

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**CITOESQUELETO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS COMO
MARCADOR PERIFÉRICO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA
FENILALANINA NA FENILCETONÚRIA**

Sabrina Dick

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur

Trabalho de conclusão apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências
Biológicas – Bacharelado com Ênfase
Molecular, Celular e Funcional da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial à obtenção
do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Porto Alegre, dezembro de 2000.

BIO
BIO
152

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

Este trabalho foi elaborado na forma de um manuscrito, conforme as instruções para autores (em anexo) da revista **Metabolic Brain Disease**.

**CITOESQUELETO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS COMO
MARCADOR PERIFÉRICO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA
FENILALANINA NA FENILCETONÚRIA**

**Autores: Sabrina Dick, Priscila L. Pelaez, Renata Meirelles, Clóvis Miltom
Duval Wannmacher e Regina Pessoa-Pureur.**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo 90035-
003 Porto Alegre, RS BRASIL.

Endereço para correspondência:

Dr. Regina Pessoa-Pureur.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Bioquímica

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003 Porto Alegre, RS BRASIL.

Telefone: 0XX51 316 5565 Fax: 0XX51 316 5535

E-mail: rpureur@vortex.ufrgs.br

Título resumido: Citoesqueleto de células mononucleares e fenilcetonúria.

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos causado pela deficiência severa ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) hepática levando ao acúmulo de fenilalanina (Phe) e dano neurológico. Os mecanismos pelos quais a Phe provoca disfunção neurológica são múltiplos e pouco conhecidos, em parte pela dificuldade de acesso ao tecido nervoso. O citoesqueleto é formado por filamentos intermediários, microfilamentos e microtúbulos, cuja função é regulada, em parte, por seu estado de fosforilação. Considerando que a Phe altera a fosforilação de proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos, decidimos investigar o efeito da fenilalanina 2mM sobre a fosforilação da vimentina, um filamento intermediário, em células mononucleares humanas para avaliar se os efeitos observados no cérebro de ratos também ocorrem nestas células. Células mononucleares obtidas de voluntários normais foram pré-incubadas com ou sem (controle) fenilalanina 2mM a 30°C e posteriormente incubadas com 60 μ Ci de 32 P ortofosfato na presença ou ausência do aminoácido. A fração citoesquelética foi extraída com Triton X-100 0,8%, as proteínas analisadas em SDS-PAGE 10% e o gel seco submetido à autorradiografia. Os resultados indicaram que a fenilalanina aumentou significativamente a incorporação de fosfato na vimentina, sugerindo que o citoesqueleto de células mononucleares possa vir a constituir-se num marcador periférico de fácil acesso para estudo dos efeitos da Phe no tecido nervoso.

Palavras-chave: células mononucleares humanas, vimentina, fosforilação, fenilalanina, citoesqueleto.

INTRODUÇÃO

O citoesqueleto é uma complexa rede de filamentos protéicos constituídos por microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos, sendo cada tipo de filamento formado pela associação ou polimerização de monômeros específicos. Sabe-se que a função das proteínas do citoesqueleto na célula é regulada principalmente por seu estado de fosforilação (Miyasaka, 1993; Sontag, 1995).

Erros inatos do metabolismo são doenças genéticas que acarretam importantes alterações metabólicas no paciente, podendo levar a danos neurológicos. A fenilcetonúria (PKU), o erro inato do metabolismo dos aminoácidos mais estudado, é uma desordem autossômica recessiva caracterizada por uma grande deficiência ou ausência da atividade da fenilalanina hidroxilase hepática bloqueando a conversão de fenilalanina em tirosina, levando ao acúmulo daquele aminoácido e seus metabólitos (feniletilamina, fenilacetato, fenilpiruvato, fenilactato e hidroxifenilacetato) no plasma e nos tecidos dos pacientes (Scriver, 1995).

Os resultados obtidos com os modelos animais têm trazido novos e importantes conhecimentos sobre a patogênese dos distúrbios metabólicos. No entanto, há uma real dificuldade em verificar se o mesmo ocorre nos seres humanos doentes devido à dificuldade de se estudar o sistema nervoso dos pacientes em vida. Por esses motivos, torna-se importante buscar uma alternativa para aplicação em seres humanos dos resultados obtidos nos estudos realizados em modelos animais. Elementos figurados do sangue, como eritrócitos, plaquetas e leucócitos têm sido utilizados como marcadores periféricos de alterações enzimáticas em várias doenças metabólicas (Stahl, 1985; Finotti e Palatini, 1986; Ringel et al, 1987; Testa, et al., 1987; Bedin et al, 2000). Em estudos anteriores mostramos que a Phe altera a fosforilação de proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos (De Freitas et al, 1995; 1997; Carreras et al., 2000). Assim, se as alterações citoesqueléticas provocadas por Phe em córtex cerebral de ratos também ocorrerem no cérebro dos pacientes com PKU, é possível que o

citoesqueleto de células mononucleares humanas possa ser usado como marcador destas alterações citoesqueléticas.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo verificar o efeito da Phe sobre a fosforilação da vimentina, filamento intermediário, de células mononucleares humanas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue- Foram coletadas amostras de 20 ml de sangue periférico de doadores voluntários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O sangue foi coletado em tubos previamente heparinizados.

Separação das células mononucleares- A separação das células mononucleares das demais células sangüíneas foi realizada essencialmente como descrita por Boyium (1968). Cada amostra de sangue foi diluída em 15ml de HBSS (CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, Glicose 6,1 mM, Vermelho de Fenol, NaHCO₃ 0,35 g/l) pH 7,15 (\pm 0,3), sendo cada 8 ml desta mistura colocados cuidadosamente sobre uma coluna de 2 ml de Histopaque 1077 (Sigma St. Louis MO, USA), contidos num tubo com capacidade de 15 ml e centrifugados por 30 min a 800 x g a temperatura ambiente. A camada de células mononucleares formada sobre a camada de Histopaque foi coletada manualmente com uma pipeta Pasteur de vidro. As células foram reunidas num único tubo, novamente diluídas em HBSS até um volume final de 5 ml e centrifugadas por 10 min a 800 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento novamente suspenso em 5 ml de HBSS. Desta suspensão de células foi retirada uma alíquota de 50 μ l que, após misturada a 50 μ l de Azul Tripán (4 g/l) 50% em PBS (CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM), foi contada ao microscópio óptico em Câmara de Neubauer. A suspensão de células foi novamente centrifugada por 10 min a 800 x g a temperatura ambiente e o sedimento foi suspenso em volume de HBSS adequado para fornecer $0,5 \times 10^7$ células/ml. Esta suspensão de células foi dividida em quatro alíquotas de $0,5 \times 10^7$ células e novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores.

Pré-tratamento das células com Phe : Cada alíquota de $0,5 \times 10^7$ células foi homogeneizada em 1 ml de HBSS na ausência (controle) ou presença de fenilalanina 2 mM. Cada tubo foi incubado em banho metabólico com agitação por

10 min a 30°C. Após, cada amostra foi centrifugada por 10 min a 800 x g a temperatura ambiente.

Ensaio de incorporação in vitro de [³²P] ortofosfato- A fosforilação in vitro foi feita essencialmente como descrito por De Freitas et al (1995). Cada uma das amostras provenientes do pré-tratamento foi incubada com 50 µl de HBSS na ausência (controle) ou presença de Phe 2 mM, ambos com 60 µCi de [³²P] ortofosfato (8 TBq/g) (CNEN, São Paulo, Brasil). Os tubos foram incubados em banho metabólico com agitação por 30 min a 30°C. A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de solução de NaF (NaF 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM e TRIS-HCl 50 mM pH 6,8) a 4°C e as amostras foram centrifugadas por 4 min a 800 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e sobre as células sedimentadas foi novamente adicionado 1 ml de solução de NaF a 4°C. Após, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições, obtendo-se um sedimento final de células fosforiladas in vitro.

Preparação da fração citoesquelética insolúvel em Triton das células mononucleares humanas- Após a fosforilação, a fração citoesquelética das células mononucleares humanas foi preparada como descrito por Carreras et al (2000). As células sedimentadas foram homogeneizadas em 3 ml de tampão de extração gelado (Rovere, 1996), modificado como descrito a seguir: HEPES 50 mM, MES 30 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 2 mM, PMSF 2 mM, Triton X-100 0,8%, Benzamidina 2,6 mM, leupeptina 10 µM, pepstatina 0,7 µM, antipainá 0,7 µM e quimostatina 0,7 µM (Sigma St. Louis MO, USA) e mantidas neste tampão por 20 min a 4°C, sendo após centrifugadas por 5 min a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e a fração insolúvel foi dissolvida em 50 µl de SDS 1%. As proteínas foram dosadas segundo o método descrito por Lowry (1951).

Eletroforese em gel de poliacrilamida- As amostras da fração citoesquelética obtidas conforme descrito acima foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE), de acordo com o sistema

descontínuo de Laemmli (1951). Após a migração, os géis foram secados em solução contendo metanol 50% e glicerol 1% em água. O gel seco foi exposto a filmes Kodak X-Omat AR por aproximadamente 7 dias a -70°C com intensificador de radiação. As autorradiografias foram quantificadas com base nas densidades ópticas determinadas em análise no software OptiQuant. Os valores das densidades ópticas obtidos na banda de interesse foram expressos em percentagem do controle.

Immunoblotting- A fração citoesquelética foi analisada por SDS-PAGE e eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose usando um trans-Blot SD Semi-Dry transfer Cell (BIO-RAD Laboratories, CA, USA). A reação imunológica foi feita pelo método de Towbin et al (1979), incubando-se com o anticorpo monoclonal anti-vimentina (VIM -13.2) (Sigma Chemical Co St. Louis MO, USA) 1:400 durante a noite, a 4°C . O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co St. Louis MO, USA) (1:4000). A incubação foi por duas horas a temperatura ambiente. Após, a membrana foi revelada com um Kit ECL (Amersham Pharmacia Biottech-England).

Análise estatística- Os valores obtidos nas quantificações no OptiQuant Acquisition & Analysis foram transformados em percentagem do controle e analisados estatisticamente através do teste t pareado de Student usando o programa de software SPSS 10 para Windows.

RESULTADOS

A fração citoesquelética foi extraída das células mononucleares humanas na presença de Triton-X 100, como descrito em Material e Métodos. A figura 1A mostra o perfil eletroforético da fração citoesquelética de células mononucleares humanas insolúvel em Triton X-100, corada com Coomassie Blue (b); em B pode ser observada uma autorradiografia desta fração citoesquelética tratada com [³²P] ortofosfato in vitro. Nela podem ser observadas algumas bandas que constituem bons substratos para as quinases endógenas. A seta indica a posição da vimentina; em C a vimentina foi identificada na fração citoesquelética por reação imunológica, utilizando anticorpo monoclonal anti-vimentina.

A figura 2 mostra que as células mononucleares humanas tratadas com Phe 2 mM apresentaram um aumento significativo da incorporação de fosfato inorgânico radioativo na vimentina ($t_{(7)} = 2,490$; $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra a obtenção da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 de células mononucleares humanas, evidenciando que nas presentes condições experimentais o sistema fosforilante endógeno associado ao citoesqueleto apresenta boa incorporação de ^{32}P in vitro nas proteínas da fração citoesquelética. Quando estas células são incubadas com Phe 2 mM apresentam um aumento significativo, em torno de 20%, na fosforilação da vimentina.

O citoesqueleto é uma complexa rede de filamentos protéicos que se estende por todo o citoplasma possibilitando que as células eucarióticas adotem formas variadas e desenvolvam movimentos coordenados e direcionados. É uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente, sendo responsável pela mudança de forma, divisão e movimento celular. Além disso, fornece a maquinaria para os movimentos intracelulares, como o transporte de organelas de uma região à outra no citoplasma e a segregação dos cromossomos durante a mitose (Saunders, 1999; Williamson, 1998).

Os componentes mais abundantes do citoesqueleto são os microtúbulos, os microfilamentos e os filamentos intermediários. Cada tipo de filamento é formado pela associação ou polimerização de monômeros específicos: os microtúbulos são polímeros de tubulina, os microfilamentos são formados por actina monomérica e os filamentos intermediários são formados por uma família de proteínas fibrosas específicas para cada tipo celular, sendo dentre elas, a vimentina a mais amplamente distribuída.

A fosforilação protéica é um processo dinâmico que envolve a ação e regulação de quinases e fosfatases. Embora as funções específicas da fosforilação das proteínas do citoesqueleto não sejam completamente conhecidas, tem sido demonstrado que a incorporação de fosfato pode regular a habilidade destas proteínas de polimerizar e formar filamentos além de modular a interação entre microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários com proteínas associadas e a outros constituintes celulares (Miyakasa, 1993).

A fenilcetonúria (PKU) é uma desordem autossômica recessiva caracterizada por uma grande deficiência ou ausência da atividade da fenilalanina hidroxilase hepática bloqueando a conversão de Phe em tirosina. É sabido que altos níveis de Phe durante algumas fases do desenvolvimento cerebral podem causar danos irreversíveis (Hommes, 1991) e podem provocar efeitos tóxicos reversíveis nas funções cerebrais em pacientes tratados (Krouse, 1985; Lou, 1987). Os mecanismos pelos quais a Phe provoca disfunção neurológica são múltiplos e ainda pouco conhecidos, em parte pela dificuldade de acesso ao tecido nervoso.

Os resultados obtidos com os modelos animais têm trazido novos e importantes conhecimentos sobre a patogênese dos distúrbios metabólicos. No entanto, há uma real dificuldade em verificar se o mesmo ocorre nos seres humanos doentes devido à dificuldade de se estudar o sistema nervoso dos pacientes em vida. Por esses motivos, torna-se importante buscar uma alternativa para aplicação em seres humanos dos resultados obtidos nos estudos realizados em modelos animais. Elementos figurados do sangue, como eritrócitos, plaquetas e leucócitos têm sido utilizados como marcadores periféricos de alterações enzimáticas em várias doenças metabólicas (Stahl, 1985; Finotti e Palatini, 1986; Ringel et al, 1987; Testa, et al., 1987; Bedin et al, 2000).

Resultados prévios obtidos em nosso laboratório mostram que a Phe 2 mM é capaz de reduzir a incorporação de ^{32}P in vitro a partir de ^{32}P -ATP em proteínas da fração citoesquelética de córtex cerebral de ratos jovens e que este efeito pode ser revertido pela alanina 1 mM (Carreras et al., 2000). No presente trabalho mostramos que a Phe, na mesma concentração, é capaz de aumentar a incorporação de ^{32}P in vitro a partir de ^{32}P - ortofosfato na vimentina, uma proteína do tipo filamento intermediário presente em células mononucleares humanas. A capacidade de reversão deste efeito pela alanina será o próximo objetivo de nosso trabalho.

A aparente discrepância entre os resultados obtidos a partir de córtex cerebral de ratos e as células mononucleares humanas pode ser parcialmente explicada pelo fato de que em córtex cerebral as fatias de tecido eram tratadas

com Phe, e a fração citoesquelética, posteriormente isolada, era incubada com ^{32}P -ATP, medindo-se diretamente a atividade do sistema fosforilante/desfosforilante e indiretamente o efeito prévio da Phe. No caso das células mononucleares humanas, as mesmas foram incubadas com a Phe na presença de ^{32}P - ortofosfato, extraindo-se posteriormente a fração citoesquelética já marcada. Esta abordagem experimental permitiu mostrar o efeito da Phe sobre o sistema fosforilante/desfosforilante na célula intacta. Experimento similar ao realizado em córtex cerebral de rato encontra-se em andamento.

Os resultados até agora obtidos no presente trabalho sugerem que o citoesqueleto de células mononucleares humanas possa vir a ser usado como marcador das alterações citoesqueléticas observadas em córtex cerebral de ratos. No entanto, há a necessidade de dar prosseguimento ao presente trabalho, inclusive estudando a incorporação de ^{32}P em citoesqueleto de células mononucleares de pacientes com PKU.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o suporte financeiro o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESq-UFRGS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

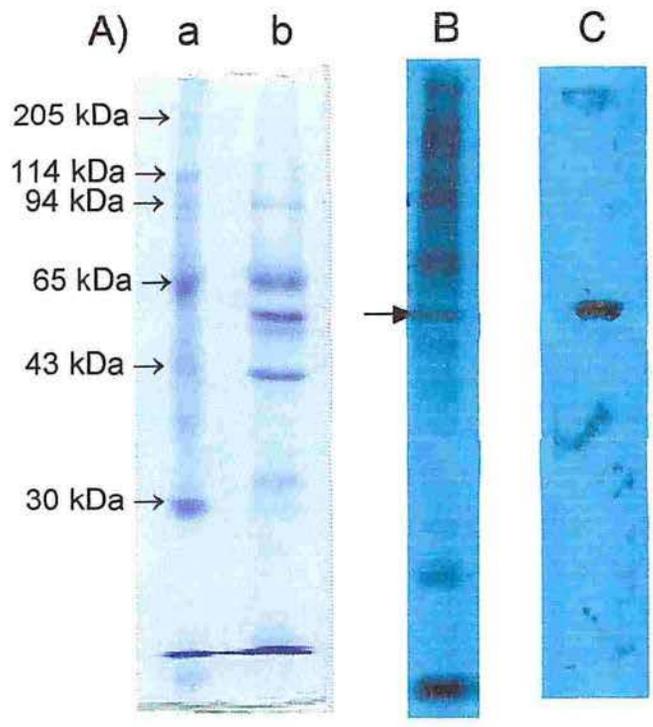
- Bedin, M.; Estrella, C. H. G.; Duarte, D. V.; Ponzi, D.; Dutra-Filho, C. S.; Wyse, A.T. S.; Wajner, M.; Wannmacher, C. M. D. (2000). Platelet Na⁺,K⁺ - ATPase activity as a possible peripheral marker for the neurotoxic effects of phenylalanine in phenylketonuria. *Metab. Brain Disease* 15:115-121.
- Boyium, A. (1968). Separation of leucocytes from human blod: further observation. *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.* 21:31-50.
- Carreras, A. L.; ; de Mattos, A. D.; Meirelles, R.; Rocha, B. B.; Wannmacher, C. M. D.; Pessoa-Pureur, R. (2000). Phenylalanine inhibition of the phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats is prevent by alanine. *Eur. J. Clin. Inv.* 30:536-542.
- De Freitas, M. S.; de Mattos, A. D.; Camargo, M. M.; Wannmacher, C. M. D.; Pessoa-Pureur, R. (1995). Effect of phenylalanine and alphamethylphenylalanine on in vitro incorporation of ³²P into cytoskeletal proteins. *Neurochem. Int.* 26:381-385.
- De Freitas, M. S.; de Mattos, A. D.; Schroder, N.; Wannmacher, C. M. D.; Pessoa-Pureur, R. (1997). Effect of hyperphenylalaninemia chemically induced on in vitro incorporation of ³²P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of developping rats. *Exp. Neurol.* 143(2):188-195.
- Finotti, P.; Palatini, P. (1986). Reduction of erythrocyte (Na-K⁺)ATPase activity in type I (insulin dependent) diabetic subjects and its activation by homologous plasma. *Diabetologia* 29:623-628.
- Hommes, F. A. (1991). On the mechanism of permanent brain dysfunction in Hyperphenylalaninemia. *Med. Metab. Biol.* 46:277-87.
- Krouse, W.; Halminski, M.; Mc Donald, L.; Dembure, P.; Salvo, R.; Freides, D.; et al (1985). Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. *J. Clin. Invest.* 75:40-8.
- Laemmli, U. K. (1951). Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 277:680-685.

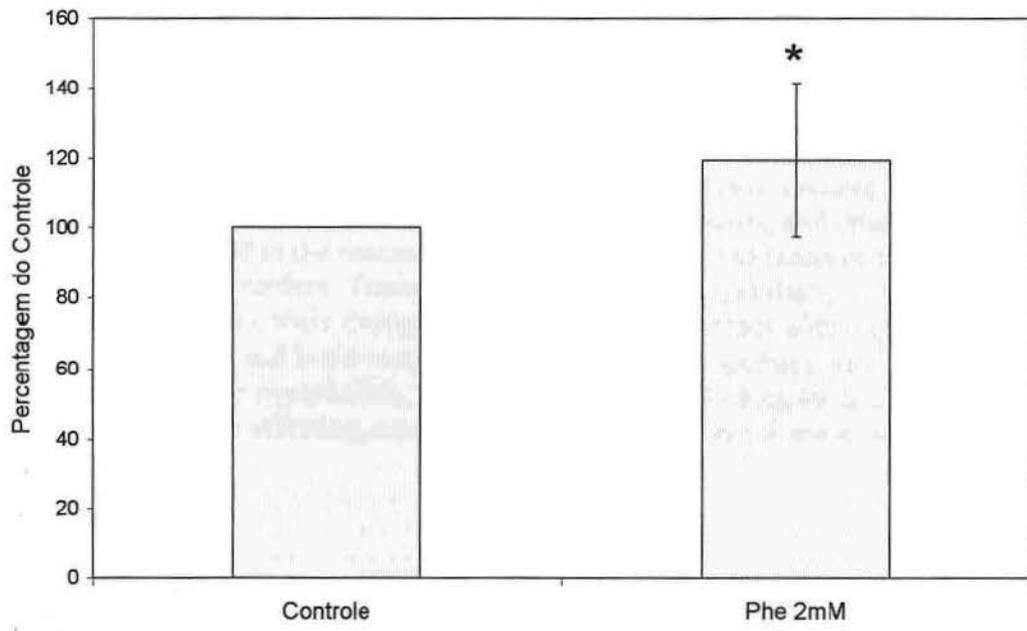
- Lou, H. C.; Lykkelund, C.; Gerdes, A. M.; Udesen, H.; Bruhn, P. (1987). Increased vigilance and dopamine synthesis by large doses of tyrosine or phenylalanine restriction in phenylketonuria. *Acta Paediatr. Scand.* 76:560-5.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, R. L.; Farr, R. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Miyakasa, H.; Okabe, S.; Ishiguro, K.; Ushida, T.; Hirokawa, N. (1993). Interaction of the tail domain of high molecular weight subunits of neurofilaments with the COOH terminal region of tubulin and its regulation by tau protein kinase II. *J. Biol. Chem* 268:22695-70.
- Ringel, R. E.; Hámlyn, J. M.; Hamilton, B. P.; Pinkas, G. A.; Chalew, S. A.; Berman, M. A. (1987). Red blood cell Na⁺,K⁺ -ATPase in men with newly diagnosed or previously treated essential hypertension. *Hypertension* 9:437-443.
- Rovere, P.; Inverardi, L.; Bender, J. R.; Pardi, R. (1996). Feedback modulation of ligand-engaged alpha L/beta 2 leukocyte integrin (LFA-1) by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Immunol.* 156(6):2273-9.
- Saunders, W. S. (1999). Actions of the ends of microtubules. *Curr. Op. Cell Biol.* 11:129-33
- Scriver, C. R. (1995). Whatever happened to PKU? *Clin. Biochem.* 28:137-44.
- Sontag, E.; Nunbhakdi-Craig, V.; Bloom, G. S.; Mumby, M. C. (1995). A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. *J. Cell Biol* 128:1131-44.
- Stahl, W. L. (1985). The Na,K-ATPase of nervous tissue. *Neurochem. Int.* 8:449-476.
- Testa, I.; Rabini, R. A.; Corvetta, A.; Danieli, G. (1987). Decreased Na⁺,K⁺ -ATPase activity in erythrocyte membrane from rheumatoid arthritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* 16:301-305.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979). Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: produce and some applications. *PNAS USA* 76:4350-4354.

Williamson, T. L.; Bruinj, L. I.; Zhu Q.; Anderson, K. L.; Anderson, S. D.; Julien J-P et al (1998). Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amiotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 95:9631-6.

Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da fração citoesquelética de células mononucleares humanas, com correspondente autorradiografia e reação imunológica (“immunoblotting”). A) SDS-PAGE de padrões de peso molecular (a) e da fração citoesquelética de células mononucleares humanas (b), corados com Coomassie Blue. B) Autorradiografia da fração citoesquelética de células mononucleares humanas fosforiladas in vitro. A seta indica a posição da vimentina. C) Reação imunológica da fração citoesquelética de células mononucleares humanas, utilizando anticorpo monoclonal anti-vimentina (VIM – 13.2). A fração citoesquelética foi obtida como descrito em Material e Métodos.

Figura 2: Efeito do tratamento in vitro de células mononucleares humanas com fenilalanina 2 mM sobre a fosforilação da vimentina. Células mononucleares humanas foram incubadas com Phe 2 mM na presença de $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$. A fração citoesquelética foi obtida como descrito em Material e Métodos e a radioatividade incorporada foi medida em Phosfoimager. Os dados são a média \pm desvio padrão para oito experimentos expressos em percentagem do controle e analisados por teste t pareado de Student. * $P < 0,05$.







Kluwer
Homepage

Customer
Service

Webmaster

Journal
Homepage

Metabolic Brain Disease

Editor-in-Chief:

David W. McCandless

*Finch University of Health Sciences/The Chicago Medical School, IL,
USA*

Managing Editor:

Cynthia J. Snider

*Finch University of Health Sciences/The Chicago Medical School, IL,
USA*

Aims & Scope

Metabolic Brain Disease serves as a forum for the publication of outstanding basic and clinical papers on all metabolic brain disease, including both human and animal studies. The journal publishes papers on the fundamental pathogenesis of these disorders and on related experimental and clinical techniques and methodologies. *Metabolic Brain Disease* is directed to physicians, neuroscientists, internists, psychiatrists, neurologists, pathologists, and others involved in the research and treatment of a broad range of metabolic brain disorders. Topics covered include stroke, epilepsy, myelin disorders, toxic encephalopathies, genetic diseases affecting the brain, alcohol and brain metabolism, neuroendocrinopathies, viral and nonviral encephalitis, nutritional disorders affecting the brain, diseases affecting neurotransmitters, Alzheimer's disease, and aging.

Instructions to Contributors

Manuscripts, in triplicate and in English, and books for review should be submitted to the Editor-in-Chief:

Dr. Roger F. Butterworth
Neuroscience Research Unit
Hôpital Saint-Luc
1058 St-Denis Street
Montreal, Quebec
Canada H2X 3J4

In addition to hard copy (manuscripts), authors are encouraged to submit disks using Macintosh Word 3.0 or higher or IBM WordPerfect, if possible.

Submission is a representation that the manuscript has not been published previously and is not currently under consideration for publication elsewhere. A statement transferring copyright from the authors (or their employers, if they hold the copyright) to Plenum Publishing Corporation will be required before the manuscript can be accepted for publication. The Editor-in-Chief will supply the necessary forms for this transfer. Such a written transfer of copyright, which previously was assumed to be implicit in the act of submitting a manuscript, is necessary under the U.S. Copyright Law in order for the publisher to carry through the dissemination of research results and reviews as widely and effectively as possible.

Type double-spaced, and submit the original and two copies (including copies of all illustrations and tables) plus disk.

Order the elements comprising the manuscript as follows: title page, abstract, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions, appendix, acknowledgments, references, tables, and figure-caption list. Short communications should comprise a maximum of 6 (journal) pages including references and are limited to 2 tables or figures, and should carry no text headings or subheadings. Abbreviations should be those recommended in the Council of Biology Editors *Style Manual*. Generic names should be used when referring to drugs.

A title page is to be provided and should include the title of the article, author's name (no degrees), author's affiliation, and suggested running head. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation) and should be typed as a footnote to the author's name. The suggested running head should be less than 80 characters (including spaces) and should comprise the article title or an abbreviated version thereof. For office purposes, the title page should include the complete mailing address and telephone number of the one author designated to review proofs.

An abstract, preferably not more than 200 words (120 for short communications), is to be provided as the second page.

A list of 4-6 key words is to be provided directly below the abstract. Key words should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes.

All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph on a separate page that directly precedes the references section.

Illustrations (photographs, drawings, diagrams, and charts) are to be numbered in one consecutive series of Arabic numerals. The captions for illustrations should be typed on a separate sheet of paper. Photographs should be large, glossy prints, showing high contrast. Drawings should be prepared with india ink. Either original drawings or good-quality photographic prints are acceptable. Identify figures on the back with author's name and number of the illustration.

Tables should be numbered (preferably with Roman numerals) and referred to by number in the text. Each table should be typed on a separate sheet of paper.

List references alphabetically at the end of the paper and refer to them in the text by name and year in parentheses. Where there are three or more authors, only the first author's name is given in the text, followed by *et al.* References should include (in this order): last names and initials of *all* authors, year published, title of article, name of publication, volume number, and inclusive pages. Abbreviations for journal names should conform to those in *Index Medicus*. The style and punctuation of the references should conform to that used in the journal—illustrated by the following examples:

Journal Article

Siperstein, M.D., Unger, R.H., and Madison, L.L. (1968). Studies of muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic and prediabetic patients. *J. Clin. Invest.* 47:1973-1999.

Book

Himwich, H.E. (1951). *Brain Metabolism and Cerebral Disorders*, Williams and Wilkins, Baltimore.

Contribution to a Book

O'Neill, J.J., and Holtzman, D. (1985). Heavy metal toxicity and energy metabolism in the developing brain: Lead as the model. In (D.W. McCandless, ed.), *Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy*, Plenum Press, New York, pp. 391-424.

Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be typed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnotes, so that it is set off from the text. Use the appropriate superscript numeral for citation in the text.

The journal makes no page charges. Reprints are available to authors, and order forms with the current price schedule are sent by the Editor-in-Chief with proofs.

Porto Alegre, 13 de dezembro de 2000

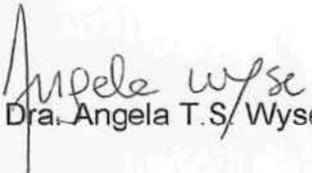
Ilma Sra
Profa. Dra. Inga L.V. Mendes
Coordenadora CONGRAD BIO
UFRGS

Prezada Coordenadora

Tenho a satisfação de encaminhar a V.S^a. o meu parecer sobre o Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas-Bacharelado com Ênfase Molecular, Celular e Funcional intitulado "*Citoesqueleto de células mononucleares humanas como marcador periférico dos efeitos neurotóxicos da fenilalanina na fenilcetonúria*" da aluna **Sabrina Dick** orientada pela Profa. Dra. Regina Pureur.

Aproveito a oportunidade para agradecer o convite para participar desta Banca examinadora e coloco-me a sua disposição para quaisquer esclarecimentos que se julgarem necessários.

Atenciosamente


Profa. Dra. Angela T.S. Wyse

**TRABALHO DE CONCLUSÃO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-
BACHARELADO COM ÊNFASE MOLECULAR , CELULAR E FUNCIONAL DA
UFRGS**

TÍTULO: Citoesqueleto de células mononucleares humanas como marcador periférico dos efeitos neurotóxicos da fenilalanina na fenilcetonúria

ALUNA: Sabrina Dick

ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Pureur.

PARECER

Trata-se de um trabalho muito interessante sobre o efeito da fenilalanina, principal metabólito acumulado na fenilcetonúria (PKU), sobre a fosforilação de proteínas do citoesqueleto de células mononucleares humanas. Foi estudado o efeito deste aminoácido sobre a fosforilação da vimentina e de filamento intermediário do citoesqueleto. A autora sugere que o citoesqueleto de células mononucleares humanas possa ser usado como marcador de possíveis alterações citoesqueléticas no SNC de pacientes com PKU.

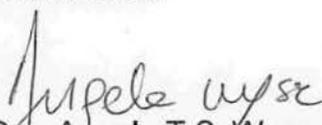
A abordagem experimental foi adequada para testar a hipótese formulada.

Os resultados foram bem interpretados e discutidos de acordo com a literatura recente. A revisão bibliográfica está ótima.

A apresentação é moderna, sendo o artigo a ser submetido perfeitamente adequada.

Meu parecer é pela aprovação com conceito A

Atenciosamente


Prof. Dra. Angela T.S. Wyse

Porto Alegre, 11 de dezembro de 2000

Á Comissão de Graduação em Ciências Biológicas
Bacharelado em Ciências Biológicas-Bioquímica
UFRGS

Parecer sobre Dissertação de Bacharelado

Título: Citoesqueleto de células mononucleares humanas como marcador periférico dos efeitos neurotóxicos da fenilalanina na fenilcetonúria

Aluna: Sabrina Dick

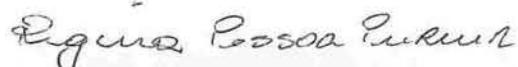
Orientadora: Profa. Regina Pessoa Pureur

Como orientadora, conheço o trabalho de Sabrina e o seu desempenho na realização do mesmo. O trabalho desenvolvido pela aluna é de grande importância, porque é um avanço na tentativa de encontrar um modelo periférico adequado para o estudo das alterações envolvendo o citoesqueleto, com o objetivo futuro de melhor compreender o envolvimento do citoesqueleto no cérebro de pacientes fenilcetonúricos.

Quanto ao desempenho de Sabrina na realização desta pesquisa, meu parecer é de que a aluna foi bastante dedicada ao trabalho, demonstrando capacidade de análise e compreensão dos dados experimentais. Além disso, seu trabalho foi bem redigido, e a bibliografia utilizada foi adequada.

Pelo exposto acima seu conceito é A.

Atenciosamente,



Profa. Regina Pessoa Pureur



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

Porto Alegre, 8 de dezembro de 2000

Comissão de Graduação em Ciências Biológicas
Bacharelado em Ciências Biológicas – Bioquímica
UFRGS

REF: Parecer sobre dissertação de bacharelado

Título: Citoesqueleto de células mononucleares humanas como marcador periférico dos efeitos neurotóxicos da fenilalanina na Fenilcetonúria.

Aluna: Sabrina Dick

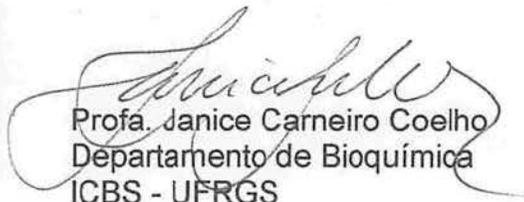
Orientadora: Profa. Regina Pessoa Pureur

O trabalho da aluna Sabrina está bem redigido, apresenta uma boa introdução abrangendo o que há na área em estudo, os materiais e métodos estão bem delineados e os resultados e a discussão estão muito bem apresentados.

A única crítica ao trabalho é quanto à citação das referências no decorrer do texto. As instruções para autores da revista escolhida indicam que, quando há mais de três autores do artigo ou livro a ser citado, seja citado o nome do primeiro autor seguido por *et al.* Isto não foi obedecido pela aluna, pois todas as referências estão citadas, no texto, com o nome do primeiro autor, mas sem *et al.* Isto deverá ser corrigido antes do artigo ser submetido para publicação.

Conceito para o trabalho: **A**

Atenciosamente,


Prof.ª Janice Carneiro Coelho
Departamento de Bioquímica
ICBS - UFRGS