

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE CÓRTEX CEREBRAL E DE CEREBELO  
DE RATOS SUBMETIDOS A MODELOS EXPERIMENTAIS DE  
ERROS INATOS DO METABOLISMO NO PERIODO  
DE DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL

MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Orientadora: Profa. REGINA PESSOA PUREUR

Co-orientador: Prof. CLÓVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas - Bioquímica do Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título  
de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

1991

## AGRADECIMENTOS

A Regina e ao Clóvis pela dedicação e carinho com que me orientaram neste trabalho.

Aos amigos do laboratório 4: Giselle, Márcia, Ângela G. de Matos e Clarissa que muito me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório 8: Ângela Wyse, Carlos Dutra, Janice e Moacir que muito me ajudaram.

Ao Carlos pelo apoio e incentivo dado nos momentos difíceis deste trabalho.

A minha mãe e a Marlise pelo carinho e incentivo que sempre me deram.

Enfim a todos que de uma maneira ou de outra auxiliaram na confecção deste trabalho.

Ao CNPq, FINEP, FAPERGS, PROPESP-UFRGS, pelos auxílios à pesquisa e à CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

I.	- INTRODUÇÃO .....	1
I.1	- ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	2
I.1.a	- HIPERFENILALANINEMIA .....	2
I.1.b	- HIPERPROLINEMIA .....	9
I.1.c	- METILMALONICAIDEMIA .....	13
I.2	- CITOESQUELETO .....	18
I.3	- NEUROFILAMENTOS .....	24
I.4	- OBJETIVOS .....	29
II.	- MATERIAL E MÉTODOS .....	30
II.1	- REAGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS .....	31
II.2	- ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	31
II.3	- TRATAMENTO .....	31
II.4	- EXTRAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	34
II.5	- DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	35
II.6	- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDA-PAGE) ...	35
II.7	- FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) .....	37
II.8	- ELETROFORESE BIDIMENSIONAL .....	38
II.9	- SECAGEM DOS GEIS .....	38
II.10	- DENSITOMETRIA .....	38
II.11	- MAPEAMENTO PEPTÍDICO .....	39
II.12	- ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
III.	- RESULTADOS .....	42
III.1	- EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE OS PESOS CORPORAL, CEREBRAL, CORTICAL E CEREBELAR .....	43
III.2	- EXTRAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	45
III.3	- FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	47

III.4	- DENSITOMETRIA .....	48
III.5	- EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CORTEX CEREBRAL .....	51
III.5.a	- CONTEUDO PROTÉICO DO HOMOGENEIZADO E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	51
III.5.b	- CONTEUDO TOTAL DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS E DAS SUBUNIDADES PROTEICAS INDIVIDUAIS DOS FILAMENS INTERMEDIÁRIOS .....	53
III.5.c	- QUANTIFICAÇÃO INDIVIDUAL DAS PROTEÍNAS DO TIPO FILAMENTO INTERMEDIÁRIO EXPRESSAS EM $\mu\text{g}$ DE FI POR $\text{mg}$ DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	55
III.5.d	- RAZÃO MOLAR ENTRE AS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS	57
III.5.e	- MAPEAMENTO PEPTIDICO .....	59
III.6	- EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE O CEREBELO .....	61
III.6.a	- CONTEUDO PROTÉICO DO HOMOGENEIZADO E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS NO CEREBELO	61
III.6.b	- CONTEUDO TOTAL DE FILAMENTS INTERMEDIÁRIOS E DAS SUBUNIDADES PROTEICAS INDIVIDUAIS DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	63
III.6.c	- QUANTIFICAÇÃO INDIVIDUAL DAS PROTEÍNAS DO TIPO FILAMENTO INTERMEDIÁRIO EXPRESSA EM $\mu\text{g}$ DE FI POR $\text{mg}$ DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	68
III.6.d	- RAZÃO MOLAR ENTRE AS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS	70
III.7	- COMPARAÇÃO ENTRE CÔRTEX CEREBRAL E CEREBELO DOS ANIMAIS TRATADOS COM SALINA (GRUPO CONTROLE) .....	70
III.7.a	- CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO HOMOGENEIZADO E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS E CONCENTRAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS E NEUROFILA-	

	MENTOS .....	70
III.7.b	- SUBUNIDADES PROTEICAS INDIVIDUAIS DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	72
III.7.c	- RAZÕES MOLARES ENTRE AS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS .....	74
IV.	- DISCUSSÃO .....	77
IV.1	- INDUÇÃO DOS EIM E INFLUÊNCIA DOS MESMOS SOBRE OS PESOS CORPORAL, CEREBRAL, CEREBELAR E CORTICAL .....	78
IV.2	- EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	79
IV.3	- EFEITO DOS EIM SOBRE OS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS ..	81
IV.4	- ESTUDO COMPARATIVO DOS NEUROFILAMENTOS DE CORTEX CEREBRAL E DE CEREBELO .....	84
V.	- CONCLUSÕES .....	89
VI.	- RESUMO .....	91
VII.	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

## TABELAS

TABELA I.1 - CLASSIFICAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI) E SUAS ORIGENS CELULARES .....	20
TABELA II.1 - ESQUEMA DE INDUÇÃO DOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	33
TABELA III.1 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE OS PESOS CORPORAL, CEREBRAL, CORTICAL E CEREBELAR DE RATOS COM 30 DIAS DE IDADE .....	44
TABELA III.2 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO PROTEICO DO HOMOGENEIZADO (H) E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FE) NO CORTEX CEREBRAL .....	52
TABELA III.3 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO TOTAL DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI) NO CORTEX CEREBRAL .....	54
TABELA III.4 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A RAZÃO MOLAR ENTRE AS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS NO CORTEX CEREBRAL .....	60
TABELA III.5 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO PROTEICO DO HOMOGENEIZADO (H) E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FE) NO CEREBELO .	64
TABELA III.6 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO TOTAL DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI) NO CEREBELO .	66
TABELA III.7 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A RAZÃO MOLAR ENTRE AS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS NO	



CEREBELO ..... 71

TABELA III.8 - COMPARAÇÃO ENTRE CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO QUANTO A CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO HOMOGENEIZADO (H) E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA (FE) E SOBRE A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI) E DE NEUROFILAMENTOS (NF) ..... 73

TABELA III.9 - COMPARAÇÃO ENTRE CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO QUANTO A RAZÃO MOLAR ENTRE AS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS ..... 76

## FIGURAS

FIGURA I.1 - REAÇÃO DE HIDROXILAÇÃO DA FENILALANINA .....	4
FIGURA I.2 - ROTA METABOLICA DA PROLINA .....	11
FIGURA I.3 - ROTA DE DEGRADAÇÃO DO PROPIONIL-CoA A SUCCINIL-CoA .....	15
FIGURA I.4 - ESQUEMA DE UMA SUBUNIDADE DE FILAMENTO INTERMEDIÁRIO .....	22
FIGURA I.5 - POLIMERIZAÇÃO DAS SUBUNIDADES PROTEICAS CONSTITUINTES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS ...	23
FIGURA I.6 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO TRIPLETE PROTEICO DOS NEUROFILAMENTOS .....	26
FIGURA II.1 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	36
FIGURA III.1 - SDS-PAGE 10 % DAS DIFERENTES ETAPAS DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	46
FIGURA III.2 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10 % DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	49
FIGURA III.3 - TRAÇADO DENSITOMÉTRICO DE UM GEL DE SDS-PAGE OBTIDO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS, REPRESENTATIVO DO MÉTODO ANALÍTICO UTILIZADO .....	50
FIGURA III.4 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO INDIVIDUAL DE SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS .....	

RIOS EXPRESSO EM $\mu$ g DE FI POR ESTRUTURA (CÓRTEX CEREBRAL) .....	56
FIGURA III.5 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO INDIVIDUAL DE SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS EXPRESSO EM $\mu$ g DE FI POR mg DE PROTEÍNAS TOTAIS NO CÓRTEX CEREBRAL .....	58
FIGURA III.6 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A DIGESTÃO PROTEOLÍTICA DA SUBUNIDADE PROTEICA DE 200 kDa DOS NF PELA PROTEASE V-8 DO <u>S. aureus</u> .....	62
FIGURA III.7 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO INDIVIDUAL DE SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS EXPRESSO EM $\mu$ g DE FI POR ESTRUTURA (CEREBELO) .....	67
FIGURA III.8 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CONTEÚDO INDIVIDUAL DE SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS EXPRESSO EM $\mu$ g DE FI POR mg DE PROTEÍNAS TOTAIS NO CEREBELO .....	69
FIGURA III.9 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SUBUNIDADES INDIVIDUAIS DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO .....	75

## I. INTRODUÇÃO

## I.1- ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários geralmente devidos a deficiências enzimáticas, o que ocasiona um bloqueio de rotas metabólicas. O resultado deste bloqueio pode levar ao acúmulo de substâncias tóxicas ou à falta de substâncias essenciais, gerando muitas vezes distúrbios no desenvolvimento mental e/ou físico do indivíduo (Scriver et al., 1989).

### I.1.a - Hiperfenilalaninemia

A homeostase do "pool" de fenilalanina reflete a interação entre a dieta, "turnover protéico" e catabolismo. A hidroxilação na posição 4 do anel fenil (Moss & Schoenheimer, 1940) fisiologicamente é a via mais significativa da sua degradação (Moss & Schoenheimer, 1940; Grau & Steele, 1954) formando tirosina.

A hidroxilação da fenilalanina está esquematizada na figura I.1. O sistema hepático de hidroxilação da fenilalanina contém 3 componentes essenciais: fenilalanina hidroxilase (PAH), diidrobiopteridina redutase (DHPR), e tetraidrobiopterina ( $BH_4$ ) (Kaufman, 1963 ; Kaufman, 1971). PAH catalisa uma reação acoplada em que a fenilalanina é oxidada a tirosina e  $BH_4$  é oxidado ao correspondente quinonóide-diidropteridina ( $qBH_2$ ). O oxigênio incorporado na tirosina é originado do oxigênio molecular. Durante a reação de hidroxilação, o segundo átomo de oxigênio da molécula é reduzido a água. A enzima DHPR NADH-dependente

catalisa a regeneração do BH<sub>4</sub> a partir do qBH<sub>2</sub> (Fellman et al., 1972; Buist et al., 1978 - citados por Tourian & Sidbury, 1983).

Outra enzima que participa da hidroxilação da fenilalanina "in vivo" é a diidrofolato redutase (DHFR). Esta enzima catalisa a redução de 7,8-diidrobiopteridina (7,8-BH<sub>2</sub>) para tetraidrobiopterina (Kaufman, 1967). Esta reação é importante quando a taxa de redução do qBH<sub>2</sub> pela DHFR é menor do que a sua formação pela PAH, acumulando qBH<sub>2</sub> que é extremamente instável e sofre um rearranjo para 7,8-BH<sub>2</sub>. Este último é transformado em BH<sub>4</sub> através da enzima DHFR.

O sistema completo de hidroxilação da fenilalanina em humanos foi demonstrado somente em fígado (Scriver et al., 1980). A fenilalanina hidroxilase não está presente no cérebro (Abita et al., 1974). O cérebro contém outra enzima, tirosina hidroxilase, que catalisa a conversão de fenilalanina em tirosina em uma taxa comparável à sua capacidade de hidroxilar tirosina (Katz et al., 1976). Portanto, a tirosina hidroxilase atuando na fenilalanina dá ao cérebro em desenvolvimento a tirosina necessária para a síntese protéica (Kaufman, 1987 - citado por Scriver et al., 1989).

A biopteridina é cofator obrigatório na hidroxilação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofânio (Breneman & Kaufman, 1964; Friedman et al., 1972).

A fenilalanina também segue vias catabólicas menores, formando fenilpiruvato, feniletilamina e outros metabólitos, todos em pequenas quantidades (Rodwell, 1983; Scriver et al., 1989).

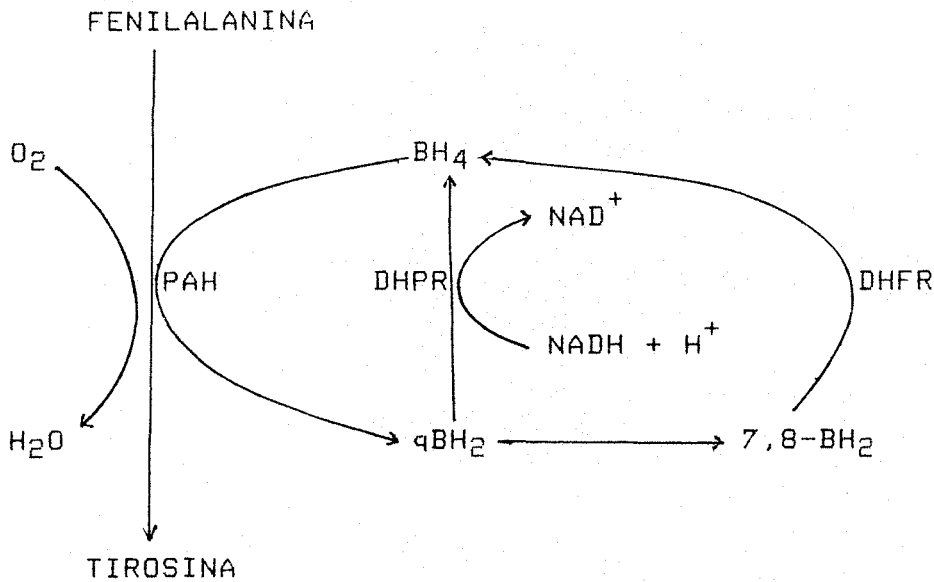


Figura I.1 - Reação de hidroxilação da fenilalanina

Abreviações: PAH - fenilalanina hidroxilase; DHPR - diidropteridina redutase; DHFR - diidrofolato redutase; BH<sub>4</sub> - tetraidrobiopterina; qBH<sub>2</sub> - diidrobiopterina na forma quinonóide; 7,8-BH<sub>2</sub> - 7,8-diidrobiopterina; NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH - NAD reduzido ( Sciver et al., 1989 ).

As hiperfenilalaninemias (HFA) compreendem um grupo de distúrbios metabólicos causados por um defeito genético no sistema enzimático que catalisa a conversão de fenilalanina em tirosina, causando elevados níveis circulantes e teciduais de fenilalanina (Tourian & Sidbury, 1983). Os pacientes com HFA possuem níveis plasmáticos de fenilalanina acima de 0,12 mM (Scriver et al., 1989).

Segundo Scriver e colaboradores, (1989) as HFA são classificadas em:

1- HFA com deficiência de fenilalanina hidroxilase

- Fenilcetonúria (PKU)
- Não fenilcetonúria (não-PKU)

2- HFA sem alteração da fenilalanina hidroxilase

- Deficiência de BH<sub>4</sub>
- Deficiência de DHPR

Não-PKU é um tipo de HFA em que a deficiência da atividade da PAH é menor do que no caso da PKU, e o aumento da formação de ácido fenilpirúvico é mínimo ou ausente. Esta forma de HFA é considerada benigna (Scriver et al., 1989). PKU resulta de uma severa disfunção da fenilalanina hidroxilase hepática, que normalmente converte 90% de toda fenilalanina da dieta em tirosina (Singer & Johnson, 1982). A concentração plasmática de fenilalanina nos pacientes com PKU não tratados é superior a 1,2 mM (Guttler, 1984).

Pacientes com PKU não tratados possuem um retardo mental progressivo, com quociente de inteligência (QI) menor do que 50 (Jervis, 1963; citado por Berry et al., 1990). A dieta com



baixa concentração de fenilalanina previne o retardo mental, mas somente se iniciada logo após o nascimento (Knox, 1972, citado por Delvale et al., 1978). Isto indica que a deficiência mental está relacionada ao acúmulo de fenilalanina e/ou seus metabólitos, e que os primeiros dias de vida são decisivos para a sua instalação (Delvalle et al., 1978).

Appel (1966) sugeriu que o retardo mental associado à fenilcetonúria resulta do comprometimento da síntese protéica no cérebro em desenvolvimento. Oldendorf (1973) observou que a alta concentração de fenilalanina no soro dos animais com PKU experimental reduz muito a captação cerebral dos grandes aminoácidos neutros. Estes aminoácidos são transportados para o cérebro através do mesmo carreador da fenilalanina. É provável que o desequilíbrio de aminoácidos no cérebro, e não a elevada concentração de fenilalanina em si, seja o mecanismo responsável pela inibição da síntese protéica cerebral observada nos pacientes com PKU (Singer & Johnson, 1982).

Nos animais com PKU experimental se observa diminuição no conteúdo de mielina, devido à menor quantidade de lipídios associados à mesma, principalmente os galactolipídios (Agrawal, 1973 - citado por Tourian & Sidbury, 1983). A diminuição do conteúdo de mielina também é devida a redução da síntese protéica cerebral (Appel, 1966; Siegel et al., 1971; Copenhaver et al., 1973).

Tem sido observado que a fenilalanina e seus metabólitos "in vitro" alteram a atividade de enzimas associadas a neurotransmissão. Fenilpiruvato e fenilacetato diminuem a atividade da hexoquinase (Weber, 1969) assim como, fenilalanina e

fenilpiruvato alteram a atividade da ATP-difosfohidrolase (EC 3.6.1.5) em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos (Wyse, 1990).

Para elucidar os mecanismos pelos quais a fenilcetonúria atua impedindo o desenvolvimento neuronal normal várias tentativas de imitar a doença humana em animais de laboratório foram realizadas. Foi desenvolvido um modelo de PKU com administração de fenilalanina em altas doses aos animais, atingindo altas concentrações de fenilalanina no soro. Entretanto, este modelo mostrou-se ineficiente, devido ao acúmulo concomitante de tirosina (Clark, 1969; Prensky, 1971; Johnson, 1973 - citados por Lane et al., 1980). Para inibir a formação de tetraidrobiopteridina e, consequentemente diminuir a hidroxilação da fenilalanina, foram utilizados inibidores da enzima pteridina redutase tal como esculina (Valdivieso et al., 1975) e antibióticos como cotrimazole (Dhondt, 1977 - citado por Lane et al., 1980), mas estes se mostraram tóxicos e não específicos em suas ações.

Lipton e colaboradores (1967) introduziram um modelo de HFA em ratos com administração concomitante de fenilalanina e p-clorofenilalanina que é um inibidor da PAH. Neste modelo, algumas das características de fenilcetonúria foram reproduzidas, porém a p-clorofenilalanina apresentou diversos efeitos tóxicos e ações não específicas (Lane et al., 1980).

Greengard e colaboradores, (1976) introduziram um modelo de fenilcetonúria com administração de fenilalanina juntamente com  $\alpha$ -metilfenilalanina (MePHE). A MePHE é um

análogo da fenilalanina e um potente inibidor da enzima PAH hepática. Camundongos tratados desta maneira exibem concentrações plasmáticas de fenilalanina aproximadamente 10 vezes maior do que o normal, sem aumento na concentração de tirosina ou efeito no crescimento do animal (Greengard et al., 1976). MePHE produz menos efeitos tóxicos do que p-clorofenilalanina (Delvalle, 1978).

Huether e colaboradores (1983), observaram que ratos submetidos a modelo experimental de fenilcetonúria com injeção diária de fenilalanina mais MePHE apresentaram pequena redução de peso corporal mas considerável dano no desenvolvimento cerebral como peso, tamanho e conteúdo de DNA diminuídos.

Estudos realizados em nossos laboratórios demonstraram que PKU aguda produzida em ratos com 29-31 dias de idade, não afetou a atividade motora nem o comportamento exploratório dos animais, mas afetou a aquisição e/ou consolidação da memória, sem interferir na evocação da mesma na tarefa de campo aberto. Estes efeitos foram independentes da presença da MePHE (Castilhos, 1986).

Estudos "in vitro" realizados em nossos laboratórios mostraram que a p-clorofenilalanina, mas não MePHE inibem a piruvato quinase e a captação cerebral de glicose (Rodrigues et al., 1990).

A PKU experimental (aguda e crônica) induzida em ratos com administração de fenilalanina em associação com MePHE aumenta a atividade da ATP-difosfohidrolase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento (Wyse, 1990).

### I.1.b - Hiperprolinemia

A prolina é um aminoácido não essencial. A L-prolina é o maior substrato metabólico nos fluidos extracelulares sendo excedido apenas por glutamina e alanina no "pool" de aminoácidos.

A prolina pode ser sintetizada a partir da ornitina e glutamato tendo pirrolino-5-carboxilato (P5C) ou gama-semialdeído glutâmico como intermediários (figura I.2). Os dois últimos compostos estão em equilíbrio espontâneo. A ornitina aminotransferase cataliza a conversão de ornitina para P5C. A ornitina parece ser a fonte principal de prolina (Smith, 1979 - citado por Phang & Scriver, 1989).

A degradação da prolina em seres humanos envolve a sua conversão para P5C pela enzima prolina oxidase e a oxidação do P5C a ácido glutâmico pela enzima pirrolino-5-carboxilato desidrogenase NAD(P)<sup>+</sup> dependente (Strecker, 1960) (figura I.2).

Todas as reações apresentadas na figura I.2, exceto a reação catalisada pela enzima ornitina aminotransferase, possuem enzimas separadas catalisando os passos de síntese e degradação da prolina.

A prolina oxidase está ligada à membrana mitocondrial do fígado, rim e cérebro (Tagart & Krakaur, 1949; Kramar & Fitscha, 1970 - citados por Phang & Scriver, 1989). A P5C desidrogenase pode estar presente no citosol e na mitocôndria.

Observando-se a rota metabólica da prolina podemos notar que o P5C não é só um intermediário do metabolismo da prolina, como também, ocupa uma posição central no metabolismo intermediário, ligando o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o

ciclo da uréia.

Hiperprolinemias são erros inatos do metabolismo causados pela deficiência de enzimas que compõem a via degradativa da prolina. Existem dois tipos de hiperprolinemia: hiperprolinemia tipo I e hiperprolinemia tipo II. Cada tipo é devido a mutações em diferentes locus gênicos; ambas são desordens autossômicas recessivas (Phang & Scriver, 1989).

A hiperprolinemia tipo I é causada pela deficiência na atividade da enzima prolina oxidase que converte prolina em P5C. Nos indivíduos com este tipo de hiperprolinemia são encontrados níveis plasmáticos de prolina 3 a 5 vezes maiores do que o normal (valores normais 0,10 - 0,45 mM), permanecendo os outros aminoácidos em seus níveis normais. A excreção de P5C é normal. O nível de prolina no líquido céfalo-raquidiano é normal na maioria dos casos (Shafer et al., 1962; Efron, 1965; Fusco et al., 1976).

A hiperprolinemia tipo II é devida à ausência ou deficiência severa de atividade da enzima pirrolino-5-carboxilato desidrogenase que catalisa a conversão do P5C em glutamato (Valle et al., 1973). Os pacientes com este tipo de hiperprolinemia possuem concentrações plasmáticas de prolina 10 a 15 vezes maiores do que o normal.

Pacientes com hiperprolinemia tipo II excretam uma substância com atividade O-aminobenzaldeído na urina identificada como ácido pirrolino-5-carboxílico (Goodman et al., 1974). Esta substância está presente no plasma e na urina em concentração 10 a 40 vezes maiores do que o seu valor normal (Flemming et al.,

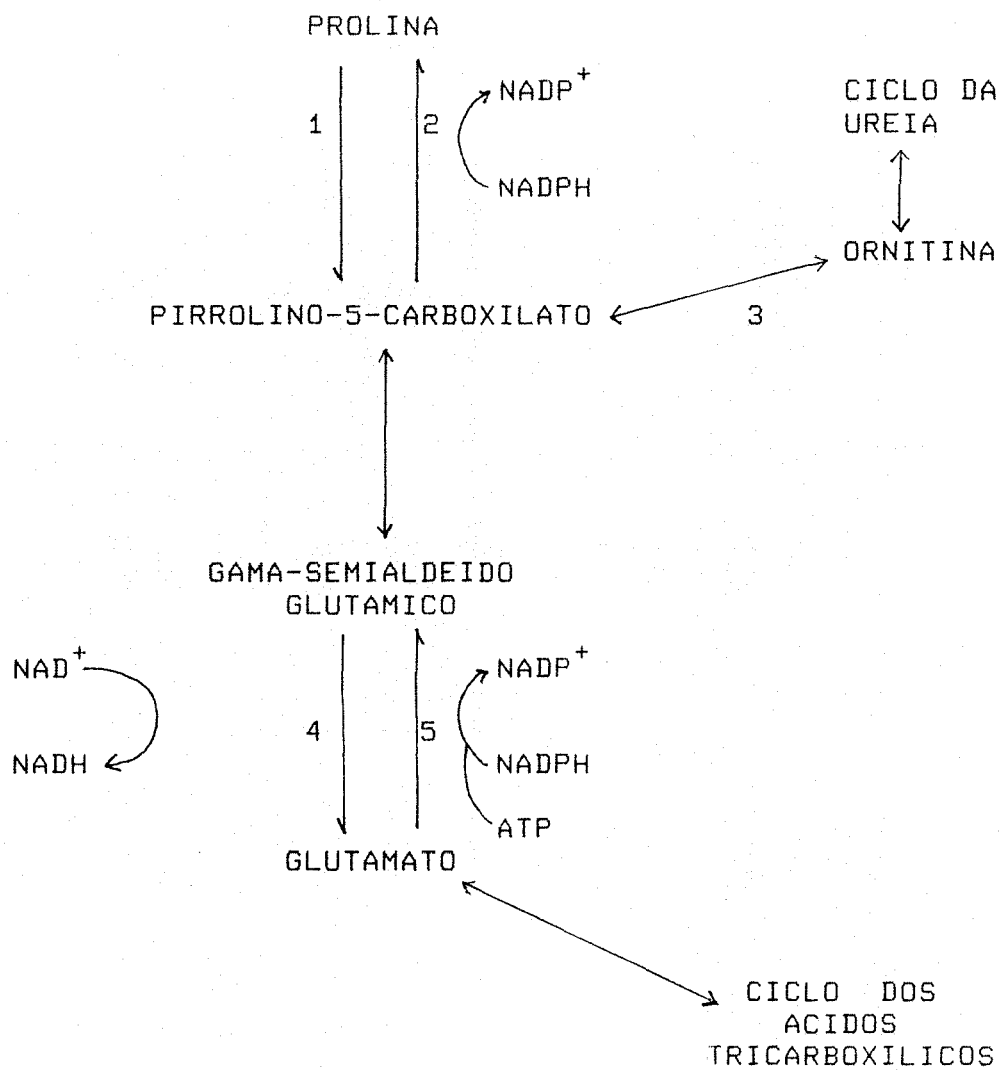


Figura I.2 - Rota metabólica da prolina ( Phang & Scriver, 1989 )

- 1- Prolina oxidase
- 2- Pirrolino-5-carboxilato-redutase
- 3- Ornitina aminotransferase
- 4- Pirrolino-5-carboxilato desidrogenase
- 5- Pirrolino-5-carboxilato sintase

1984). A presença deste composto, que pode estar conjugado com glicina, diferencia hiperprolinemia tipo II do tipo I (Wajner et al., 1990).

A concentração de prolina, maior do que a concentração de P5C, nos pacientes com hiperprolinemia tipo II, provavelmente reflete a atividade das enzimas P5C redutase e prolina oxidase. A P5C redutase em fígado e rim possui velocidade máxima 2 a 3 vezes maior e Km 10 vezes menor para P5C (0,2 mM) do que prolina oxidase tem para prolina (2 mM), favorecendo o acúmulo de prolina (Peisach & Streker, 1962). Além do mais P5C redutase no fígado e rim é relativamente insensível à inibição por prolina (Peisach & Streker, 1962; Valle et al., 1973). Portanto, a alta concentração de prolina não inibe a conversão de P5C em prolina. Nas hiperprolinemias o único aminoácido aumentado no sangue é a prolina, porém, prolina, hidroxiprolina e glicina estão em concentrações aumentadas na urina. A excreção urinária elevada destes aminoácidos é chamada iminoglicinúria e é devida à competição da prolina em excesso com os demais aminoácidos que compartilham o mesmo sistema de transporte renal.

Ácido-gama-aminobutírico (GABA), glutamato e prolina, que possuem propriedades neuromoduladoras, estão elevados nos pacientes com hiperprolinemia tipo II.

Vários trabalhos comportamentais empregando modelos de hiperprolinemias tipo I e II têm demonstrado que existem alterações comportamentais decorrentes destes estados em animais submetidos a tais modelos, porém, o assunto ainda apresenta algumas controvérsias que esperam por posterior confirmação (Cherkin et al., 1976; Baxter et al., 1985; Davis et al., 1987).

Trabalhos realizados em nosso laboratório (Moreira et al., 1989) demonstraram haver um decréscimo na aprendizagem de animais submetidos a um modelo experimental que simulava os níveis de prolina observados em pacientes com hiperprolinemia tipo II. Foi observado que a alteração de aprendizagem era permanente. Esta deficiência foi observada em aprendizado com tarefas não aversivas.

Há controvérsia quanto a relação entre hiperprolinemia tipo II e alterações clínicas. Segundo Phang e Scriver (1989), as hiperprolinemias são condições benignas, não se constituindo em doença e não sendo indicado tratamento. Outros autores sugerem que dietas pobres em prolina administradas às crianças ajudam a melhorar os sintomas de retardo mental e físico quando presentes nos pacientes com hiperprolinemias tipo I (Harries, 1971 - citado por Davis et al., 1987) e tipo II (Goodman et al., 1974).

#### I.1.c - Metilmalonicacidemia

O metilmalonato (MMA) é um ácido orgânico derivado da metilmalonil-CoA (MMCoA) que, por sua vez, é sintetizada a partir de duas fontes: catabolismo da timina, que contribui pouco para a formação do MMCoA e carboxilação do propionil-CoA, que é a principal fonte de MMCoA. O propionil-CoA provem do catabolismo de alguns aminoácidos essenciais (isoleucina, valina, metionina e treonina), alguns ácidos graxos, e colesterol (Rosenberg & Fenton, 1989) (figura I.3).

Metilmalonicacidemia é uma doença hereditária



autossômica recessiva. Caracteriza-se pelo acúmulo de MMA no sangue e nos tecidos, devido a um defeito na atividade da enzima metilmalonil-CoA-mutase (MMCoA mutase) que faz a conversão de L-metilmalonil-CoA em succinil-CoA (Rosenberg & Fenton, 1989).

De acordo com a natureza do comprometimento bioquímico envolvido, as metilmalonicacidemias são classificadas em 7 tipos, sendo 2 os mais comuns: tipo Mut<sup>0</sup>, que é devido a completa ausência da atividade da enzima MMCoA mutase; e o tipo Mut<sup>-</sup>, que é causado pela redução parcial da atividade da enzima (Rosenberg & Fenton, 1989).

A principal característica bioquímica dos pacientes afetados é o acúmulo de MMA no sangue e na urina. Enquanto crianças normais e adultos excretam na urina menos de 5 mg de MMA diariamente, crianças com metilmalonicacidemia excretam 240 a 5700 mg num período de 24 horas. A concentração plasmática de MMA, não detectada em pessoas normais, varia de 2,6 a 34 mg/dl nestes pacientes (Rosenberg & Fenton, 1989). A concentração de MMA no líquido céfalo raquidiano em um paciente foi igual à concentração sanguínea (18,6 mg/dl) (Oberholzer et al., 1967).

Uma vez que a carboxilação do propionil-CoA é reversível, propionato e alguns de seus precursores (butanona) ou metabólitos ( $\beta$ -hidroxipropionato e metilcitrato) também acumulam no sangue e na urina dos pacientes com metilmalonicacidemia, porém em baixas concentrações (Rosenberg & Fenton, 1989).

As características clínicas mais comuns nos pacientes com metilmalonicacidemia são vômitos, letargia, hipotonia, hepatomegalia, convulsões, retardo mental e coma (Oberholzer et

Valina

Isoleucina

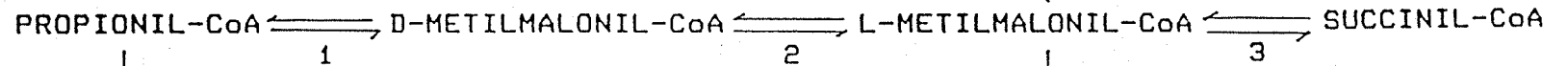
Metionina

Treonina

Colesterol

Ácidos graxos com número ímpar de carbono

Timina



Propionato

METILMALONATO

$\beta$ -hidróxi-propionato

Metilcitrato

Propionilglicina

Figura I.3 - Rota de degradação do propionil-CoA à succinil-CoA

( Rosemberg & Fenton, 1989 ).

1 - Propionil-CoA carboxilase

2 - Metilmalonil-CoA racemase

3 - metilmalonil-CoA mutase

al., 1967).

Ledley e colaboradores (1984) descreveram 8 crianças que apresentavam metilmalonicacidúria benigna. Estas crianças, possuíam níveis altos de MMA na urina e a excreção de - hidroxipropionato, metilcitrato e outros metabólitos do propionil-CoA era normal. Mesmo sem tratamento estas crianças apresentaram desenvolvimento físico e mental normal, sem episódios de acidose metabólica.

Foi detectada hipoglicemia nos pacientes com metilmalonicacidemia após a ingestão de proteínas (Oberholzer et al., 1967). Esta hipoglicemia pode ser devida à inibição da gliconeogênese, uma vez que o metilmalonil-CoA, que é um potente inibidor da piruvato carboxilase (Utter, 1964 - citado por Rosenberg & Fenton, 1989), está aumentado nestes pacientes.

Uma característica importante da metilmalonicacidemia é a acidose metabólica. Esta acidose não é devida tanto à elevação do MMA no sangue destes pacientes, mas ao aumento da concentração de corpos cetônicos. O excessivo aumento dos últimos é resultado de uma grande utilização de ácidos graxos pelo fígado para manter a glicemia (Oberholzer et al., 1967).

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram uma diminuição no conteúdo de ácido N-acetilneuramínico - gangliosídeos em cerebelo de ratos com 25 dias de vida (Wajner et al., 1988). Além disto, foi observado um aumento da captação de glicose e inibição da atividade da succinato desidrogenase em cérebro de ratos com 30 dias de vida, em jejum. Foi constatado, também, que o MMA "in vitro" diminui a captação cerebral de  $\beta$  - hidroxibutirato e inibiu a atividade da  $\beta$ -hidroxibutirato

desidrogenase, principalmente nos ratos em jejum (Dutra et al., 1991)

Trabalhos comportamentais realizados em nosso laboratório (Dutra, 1987) demonstraram que a metilmalonicacidemia experimental não teve efeito sobre a atividade motora dos ratos, porém os mesmos apresentaram-se mais reativos que o grupo controle ao choque elétrico de 0,8 mA aplicado no teste de esquiva ativa de duas vias.

## I. 2 - CITOESQUELETO

O citoesqueleto é composto por uma rede protéica que está presente no citoplasma das células eucarióticas. Ele é responsável por várias funções celulares tais como: divisão celular, aderência das células a um substrato (Bray & White, 1988), contração muscular (Cooke, 1986) e muitas das mudanças de forma de embriões de vertebrados em desenvolvimento (Albert et al., 1989). Ele também proporciona os instrumentos para o movimento ativo de organelas de um lugar para outro no citoplasma (Birchmeier, 1984). Desde que o citoesqueleto está aparentemente ausente em bactérias, ele deve ser fator fundamental na evolução das células eucarióticas.

Existem 3 tipos de fibras que constituem o citoesqueleto: microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos. Estes componentes do citoesqueleto são interconectados formando uma rede tridimensional.

Os microtúbulos foram os primeiros elementos morfológicos do citoesqueleto a serem caracterizados (Slautterback, 1963; Ledbetter & Porter, 1966). Os microtúbulos são tubos ocos com 25 nm de diâmetro, compostos por um heterodímero composto por alfa e beta tubulina com peso molecular em torno de 54 kDa. Estas subunidades polimerizam hidrolisando uma molécula de GTP (Weisenberg, 1972). Apesar de ainda ser desconhecido o modo de ação dos microtúbulos em sua totalidade, este constituinte do citoesqueleto é, talvez, o mais estudado até hoje.

Os microfilamentos são compostos por subunidades de actina monomérica, com peso molecular de 42 kDa, dispostos em homopolímeros lineares de aproximadamente 7 nm de diâmetro. Eles estão situados em regiões da célula sujeitas a estiramentos (Brabander, 1983). Assim como os microtúbulos, os filamentos de actina associam-se a partir de subunidades solúveis, mas utilizando o ATP como fonte de energia.

Os filamentos intermediários constituem a terceira categoria de filamentos que compõem o citoesqueleto. Eles são assim chamados por possuírem diâmetro intermediário entre os microfilamentos e os microtúbulos, aproximadamente 10 nm.

Além das três redes bem conhecidas de filamentos que constituem o citoesqueleto, Porter e colaboradores (Wolosewich & Porter, 1976, 1979 - citados por Kuroda & Porter, 1987) observaram a existência de uma rede de filamentos extremamente finos (3 a 8 nm) a qual chamaram rede microtrabecular. De acordo com aqueles autores os outros constituintes do citoesqueleto e as organelas celulares estão contidos no interior desta rede tridimensional. A existência da rede microtrabecular no citoplasma das células "in vivo" é uma questão controversa, sendo considerada por alguns autores como um artefato de técnica.

Os filamentos intermediários constituem uma família multigênica heterogênea e estão presentes em todas as células eucarióticas (Steinert & Roop, 1988). Eles são divididos em subclasses (Tabela I.1) que são características de cada tecido, possuindo propriedades bioquímicas e imunológicas distintas (Bloemendal & Pieper, 1989). As lâminas nucleares, que formam uma camada na superfície interna da membrana nuclear constituem uma

Tabela I.1 - Classificação dos Filamentos Intermediários (FI) e suas origens celulares (Bloemendal & Pieper, 1989).

Tipo celular	Proteínas dos FI	Massa molecular (kDa)
Epitélio	queratinas ácidas queratinas básicas	40-70
Mesenquimais e maioria das células em cultura	vimentina	57
Células musculares	desmina	50
Células gliais e astrócitos	GFAP (proteína glial fibrilar ácida)	52
Neurônios	neurofilamentos	68, 150, 200

família a parte de proteínas dos filamentos intermediários que está presente em todas as células (Franser et al., 1987).

Os filamentos intermediários são polímeros constituídos por moléculas protéicas fibrosas que possuem 3 regiões distintas: região central, região amino-terminal e região carbóxi-terminal (figura I.4). A região central (310 a 315 resíduos de aminoácidos) possui estrutura secundária em alfa hélice interrompida por regiões não helicoidais, possui tamanho, estrutura secundária e sequência de aminoácidos altamente conservados (Steinert & Roop, 1988). As regiões amino-terminal e carbóxi-terminal possuem tamanho e sequência de aminoácidos variáveis e são responsáveis pela diferença no tamanho e nas propriedades físico-químicas e imunológicas existentes entre as proteínas dos filamentos intermediários (Bloemendal & Pieper, 1989).

A polimerização das subunidades protéicas formadoras dos filamentos intermediários ocorre em 3 etapas (figura I.5). Na primeira etapa dois monômeros interagem através da região central em alfa hélice formando um dímero. Na segunda etapa, dois dímeros se combinam formando um tetrâmero, também chamado protofilamento. Baseado em experimentos com anticorpos sobre os tetrâmeros polimerizados "in vitro", notou-se que os dímeros são arranjados de maneira antiparalela um ao outro (Geisler et al., 1985; Stewart et al., 1989). Isto indica que, ao contrário dos microtúbulos e microfilamentos que possuem estrutura polar, os filamentos intermediários são apolares. A organização dos tetrâmeros no filamento intermediário é pouco conhecida. Estudos sugerem que uma molécula de filamento intermediário seja composta



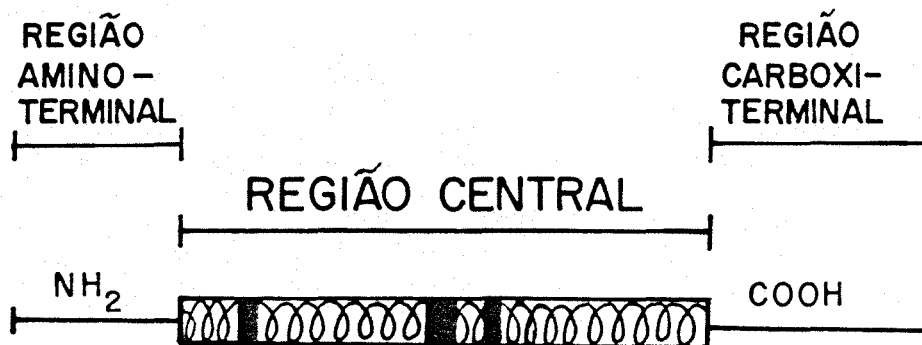


Figura I.4 - Esquema de uma subunidade de filamento intermediário  
(Bloemendal & Pieper, 1989)

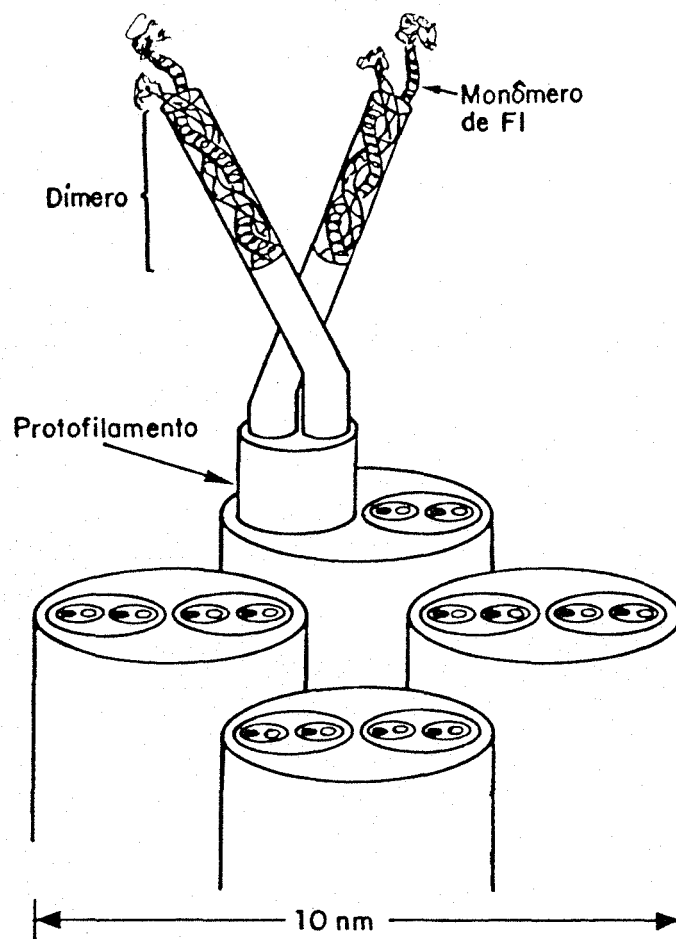


Figura I.5 - Polimerização das subunidades protéicas dos filamentos intermediários.

Dois monômeros de FI interagem formando um dímero, a seguir dois dímeros se combinam formando o protofilamento. Seis a oito protofilamentos se combinam e formam a molécula de FI (Bloemendal & Pieper, 1989).

por seis a oito protofilamentos (Steinert & Roop, 1988). A polimerização "in vitro" dos filamentos intermediários parece ser independente de energia (Steinert et al., 1976).

As cadeias protéicas dos filamentos intermediários sofrem modificações pós-traducionais, por razões ainda não bem conhecidas mas que, provavelmente, regulam sua função e sua organização dinâmica na célula. Estas modificações pós-traducionais incluem acetilação do resíduo amino terminal (Celis et al., 1983) fosforilação, proteólise e glicosilação. A maioria das modificações ocorrem nos domínios terminais das cadeias dos filamentos intermediários (Steinert & Roop, 1988).

Apesar do considerável avanço no conhecimento da estrutura, padrão de expressão gênica e organização dinâmica dos filamentos intermediários nas células, não se sabe com clareza qual a sua função. Parece que o papel principal dos mesmos é de integrador mecânico do espaço celular (Klymkowsky et al., 1989). Os filamentos intermediários podem também estar envolvidos no transporte de informações, ou na diferenciação celular (Bloemendal & Pieper, 1989).

### I. 3 - NEUROFILAMENTOS

Os neurofilamentos são os filamentos intermediários presentes nos neurônios. Eles são compostos por um triplete de componentes protéicos com massas moleculares aproximadas de 68, 150 e 200 kDa.

A organização ultra-estrutural dos componentes do

tripleto proteico que forma os neurofilamentos foi examinada usando anticorpos contra componentes individuais do tripleto. Estes estudos indicaram que a subunidade de 68 kDa forma o núcleo do filamento, enquanto a subunidade de 150 kDa se enrola em forma de hélice ao redor do núcleo e a subunidade de 200 kDa forma braços laterais que fazem conexão entre os filamentos e com outras estruturas celulares, conforme esquematizado na figura I.6 (Sharp et al., 1982; Tokutake, 1990).

Tokutake (1990), baseado em experimentos de associação e na estrutura primária dos neurofilamentos concluiu que as subunidades de 150 e 200 kDa se associam com a subunidade de 68 kDa através da região central em alfa hélice, formando uma estrutura em forma de "bastão", enquanto que as regiões carbóxi-terminais das subunidades de 150 e 200 kDa localizam-se na face externa desta estrutura formando uma superfície do tipo "espanador".

Os neurofilamentos estão presentes em maior quantidade nos axônios do que no corpo celular dos neurônios (Drake & Lasek, 1984) e estão distribuídos espaçadamente, ou mesmo ausentes, nos dendritos de muitos neurônios (Wuerker & Kirkpatrick, 1972). No entanto, a subunidade de 68 kDa está presente em quantidades aproximadamente iguais no corpo celular e no axônio. Os neurofilamentos presentes nos axônios são altamente fosforilados, enquanto aqueles do corpo celular e dendritos não são (Lee et al., 1987; Oblinger, 1987). A subunidade de 200 kDa dos neurofilamentos tem um desenvolvimento independente das subunidades de 150 e 68 kDa durante a diferenciação celular do cérebro de rato e sua expressão em diferentes regiões é variável.

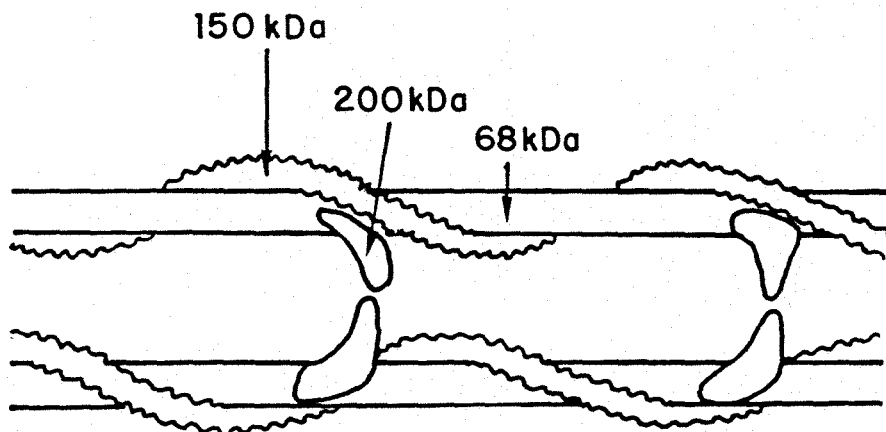


Figura I.6 - Esquema da organização dos componentes do triplete protéico dos neurofilamentos (Tokutake, 1990).

Além disto, a subunidade de 200 kDa aparece depois das demais subunidades dos neurofilamentos (Shaw & Weber, 1982).

Estudos com microscopia eletrônica indicam diferente organização dos neurofilamentos em axônio, corpo celular e dendritos (Hirokawa, 1982; Hirokawa et al., 1984). Os neurofilamentos no axônio têm orientação paralela e são entrelaçados por muitas pontes, enquanto os do corpo celular tendem a estar orientados ao acaso e o número de pontes está reduzido a cerca de 2/5 em relação às do axônio. Os neurofilamentos nos dendritos possuem orientação paralela mas são dispersos, ou existem como pequenos feixes e com frequência de pontes cerca de 3/5 em relação às do axônio. As pontes que ligam os neurofilamentos são formadas pela cauda carboxílica das subunidades protéicas de 150 e 200 kDa (Hisanaga & Hirokawa, 1989).

As funções dos neurofilamentos como dos demais constituintes dos filamentos intermediários não está bem definida. É proposto que os neurofilamentos possuam função de manter a organização axoplasmática (Klymkowsky et al., 1987). Além disto, Hofman e colaboradores (1988) sugerem que os neurofilamentos podem atuar na manutenção ou determinação do calibre axonal.

Estudos indicam que o número de neurofilamentos pode ser alterado mediante algumas condições experimentais, tais como baixa temperatura (Brimijoin et al., 1979; Piezzi & Cavicchia, 1981 - citados por Cuenca et al., 1987), axotomia (Dyck et al., 1985), aumento na atividade neuronal (Alvarez et al., 1982) e administração de hormônios ou substâncias tóxicas (Griffin et

al., 1983; Marc & Rabie, 1985).

São descritas várias substâncias químicas que alteram a distribuição dos neurofilamentos no axônio. Algumas, como n-hexano, metil n-butil cetona, 2,5-hexanodiona, dissulfito de carbono e acrilamida causam acúmulo dos neurofilamentos na porção distal do axônio (Sayre et al., 1985). Esta mesma alteração morfológica ocorre na neuropatia do axônio gigante (Pena, 1982; Monaco et al., 1985). Outros produtos tóxicos como  $\beta, \beta'$ -iminodipropionitrilo (IDPN) e alumínio causam acúmulo dos neurofilamentos na porção proximal do axônio, o que também é uma característica da doença chamada esclerose lateral amiotrófica (Sayre et al., 1985).

Trabalhos realizados em nosso laboratório (Paz et al., no prelo) demonstraram que a desnutrição protéica pós natal causou aumento das subunidades protéicas de 150 e 68 kDa dos neurofilamentos em córtex cerebral de ratos com 90 dias de idade reabilitados nutricionalmente.

Levando em consideração estes trabalhos que demonstram ser os filamentos intermediários sensíveis a fatores externos, decidimos verificar os efeitos dos modelos experimentais de erros inatos do metabolismo sobre a quantidade dos filamentos intermediários no córtex cerebral e no cerebelo de ratos com 30 dias de vida.

#### I.4 - OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Verificar o efeito da administração crônica de fenilalanina +  $\alpha$ -metilfenilalanina, de prolina ou de ácido metilmalônico sobre as proteínas dos filamentos intermediários do córtex cerebral e do cerebelo de ratos com 30 dias de vida.

- Fazer um estudo comparativo dos constituintes dos neurofilamentos de córtex cerebral e de cerebelo de ratos com 30 dias de vida.



## II. MATERIAL E MÉTODOS

## II.1 - REAGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS

Fenilalanina,  $\alpha$ -metilfenilalanina, prolina, ácido metilmalônico, EGTA, Triton X-100, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), benzamidina, leupeptina, antipapaína, pepstatina, quimiostatina, dodecil sulfato de sódio (SDS), albumina bovina, tris-HCl, glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol, acrilamida, N,N-metilbisacrilamida, glicina, Comassie blue R-250, kit MW-SDS-200-(6H) e protease V-8 de S. aureus foram da Sigma. Uréia, fosfato de potássio, cloreto de magnésio, etanol, acetona, metanol, ácido acético, hidróxido de sódio e ácido fosfórico foram da Reagen. Cloreto de sódio, cloreto de potássio, EDTA e azul de bromofenol foram da Merck. Anfolinás - pH 5-7 e 3,5-10 foram da LKB. Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

## II.2 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos. Durante a gestação as ratas grávidas foram mantidas em gaiolas individuais. No dia do nascimento, as ninhadas foram ajustadas para oito filhotes por eliminação dos excedentes. Com a idade de 21 dias os filhotes foram desmamados.

Todos os ratos foram mantidos em ambiente climatizado (20°C) com intervalos de 12 horas de ciclo claro/escuro, recebendo água e ração comercial (Germania) "ad libitum".

## II.3 - TRATAMENTO

Com o propósito de atingir níveis séricos e cerebrais de fenilalanina (PHE), prolina (PRO), e ácido metilmalônico

(MMA) similares aos encontrados em pacientes com os respectivos EIM, foram feitas administrações, por via subcutânea, de drogas com concentrações crescentes conforme a idade dos animais, de acordo com parâmetros farmacocinéticos medidos em nossos laboratórios (Castilhos, 1986; Dutra, 1987; Moreira et al., 1989). As soluções foram preparadas de maneira a injetar-se um volume de 2,0 ml por 100 g de peso corporal. Essas injeções foram aplicadas duas vezes ao dia, com intervalos de aproximadamente 9 e 15 horas entre cada injeção, do sexto ao vigésimo oitavo dia de vida do animal.

Dentro de cada ninhada os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento aplicado (ou controle). As concentrações e doses das drogas administradas podem ser vistas na tabela II.1.

Grupo 1 - Fenilcetonúria: A L-fenilalanina (PHE) foi dissolvida em solução salina por aquecimento a 80°C (Castilhos et al., 1986). Uma vez por dia, juntamente com a L-fenilalanina, foi dissolvida  $\alpha$ -metil-D,L-fenilalanina (MePHE) que é um inibidor da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) (Greengard et al., 1976).

Grupo 2 - Hiperprolinemia: A L-prolina foi dissolvida em solução salina (Moreira et al., 1989).

Grupo 3 - Metilmalonicacidemia. A solução de ácido metilmalônico foi ajustada para pH entre 7,2 e 7,4 com NaOH antes da administração (Dutra, 1987).

Grupo 4 - Controle: O grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,85 g%).

Tabela II.1 - Esquema de indução de modelos experimentais de erros inatos do metabolismo

IDADE (dias)	FENILCETONURIA		HIPERPROLINEMIA	METILMALONICACIDEMIA
	Fenil- alanina	$\alpha$ -metil fenil alanina	Prolina	Ácido metilmalônico
6-12	(a) 1,75	1,40	7,50	0,45
	(b) 0,21	0,16	1,30	0,07
13-17	(a) 2,50	1,40	8,50	0,52
	(a) 0,30	0,16	1,53	0,09
18-22	(a) 3,75	2,15	9,50	0,75
	(a) 0,45	0,24	1,65	0,13
23-28	(a) 4,50	2,15	10,50	1,00
	(b) 0,54	0,24	1,82	0,17

(a) - Concentração expressa em g / dl.

(b) - Dose expressa em mmol / 100 g de peso corporal.

As soluções foram mantidas à temperatura de aproximadamente 37°C até serem injetadas nos animais.

No trigésimo dia de vida, os animais foram pesados e sacrificados por decapitação com guilhotina. O cérebro foi imediatamente removido, pesado e transferido para uma placa de Petri invertida sobre gelo picado. O córtex cerebral e o cerebelo foram dissecados, pesados e homogeneizados em tampão de Dahl para extração dos filamentos intermediários (FI), conforme descrito abaixo.

#### II.4 - EXTRAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

As frações enriquecidas em FI foram obtidas por modificação do método de extração descrito por Shaw e Weber (1982), conforme esquematizado na figura II.1.

Dentro de cada ninhada, a extração de FI foi feita a partir de um "pool" de dois córtices cerebrais ou de dois cerebelos de animais submetidos ao mesmo tratamento de maneira que cada ninhada fornecia uma amostra para cada um dos tratamentos.

O material foi homogeneizado com homogeneizador Potter Elvehjem e êmbolo de Teflon a velocidade de aproximadamente 1.000 rpm (entre 800 e 1.200 rpm), com 5 movimentos verticais e 4°C, em 20 volumes de tampão, pH 7,1, contendo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM; KCl 600 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EGTA 2 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1 %; PMSF 1 mM; Benzamidina 1 mM e 2 ug/ul de uma mistura de inibidores de proteases contendo leupeptina, antipapaína, pepstatina e

quimiostatina.

Uma alíquota de 0,5 ml foi retirada do homogeneizado (fração H) para dosagem de proteínas e o restante centrifugado durante 10 minutos a 17300 x g, a 4°C em uma centrífuga Sorvall, rotor SS-34. O sobrenadante (fração S<sub>1</sub>) foi recolhido e o precipitado novamente homogeneizado em 20 volumes de tampão de Dahl sendo submetido a nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante (fração S<sub>2</sub>) foi recolhido. O precipitado (fração FE), insolúvel em alta força iônica e pH 7.1, corresponde à fração rica em FI.

Todas as frações (H, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e FE) foram precipitadas separadamente com ácido tricloroacético 5 % a frio e lavadas duas vezes com etanol e uma vez com acetona. Após centrifugação a 1085 x g durante 3 minutos e completa evaporação da acetona, a proteína precipitada foi dissolvida em SDS 1 % e armazenada a 20°C negativos para posterior utilização.

## II.5 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantidade de proteínas contida em cada uma das frações (H, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, FE) foi dosada pelo método de Lowry (1951) adaptado para amostras dissolvidas em SDS. O padrão de proteínas usado foi albumina bovina na concentração de 1 mg/ml em SDS 1 %.

## II.6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras em SDS 1 % foram diluídas em tampão contendo Tris-HCl 65 mM, glicerol 10 %, SDS 3 %, β-mercaptoetanol 5 %, pH 6,8, a uma concentração protéica final de 2 mg/ml. Após 3

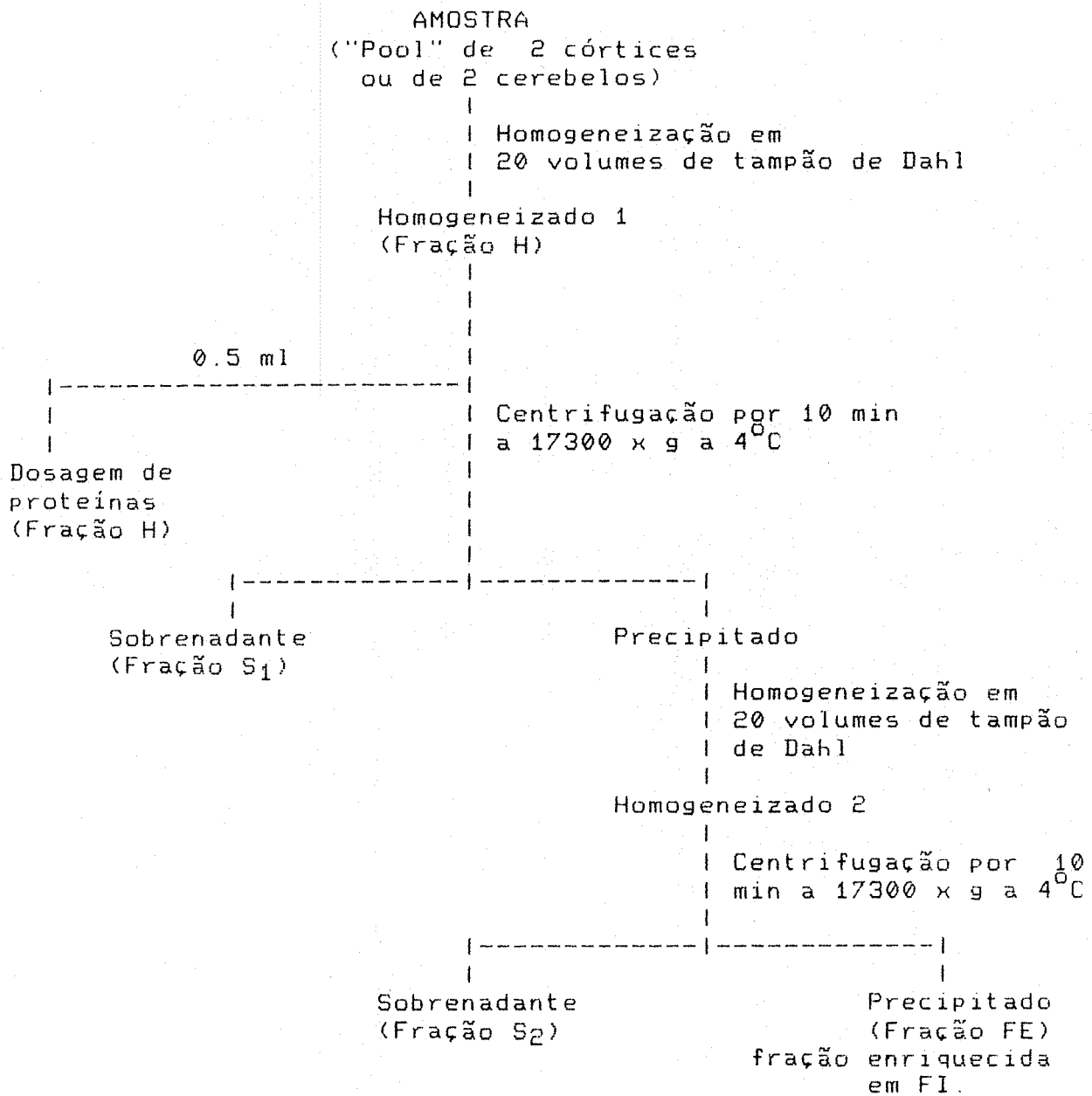


Figura I. 1 - Esquema de extração dos filamentos intermediários

minutos de fervura, foram analisadas em SDS-PAGE a 10 % de acordo com o método de Laemmli (1970). A duração de cada corrida foi de aproximadamente 7 horas, a uma corrente inicial de 60 V e 12 mA, passando a 100 V e 150 mA após as primeiras 2 horas. Utilizou-se uma fonte de corrente da marca "Shandon Southern". A migração foi acompanhada com o corante azul de bromofenol 2 % em água. Após a migração, o gel foi corado durante 3 horas com Comassie blue R-250 0,2g %, metanol 50 % e ácido acético 10 %. A descoloração foi procedida por sucessivas lavagens em solução contendo etanol 20 % e ácido acético 7 % até a descoloração completa do fundo. As massas moleculares das amostras foram determinadas com referência ao "KIT MW-SDS-200 (6H)" que contém as seguintes proteínas: ovoalbumina (45 kDa), albumina bovina (66 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), alfa-galactosidase (116 kDa) e miosina (205 kDa).

## II.7 - FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF)

A focalização isoelétrica (IEF) foi conduzida de acordo com o método descrito por O'Farrel (1975).

Amostras em SDS 1 % contendo 300 ug de proteína foram precipitadas em 8 volumes de acetona a 4<sup>o</sup> C. Após centrifugação a 1085 x g durante 3 minutos os precipitados resultantes foram dissolvidos em 30 ul de "lysis buffer" contendo 2 % de anfolinas (1,6 % - pH 5-7 e 0,4 % - pH 3,5-10).

O gel, contendo as mesmas anfolinas, foi depositado em tubos cilíndricos com 12 centímetros de comprimento e 3 milímetros de diâmetro e coberto com 10 ul de "lysis buffer" durante duas horas. Após a polimerização, 25 ul da amostra em "lysis buffer" foi depositada sobre o gel e coberto com "sample



overlay solution". Durante a migração, o cátodo continha NaOH 0,02 M e o ânodo  $H_3PO_4$  0,01 M. A duração média da migração foi de 16 horas, sob corrente constante de 400 V. Após a corrida, os géis foram imediatamente submetidos à eletroforese bidimensional.

## II.8 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A segunda dimensão do IEF foi realizada nas mesmas condições descritas em II.6, depositando-se os géis de IEF horizontalmente sobre géis de SDS-PAGE. Após a migração, os géis foram corados e descorados como descrito anteriormente na seção II.6.

## II.9 - SECAGEM DOS GÉIS

Após a completa descoloração, os géis foram embebidos na solução de secagem (glicerol 4 %, etanol 30 %) durante 30 minutos. Em seguida, o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane previamente banhadas na mesma solução de secagem e o conjunto firmemente adaptado a uma placa de vidro. A secagem ocorreu com o auxílio de uma lâmpada de raios infra-vermelhos colocada a 40 cm da placa durante 2 horas.

## II.10 - DENSITOMETRIA

A partir dos géis de SDS-PAGE secos foi procedida a densitometria em um densitômetro da marca "Hoefer" modelo "GS 300". As leituras são representadas de forma gráfica, onde os picos correspondem às proteínas presentes na fração enriquecida

em filamentos intermediários (FE). Estes picos foram cuidadosamente recortados e pesados em balança analítica da marca "Mettler". Conhecido o peso de cada pico, foi possível estabelecer a porcentagem de cada uma das proteínas contidas na fração analisada. O cálculo da quantidade absoluta das mesmas foi feito considerando-se que a quantidade total de proteínas, dosada pelo método de Lowry, correspondia a 100 % .

## II.11 - MAPEAMENTO PEPTÍDICO

Foi feita a proteólise enzimática da subunidade de 200 kDa do córtex cerebral dos ratos submetidos aos EIM, usando protease V-8 de S. aureus, segundo o método descrito por Cleveland, (1977).

Dois géis foram usados neste procedimento. O primeiro gel (gel A), para separar cada componente protéico, foi preparado como descrito em II.6. O segundo gel (gel B) foi usado para proteólise e subsequente separação dos fragmentos proteolíticos gerados. As dimensões do gel B foram 16 x 20 x 0,1 cm com 8 canaletas para aplicação de amostra com 1,4 cm de largura cada uma. O gel de entrada, com 5 cm de altura, possuía 4,0 % de acrilamida. O gel de separação consistia de um gradiente de 12,5 - 20 % em acrilamida. Os tampões foram os mesmos usados para o gel A.

As frações enriquecidas em FI obtidas a partir de córtex cerebral dos animais submetidos aos 4 modelos experimentais (aproximadamente 90 ug de proteínas a uma concentração de 3 ug/ul em tampão de amostra) foram primeiro

analisadas no gel A, como descrito em II.6. O gel A foi corado com Comassie blue 0,2 %, metanol 50 % e ácido acético 7 % por 1 hora à temperatura ambiente com agitação, e descorado por 45 min com 2 trocas de solução descorante (etanol 50 % e ácido acético 10 %) . As proteínas de interesse ficaram visíveis com este procedimento. A banda contendo a proteína de 200 kDa dos NF foi cortada com bisturi e equilibrada em Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 1 %, EDTA 1 mM e azul de bromofenol 0,01 % por 30 min. Várias bandas da proteína de 200 kDa, perfazendo um total de aproximadamente 12 ug da mesma amostra, foram colocadas com o auxílio de uma espátula numa canaleta do gel B tendo o cuidado para não formar bolhas de ar. Os espaços ao redor das amostras foram preenchidos com uma solução contendo Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1 % e glicerol 20 %. Em seguida, 20 ul (6 ug) de uma solução de protease recentemente preparada contendo 0,3 ug/ul de protease V-8 de S. aureus em Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1 % e glicerol 10 % foram adicionados em cada canaleta. A eletroforese foi realizada a 1000 W até que a frente do corante Comassie blue presente nas bandas de 200 kDa do gel A chegasse na interface com o gel de separação . A corrente elétrica foi então, interrompida por 30 min, período no qual ocorreu a proteólise. A corrente foi restabelecida a 2000 W e a migração continuou até que a frente do corante azul de bromofenol atingisse a parte inferior do gel de separação. A migração no gel B foi feita à temperatura de 10<sup>0</sup>C e levou aproximadamente 11 horas. O gel de separação B foi corado e descorado conforme descrito em II.6. Posteriormente, este gel foi submetido à análise densitométrica.

## II.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via, seguida de teste do raio múltiplo de Duncan, quando indicado, através de um programa SPSS utilizando um microcomputador PC IBM.

As comparações entre córtex cerebral e cerebelo foram realizadas pelo teste "t" de Student.

### III. RESULTADOS

### III.1- EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE OS PESOS CORPORAL, CEREBRAL, CORTICAL E CEREBELAR

A tabela III.1 mostra os valores médios dos pesos corporais, cerebrais, corticais e cerebelares dos ratos de 30 dias de idade submetidos aos EIM e do grupo controle. Para os cálculos foram usados os valores médios de peso de 2 animais e de 2 estruturas estudadas.

Com o tratamento crônico, do sexto ao vigésimo oitavo dia de vida, os ratos não apresentaram diferenças significativas de peso corporal aos 30 dias de vida [  $F(3,36) = 0,658$  ;  $p > 0,58$  ]. O peso cerebral dos animais apresentou diferença significativa [  $F(3,36) = 3,517$  ;  $p < 0,03$  ]. O teste de Duncan mostrou que o peso cerebral dos animais submetidos aos modelos de hiperprolinemia e metilmalonicacidemia não sofreu alteração; no entanto, aquele dos animais submetidos ao modelo de PKU sofreu redução significativa quando comparado com os animais do grupo controle. O peso cortical dos animais tratados não apresentou diferença significativa [  $F(3,36) = 0,164$  ;  $p > 0,91$  ], o mesmo ocorrendo com o peso cerebelar [  $F(3,36) = 2,252$  ;  $p > 0,09$  ].

Tabela III.1 - Efeito dos tratamentos sobre os pesos corporal, cerebral, cortical e cerebelar de ratos com 30 dias de idade<sup>a</sup>.

Tratamento	Peso Corporal	Peso Cerebral	Peso Cortical	Peso Cerebelar
Salina	70,4 ± 1,9	0,99 ± 0,012	0,56 ± 0,019	0,19 ± 0,003
PHE + MePHE	67,4 ± 1,8	0,94 ± 0,012*	0,53 ± 0,018	0,17 ± 0,006
PRO	67,4 ± 2,0	0,98 ± 0,006	0,55 ± 0,019	0,18 ± 0,009
MMA	68,8 ± 2,1	0,98 ± 0,012	0,53 ± 0,019	0,18 ± 0,006

a- Peso expresso em gramas.

Resultados expressos em média ± erro padrão. Número de experimentos = 10.

\* Diferença significativa para  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( Teste de Duncan ).

PHE + MePHE: Tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina.

PRO: Tratamento com prolina.

MMA: Tratamento com metilmalonato.

### III.2 - EXTRAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

O critério de extração dos filamentos intermediários baseou-se numa característica geral destas estruturas, ou seja, sua insolubilidade na presença de Triton X-100, em um meio de alta força iônica, em pH neutro. Utilizaram-se sucessivas extrações do tecido em presença de Triton X-100 1 %, KCl 0,6 M, pH 7,1, recolhendo-se em cada etapa, após centrifugação, o sobrenadante que continha proteínas solúveis, até chegar-se a uma fração insolúvel final. A figura III.1 mostra um gel de poliacrilamida a 10 % (SDS-PAGE) contendo as etapas de obtenção da fração insolúvel em alta força iônica. O homogeneizado total está representado na linha H onde se pode identificar um grande número de bandas, correspondentes às diversas proteínas celulares. Nas linhas S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> estão as proteínas solúveis do tecido, que permanecem no sobrenadante após centrifugação a 17300 x g. Observa-se que nestas frações está a maior parte das proteínas do tecido. A linha P representa a fração final da extração, insolúvel em KCl 0,6 M, que deve conter as proteínas dos filamentos intermediários. Identifica-se a presença de 7 bandas principais com pesos moleculares de 200, 150, 68, 66, 57, 52 e 42 kDa. A linha MW representa o padrão de pesos moleculares, através do qual pode-se estimar o peso molecular das diversas proteínas encontradas ao longo da extração. Analisando-se o gel de SDS-PAGE nota-se que as proteínas presentes na fração enriquecida em FI não estão presentes nas frações solúveis, sugerindo um processo seletivo de extração, baseado na força iônica do meio.



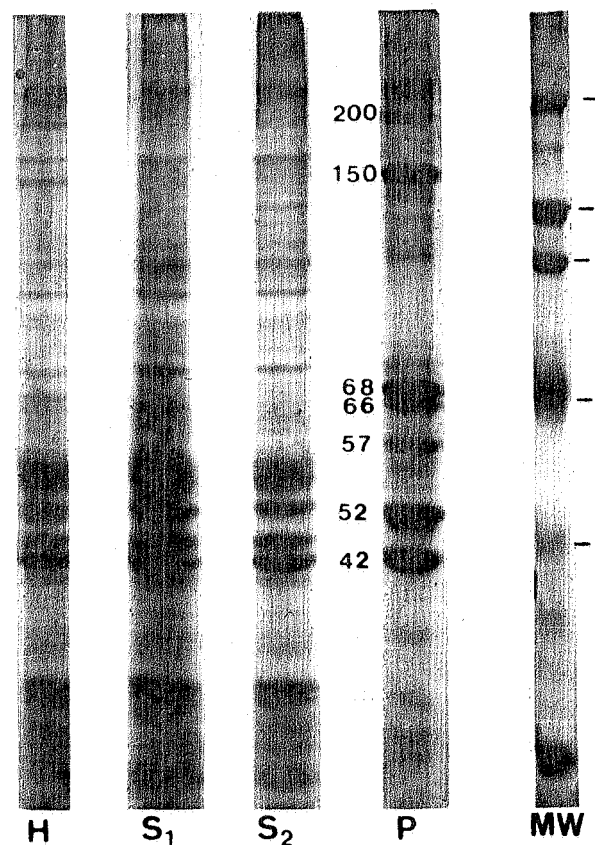


Figura III.1 - SDS-PAGE 10 % das diferentes etapas de obtenção da fração enriquecida em filamentos intermediários no córtex cerebral.

H - homogeneizado total do tecido; S<sub>1</sub> - sobrenadante obtido após a primeira centrifugação a 17300 x g contendo proteínas solúveis; S<sub>2</sub> - sobrenadante obtido após a segunda centrifugação a 17300 x g contendo proteínas solúveis; P - fração enriquecida em filamentos intermediários: 200 kDa, 150 kDa, 68 kDa - subunidades dos NF, 66 kDa - proteína associada a FI, 57 kDa - vimentina, 52 kDa - GFAP, 42 kDa - actina; MW - padrão de massa molecular, de cima para baixo: miosina (205 kDa), alfa-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa). O gel foi corado com Comassie blue.

O método de extração, baseado na insolubilidade em alta força iônica de proteínas dos filamentos intermediários, foi utilizado em córtex cerebral e cerebelo dos animais controle e dos animais submetidos aos modelos experimentais de EIM. Em todos os casos os perfis eletroforéticos foram semelhantes aos apresentados na figura III.1.

### III.3 - FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A fração enriquecida em FI descrita e representada na linha P da figura III.1, foi submetida à técnica de focalização isoelétrica seguida de eletroforese bidimensional, como descrito nas seções II.7 e II.8 de "Material e Métodos", com o objetivo de melhor caracterizar as proteínas constituintes dos FI através de seus pontos isoelétricos. Por esta técnica nós demonstramos também a inexistência de sobreposição de bandas em SDS-PAGE. Os resultados obtidos estão apresentados na figura III.2, onde identificam-se as proteínas de 150 kDa ( pI = 5,28 ) e de 68 kDa ( pI = 5,1 ) constituintes dos neurofilamentos e uma proteína com peso molecular ligeiramente inferior (66 kDa), cujo ponto isoelétrico corresponde ao de uma proteína associada a filamentos intermediários ( pI = 5,4 ), descrita por Chiu e colaboradores (1989). A proteína de 57 kDa ( pI = 5,3 ), que provavelmente é a vimentina, proveniente das células das paredes vasculares ou, ainda a periferina ( Aletta et al., 1988 ). Finalmente, o peptídeo de 52 kDa ( pI = 5,6 ) comporta-se como a GFAP, subunidade dos filamentos gliais provenientes de células gliais. Estas proteínas, identificadas por eletroforese bidimensional,

correspondem ao conjunto de filamentos intermediários encontrados nas células que constituem o córtex cerebral e o cerebelo: neurônios, células gliais e endoteliais.

O principal contaminante identificado nesta fração é a proteína de 42 kDa cujo ponto isoelétrico corresponde ao da actina ( pI = 5,5 ). Embora as propriedades de solubilidade da actina sejam diferentes daquelas dos filamentos intermediários, sabe-se que uma parcela destas estruturas está associada "in vivo" a estes filamentos de modo que durante o processo de extração há um concomitante enriquecimento em actina.

A subunidade protéica de 200 kDa dos neurofilamentos encontra-se presente em quantidade reduzida na preparação sendo, por isso, não detectada em nosso gel de IEF.

Em todos os casos analisados, córtices e cerebelos de ratos controle e submetidos aos modelos experimentais de EIM , o perfil da fração enriquecida em FI foi semelhante quando analisado por esta técnica.

#### III.4 - DENSITOMETRIA

A figura III.3 mostra um gel de SDS-PAGE da fração enriquecida em filamentos intermediários com a respectiva densitometria. Os picos correspondem às subunidades protéicas dos filamentos intermediários.

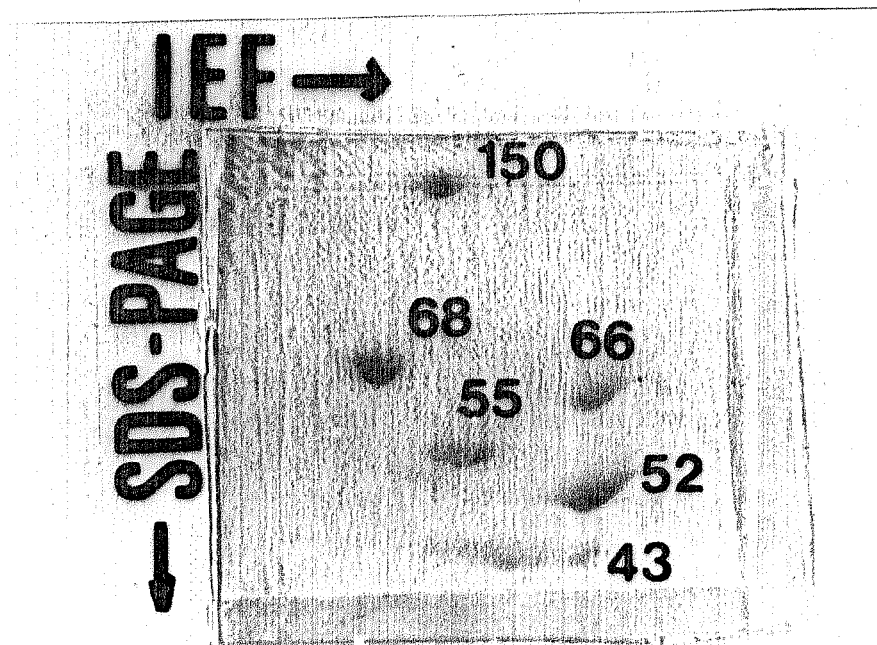


Figura III.2 - Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida 10 % da fração enriquecida em filamentos intermediários do córtex cerebral.

Os números representam os pesos moleculares das subunidades protéicas dos filamentos intermediários em kDa. O gel foi corado com Comassie blue.

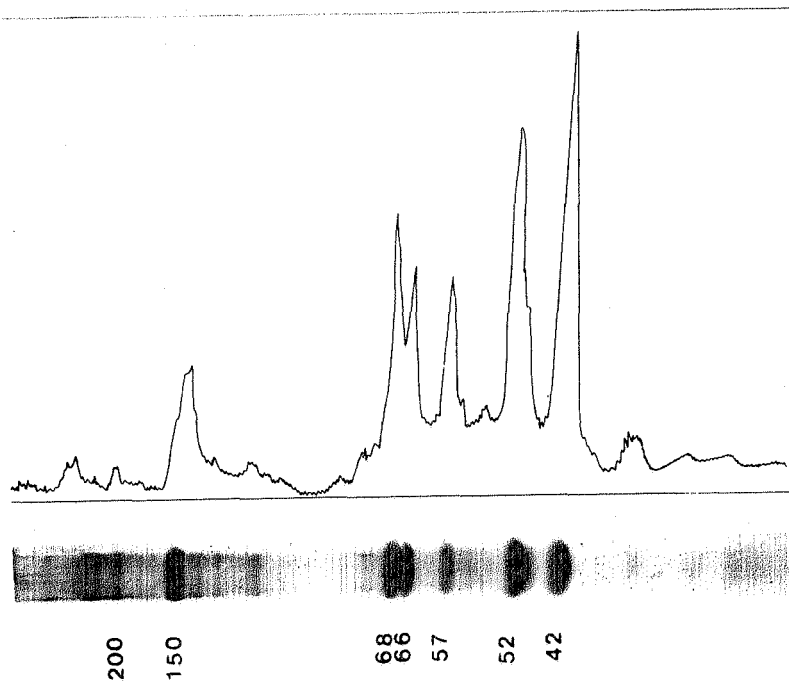


Figura III.3 - Traçado densitométrico de um gel de SDS-PAGE obtido da fração enriquecida em filamentos intermediários, (do córtex cerebral) representativo do método quantitativo utilizado. Os números indicam as massas moleculares (em kDa) das subunidades protéicas das proteínas do citoesqueleto.

### III.5 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O CÓRTEX CEREBRAL

#### III.5.a - Conteúdo protéico do homogeneizado e da fração enriquecida em filamentos intermediários

Os resultados obtidos a partir da dosagem de proteínas do homogeneizado total (H) e da fração enriquecida em filamentos intermediários (FE) do córtex cerebral dos animais tratados, estão apresentados na tabela III.2. Os resultados foram obtidos a partir de um "pool" de 2 córtices cerebrais e dividido por 2 para se obter os valores correspondentes a cada estrutura.

A análise de variância do conteúdo protéico do homogeneizado total expresso por estrutura não apresentou alteração nos grupos testados [  $F(3,35) = 0,237$  ;  $p > 0,86$  ]. O mesmo ocorreu com o conteúdo protéico do homogeneizado quando expresso por grama de tecido [  $F(3,35) = 0,055$  ;  $p > 0,98$  ]. O conteúdo protéico da fração enriquecida em filamentos intermediários expresso por estrutura não apresentou diferença significativa nos grupos testados [  $F(3,36) = 2,366$  ;  $p > 0,08$  ]. O mesmo ocorreu com o conteúdo protéico da fração enriquecida em filamentos intermediários expresso por grama de tecido [  $F(3,42) = 0,269$  ;  $p > 0,84$  ].

Portanto, a administração crônica de fenilalanina +  $\alpha$ -metilfenilalanina, prolina e metilmalonato aos ratos não alterou o conteúdo protéico do homogeneizado, nem da fração enriquecida em filamentos intermediários no córtex cerebral.

Tabela III.2 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo protéico do homogeneizado (H) e da fração enriquecida em filamentos intermediários (FE) no córtex cerebral<sup>a</sup>

Tratamento	H/estrutura (mg)	H/g tecido (mg/g)	FE/estrutura (mg)	FE/g tecido (mg/g)
Salina	57,3 ± 2,37	107,0 ± 4,24	1,4 ± 0,09	2,4 ± 0,19
PHE + MePHE	55,9 ± 1,80	105,9 ± 5,15	1,1 ± 0,09	2,6 ± 0,25
PRO	57,3 ± 2,12	104,8 ± 3,86	1,3 ± 0,09	2,3 ± 0,19
MMA	58,7 ± 2,59	104,6 ± 4,71	1,1 ± 0,06	2,4 ± 0,22

a- Resultados expressos em média ± erro padrão. Número de experimentos = 10.

PHE + MePHE: Tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina.

PRO: Tratamento com prolina.

MMA: Tratamento com metilmalonato

### III.5.b - Conteúdo total de filamentos intermediários e das subunidades protéicas individuais dos filamentos intermediários.

Após a dosagem de proteínas da fração enriquecida em filamentos intermediários (FE), procedeu-se à análise quantitativa individual de cada componente protéico a fim de verificar a ocorrência ou não de alterações nos mesmos. Para tanto, fez-se quantificação por densitometria sobre géis de SDS-PAGE, conforme descrito na seção II.10 de "Material e Métodos". Tomando-se o conteúdo protéico total da fração enriquecida em filamentos intermediários como 100 %, foi possível determinar quantitativamente o conteúdo de cada subunidade protéica nela contida. Para o cálculo do conteúdo total de filamentos intermediários fez-se a soma dos valores das subunidades protéicas individuais, excluindo-se a actina que não pertence à classe dos filamentos intermediários. Obteve-se, assim, apenas o conteúdo de filamentos intermediários na preparação.

A tabela III.3 mostra os valores dos conteúdos totais dos filamentos intermediários (FI) no córtex cerebral. A análise de variância de uma via naqueles dados não mostrou diferença significativa entre os grupos, quando expressos em mg de FI por estrutura [  $F(3,24) = 0,204$  ;  $p > 0,89$  ] ou em mg de FI por g de tecido [  $F(3,31) = 0,777$  ;  $p > 0,51$  ].

A figura III.4 mostra os valores médios e os erros padrões obtidos após a quantificação individual das proteínas do tipo filamentos intermediários em animais controle e submetidos aos 3 modelos de EIM expressos em ug de FI por estrutura no



Tabela III.3 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo total de filamentos intermediários (FI) no córtex cerebral<sup>a</sup>.

Tratamento	FI / estrutura (mg)	FI / g tecido (mg/g)
Salina	0,45 ± 0,03 (7)	0,90 ± 0,09 (9)
PHE + MePHE	0,47 ± 0,06 (8)	0,91 ± 0,13 (9)
PRO	0,42 ± 0,03 (7)	0,72 ± 0,08 (8)
MMA	0,46 ± 0,04 (6)	0,82 ± 0,07 (9)

a - Resultados expressos em média ± erro padrão (número de experimentos).

PHE + MePHE: Tratamento com fenilalanina e α-metilfenilalanina.

PRO: Tratamento com prolina.

MMA: Tratamento com metilmalonato.

córtex cerebral.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre os grupos estudados foi procedida a análise de variância de uma via para cada proteína, seguida do teste do raio múltiplo de Duncan.

A análise de variância de uma via para a subunidade de 200 kDa, mostrou diferença significativa entre os grupos, [  $F(3,22) = 3,201$  ;  $p < 0,05$  ]. O teste do raio múltiplo de Duncan indicou diferença em todos os grupos tratados quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

As demais proteínas não apresentaram alterações significativas no córtex cerebral, comparados com os dados do grupo controle.

A seguir estão apresentados os resultados da ANOVA de uma via para os dados expressos em ug FI / estrutura.

Subunidade de 150 kDa:  $F(3,22) = 0,799$  ;  $p > 0,50$ .

Subunidade de 68 kDa:  $F(3,16) = 0,204$  ;  $p > 0,89$ .

Subunidade de 66 kDa:  $F(3,17) = 0,339$  ;  $p > 0,79$ .

Subunidade de 57 kDa:  $F(3,24) = 0,157$  ;  $p > 0,92$ .

Subunidade de 52 kDa:  $F(3,24) = 0,437$  ;  $p > 0,72$ .

Subunidade de 42 kDa:  $F(3,21) = 1,070$  ;  $p > 0,38$ .

### III.5.c- Quantificação individual das proteínas do tipo filamento intermediário expressas em ug de FI por mg de proteínas totais

A figura III.5 mostra os valores médios e os erros padrões obtidos após a quantificação individual das proteínas do tipo filamentos intermediários em animais controle e submetidos

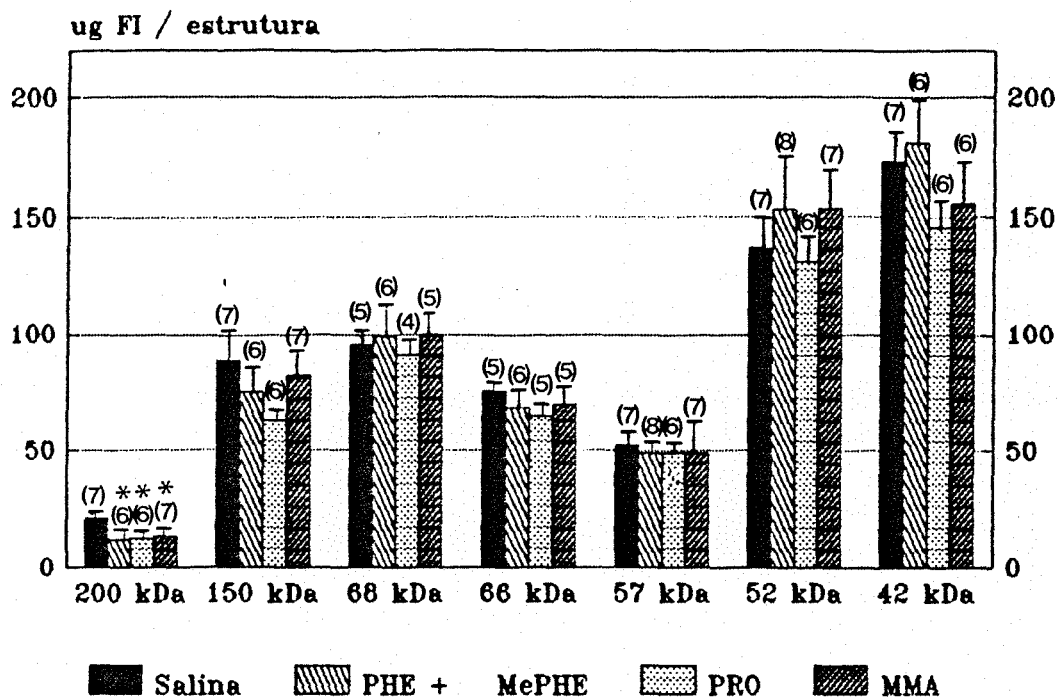


Figura III.4 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo individual de subunidades dos filamentos intermediários expresso em ug de FI por estrutura (CORTEX CEREBRAL).

Resultados expressos em média, erro padrão, (número de experimentos). \* Diferença significativa para  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina (teste de Duncan). PHE + MePHE - tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina; PRO - tratamento com prolina; MMA - tratamento com metilmalonato; 200 kDa, 150 Kda e 68 kDa - subunidades dos NF; 66 kDa - proteína associada a FI; 57 kDa - vimentina; 52 kDa - GFAP; 42 kDa - actina.

aos 3 modelos de EIM expressos em ug de filamentos intermediários por mg de proteínas totais no córtex cerebral.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre os grupos estudados foi procedida a análise de variância de uma via para cada proteína, seguida do teste do raio múltiplo de Duncan.

A análise de variância de uma via para a subunidade de 200 kDa, mostrou diferença significativa entre os grupos, [  $F(3,24) = 8,733$  ;  $p < 0,0005$  ]. O teste do raio múltiplo de Duncan indicou diferença em todos os grupos tratados quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

As demais subunidades protéicas não apresentaram alterações significativas no córtex cerebral, comparados com os dados do grupo controle.

A seguir estão apresentados os resultados da ANOVA de uma via para os dados expressos em ug FI / mg de proteínas totais.

Subunidade de 150 kDa:  $F(3,24) = 1,398$  ;  $p > 0,26$ .

Subunidade de 68 kDa:  $F(3,18) = 0,581$  ;  $p > 0,63$ .

Subunidade de 66 kDa:  $F(3,19) = 0,449$  ;  $p > 0,72$ .

Subunidade de 57 kDa:  $F(3,26) = 0,537$  ;  $p > 0,66$ .

Subunidade de 52 kDa:  $F(3,23) = 0,613$  ;  $p > 0,61$ .

Subunidade de 42 kDa:  $F(3,24) = 0,769$  ;  $p > 0,52$ .

#### III.5.d - Razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos

Na tabela III.4 estão apresentadas as razões molares entre as subunidades de 200 kDa, 150 kDa e 68 kDa dos neurofilamentos (NF) no córtex cerebral dos grupos experimentais

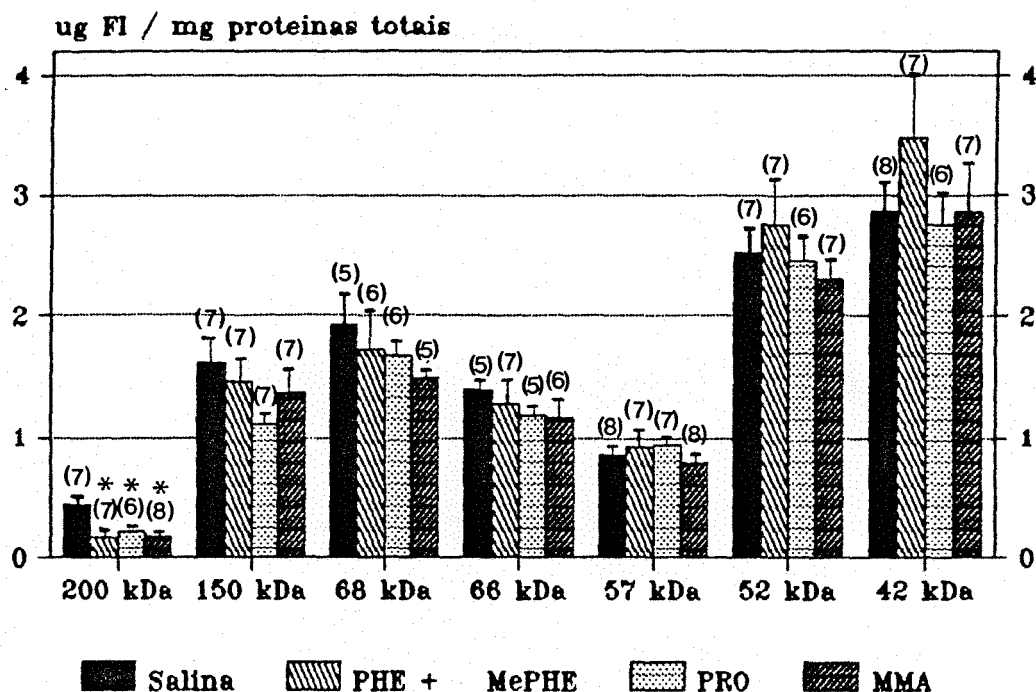


Figura III.5 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo individual de subunidades dos filamentos intermediários expresso em ug de FI por mg de proteínas totais no CORTEX CEREBRAL.

Resultados expressos em média, erro padrão, (número de experimentos). \* Diferença significativa para  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina (teste de Duncan). PHE + MePHE -tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina; PRO - tratamento com prolina; MMA - tratamento com metilmalonato; 200 kDa, 150 Kda e 68 kDa - subunidades dos NF; 66 kDa - proteína associada a FI; 57 kDa - vimentina; 52 kDa - GFAP; 42 kDa - actina.

e controle.

O cálculo da razão molar foi feito dividindo o peso de cada subunidade constituinte dos NF pela massa molecular relativa da respectiva subunidade. Para estabelecer uma relação percentual entre as 3 subunidades, a de 68 kDa foi considerada como referência (100 %).

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre os grupos estudados foi procedida a análise de variância de uma via para cada razão molar, seguida do teste do raio múltiplo de Duncan.

A análise de variância entre as razões molares da subunidade de 200 kDa dos neurofilamentos no córtex cerebral mostrou diferença significativa entre os grupos [  $F(3,18) = 5,793$  ;  $p < 0,01$  ]. O teste do raio múltiplo de Duncan indicou diferença nos grupos tratados com fenilalanina +  $\alpha$ -metilfenilalanina e metilmalonato quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). O mesmo não ocorreu com as razões molares da subunidade de 150 kDa que não apresentaram diferenças significativas entre os grupos [  $F(3,22) = 0,658$  ;  $p > 0,58$  ].

Embora a razão molar não tenha mostrado diferença significativa para a subunidade de 200 kDa dos animais tratados com prolina, verifica-se uma grande tendência de diminuição desta subunidade em relação aos dados dos animais controle.

### III.5.e - Mapeamento peptídico

Numa tentativa de verificar a existência ou não de modificações estruturais provocadas pelos tratamentos nas

Tabela III.4 - Efeito dos tratamentos sobre a razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos no córtex cerebral<sup>a</sup>

Subunidades dos neurofilamentos			
Tratamento	200 kDa	150 kDa	68 kDa
Salina	10,2 ± 2,24 (6)	41,6 ± 3,79 (6)	100
PHE + MePHE	3,2 ± 0,85 (5)*	38,3 ± 4,08 (7)	100
PRO	6,8 ± 1,07 (5)	37,3 ± 4,04 (6)	100
MMA	3,2 ± 0,57 (6)*	45,5 ± 5,89 (7)	100

a - Resultados expressos em média ± erro padrão (número de experimentos).

\* - Diferença significativa para  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Teste de Duncan).

PHE + MePHE: Tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina.

PRO: Tratamento com prolina.

MMA: Tratamento com metilmalonato.

subunidades de 200 kDa dos neurofilamentos em córtex cerebral, procedeu-se à proteólise enzimática parcial utilizando a enzima V-8 do S. aureus.

A figura III.6 mostra os perfis densitométricos da digestão enzimática nos quatro grupos analisados. Os perfis mostram semelhança entre os grupos. Devido ao fato da subunidade de 200 kDa ser um componente presente em baixas concentrações na preparação total de FI o mapa proteolítico apresentou bandas fracas e de difícil visualização.

### III.6 - EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE O CEREBELO

#### III.6.a - Conteúdo protéico do homogeneizado e da fração enriquecida em filamentos intermediários no cerebello

Os resultados obtidos a partir da dosagem de proteínas do homogeneizado (total) (H) e da fração enriquecida em filamentos intermediários (FE) do cerebello dos animais tratados, estão apresentados na tabela III.5. Os resultados foram obtidos a partir de um "pool" de 2 cerebelos e dividido por 2 para se obter os valores correspondentes a cada estrutura.

A análise de variância de uma via para a quantidade de proteínas do homogeneizado total, expressa por estrutura (cerebello), mostrou diferença significativa entre os grupos [  $F(3,39) = 4,169$  ;  $p < 0,02$  ]. O teste do raio múltiplo de Duncan indicou diferença no grupo com PKU experimental comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas.



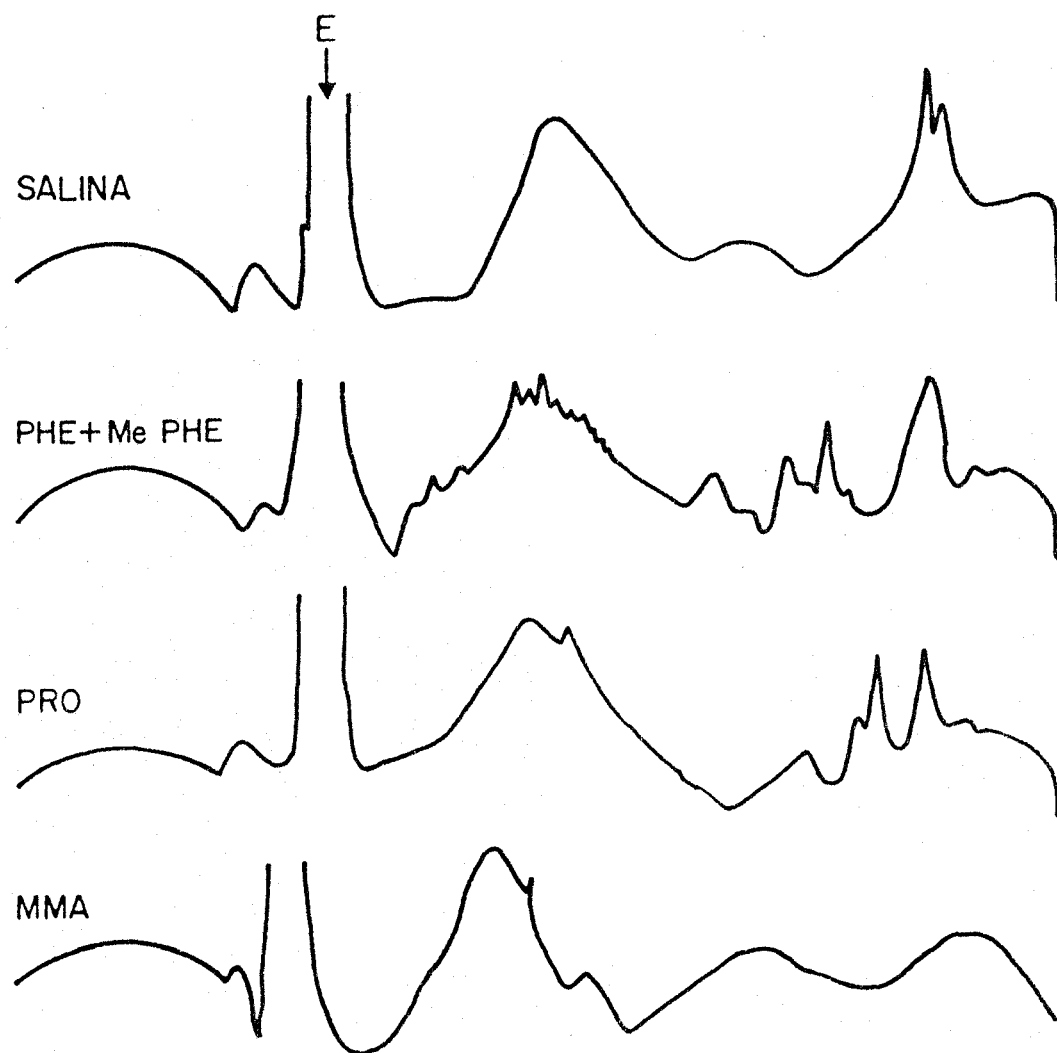


Figura III.6 - Efeito dos tratamentos sobre a digestão proteolítica da subunidade protéica de 200 kDa dos NF pela protease V-8 do *S. aureus*. A figura representa traçados densitométricos de géis de poliacrilamida 15 %. A digestão foi realizada com 6 ug de enzima e 12 ug de proteína. E - enzima; PHE + MePHE - tratamento com fenilalanina e  $\phi$ -metilfenilalanina; PRO - tratamento com prolina; MMA - tratamento com metilmalonato.

O conteúdo protéico da fração enriquecida em filamentos intermediários expresso por grama de tecido não apresentou diferença significativa nos grupos testados [  $F(3,37) = 0,647$  ;  $p > 0,58$  ]. O mesmo ocorreu com o conteúdo protéico da fração enriquecida em filamentos intermediários, expresso por estrutura, [  $F(3,39) = 2,190$  ;  $p > 0,10$  ], ou expresso por grama de tecido [  $F(3,37) = 0,742$  ;  $p > 0,53$  ].

Portanto, o cerebelo dos animais submetidos ao modelo experimental de fenilcetonúria apresentou diminuição significativa no conteúdo protéico do homogeneizado expresso em mg por estrutura.

### III.6.b - Conteúdo total de filamentos intermediários e das subunidades protéicas individuais dos filamentos intermediários

Após a dosagem de proteínas da fração enriquecida em filamentos intermediários no cerebelo procedeu-se à análise quantitativa individual de cada componente protéico a fim de verificar a ocorrência ou não de alterações nos mesmos. Para tanto, fez-se quantificação por densitometria sobre géis de SDS-PAGE, conforme descrito na seção II-10 de "Material e Métodos". Tomando-se a quantidade de proteínas totais da fração enriquecida em filamentos intermediários como 100 %, foi possível determinar quantitativamente o conteúdo de cada subunidade protéica nela contida. Para o cálculo do conteúdo total de filamentos intermediários fez-se a soma dos valores das subunidades protéicas individuais, excluindo-se a actina que não pertence à classe dos filamentos intermediários. Obteve-se, assim, apenas o conteúdo de FI na preparação.

Tabela III.5 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo protéico do homogeneizado (H) e da fração enriquecida em filamentos intermediários (FE) no cerebelo<sup>a</sup>.

Tratamento	H/estrutura (mg)	H/g tecido (mg/g)	FE/estrutura (mg)	FE/g tecido (mg/g)
Salina	20,2 ± 0,92	104,6 ± 4,58	1,0 ± 0,06	5,4 ± 0,35
PHE + MePHE	16,0 ± 1,01*	105,2 ± 6,51	0,8 ± 0,06	4,9 ± 0,31
PRO	19,4 ± 1,07	107,7 ± 3,98	0,9 ± 0,06	4,8 ± 0,35
MMA	20,1 ± 0,98	114,3 ± 6,45	1,0 ± 0,06	4,7 ± 0,28

a - Resultados expressos em média ± erro padrão. Número de experimentos = 10.

\* - Diferença significativa para  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Teste de Duncan).

PHE + MePHE: Tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina.

PRO: Tratamento com prolina.

MMA: Tratamento com metilmalonato.

A tabela III.6 mostra os valores dos conteúdos totais dos filamentos intermediários (FI) no cerebelo. A análise de variância de uma via para o conteúdo total de filamentos intermediários não mostrou diferença significativa entre os grupos, quando expresso em mg de FI por estrutura [  $F(2,24) = 0,411$  ;  $p > 0,75$  ] ou em mg FI por g de tecido [  $F(3,22) = 0,312$  ;  $p > 0,81$  ].

A figura III.7 mostra os valores médios e os erros padrões obtidos após a quantificação das proteínas do tipo filamentos intermediários em animais controle e submetidos aos 3 modelos de EIM, expressos em ug de FI por estrutura, no cerebelo.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre os grupos estudados foi procedida a análise de variância de uma via para cada proteína, seguida do teste do raio múltiplo de Duncan. Os resultados indicam que a quantidade individual das proteínas do tipo filamentos intermediários não sofreu alteração quantitativa com os tratamentos administrados aos animais.

A seguir estão apresentados os resultados da ANOVA de uma via para os dados expressos em ug FI por estrutura.

Subunidade de 200 kDa:  $F(3,21) = 1,174$  ;  $p > 0,34$ .

Subunidade de 150 kDa:  $F(3,21) = 1,480$  ;  $p > 0,24$ .

Subunidade de 68 kDa:  $F(3,13) = 0,553$  ;  $p > 0,65$ .

Subunidade de 66 kDa:  $F(3,14) = 0,726$  ;  $p > 0,55$ .

Subunidade de 57 kDa:  $F(3,20) = 0,289$  ;  $p > 0,83$ .

Subunidade de 52 kDa:  $F(3,20) = 0,885$  ;  $p > 0,46$ .

Subunidade de 42 kDa:  $F(3,20) = 0,171$  ;  $p > 0,91$ .

Tabela III.6 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo total de filamentos intermediários (FI) no cerebelo<sup>a</sup>.

Tratamento	FI / Estrutura (mg)	FI / g tecido (mg/g)
Salina	0,33 ± 0,02 (7)	1,88 ± 0,07 (7)
PHE + MePHE	0,31 ± 0,01 (7)	1,71 ± 0,07 (6)
PRO	0,36 ± 0,04 (6)	1,86 ± 0,21 (6)
MMA	0,35 ± 0,04 (8)	1,81 ± 0,16 (7)

a - Resultados expressos em média ± erro padrão (número de experimentos).

PHE + MePHE: Tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina.

PRO: Tratamento com prolina.

MMA: Tratamento com metilmalonato.

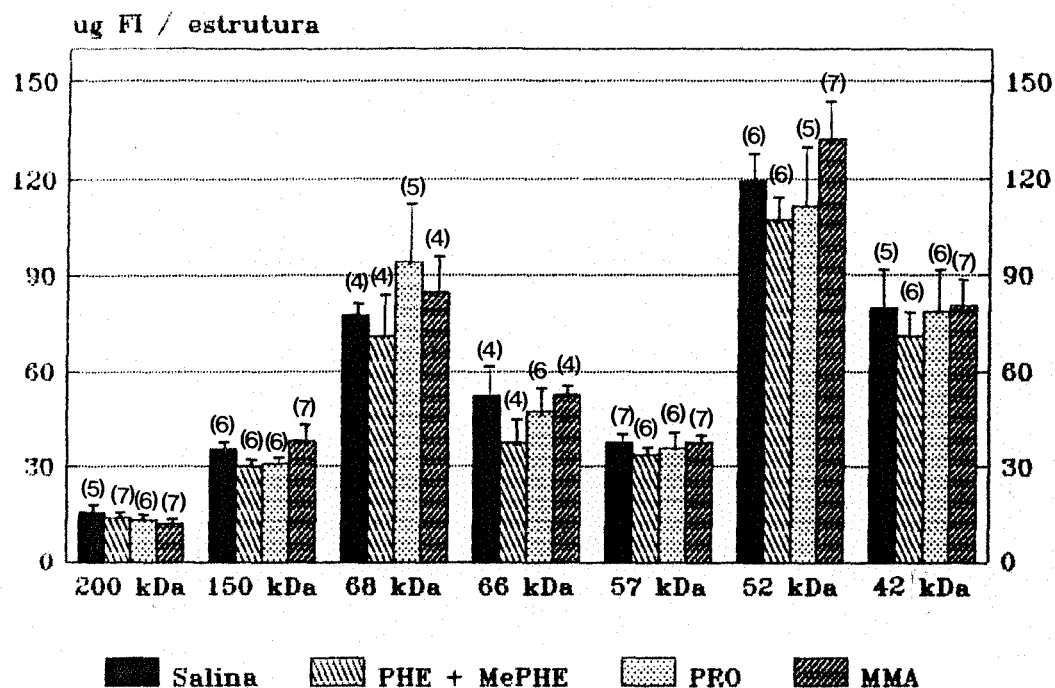


Figura III.7 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo individual de subunidades dos filamentos intermediários expresso em ug de FI por estrutura ( CEREBELO ).

Resultados expressos em média, erro padrão, (número de experimentos). PHE + MePHE - tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina; PRO - tratamento com prolina; MMA - tratamento com metilmalonato; 200 kDa, 150 Kda e 68 kDa - subunidades dos NF; 66 kDa - proteína associada a FI; 57 kDa vimentina; 52 kDa - GFAP; 42 kDa - actina.

### III.6.c - Quantificação individual das proteínas do tipo filamento intermediário expressa em ug de FI por mg de proteínas totais

A figura III.8 mostra os valores médios e os erros padrões obtidos após a quantificação das proteínas do tipo filamentos intermediários em animais controle e submetidos aos 3 modelos de EIM, expressos em ug de FI por mg de proteínas totais, no cerebelo.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre os grupos estudados foi procedida a análise de variância de uma via para cada proteína, seguida do teste do raio múltiplo de Duncan.

A seguir estão apresentados os resultados da ANOVA de uma via para os dados expressos em ug FI por mg de proteínas totais.

Subunidade de 200 kDa:  $F(3,19) = 1,096$  ;  $p > 0,37$ .

Subunidade de 150 kDa:  $F(3,21) = 0,511$  ;  $p > 0,67$ .

Subunidade de 68 kDa:  $F(3,13) = 0,412$  ;  $p > 0,74$ .

Subunidade de 66 kDa:  $F(3,15) = 0,869$  ;  $p > 0,47$ .

Subunidade de 57 kDa:  $F(3,23) = 0,526$  ;  $p > 0,66$ .

Subunidade de 52 kDa:  $F(3,19) = 1,592$  ;  $p > 0,22$ .

Subunidade de 42 kDa:  $F(3,19) = 1,501$  ;  $p > 0,24$ .

Os resultados mostrados aqui e na secção III.6.b indicam que a quantificação individual das proteínas do tipo filamentos intermediários no cerebelo não sofreram alteração quantitativa com os tratamentos administrados aos animais.

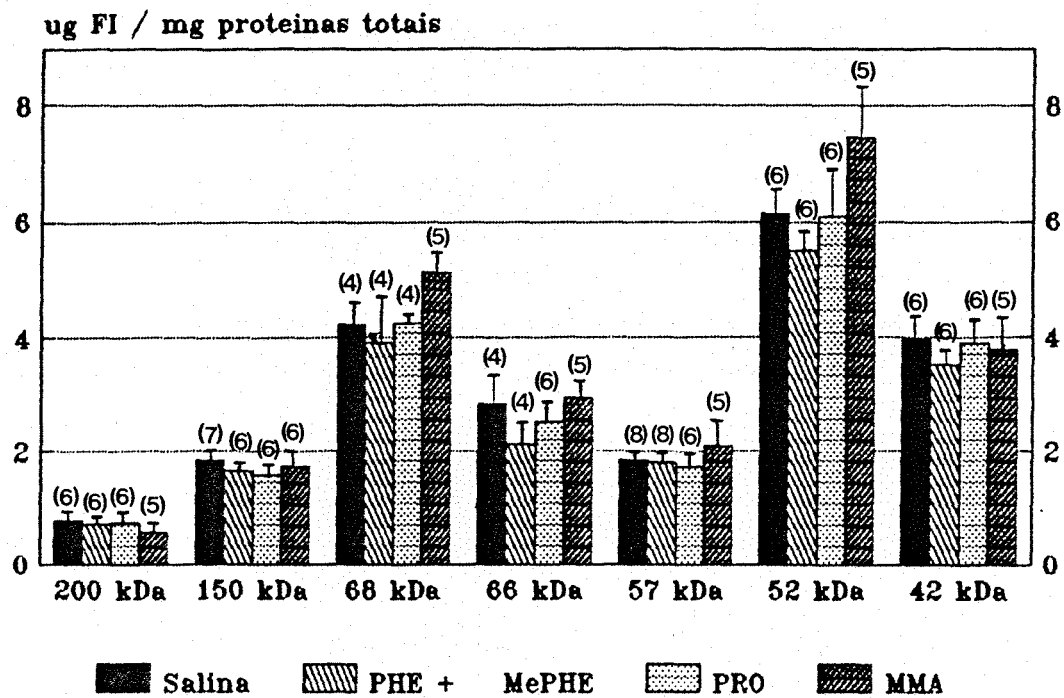


Figura III.8 - Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo individual de subunidades dos filamentos intermediários expresso em ug de FI por mg de proteínas totais no CEREBELO.

Resultados expressos em média, erro padrão, (número de experimentos). PHE + MePHE - tratamento com fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina; PRO - tratamento com prolina; MMA - tratamento com metilmalonato; 200 kDa, 150 Kda e 68 kDa - subunidades dos NF; 66 kDa - proteína associada a FI; 57 kDa - vimentina; 52 kDa - GFAP; 42 kDa - actina.



### III.6.d - Razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos

Na tabela III.7 estão apresentadas as razões molares entre as subunidades protéicas de 200 kDa, 150 kDa e 68 kDa dos neurofilamentos no cerebelo dos animais experimentais e controle.

O cálculo da razão molar foi feito como descrito na seção III.5.d.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre os grupos estudados foi procedida a análise de variância de uma via para cada razão molar, seguida do teste do raio múltiplo de Duncan.

A análise de variância entre as razões molares das subunidades de 200 kDa dos neurofilamentos no cerebelo não apresentou diferença entre os grupos [  $F(3,13) = 0,386$  ;  $p > 0,98$  ], o mesmo ocorrendo com a subunidade de 150 kDa [  $F(3,13) = 0,170$  ;  $p > 0,91$  ].

### III.7- COMPARAÇÃO ENTRE CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO DOS ANIMAIS TRATADOS COM SALINA (GRUPO CONTROLE)

#### III.7.a - Concentrações protéicas do homogeneizado e da fração enriquecida em filamentos intermediários e concentrações dos filamentos intermediários e neurofilamentos

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre córtex cerebral e cerebelo foi feito o teste t de Student nos dados das concentrações protéicas do homogeneizado (H) e da fração enriquecida em filamentos

Tabela III.7 - Efeito dos tratamentos sobre a razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos no cerebelo<sup>a</sup>

Subunidades dos Neurofilamentos			
Tratamento	200 kDa	150 kDa	68 kDa
Salina	6,7 ± 1,10 (4)	20,9 ± 2,05 (4)	100
PHE + MePHE	6,9 ± 3,25 (4)	21,3 ± 5,00 (4)	100
PRO	6,5 ± 1,38 (5)	24,1 ± 3,53 (5)	100
MMA	6,0 ± 0,90 (4)	22,6 ± 3,10 (4)	100

a - Resultados expressos em média ± erro padrão (número de experimentos).

PHE + MePHE: Tratamento com fenilalanina e α-metilfenilalanina.

PRO: Tratamento com prolina.

MMA: Tratamento com metilmalonato.

intermediários (FE) assim como das concentrações totais de filamentos intermediários (FI) e neurofilamentos (NF) expressos em mg por grama de tecido dos grupos tratados com salina. Como pode ser observado na tabela III.8, a concentração protéica do homogeneizado não apresentou diferença significativa entre córtex cerebral e cerebelo ( $t = 0,36$  ;  $p > 0,05$  ). No entanto, o mesmo não ocorreu com a concentração de proteínas da fração enriquecida ( $t = 7,18$  ;  $p < 0,01$  ) que no cerebelo é significativamente maior do que no córtex cerebral. Observa-se que a concentração total de filamentos intermediários também é significativamente maior no cerebelo do que no córtex cerebral ( $t = 7,74$  ;  $p < 0,01$  ), assim como a concentração de neurofilamentos ( $t = 3,74$  ;  $p < 0,01$  ).

Os resultados mostram valores significativamente mais altos nas concentrações das proteínas constituintes dos filamentos intermediários e neurofilamentos do cerebelo em relação ao córtex cerebral. Conseqüentemente, observam-se valores cerebelares maiores na concentração protéica da fração enriquecida que contém essas estruturas.

### III.7.b - Subunidades protéicas individuais dos filamentos intermediários

A figura III.9 apresenta os valores das subunidades protéicas individuais dos filamentos intermediários dos grupos controle expressos em ug de filamentos intermediários por mg de proteínas totais.

Com o objetivo de comparar córtex cerebral e cerebelo foi realizado o teste t de Student nos grupos controle.

Tabela III.8 - Comparação entre córtex cerebral e cerebelo quanto a concentração protéica do homogeneizado (H) e da fração enriquecida (FE) e sobre a concentração total de filamentos intermediários (FI), e de neurofilamentos (NF)<sup>a</sup>.

---

Estrutura	H/g tecido (mg/g)	FE/g tecido (mg/g)	FI/g tecido (mg/g)	NF/g tecido (mg/g)
CX	107,0±4,23 (10)	2,4±0,19 (10)	0,9±0,09 (9)	0,44±0,07 (6)
CB	104,6±4,58 (10)	5,4±0,35 (10)*	1,8±0,07 (7)*	0,82±0,06 (6)*

---

a - Resultados expressos em média ± erro padrão (número de experimentos).

CX - córtex cerebral; CB - cerebelo

\* - Diferença significativa para  $p < 0,01$  em relação ao córtex cerebral (teste t de Student).

Todas as subunidades protéicas dos filamentos intermediários, com exceção da subunidade de 150 kDa, apresentam valores menores no córtex cerebral em relação ao cerebelo. A seguir estão apresentados os resultados do teste t:

Subunidade de 200 kDa:  $t = 2,39$ ; significativo para  $p < 0,05$ .

Subunidade de 150 kDa:  $t = 1,30$ ; não significativo para  $p < 0,05$ .

Subunidade de 68 kDa:  $t = 4,96$ ; significativo para  $p < 0,05$ .

Subunidade de 66 kDa:  $t = 2,88$ ; significativo para  $p < 0,05$ .

Subunidade de 57 kDa:  $t = 7,39$ ; Significativo para  $p < 0,05$ .

Subunidade de 52 kDa:  $t = 7,92$ ; significativo para  $p < 0,05$ .

Subunidade de 42 kDa:  $t = 2,14$ ; significativo para  $p < 0,05$ .

### III.7.c - Razões molares entre as subunidades dos neurofilamentos

Com o objetivo de observar a existência ou não de diferenças entre as razões molares do córtex cerebral e do cerebelo foi realizado o teste t de Student nos dados do grupo controle. Como pode ser visto na tabela III.9, a subunidade protéica de 150 kDa apresenta valores significativamente menores no cerebelo em relação ao córtex cerebral ( $t = 3,75$ ;  $p < 0,01$ ), o mesmo não ocorrendo com a subunidade de 200 kDa que está presente em proporções similares nas duas estruturas ( $t = 1,01$ ;  $p > 0,05$ ).

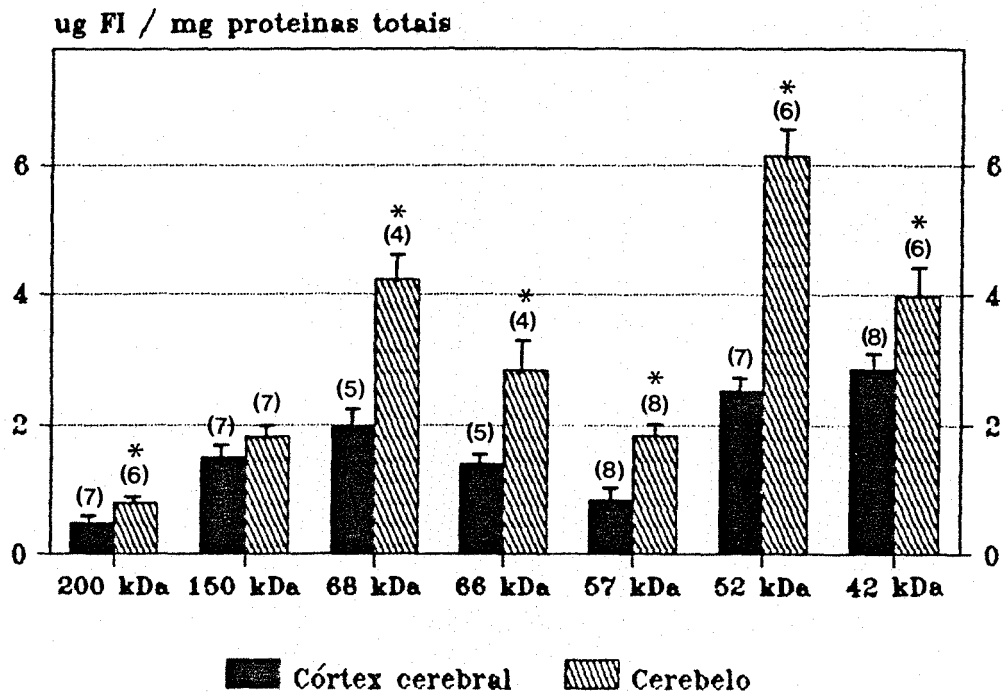


Figura III.9 - Comparação entre as subunidades individuais dos filamentos intermediários de córtex cerebral e de cerebelo. Resultados expressos em média, erro padrão, (número de experimentos). \* Diferença significativa para  $p < 0,05$  em relação ao córtex cerebral (teste t de Student). 200 kDa, 150 Kda e 68 kDa - subunidades dos NF; 66 kDa - proteína associada a FI; 57 kDa - vimentina; 52 kDa - GFAP; 42 kDa - actina.

Tabela III.9 - Comparação entre córtex cerebral e cerebelo quanto à razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos<sup>a</sup>.

Estrutura	Subunidades dos neurofilamentos		
	200 kDa	150 kDa	68 kDa
Córtex cerebral	10,2 ± 2,24 (6)	41,6 ± 3,79 (6)	100
Cerebelo	6,7 ± 1,10 (4)	20,9 ± 2,05 (4)*	100

a - Resultados expressos em média ± erro padrão (número de experimentos).

\* - Diferença significativa para  $p < 0,01$  em relação ao córtex cerebral (teste t de Student).





#### IV. 1 - INDUÇÃO DOS EIM E INFLUÊNCIA DOS MESMOS SOBRE OS PESOS CORPORAL, CEREBRAL, CEREBELAR E CORTICAL

A utilização de modelos animais para o estudo dos erros inatos do metabolismo tem permitido um melhor entendimento dos vários desarranjos metabólicos que ocorrem nestas doenças. No caso do tecido nervoso estes modelos adquirem particular importância, uma vez que o estudo em pacientes torna-se bastante dificultado, à medida que esbarra em problemas desde permissão de necrópsia pela família até a baixa incidência destas doenças na população. A incidência das hiperfenilalaninemias é 1 para cada 10.000 nascimentos vivos (Scriver et al., 1989) e a incidência da metilmalonicacidemia é 1 para 29.000 nascimentos vivos (Ledley et al., 1984). A incidência das hiperprolinemias é desconhecida.

Os modelos de EIM usados neste trabalho foram desenvolvidos em nosso laboratório (Castilhos, 1986; Moreira et al., 1989; Dutra, 1987) e foram feitos a partir do sexto dia de vida (maturação equivalente à do cérebro de um ser humano recém-nascido) até o vigésimo oitavo dia de vida (maturação equivalente à de uma criança de dois a oito anos de idade) (Loo et al., 1980). Foram utilizadas doses crescentes (conforme o peso e a idade dos animais) de fenilalanina mais  $\alpha$ -metilfenilalanina (fenilcetonúria), prolina (hiperprolinemia) e ácido metilmalônico (metilmalonicacidemia). As doses utilizadas permitiram que se atingissem concentrações plasmáticas de fenilalanina entre 1,0 e 5,0 mM (20-30 vezes maior do que a sua concentração normal no rato), de prolina entre 12 e 14 mM (10-20 vezes maior do que a sua concentração normal no rato) e de ácido metilmalônico entre

1,0-2,5 mM.

Neste estudo, o peso dos ratos submetidos aos tratamentos não diferiu do peso dos ratos do grupo controle, injetados com salina. Supondo-se que este achado possa ser transposto para o ser humano, poder-se-ia sugerir que altas concentrações séricas e cerebrais de fenilalanina, prolina e ácido metilmalônico não alterem o apetite, como ocorre nos ratos. Assim, também os pesos do cérebro, do córtex cerebral e do cerebelo dos ratos não sofreu influência do ácido metilmalônico e da prolina, indicando que não há efeito grosseiro destas drogas sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central. Por outro lado, o peso cerebral dos ratos injetados com fenilalanina mais -metilfenilalanina sofreu redução. Esta microencefalia também foi descrita em pacientes com fenilcetonúria (Alvord et al, 1950) e em animais submetidos ao modelo experimental de fenilcetonúria (Huether et al., 1983). Tem sido descrita uma concomitante deficiência de mielina no sistema nervoso central em pacientes com fenilcetonúria. Alguns autores atribuem à esta deficiência o menor peso cerebral observado nestes pacientes e nos animais experimentais (Appel, 1966; Siegel et al., 1971; Copenhaver, 1973).

#### IV. 2 - EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

O processo de extração baseou-se na característica comum a todos os filamentos intermediários de serem os elementos mais insolúveis do citoesqueleto. Os filamentos intermediários não são solubilizados mesmo na presença de tampão de alta força

iônica. O Triton X-100 utilizado em nosso método de extração permeabilizou a membrana celular, permitindo que as proteínas solúveis da célula fossem removidas, permanecendo uma fração insolúvel contendo os filamentos intermediários. A análise do perfil eletroforético das frações obtidas durante o processo de extração sugere que a quase totalidade dos filamentos intermediários permaneceu na fração insolúvel. Esta observação foi confirmada por método imunológico realizado previamente em nosso laboratório (Paz, 1989) utilizando anticorpos contra neurofilamentos. Esses resultados nos dão maior confiabilidade para o estudo quantitativo que realizamos.

Estudos de polimerização "in vitro" realizados previamente em nosso laboratório (Paz, 1989) confirmaram a presença de filamentos intermediários na fração insolúvel em alta força iônica. Além disso, a identificação da massa molecular e do ponto isoelétrico evidenciou que as proteínas da fração insolúvel tratavam-se de subunidades dos filamentos intermediários: subunidades de 200, 150 e 68 kDa dos neurofilamentos; proteína de 66 kDa - recentemente descrita por Chiu e colaboradores (1989) como pertencente à classe dos neurofilamentos; proteína de 57 kDa - vimentina (Aletta et al., 1988) e proteína de 52 kDa - GFAP, subunidade dos filamentos gliais (Parysek & Goldman, 1988). Uma proteína não pertencente à classe dos filamentos intermediários foi encontrada na fração enriquecida. Trata-se de uma proteína de 42 kDa, provavelmente a actina (Chiu et al., 1989), oriunda dos microfilamentos que estão ligados aos filamentos intermediários "in vivo", sendo, por isso parcialmente extraídos com estes.

#### IV. 3 - EFEITO DOS EIM SOBRE OS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Sabe-se que o papel dos filamentos intermediários, embora não esclarecido em sua totalidade, é de fundamental importância para a realização de funções celulares vitais. A incapacidade do axônio em sintetizar proteínas significa que substâncias fabricadas no corpo celular devem ser transportadas até os terminais nervosos ( Hirokawa, 1982 ). Há evidências de que os neurofilamentos participam diretamente no transporte de organelas para as sinapses ( Hollenbecker, 1989 ) sugerindo que fatores externos que levam a alterações nas quantidades de neurofilamentos podem afetar a atividade neuronal. Por outro lado sabe-se que dos EIM aqui estudados fenilcetonúria e metilmalonicacidemia certamente causam alterações no sistema nervoso central com conseqüente retardo mental, enquanto que hiperprolinemia possivelmente também o causa. Em vista da importância dos neurofilamentos para a atividade neuronal procedeu-se ao estudo das proteínas constituintes dos filamentos intermediários contidos no córtex cerebral e no cerebelo dos ratos com 30 dias de vida submetidos aos modelos experimentais acima citados com o objetivo de verificar possíveis alterações quantitativas que possam eventualmente contribuir para as alterações bioquímicas e comportamentais que acompanham os EIM.

Muitos trabalhos realizados em nosso laboratório e em outros laboratórios descrevem alterações bioquímicas secundárias a EIM. Em fenilcetonúria, entre outros achados se encontraram: captação cerebral de glicose diminuída (Rodrigues et al., 1990);

aumento da atividade da ATP-difosfohidrolase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento (Wyse, 1990); peso, tamanho e conteúdo de DNA cerebral diminuídos (Huether et al., 1983). Na hiperprolinemia tipo II foi observada iminoglicinúria e um leve aumento de ornitina e alanina no sangue (Goodman et al., 1974); decréscimo no aprendizado em animais submetidos a modelo experimental de hiperprolinemia (Moreira et al., 1989); alta excreção urinária de N-(pirrol-2-carboxil) glicina (Wajner et al., 1990). Na metilmalonicacidemia foi observada hipoglicemia após ingestão de proteínas e acidose metabólica (Oberholzer et al., 1967); diminuição do conteúdo de ácido N-acetilneuramínico em cerebelo de ratos com 25 dias de vida (Wajner et al., 1988); aumento da captação de glicose e inibição da succinato desidrogenase por cérebro de ratos com 30 dias de vida, em jejum (Dutra et al., 1991); MMA "in vitro" provocou uma diminuição da captação cerebral de  $\beta$ -hidroxibutirato e inibiu a atividade da  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase, principalmente nos ratos em jejum (Dutra et al., 1991).

Muitos trabalhos indicam que os filamentos intermediários são sensíveis a condições experimentais ou patológicas. Substâncias químicas como n-hexano, metil-n-butil cetona, 2,5-hexanodiona, dissulfito de carbono e acrilamida causam acúmulo dos neurofilamentos na porção distal do axônio (Sayre et al., 1985). Esta mesma alteração morfológica ocorre na neuropatia do axônio gigante (Pena, 1982; Monaco et al., 1985). Outros produtos tóxicos como IDPN e alumínio causam acúmulo dos neurofilamentos na porção proximal do axônio (Sayre et al.,

1985). A concentração de neurofilamentos também pode ser alterada em algumas circunstâncias tais como baixa temperatura (Brimijoin et al., 1979; Piezzi & Cavicchia, 1981 - citados por Cuenca et al., 1987), axotomia (Dyck et al., 1985), administração de hormônios ou substâncias tóxicas (Griffin et al., 1983).

Trabalhos realizados em nosso laboratório (Paz et al., 1991) também demonstraram que a desnutrição protéica pós-natal imposta durante o período de lactação causou um aumento na concentração das subunidades de 150 e 68 kDa dos neurofilamentos em animais adultos reabilitados nutricionalmente. Assim, demonstrou-se que os neurofilamentos são sensíveis também a modificações na dieta.

No presente trabalho constatou-se a diminuição da subunidade protéica de 200 kDa dos neurofilamentos no córtex cerebral dos ratos submetidos aos modelos experimentais de fenilcetonúria, hiperprolinemia e metilmalonicacidemia. As outras subunidades dos filamentos intermediários no córtex cerebral e todas as subunidades do cerebelo não apresentaram alterações quantitativas.

As experiências de digestão peptídica parcial com enzima V-8 de S. aureus sugerem que embora os tratamentos utilizados tenham provocado uma modificação quantitativa na subunidade de 200 kDa de córtex cerebral, provavelmente não houve modificações estruturais importantes nessa proteína.

Como a subunidade de 200 kDa está presente externamente no neurofilamento, e é responsável pela interação dos neurofilamentos entre si e com outras estruturas celulares (Sharp

et al., 1982; Tokutake, 1990) esta diminuição pode influenciar na organização global do citoesqueleto e conseqüentemente no funcionamento normal do neurônio. Porém, estudos posteriores com microscopia eletrônica, serão necessários para uma análise mais detalhada da organização do citoesqueleto de animais submetidos aos modelos experimentais estudados neste trabalho. Considerando-se que a subunidade de 200 kDa aparece a partir dos primeiros dias de vida do animal, contrariamente as outras subunidades dos neurofilamentos, de desenvolvimento pré natal, é possível que o seu aparecimento seja marca de maturidade axonal (Shaw & Weber, 1982).

Os mecanismos responsáveis pela diminuição da subunidade de 200 kDa dos neurofilamentos em córtex cerebral dos animais submetidos aos modelos experimentais de EIM são ainda desconhecidos. Porém, algumas possibilidades podem ser consideradas: 1) um efeito direto sobre a expressão da proteína de 200 kDa causando alteração nas atividades enzimáticas, envolvendo diminuição da síntese protéica ou aumento da degradação, ou 2) um efeito indireto sobre constituintes regulatórios tais como proteínas associadas ao citoesqueleto que regulam a estabilidade e as interações dos filamentos intermediários (Liem et al., 1985).

#### IV. 4 - ESTUDO COMPARATIVO DOS NEUROFILAMENTOS DE CÓRTEX CEREBRAL E DE CEREBELO

As concentrações de DNA em córtex cerebral e em cerebelo de ratos com 21 dias de vida [DNA de córtex cerebral.

1,98 mg/g de tecido ( dados não publicados), DNA de cerebelo: 7,7 mg/g de tecido (Azzolin et al., 1991)] juntamente com as concentrações de proteínas encontrados no presente trabalho (107,0 mg/g de tecido para córtex cerebral e 104,6 mg/g de tecido para cerebelo) sugerem que o cerebelo possui um número de células quatro vezes maior do que o córtex cerebral, porém estas células seriam menores. Considerando que o volume celular aproximado pode ser estimado pela relação proteína/DNA (54,04 para córtex cerebral e 13,58 para cerebelo) podemos supor que a concentração de neurofilamentos por célula seja duas vezes maior no cerebelo do que no córtex cerebral. A concentração de neurofilamentos encontrada no presente trabalho (0,44 mg/g de tecido para córtex cerebral e 0,82 mg/g de tecido para cerebelo) apresenta-se também duas vezes maior no cerebelo do que no córtex cerebral, sugerindo que a concentração de NF/célula é o dobro no cerebelo em relação ao córtex cerebral. A razão de haver um aumento na concentração de NF/célula no cerebelo em relação ao córtex cerebral é desconhecida. Podemos atribuir esse fato a duas possibilidades. 1) o cerebelo possuir células menores e conseqüentemente menor volume de citoplasma 2) diferentes funções dos NF no córtex cerebral e no cerebelo. Estudos posteriores por microscopia eletrônica serão necessários para elucidar esta questão.

Os neurofilamentos são polímeros compostos por um triplete de componentes protéicos com pesos moleculares de 68, 150 e 200 kDa.

A determinação da razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos permite um estudo da organização molecular das



três subunidades constituintes deste polímero e, conseqüentemente, especulações em torno da função dessas estruturas do citoesqueleto em diferentes regiões cerebrais.

A estequiometria dos neurofilamentos tem sido descrita em diferentes espécies. Nestes estudos evidenciou-se que diferentes espécies animais ou estruturas possuem uma diferente razão molar. Chiu e colaboradores (1980) fizeram um estudo densitométrico de neurofilamentos isolados, a partir de medula espinhal, usando Comassie blue como corante para eletroforese e encontraram as seguintes razões molares: 10:4,2:1,7 em rato; 10:8,9:1,7 em bovino e 10:6,7:3,6 (68 kDa:150 kDa:200 kDa) no homem. Outros pesquisadores (Shecket & Lasek, 1980) fizeram estudo densitométrico da razão molar das subunidades dos neurofilamentos isolados de medula espinhal de cobaio, usando o corante "fast green" e encontraram a razão 10:3,3:1,6 (68 kDa:150 kDa:200 kDa). Posteriormente, Chiu e Norton (1982) usaram neurofilamentos de medula espinhal de ratos purificados por cromatografia e com géis de eletroforese corados por "fast green" e obtiveram a seguinte razão molar 10:3,0:1,4 (68 kDa:150 kDa:200 kDa). Scott e colaboradores (1985) fizeram um estudo eletroforético seguido da coloração por "fast green" da razão molar entre os constituintes dos neurofilamentos em medula espinhal bovina usando neurofilamentos purificados por cromatografia e encontraram a seguinte razão: 10,00:6,00:2,70 (68 kDa:150 kDa:200 kDa).

A estequiometria dos constituintes dos neurofilamentos encontrada neste trabalho foi 10,00 : 4,16 : 1,00 no córtex cerebral, enquanto que no cerebelo foi 10,00 : 2,0 : 0,7 (68 kDa

: 150 kDa : 200 kDa). Os valores obtidos mostram que tanto no córtex cerebral como no cerebelo a subunidade periférica de 200 kDa apresenta-se bastante diminuída em relação a estrutura dos neurofilamentos de medula espinhal de diferentes espécies. Essa diminuição parece ser mais acentuada no cerebelo em relação ao córtex cerebral, além disso, no cerebelo observa-se também uma diminuição acentuada da subunidade de 150 kDa em relação à razão molar dos neurofilamentos de córtex cerebral e principalmente da medula espinhal.

Sabe-se que a distribuição das subunidades dos neurofilamentos é diferente no corpo celular e no axônio. Hirokawa (1982) e Hirokawa e colaboradores (1984) utilizando técnicas de microscopia eletrônica de alta voltagem demonstraram que o axônio possui muito mais estruturas de ligação do que o corpo celular. Sendo que estas estruturas de ligação são compostas por subunidades de 200 e de 150 kDa dos neurofilamentos. A diminuição da subunidade de 200 kDa na razão molar de córtex cerebral e de cerebelo encontradas no presente trabalho em relação aos trabalhos que usaram a medula espinhal não é bem compreendida. Provavelmente o fato da medula espinhal ser constituída por fibras nervosas onde os elementos do citoesqueleto se alinham paralelamente formado feixes compactos que interagem fortemente, seja o motivo pelo qual estas estruturas apresentem grande número de elementos de interconexão. Além disso, quando comparamos a razão molar dos NF de córtex cerebral e de cerebelo, observamos que no caso dessa última estrutura os NF possuem muito menos subunidades periféricas de

150 e 200 kDa. Essa constatação também é de difícil interpretação, no entanto devemos considerar a possibilidade de que os neurofilamentos de diferentes estruturas cerebrais apresentem diferentes funções, e portanto possuam diferentes razões molares. Provavelmente as diferentes razões molares encontradas em córtex cerebral e cerebelo estejam relacionadas com as diferentes concentrações de NF/célula existentes nessas duas estruturas em questão.

Estudos posteriores serão necessários para esclarecer as inúmeras dúvidas que permanecem em relação a estrutura e funções dos filamentos intermediários na célula neuronal.

## V. CONCLUSÕES

1 - Os animais submetidos ao modelo experimental de PKU apresentaram diminuição de peso cerebral.

2 - As concentrações protéicas (mg/g de tecido) dos homogeneizados totais não foram alteradas com os tratamentos realizados.

3 - Os tratamentos utilizados não alteraram a concentração protéica (mg/g de tecido) nem a quantidade total (mg/estrutura) dos filamentos intermediários de córtex cerebral e de cerebello.

4 - A subunidade de 200 kDa dos neurofilamentos do córtex cerebral apresentou-se diminuída nos 3 grupos tratados em relação ao grupo controle.

5 - O mapeamento peptídico da subunidade de 200 kDa dos neurofilamentos do córtex cerebral sugerem que não houve modificação estrutural na subunidade de 200 kDa de córtex cerebral.

6 - A razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos mostrou uma diminuição significativa da subunidade de 150 kDa e 200 kDa no cerebello em relação ao córtex cerebral, no grupo controle.

VI. RESUMO

Neste trabalho, estimou-se a concentração de filamentos intermediários contidos no córtex cerebral e no cerebelo de ratos submetidos a três modelos experimentais de EIM (fenilcetonúria, hiperprolinemia e metilmalonicacidemia) e do grupo controle. Além disso, fez-se um estudo da razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos do córtex cerebral e do cerebelo.

A indução dos EIM nos ratos consistiu na injeção, em doses crescentes conforme a idade e peso dos animais, de soluções contendo fenilalanina +  $\alpha$ -metilfenilalanina (fenilcetonúria), prolina (hiperprolinemia) e MMA (metilmalonicacidemia). Estas injeções foram feitas duas vezes ao dia, com intervalos de 9 e 15 horas, do sexto ao vigésimo oitavo dia de vida do animal. Aos 30 dias de vida os animais foram sacrificados para extração dos filamentos intermediários.

Partindo-se de córtex cerebral ou de cerebelo extraíram-se os filamentos intermediários em tampão de alta força iônica, pH 7,1, na presença de Triton X-100.

A proteína total contida na fração enriquecida em filamentos intermediários foi dosada, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e quantificada por densitometria.

Os resultados obtidos demonstraram que os EIM testados causaram diminuição na quantidade da subunidade de 200 kDa dos neurofilamentos no córtex cerebral sem causar alteração quantitativa nas demais subunidades dos filamentos intermediários no córtex cerebral e no cerebelo.

O estudo estequimétrico dos neurofilamentos de córtex cerebral e cerebelo dos animais controles demonstrou que as

células neuronais do cerebelo possuem maior concentração de neurofilamentos do que as do córtex cerebral e que a razão molar entre as subunidades dos neurofilamentos é diferente nestas duas estruturas.



## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABITA, J.P.; DORCHE, C.; KAUFMAN, S. Further studies on the nature of phenylalanine hydroxylation in brain. Pediatric Research, 8: 714-719, 1974.
- ALBERT, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFT, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. The Cytoskeleton. In: Molecular Biology of the Cell. 2nd ed. New York and London, Garland Publishing, Inc., 613-680, 1989.
- ALETTA, J.M.; ANGELETTI, R.; LIEM, R.K.H.; PURCELL, C.; SHELANSKI, M.L.; GREENE, L.A. Relationship between the nerve growth factor-Regulated clone 73 gene product and the 58-kilodalton neuronal intermediate filament protein (peripherin). Journal of Neurochemistry, 51: 1317-1320, 1988.
- ALVAREZ, J.; ARREDONDO, F.; ESPEJO, F.; WILLIAMS, V. Regulation of axonal microtubules: Effect of sympathetic hyperactivity elicited by reserpine. Neuroscience, 7: 2551-2559, 1982.
- ALVORD, E.C.; STEVENSON, L.D.; VOGEL, F.S. Neurological findings in phenylpyruvic oligophrenia (phenylketonuria). Journal of Neuropathology Experimental Neurology, 9: 298-310, 1950.
- APPEL, S.H. Inhibition of brain protein synthesis; an approach to the biochemical basis of neurological dysfunction in the amino-acidurias. Transacta N.Y. Academy of Science, 29: 63-70, 1966.
- AZZOLIN, I.R.; BERNARD, E.A.; TRINDADE, V.M.T.; GAMELLO, J.L.G.; PERRY, M.L.S. Effect of protein mal nutrition on glycoprotein, protein and lipid synthesis in the rat cerebellum during the period of brain growth spurt. Annual Nutrition and Metabolism, no prelo, 1991.
- BAXTER, C.F.; BALDWIN, R.A.; DAVIS, J.L.; FLOOD, J.F. High proline levels in brain of mice related to specific learning deficits. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 22: 1053-1059, 1985.
- BERRY, H.K.; BRUNNER, R.L.; HUNT, M.M.; WHITE, P.P. Valine, isoleucine, and leucine. A new treatment for phenylketonuria. American Journal of Diseases of Children, 144: 539-543, 1990.
- BIRCHMEIER, W. Cytoskeleton, structure and function. Trends in Biological Sciences, april: 192-195, 1984.
- BLOEMENDAL, H.; PIEPER, F.R. Intermediate filaments: known structure, unknown function. Biochimica et Biophysica Acta, 1007: 245-253, 1989.
- BRABANDER, M.J. Le cytoesquelette et la vie cellulaire. La Recherche, 14: 810-820, 1983.

- BRAY, D.; WHITE, J.G. Cortical flow in animal cells. Science, 239: 883-888, 1988.
- BRENNEMAN, A.R.; KAUFMAN, R. The role of tetrahydropteridine in the enzymatic conversion of tyrosine to 3,4- dihidroxifenilalanine. Biochemical and Biophysical Research Communications, 17: 177-181, 1964.
- CASTILHOS, Z.C. Efeitos da Hiperfenilalaninemia aguda sobre parâmetros comportamentais de rato. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1986. (Dissertação de mestrado do curso de Pós-graduação em Bioquímica da UFRGS).
- CELIS, J.E.; LARSEN, P.M.; FEY, S.J.; CELIS, A. Phosphorylation of keratin and vimentin polypeptides in normal and transformed mitotic human epithelial amnion cells: behavior of keratin and vimentin filaments during mitosis. Journal of Cell Biology, 97: 1429-1434, 1983.
- CHERKIN, A.; ECKARDT, M.J.; GERBRANDT, L.K. Memory: proline induces retrograde amnesia in chicks. Science, 193: 242-244, 1976.
- CHIU, F.C.; BERNES, E.A.; DAS, K.; HALEY, J.; SCOCOLOW, P.; MACALUSO, F.P.; FANT, J. Characterization of a novel 66 Kd subunit of mammalian neurofilaments. Neuron, 2: 1435-1445, 1989.
- CHIU, F.C.; KOREY, B.; NORTON, W.T. Intermediate filaments from bovine, rat, and human CNS: Mapping analysis of the major proteins. Journal of Neurochemistry, 34: 1149-1159, 1980.
- CHIU, F.C.; NORTON, W. Bulk preparation of CNS cytoskeleton and the separation of individual neurofilament proteins by gel filtration: dye-binding characteristics and amino acid compositions. Journal of Neurochemistry, 39: 1252-1260, 1982.
- CLEVELAND, D.W.; FISCHER, S.G.; KIRSCHNER, M.W.; LAEMMLI, U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry, 252: 1101-1106, 1977.
- COOKE, R. The mechanism of muscle contraction. CRC Critical review in Biochemistry, 21: 53-118, 1986.
- COPENHAVER, J.H.; VACANTI, J.P.; CARVER, M.J. Experimental maternal hyperphenylalaninemia; disaggregation of fetal brain ribosomes. Journal of Neurochemistry, 21: 273-280, 1973.
- CUENCA, N.; FERNANDEZ, E.; JUAN, J.; CARRERES, J.; INIGUEZ, C. Postnatal development of microtubules and neurofilaments in the rat optic nerve. A quantitative study. The Journal of

Comparative Neurology, 263: 613-617, 1987.

DAHL, D.; RUEGER, D.C.; BIGMANI, A.; WEBER, K.; OSBORN, M. Vimentin, the 57,000 dalton protein in fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. European Journal of Cell Biology, 24: 191-196, 1981.

DAVIS, J.L.; PICO, R.M. FLOOD, J.F. Differences in learning between hyperprolinemic mice and their congenic controls. Behavioral and Neuronal Biology, 48: 128-137, 1987.

DELVALE, J.A.; DIENEL, G.; GREENGARD, O. Comparison of  $\alpha$ -methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalanineamia in developing rats. Biochemical Journal, 170: 449-459, 1978.

DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.S.; DUTRA-FILHO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D. Effect of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies "in vitro" by brain of developing rats. Biochemical Medicine and Metabolic Biology, no prelo, 1991.

DUTRA, J.C. Efeito da administração crônica de metilmalonato no período pós-natal sobre o comportamento de ratos adultos submetidos a testes aversivos e não aversivos. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1987. (Dissertação de mestrado do curso de Pós-graduação em Bioquímica da UFRGS).

DRAKE, P.; LASEK, R.J. Regional differences in the neuronal cytoskeleton. Journal of Neuroscience, 4: 1173-1186, 1984.

DYCK, P.J.; LAIS, A.; KARNES, J.; SPARKS, M.; DYCK, P.J.B. Peripheral axotomy induces neurofilaments decrease, atrophy, demyelination and degeneration of root and fasciculus gracilis fibers. Brain Research, 340: 19-36, 1985.

EFRON, L.M. Familial hyperprolinemia. Report of a second case, associated with congenital renal malformation, hereditary hematuria and mild mental retardation with demonstration of enzyme defect. The New England Journal of Medicine, 272: 1243-1254, 1965.

FLEMMING, G.A.; HAGEDORN, C.H.; GRANGER, A.S. PHANG, J.M. Delta-1-Pyrroline-5-carboxylate in human plasma. Metabolism, 33: 739-742, 1984.

FRASER, R.B.; STEINERT, P.M.; STEVENS, A.C. Focus on intermediate filaments. Trends in Biological Sciences, 12: 43-45, 1987.

FRIEDMAN, P.A.; KAPPELMAN, A.H.; KAUFMAN, S. Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain. The Journal of Biological Chemistry, 247: 4165-4173, 1972.

- FUSCO, G.; CARLOMAGNO, L.; ROMANO, A.; RINALDI, E.; CEDROLA, G.; CIANCIARUSO, L.; CURTO, A.; ROSOLIA, S.; AURICCHIO, G. Type I hiperprolinemia in family sufering from aniridia and severe dystrophia of ocular tissues. Ophthalmologica, 173: 1-10, 1976.
- GEISLER, N.; KAUFMANN, E.; WEBER, K. Antiparalled orientation of the two double-standed coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments. Journal of Molecular Biology, 182: 173-177, 1985.
- GOODMAN, S.I.; MACE, J.W.; MILES, B.S.; TENG, C.C.; BROWN, S.B. Defective hydroxyproline metabolism in type II hyperprolineamia. Biochemical Medicine, 10: 329-336, 1974.
- GRAU, C.R.; STEELE, R. Phenylalanine and tyrosine utilization in normal and phenylalanine - deficient young mice. Journal of Nutrition, 53: 591-571, 1954.
- GREENGARD, O.; YOSS, M.S.; DELVALLE, J.A.  $\alpha$ -metylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. Science, 192: 1007-1008, 1976.
- GRIFFIN, J.W.; FAHNSTOCK, K.E.; PRICE, D.L.; HOFFMAN, P.N. Microtubule-neurofilament segregation produce by  $\alpha$ -iminodipropionitrile: evidence for the association of fast axonal transport with microtubules. Journal of Neuroscience, 3: 557-566, 1983.
- GUTTLER, F. Phenylketonuria: 50 years since Folling's discovery and still expanding our clinical and biochemical knowledge. Acta Paediatrica Scandinavica, 73: 705-716, 1984.
- HIROKAWA, N. Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membrane organelles in frog axons fevealed by the quick-freeze, deep-etching method. Journal of Cell Biology, 94: 129-142, 1982.
- HIROKAWA, N.; GLICKSMAN, M.A.; WILLARD, M.B. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. Journal of Cell Biology, 98: 1523-1536, 1984.
- HISANAGA, S.; HIROKAWA, N. The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament. The Journal of Neuroscience, 2: 959-966, 1989.
- HOFFMAN, P.N.; KOO, E.H.; MUMA, N.A.; GRIFFIN, J.W.; PRICE, D.L. Role of neurofilaments in the control of axonal calibre in myelinated nerve fibers. In LASEK, R.J.; BLACK, M.M. eds. Intrinsic Determinants of Neuronal Form and Function. New York: Alan R. Liss, pp. 389-402, 1988.
- HOLLENBECK, P.J. The transport and assembly of the axonal cytoskeleton. Journal of Cell Biology, 108: 223-227, 1989.

- HUETHER, G.; NEUHOFF, V.; KAUS, R. Brain development in experimental hyperphenylalanineamia: Disturbed proliferation and reduced cell numbers in the cerebellum. Neuropediatrics, 14: 12-19, 1983.
- KATZ, I.; LLOYD, T.; KAUFMAN, S. Studies on phenylalanine and tyrosine hidroxilation by rat brain tyrosine hidroxilase. Biochimica et Biophysica Acta, 445: 567-578, 1976.
- KAUFMAN, S. The structure of phenilalanine hidroxylation cofactor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 50: 1085-1093, 1963.
- KAUFMAN, S. Metabolism of phenylalanine hidroxylation cofactor. The Journal of Biological Chemistry, 242: 3934-3943, 1967.
- KAUFMAN, S. The phenylalanine hidroxylating systems from mammalian liver. Advances in Enzymology, 35: 245-251, 1971.
- KLYMKOWSKY, M.W.; BACHANT, J.B.; DOMINGO, A. Function of intermediate filaments. Cell Motility and the Cytoskeleton, 14: 309-331, 1989.
- KURODA, M.; PORTER, K.R. Cytoskeleton "in vitro": Preparation of isolated cytoskeletons with three-dimensional architecture. Journal of Biochemistry, 101: 1413-1427, 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protiens during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685, 1970.
- LANE, J.D.; SCHONE, B.; LANGENBECK, U.; NEUHOFF, V. Characterization of experimental phenylketonuria. Augmentation of hyperphenylalaninemia with  $\alpha$ -methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine. Biochimica et Biophysica Acta, 627: 144-156, 1980.
- LEDBETTER, M.C.; PORTER, K.R.A. "Microtubule" in plant cell fone structure. Journal of Cell Biology, 19: 293-298, 1966.
- LEDLEY, F.D.; LEVY, H.L.; SHIH, V.E.; BENJAMIN, R.; MAHONEY, M.J. Benign methylmalonic aciduria. The New England Journal of Medicine, 313: 1015-1018, 1984.
- LEE, V.M.-Y.; CARDEN, M.J.; SCHLAEPFER, W.W.; TROJANOWSKI, J.Q. Monoclonal antibodies distinguish several differentially phosphorylated states of the two largest rat neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats. The Journal of Neurosciences, 2: 3474-3488, 1987.
- LIEM, R.K.H.; PACTER, J.S.; NAPOLITANO, E.W.; CHIN, S.S.M.; MORARI, E.; HUMANN, R. Associated protein as possible cross-linkers in the neuronal cytoskeleton. Annals of N.Y. Academy of Sciences, 455: 492-508, 1985.

- LIPTON, M.A.; GORDON, R.; GUROFF, G.; UNDEFRIEND, S. p-Chlorophenylalanine-induced chemical manifestations of phenylketonuria in rats. Science, 156: 248-250, 1967.
- LOO, Y.H.; FULTON, A.; MILLER, K.; WISNIEWSKI, M.H. Phenylacetate effects in synaptic development. Life Science, 27: 1280-1289, 1980.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-257, 1951.
- MARC, C.; RABIE, A. Microtubules and neurofilaments in the sciatic nerve fibres of the developing rat: Effects of thyroid deficiency. International Journal of Developmental Neuroscience, 3: 656-358, 1985.
- MCKEAN, C.M.; BOGGS, D.E.; PETERSON, N.A. The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentration of essential amino acids in brain. Journal of Neurochemistry, 15: 235-241, 1968.
- MONACO, S.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; ZABEL, D. Giant axonal neuropathy: Acceleration of neurofilament transport in optic axons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 82: 920-924, 1985.
- MOREIRA, J.C.F.; WANNMACHER, C.M.D.; COSTA, S.M.; WAJNER, M. Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. Pharmacology Biochemistry Behavior, 32: 885-890, 1989.
- MOSS, A.R.; SCHOENHEIMER, R. The conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. The Journal of Biological Chemistry, 135: 415-429, 1940.
- OBERHOLZER, V.G.; LEVIN, B.; ANN BURGESS, E.; YOUNG, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. Archives of Disease in Childhood, 42: 492-504, 1967.
- OBLINGER, M.M. Characterization of posttranslational processing of the mammalian high-molecular-weight neurofilament protein "in vivo". The Journal of Neurosciences, 7: 2510-2521, 1987.
- O'FARRELL, P.H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 250: 4007-4021, 1975.
- OLDENDORF, W.H. Saturation of blood brain barrier transport of amino acids in phenylketonuria. Archives in Neurology, 28: 45-48, 1973.
- PARYSEK, L.M.; FOLDMAN, R.D. Distribution of a novel 57 Kd intermediate filament protein in the nervous system. The

Journal of Neuroscience, 8: 555-563, 1988.

- PAZ, M.M. Efeito da desnutrição protéica pós-natal sobre a quantidade de filamentos intermediários de córtex cerebral de ratos jovens e adultos. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989. (Dissertação de mestrado do curso de Pós-graduação em Bioquímica da UFRGS).
- PAZ, M.M.; VALENTE, G.B.; TASCA, C.I.; MATTOS, A.G.; PUREUR, R.P. Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex. Journal of Nutrition, no prelo, 1991.
- PEISACH, J.; STRECKER, H.J. The interconversion of glutamic acid and proline: V. The reduction of  $\gamma$ -pyrroline-5-carboxylic acid to proline. The Journal of Biological Chemistry, 237: 2255-2260, 1962.
- PENA, S.D.J. Giant axonal neuropathy: an inborn error of organization of intermediate filaments. Muscle & Nerve, 5: 166-172, 1982.
- PHANG, J.M.; SCRIVER, C.R. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALE, D.; eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6a. ed. New York, McGraw-Hill, 1989. cap. 18, p. 577-598.
- RODRIGUES, N.R.; WANNMACHER, C.D.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; PIRES, R.F.; FAGAN, P.R.; WAJNER, M. Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine and  $\alpha$ -methylphenylalanine on glucose uptake "in vitro" by the brain of young rats. Biochemical Transaction, 18: 419, 1990.
- RODWELL, V.W. Conversion of amino acids to specialized products. In: MARTIN, D.W. Jr.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. Harper's Review of Biochemistry. 19 ed. Los Altos, California. Lange Medical Publication, 1983. p. 283-306.
- ROSENBERG, L.E.; FENTON, W.A. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALE, D.; eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6a. ed. New York, McGraw-Hill, 1989. cap. 29, p. 821-856.
- SAYRE, L.M.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; GAMBETTI, P. Pathogenesis of experimental giant neurofilamentous axonopathies: A unified hypothesis based on chemical modification on neurofilaments. Brain Research Reviews, 10: 69-83, 1985.
- SCHAFER, I.A.; SCRIVER, C.; EFRON, M.L. Familial hyperprolinemia, cerebral dysfunction and renal anomalies occurring in a family with hereditary nephropathy and deafness. The New England Journal of Medicine, 267: 51-60, 1962.



- SCOTT, D.; SMITH, K.E.; O'BRIEN, B.J.; ANGELIDES, J.K. Characterization of mammalian neurofilament triplet proteins. The Journal of Biological Chemistry, 260: 10736-10747, 1985.
- SCRIVER, C.R.; CLOW, C.L. Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. The New England Journal of Medicine, 303: 1336-1342, 1980.
- SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; WOO, S.L.C. The hyperphenylalaninemias. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.I.; SLY, W.S.; VALE, D.; eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6a. ed. New York, McGraw-Hill, 1989. cap. 15, p. 495-546.
- SHARP, G.A.; SHAW, G.; WEBER, K. Immunoelectron microscopical localization of the three neurofilament triplet proteins along neurofilaments of cultured dorsal root ganglion neurons. Experimental Cell Research, 137: 403-413, 1982.
- SHAW, G.; WEBER, K. Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. Nature, 298: 277-279, 1982.
- SHECKET, G.; LASEK, R.J. Preparation of neurofilament protein from guinea pig peripheral nerve and spinal cord. Journal of Neurochemistry, 35: 1335-1344, 1980.
- SIEGEL, F.L.; AOKI, K.; COLWELL, R.E. Polyribosome disaggregation and cell-free protein synthesis in preparations from cerebral cortex of hyperphenylalaninemias rats. Journal of Neurochemistry, 18: 537-547, 1971.
- SINGER, P.B.; JOHNSON, T.C. The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids. Biochemical Journal, 204: 407-414, 1982.
- SLAUTTERBACK, D.B. Cytoplasmic microtubules. Journal of Cell Biology, 18: 367-388, 1963.
- STEINERT, P.M.; IDLER, W.W.; ZIMMERMAN, S.B. Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments "in vitro". Journal of Molecular Biology, 198: 547-567, 1976.
- STEINERT, P.M.; ROOP, D.S. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Annual Review of Biochemistry, 57: 593-625, 1988.
- STEWART, M.; QUILAN, R.A.; MOIR, R.D. Molecular interactions in paracrystals of a fragment corresponding to the alpha-helical coiled-coil rod portion of glial fibrillary acidic protein: Evidence for an antiparallel packing of molecules and polymorphism related to intermediate filament structure. Journal of Cell Biology, 109: 225-234, 1989.

- STRECKER, H.J. The interconversion of glutamic acid and proline: III. -pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase. The Journal of Biological Chemistry, 235: 3218-3223, 1960.
- TOKUTAKE, S. On the assembly mechanism of neurofilaments. International Journal of Biochemistry, 22: 1-6, 1990.
- TOURIAN, A.; SIDBURY, J.B. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In: STAMBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S. eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5a ed. New York, McGraw Hill, 1983, p. 270-286.
- VALDIVIESO, F.; GIMENEZ, C.; MAYOR, F. "in vivo" inhibition of rat liver phenylalanine hydroxylase by p-chlorophenylalanine and esculin. Experimental model of phenylketonuria. Biochemical Medicine, 12: 72-78, 1975.
- VALLE, D.; DOWNING, S.J.; PHANG, J.M. Proline inhibition of pyrroline-5-carboxylate reductase: Differences in enzymes obtained from animal and tissue culture sources. Biochemical and Biophysical Research Communications, 54: 1418-1424, 1973.
- WAJNER, M.; BRITES, E.C.; DUTRA, J.C.; BUCHALTER, M.S.; PONS, A.H.; PIRES, R.F.; WANNMACHER, L.E.; ROSA JÚNIOR, A.; TRINDADE, V.M.T.; WANNMACHER, C.M.D. Diminished concentrations of ganglioside N-acetylneuraminic acid (G-NeuAc) in cerebellum of young rats receiving chronic administration of methylmalonic acid. Journal of the Neurological Sciences, 85: 233-238, 1988.
- WEBER, G. Inhibition of human brain pyruvate kinase and hexokinase by phenylalanine and phenylpyruvate: possible relevance to phenylketonuric brain damage. Proceedings of National Academy of Sciences of the USA, 63: 1365-1369, 1969.
- WEISENBERG, R.C. Microtubule formation "in vitro" in solutions containing low calcium concentrations. Science, 177: 1104-1105, 1972.
- WUERKER, R.B.; KIRKPATICK, J.B. Neuronal microtubules, neurofilaments and microfilaments. International Reviews of Cytology, 33: 45-76, 1972.
- WYSE, A.T.S. Atividade da ATP - Difosfohidrolase (EC 3.6.1.5) em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos na fenilcetonúria experimental. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990. (Dissertação de mestrado do curso de Pós-graduação em Bioquímica da UFRGS).