenatal rat hippocampal neurons. *Anat Cell Biol* 44, 210-217.
- Leung-Pineda, V. Ryan, C.E. & Piwnica-Worms, H. (2006). Phosphorylation of Chk1 by ATR Is Antagonized by a Chk1-Regulated Protein Phosphatase 2A Circuit. *Molecular and Cellular Biology* 26, 7529–7538.
- Lieber, C.S. (2000). Alcohol: Its metabolism and interaction with nutrients. *Annual Review of Nutrition* 20, 395–430.
- Lieber, C.S. (2003). Relationships Between Nutrition, Alcohol Use, and Liver Disease. *Alcohol Res Health.* 27, 220-231.

Liem, R.H.K. & Messing, A. (2009). Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 1814-1824.

Lipinski, R.J.; Hammond, P.; O'Leary-Moore, S.K.; Ament, J.J.; Pecevich, S.J.; Jiang, Y.; Budin, F.; Parnell, S.E.; Suttie M.; Godin, E.A.; Everson; J.L.; Dehart, D.B.; Oguz, I.; Holloway, H.T.; Styner, M.A.; Johnson, G.A. & Sulik, K.K. (2012). Ethanol-Induced Face-Brain Dysmorphology Patterns Are Correlative and Exposure-Stage Dependent. *PLoS One*. 7, e43067.

Liu, Q.; Xie, F.; Alvarado-Diaz, A.; Smith, M.A.; Moreira, P.I.; Zhu, X. & Perry, G. (2011). Neurofilamentopathy in neurodegenerative diseases. *Open Neurol J* 5, 58–62.

Maier, S.; Chen, W-J. & West, J. (1996). The effects of timing and duration of alcohol exposure on development of the fetal brain, in *Fetal Alcohol Syndrome: From Mechanism to Prevention* (E L A e d), pp 27–50. CRC Press, BocaRaton, FL.

Maier, S. & West, J. (2001). Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimester equivalent in the rat. *Alcohol* 23, 49 –57.

Maier, S. & West, J. (2003). Alcohol and nutritional control treatments during neurogenesis in rat brain reduce total neuron number in locus coeruleus, but not in cerebellum or inferior olive. *Alcohol* 30, 67–74.

Masamune, A.; Kikuta, K.; Satoh, M.; Satoh A. & Shimosegawa, T. (2002). Alcohol activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *Journal of Pharmacol. Exp.* 302, 36–42.

Mattson S.N.; Riley, E.P.; Delis, D.C.; Stern, C. & Jones, K.L. (1996). Verbal learning and memory in children with fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 20, 810–816.

Mattson, S.N.; Riley, E.P.; Gramling, L.; Delis, D.C. & Jones, K.L. (1998). Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology* 12, 146–153.

Mattson, S.N. & Roebuck, T.M. (2002) Acquisition and retention of verbal and nonverbal information in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 26, 875–882.

Mattson, S.N. & Riley, E.P. (1998). A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 22, 313–320.

Matthews D.B. & Simon, P.E. (1998). Prenatal exposure to ethanol disrupts spatial memory: effect of the training-testing delay interval. *Physiol Behav* 64, 63–67.

Matthews, D. B. (2000). Ethanol and the hippocampal system: behavior to molecular biology. *Hippocampus* 10, 87.

Mennella, J. (1997). Infant's suckling responses to the flavor of alcohol in mother's milk. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 581-585.

Mennella, J. A. & Beauchamp, G. K. (1991). The transfer of alcohol to human milk. *N Engl J Med* 325, 981-985.

Menella, J. A. & Beauchamp, G.K. (1993). Beer, breast feeding and folklore. *Developmental Psycho-biology* 26, 459-466.

Menella, J.A. & Garcia-Gomez, P.L. (2001). Sleep disturbances after acute exposure to alcohol in mothers' milk. *Alcohol* 3, 153-158.

Menet, V.; Giménez y Ribotta, M.; Chauvet N.; Drian, M.J.; Lannoy, J.; Colucci-Guyon, E. & Privat, A. (2001). Inactivation of glial fibrillary acidic protein gene, but not that vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J. Neurosci.* 21, 6147-6158.

Miller, C.C.; Ackerley, S.; Brownlees, J.; Grierson, A.J.; Jacobsen, N.J. & Thornhill, P. (2002). Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 323–330.

Miller, M. (1986). Fetal alcohol effects on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science* 233, 1308–1311.

Miller, M. (1988). Effect of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex: I. Neuronal generation. *Alcohol Clin Exp Res* 12, 440–449.

Miller, M. (1989). Effects of prenatal exposure to ethanol on neocortical development: II. Cell proliferation in the ventricular and subventricular zones of the rat. *J Comp Neurol* 287, 326–338.

Miller, M. (1995). Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 19, 1500–1509.

Mokdad, A.H.; Marks, J.S.; Stroup, D.F. & Gerberding, J.L. (2004). Actual causes of death in the United States, 2000. *J Am Med Assoc* 291, 1238–1245.

Mooney S.M. & Miller M.W. (2001). Effects of prenatal exposure to ethanol on the expression of bcl-2, bax and caspase 3 in the developing rat cerebral cortex and thalamus. *Brain Research* 911, 71–81.

Murillo-Fuentes, M.L.; Murillo, M.L. & Carreras, O. (2003). Effects of maternal ethanol consumption during pregnancy or lactation on intestinal absorption of folic acid in suckling rats. *Life Sci.* 73, 2199-2209.

Nestler, E.J. & Greengard, P. (1999). Serine and Threonine phosphorylation. In: Siegel, G. et al (eds). *Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspect.* 6 ed. New York, Lippincott – Raven Publishers.

Nicholl, I.D. & Quinlan, R.A. (1994). Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO Journal* 13, 945–953.

Nutt, D.; King L.A.; Saulsbury, W. & Blakemore, C. (2007). Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 369, 1047–1053.

Ornoy, A. & Ergaz, A. (2010). Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. *Int J Environ Res Public Health* 7, 364-379.

Pant, H.C. (1988). Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J* 256, 665-668.

Paramio, J.M. & Jorcano, J.L.(2002). Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *BioEssays* 24, 836-844.

Pekny, M.; Johansson, C.B.; Eliasson, C.; Stakeberg, J.; Wallén, A.; Perlmann, T.; Lendahl, U.; Betsholtz, C.; Berthold, C.H. & Frisé, J. (1999). Abnormal Reaction to

Central Nervous System Injury in Mice Lacking Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin. *J Cell Biol.* 145, 503-514.

Perrot, R.; Berges, R.; Bocquet, A. & Eyer, J. (2008). Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 38, 27–65.

Perrot, R. & Eyer, J. (2009). Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Bull.* 80, 282–295.

Petersen, O.H. & Sutton, R. (2006). Ca² signaling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci* 27, 113–120.

Pikkarainen, P.H. & Raiha, N.C.R. (1967). Development of alcohol dehydrogenase activity in the human liver. *Pediatr. Res.* 1, 165–168.

Potokar, M. et al. (2007). Cytoskeleton and Vesicle Mobility in Astrocytes. *Traffic.* 8, 12-20.

Povlishock, J. T.; Marmarou, A.; McIntosh, T.; Trojanowski, J.Q. & Moroi, J. (1997). Impact acceleration injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 347-59.

Quertemont, E.; Eriksson, C.J.; Zimatkin, S.M.; Pronko, O.S.; Diana, M.; Pisano, M.; Rodd, Z.A.; Bell, R.R. & Ward, R.J. (2005). Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. *Alcohol Clin Exp Res* 29, 1514 –1521.

Rao, P.S. & Sari, Y. (2012). Glutamate Transporter 1: Target for the Treatment of Alcohol Dependence. *Curr Med Chem.* 19, 5148-5156.

Rehm, J. (2011). The Risks Associated With Alcohol Use and Alcoholism. *Alcohol Res Health* 34, 135–143.

Riley, E.P. (1990). The long-term behavioral effects of prenatal alcohol exposure in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 14, 670-673.

Robinson M.J. & Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 180–186.

Rockwood, G.A. & Riley, E.P. (1986). Suckling deficits in rats exposed to ethanol in utero. *Teratology* 33, 145–151.

Roivainen, R.; Hundle, B. & Messing, R.O. (1995). Ethanol enhances growth factor activation of mitogen-activated protein kinases by a protein kinase C-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 1891-1895.

Rosenegger, D.; Parvez, K. & Lukowiak, K. (2008). Enhancing memory formation by altering protein phosphorylation balance. *Neurobiol Learn Mem* 90, 544–552.

Ruffles, J.; Griffin, M. & Dickenson; J.M. (2004). Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *Eur J Pharmacol.* 483, 163-73.

Saito, M.; Mao, R.F.; Wang, R.; Vadasz, C. & Saito, M. (2007). Effects of gangliosides on ethanol-induced neurodegeneration in the developing mouse brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 31, 665-674.

Sanna, P.; Simpson C.; Lutjens R. & Koob, G. (2002). ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. *Brain Res.* 948, 186–191.

- Schulman, H. (1995). Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 375-381.
- Shen, Y. et al. (1994). The hippocampus: a biological model for studying learning and memory. *Prog. Neurobiol.* 44, 485–496.
- Silverman-Gavrila, L.B.; Senzel, A.G.; Charlton, M.P. & Feng, Z.P. (2011). Expression, phosphorylation, and glycosylation of CNS proteins in aversive operant conditioning associated memory in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience* 186, 94-109.
- Smith, T. & Navratilova, E. (2003). The effect of ethanol exposure on mitogen-activated protein kinase activity and expression in cultured rat astrocytes. *Neuroscience Letters* 341, 91–94
- Spanagel, R. (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89, 649–705.
- Sokol R.J.; Delaney-Black, V. & Nordstrom, B. (2003). Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA* 290, 2996 –2999.
- Sontag, E. (2001). Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal* 13, 7-16.
- Steinert, P. M. & Roop, D. R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 593–625.
- Streissguth, A.P.; Barr, H.M. & Sampson, P.D. (1990). Moderate prenatal alcohol exposure: Effects on child IQ and learning problems at age 7th years. *Alcohol Clin Exp Res* 14, 662-669.

Styers, M.; Salazar, G.; Love, R.; Peden, A.A.; Kowalczyk, A.P. & Faundez, V. (2004). The Endo-Lysosomal Sorting Machinery Interacts with the Intermediate Filament Cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell* 15, 5369-5382.

Subramanian, M.G. (1999). Alcohol Inhibits Suckling-Induced Oxytocin Release in the Lactating Rat. *Alcohol*. 19, 51-55.

Subramanian, M.G. & Abel, E.L. (1988). Alcohol inhibits suckling-induced prolactin release and milk yield. *Alcohol* 5, 95-98.

Sullivan, S.M.; Björkman, S.T.; Miller, S.M.; Colditz, P.B. & Pow, D.V. (2010). Structural remodeling of gray matter astrocytes in the neonatal pig brain after hypoxia/ischemia. *Glia* 58, 181–194.

Sullivan, S.M.; Sullivan, R.K.; Miller, S.M.; Ireland, Z.; Björkman, S.T.; Pow, DV. & Colditz, P.B. (2012). Phosphorylation of GFAP is Associated with Injury in the Neonatal Pig Hypoxic-Ischemic Brain. *Neurochem Res*. 37, 2364-2378.

Szeverenyi, I.; Cassidy A.J.; Chung, C.W.; Lee, B.T.; Common, J.E.; Ogg, S.C.; Chen, H.; Sim, S.Y.; Goh, W.L.; Ng, K.W.; Simpson, J.A.; Chee, L.L.; Eng, G.H.; Li, B.; Lunny, D.P.; Chuon, D.; Venkatesh, A.; Khoo, K.H.; McLean, W.H.; Lim, Y.P. & Lane, E.B. (2008). The human intermediate filament database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Human Mutation* 29, 351–360.

Tavares, E.; Gomez-Tubio, A.; Murillo & M.L.; Carreras, O. (1999). Folic acid intestinal absorption in newborn rats at 21 day postpartum: effects of maternal ethanol consumption. *Life Sci*. 64, 2001-2010.

Takemura, M., Gomi, H.; Colucci-Guyon, E. & Itohara, S. (2002). Protective Role of Phosphorylation in Turnover of Glial Fibrillary Acidic Protein in Mice. *The Journal of Neuroscience* 22, 6972–6979.

Thomas, G.M. & Huganir, R.L. (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 173–183.

Thomas, J.D. (1997). MK-801 administration during ethanol withdrawal in neonatal pups attenuates ethanol induced behavioral deficits. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 1218–1225.

Toivola, D.M.; Tao, G.Z.; Habtezion, A.; Liao, J. & Omary, M.B. (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in Cell Biology* 15, 608-617.

Tran, M.N.; Wu, A.H. & Hill, D.W. (2007). Alcohol dehydrogenase and catalase content in perinatal infant and adult livers: Potential influence on neonatal alcohol metabolism. *Toxicol Lett.* 169, 245-252.

Trevisan, L.; Fitzgerald, L.W.; Brose, N.; Gasic, G.P.; Heinemann, S.F.; Duman, R.S. & Nestler, E.J. (1994). Chronic ingestion of ethanol upregulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 62, 1635– 1638

Troncoso, J. C.; Hoffman, P.N.; Griffin, J.W.; Hess-Kozlow, K.M. & Price, D.L.; (1985) Aluminum intoxication: a disorder of neurofilament transport in motor neurons. *Brain Res.* 342, 172-175.

Veeranna; Amin, N.D.; Ahn, N.G.; Jaffe, H.; Winters, C.A.; Grant, P. & Pant, H.C. (1998). Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J Neurosci.* 18, 4008–4021.

Xu, Z.S.; Liu, W.S. & Willard, M.B. (1992). Identification of six phosphorylation sites in the COOH-terminal tail region of the rat neurofilament protein. *Journal of Biological Chemistry* 267, 4467–4471.

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

Wang, Y.T. & Salter, M.W. (1994). Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* 369, 233-235.

Wettstein, G.; Bellaye, P.S.; Micheau, O. & Bonniaud, P.; (2012). Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity? *Int J Biochem Cell Biol.* 44, 1680-1686.

White, A.M. et al. (2000) Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus* 10, 88–93.

Wilhelmsson U.; Pekna, M.; Berthold; C.H.; Blom, S.; Eliasson, C.; Renner, O.; Bushong, E.; Ellisman, M. & Morgan; T.E.; Pekny, M. (2004). Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci* 24, 5016–5021.

Willoughby, K.A.; Sheard, E.D.; Nash, K. & Rovet, J. (2008). Effects of prenatal alcohol exposure on hippocampal volume, verbal learning, and verbal and spatial recall in late childhood. *Journal of International Neuropsychological Society* 14, 1022–1033.

Zheng, Y.L.; Li, B.S.; Veeranna & Pant, H.C. (2003). Phosphorylation of the head domain of neurofilament protein (NF-M). A factor regulating topographic phosphorylation of NF-M tail domain KSP sites in neurons. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24026–24032.

Zhou, J.; Wang, H.; Feng, Y. & Chen, J. (2010). Increased expression of cdk5/p25 in N2a cells leads to hyperphosphorylation and impaired axonal transport of neurofilament proteins. *Life Sciences* 86, 532–537.

Zima, T. & Kalousova, M. (2005). Oxidative Stress and Signal Transduction Pathways in Alcoholic Liver Disease. *Alcoholism: Clin Exp Res* 29, 110S-115S.

5. ANEXOS

5.1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos elementos do citoesqueleto.

Figura 2: Representação esquemática da estrutura da subunidade de um FI.

Figura 3: Representação esquemática do citoesqueleto em um neurônio.