

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

**ESTUDO ONTOGENÉTICO DOS EFEITOS DO ÁCIDO
 α -CETOISOCAPRÓICO NA FOSFORILAÇÃO *IN VITRO*
DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS**

Cláudia da Silva Funchal

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur

Co-orientador:

Prof. Dr. Moacir Wajner

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

Porto Alegre

2002

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original..."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Regina, pela oportunidade, compreensão e dedicação constantes que foram fundamentais na construção desse trabalho.

Ao Moacir, pelo incentivo e dedicação prestados ao longo desse trabalho.

Às minhas queridas bolsistas, Priscila, Samanta, Lilian e Franciele pela dedicação, empenho e amizade que foram fundamentais para a construção desse trabalho.

À Lúcia, pela disposição e ajuda durante esse trabalho e pelo agradável tempo em que dividimos a mesma bancada.

À Susana, pela importante colaboração desenvolvida em parte desse trabalho.

À minhas amigas e colegas de mestrado, Dani O., Dani G., Francine e Mônica pelo apoio e compreensão prestados durante todo o período de desenvolvimento desse trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica por ter me oferecido a oportunidade de crescimento profissional.

Ao Diogo, por ter me incentivado a vir de Pelotas para estudar em Porto Alegre e por ter me apresentado à Regina.

Ao meu pai, que sempre me incentivou a fazer esse mestrado e por sempre ter acreditado e confiado em mim.

Às minhas tias Cirlei e Celi pela amizade, apoio e compreensão dedicadas ao longo de todo esse período.

Às minhas avós, Morena e Maria pelo carinho e apoio depositados ao longo desse trabalho.

À minha mãe, que onde estiver, está sempre ao meu lado me incentivando em tudo.

A todas as pessoas que fazem parte da minha vida, por tudo o que representaram para mim.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Em especial ao Marcelo, meu namorado, por seu amor, presença, paciência e companheirismo que foram fundamentais ao longo dessa caminhada, e por ser o grande incentivador dos meus projetos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	IX
INTRODUÇÃO.....	1
1. CITOESQUELETO.....	1
1.1. Filamentos de actina.....	4
1.2. Microtúbulos.....	6
1.3. Filamentos intermediários.....	8
2. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	15
2.1. Fosforilação de Proteínas no SNC.....	17
2.2. Fosforilação dos filamentos intermediários de células no SNC	20
3. DOENÇA DO XAROPE DO BORDO.....	24
4. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA.....	31
4.1. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos.....	32
4.2. Receptores glutamatérgicos metabotrópicos.....	34
5. OBJETIVOS.....	36
6. ANEXO 1.....	37
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES.....	44
9. PERSPECTIVAS.....	45
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos constituintes do citoesqueleto.....	03
Figura 2: Representação esquemática da distribuição de cada tipo de filamento no tecido epitelial.....	04
Figura 3: Representação esquemática de um microfilamento.....	05
Figura 4: Representação esquemática de um microtúbulo.....	07
Figura 5: Representação esquemática da formação de um filamento intermediário.....	10
Figura 6: Representação esquemática de um neurofilamento.....	12
Figura 7: Representação esquemática do sistema de fosforilação de proteínas e alguns de seus agentes regulatórios.....	15
Figura 8: Representação esquemática de um sistema fosforilante.....	16
Figura 9: Representação esquemática da via catabólica dos AACR..	26
Figura 10: Representação esquemática de um receptor glutamatérgico ionotrópico.....	32
Figura 11: Representação esquemática de um receptor glutamatérgico metabotrópico.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

1S, 3R- ACPD	Ácido (1S, 3R)-1-amino ciclopentano-1,3-dicarboxílico
AACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropionato
AMPc	3',5'- Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
CACR	α -cetoácidos de cadeia ramificada
CCG-I	(2S, 1'S, 2'S)-2 (2'-carboxiciclopropil)glicina
CDKs	Proteínas quinases dependentes de ciclinas
CIC	Ácido α -cetoisocapróico
CIV	Ácido α -cetoisovalérico
CK	Caseína quinases
CMV	Ácido α -ceto- β -metilvalérico
DARPP-32	Fosfoproteína de 32kDa regulada por dopamina e AMPc
DCG IV	(2S,1'R, 2'R, 3'R)-2- (2'-3'-dicarboxiciclopropil)glicina
DXB	Doença do Xarope do Bordo
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GluRs	Receptores glutamatérgicos
IDPN	β , β - iminodipropilnitrila
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
GMPc	3', 5'-Guanosina monofosfato cíclico
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
kDa	Quilodáltons
L-AP ₄	L-2-amino-4-fosfonobutirato

MAPs	Proteínas associadas a microtúbulos
Mg ²⁺	Íon magnésio
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
Na ⁺	Íon sódio
NF-H	Subunidade protéica de 200 kDa dos neurofilamentos
NF-L	Subunidade protéica de 68 kDa dos neurofilamentos
NF-M	Subunidade protéica de 150 kDa
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKCaM	Proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídios
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PP1	Proteína fosfatase do tipo 1
PP2A	Proteína fosfatase do tipo 2A
PP2B	Proteína fosfatase do tipo 2B
PP2C	Proteína fosfatase do tipo 2
SNC	Sistema nervoso central

RESUMO

A disfunção neurológica é um sintoma comum em pacientes com Doença do Xarope do Bordo. Entretanto, os mecanismos que levam à neuropatologia dessa doença são pouco conhecidos. Neste trabalho, nós investigamos os efeitos do ácido α -cetoisocapróico (CIC) na incorporação *in vitro* de proteínas do tipo filamento intermediário de córtex cerebral de ratos durante o desenvolvimento. Fatias de tecido de ratos de 09, 12, 15, 17, 21 e 60 dias foram incubadas com ^{32}P -ortofosfato na presença ou na ausência de CIC. A fração citoesquelética foi isolada e a radioatividade incorporada nas proteínas de filamento intermediário foi medida. Nós observamos que o CIC diminui a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas estudadas até 12 dias, entretanto, a fosforilação aumentou nas fatias de tecido de ratos de 17, 21 e 60 dias e nenhuma alteração ocorreu nas fatias cerebrais dos animais de 15 dias.

Nós também testamos a influência do sistema glutamatérgico na incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas estudadas, incubando fatias de córtex cerebral na presença de glutamato, agonistas e antagonistas glutamatérgicos. O glutamato apresentou um efeito similar ao observado para o CIC na fosforilação das proteínas de filamento intermediário durante o desenvolvimento, mas não afetou a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas estudadas nos ratos de 60 dias, sugerindo que nos animais adultos o CIC aumenta a incorporação *in vitro* nas proteínas estudadas por outros mecanismos. Além disso, nós observamos que os agonistas glutamatérgicos ionotrópicos NMDA, AMPA e cainato mimetizam o efeito inibitório do CIC, enquanto os agonistas metabotrópicos 1S, 3R ACPD e L-AP4 não induziram alterações na incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas de

filamento intermediário estudadas nos animais de 09 dias. Nos ratos de 21 dias, somente os agonistas ionotrópicos NMDA e AMPA mimetizaram o efeito estimulatório do CIC. Também observamos que quando fatias de córtex cerebral de ratos de 09 e 21 dias foram incubadas com 1mM CIC seguidas de incubação com o DL-AP5, um antagonista específico para receptores NMDA, ou com CNQX, antagonista de receptores ionotrópicos AMPA e cainato, o efeito inibitório ou estimulatório do ácido na fosforilação *in vitro* de ratos de 09 e 21 dias foi revertido.

Estes resultados demonstram que o CIC, nas mesmas concentrações encontradas no sangue de crianças afetadas por DXB, altera o sistema de fosforilação associado com as proteínas do citoesqueleto, via sistema glutamatérgico, de maneira regulada pelo desenvolvimento. Portanto, é provável que a alteração de fosforilação das proteínas de citoesqueleto cerebral seja importante para o entendimento da patofisiologia da disfunção neuronal e das alterações estruturais observadas do SNC dos pacientes com DXB.

INTRODUÇÃO

1 – CITOESQUELETO

A capacidade que as células eucarióticas têm de adotar uma variedade de formas e de executar movimentos coordenados e direcionados depende de uma rede complexa de filamentos de proteínas fibrosas que se estendem por todo o citoplasma. Esta rede é chamada de citoesqueleto, o qual é uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, se divide ou responde ao seu ambiente. O citoesqueleto poderia ser denominado “citomusculatura”, pois ele é o responsável direto por movimentos tais como: deslocamento das células sobre um substrato, contração muscular e muitas alterações na forma em embriões de vertebrados em desenvolvimento. O citoesqueleto também fornece a maquinaria necessária para movimentos intracelulares tais como: transporte de organelas de uma região para outra no citoplasma e a segregação de cromossomos na mitose (Alberts et al, 1994).

As proteínas do citoesqueleto têm papel fundamental na criação e manutenção da forma celular de neurônios e glia, que apresentam uma grande diferença morfológica a qual define suas funções. Além disso, o citoesqueleto participa da manutenção do calibre e do transporte axonal de organelas (vesículas sinápticas, precursores de membrana plasmática e mitocôndrias) e do transporte de substâncias envolvidas na transmissão sináptica (Kirkpatrick & Brady, 1999; Ackerley et al, 2000).

As mudanças citoesqueléticas são a chave para a transmissão de sinais que levam a uma resposta celular apropriada. As interações entre as proteínas de membrana e as proteínas do citoesqueleto têm papéis centrais nas respostas celulares. O citoesqueleto também está envolvido na

organização e reorganização dos receptores da membrana plasmática e é essencial para os mecanismos de reconhecimento celulares (Carraway, 2000).

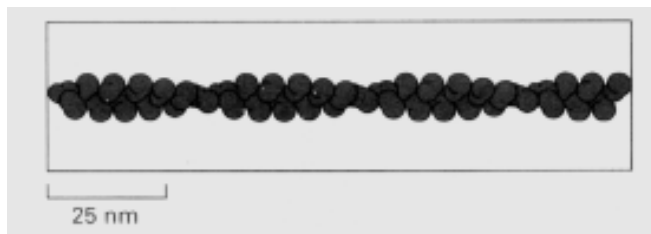
As diferentes atividades do citoesqueleto dependem de três diferentes tipos de filamentos protéicos: 1) filamentos de actina (microfilamentos), 2) microtúbulos e 3) filamentos intermediários (figuras 1 e 2). Cada tipo é formado pela associação ou polimerização de monômeros específicos: nos microfilamentos, por polímeros de actina globular, nos filamentos intermediários por associações de famílias de proteínas fibrosas célula-específicas e nos microtúbulos por associações de dímeros de tubulina α e β (Alberts et al, 1994; Carraway, 2000).

1- Os filamentos de actina são polímeros helicoidais formados por duas cadeias de actina filamentosa. São estruturas flexíveis, organizadas na forma de feixes lineares, redes bidimensionais ou géis tridimensionais. Embora os filamentos de actina estejam distribuídos por toda a célula, eles estão mais concentrados na região cortical, logo abaixo da membrana plasmática;

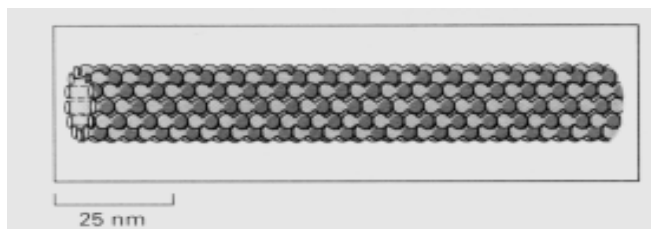
2- Os microtúbulos são filamentos ocos formados pela polimerização dos dímeros α e β tubulina, formando filamentos mais rígidos que os filamentos de actina. São longos e retos tendo uma extremidade ligada ao único centro organizador de microtúbulos (MTOC) da célula, chamado centróssomo. A partir desta estrutura os microtúbulos emanam por toda a célula;

3- Os filamentos intermediários constituem uma família de proteínas fibrosas codificadas por diferentes genes. Apesar dos filamentos intermediários constituírem importantes redes citoplasmáticas, um de seus representantes forma uma estrutura em trama chamada lâmina nuclear, logo abaixo da membrana nuclear interna. A principal função dos filamentos

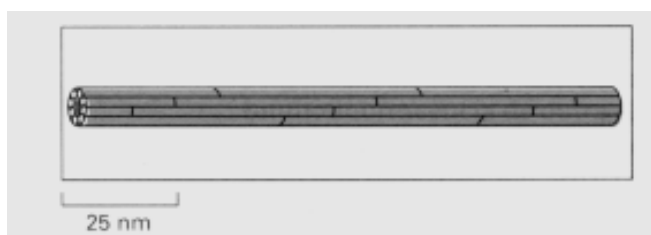
intermediários, pelo menos em células de vertebrados, é conferir proteção contra o estresse mecânico. Além disso, os filamentos intermediários também realizam funções específicas para cada tipo de célula, como a contribuição dos neurofilamentos para o calibre axonal, da vimentina para a síntese de esfingolipídios e das citoqueratinas K8-K18 na proteção do hepatócito contra o estresse induzido por drogas e apoptose (Alberts et al, 1994; Coulombe et al, 2000).



Filamentos de actina



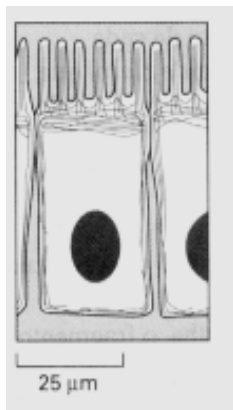
Microtúbulos



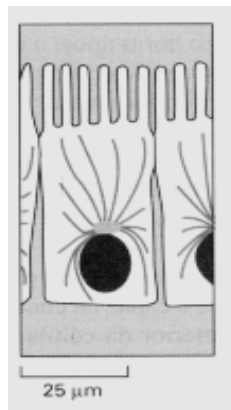
Filamentos intermediários

Figura 1: Representação esquemática dos constituintes do citoesqueleto. Adaptado de Alberts et al, 1994.

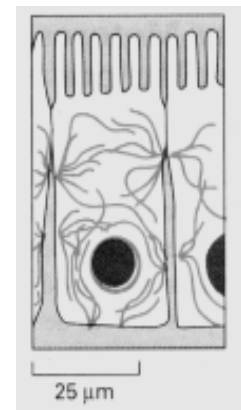
Os aspectos dinâmicos da estrutura citoesquelética são viabilizados por uma variedade de proteínas acessórias, as quais permitem ao mesmo filamento participar de diferentes funções em diversas regiões de uma célula (Ingber, 1993). Essa diversidade é refletida na especialização funcional, na expressão específica em cada célula e tecido e na regulação durante o desenvolvimento (Shelanski, 1994).



Filamentos de actina



Microtúbulos



Filamentos intermediários

Figura 2: Representação esquemática da distribuição de cada tipo de filamento no tecido epitelial. Adaptado de Alberts et al, 1994.

1.1 – FILAMENTOS DE ACTINA

Os filamentos de actina, também chamados de microfilamentos, são formados por moléculas de actina, conhecida como actina globular (G),

uniformemente orientadas, formando um filamento de aproximadamente 8 nm de diâmetro (figura 3). São filamentos finos e flexíveis, raramente encontram-se isolados na célula, apresentando-se como agregados ou feixes. São estruturas polares com duas extremidades diferentes – a extremidade “menos”, a qual é relativamente inerte e de crescimento lento, e a “mais”, a qual é de crescimento rápido (Alberts et al, 1994).

Em vários tipos celulares, incluindo os neurônios, a actina apresenta-se em concentrações extremamente altas em relação às demais proteínas (Kim & Lisman, 1999). Os microfilamentos são encontrados nas células da glia e nos neurônios, onde estão concentrados nos terminais sinápticos, espinhos dendríticos, cones de crescimento e córtex celular (Kirkpatrick & Brady, 1999). No terminal pré-sináptico, os filamentos de actina interagem com as vesículas sinápticas em processos que envolvem as sinapsinas (Greengard et al, 1993; Sudhof, 1995; Calakos & Scheller, 1996), enquanto no terminal pós-sináptico os filamentos de actina exercem diversas ações na transmissão nervosa e plasticidade sináptica (Kim & Lisman, 1999).

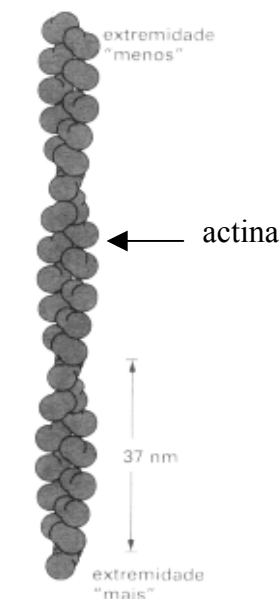


Figura 3: Representação esquemática de um microfilamento. Adaptada de Alberts et al, 1994.

Além das funções clássicas de controle da forma e motilidade celular, os filamentos de actina nas células nervosas têm importante papel no crescimento de neuritos (Lin & Forscher, 1995) e na liberação de neurotransmissores (Marinovich et al, 1997; Small et al, 1999).

Várias proteínas que interagem com microfilamentos têm sido descritas, tais como a proteína motora miosina. Exemplos de proteínas associadas aos microfilamentos são: a filamina, que une os filamentos por meio de ligações transversais formando um gel frouxo; a fimbrina e a α -actinina que formam feixes de filamentos paralelos; a gelsolina que induz a fragmentação da actina na presença de Ca^{+2} . As espectrinas formam o complexo de sustentação da membrana plasmática, sendo importantes para as interações célula-célula, além disso parecem estar relacionadas com a modulação da transmissão sináptica por sua associação com as vesículas sinápticas (Alberts et al, 1994; Kirkpatrick & Brady, 1999). O efeito coordenado das várias proteínas associadas à actina, gerando uma resposta do citoesqueleto de actina a um sinal extracelular, só é possível graças a complexos mecanismos cooperativos de interação destas proteínas, tanto com a actina monomérica, regulando sua capacidade de polimerização, quanto com os microfilamentos, regulando a sua organização citoplasmática e conseqüentemente os movimentos de superfície celular (Alberts et al, 1994).

1.2 – MICROTÚBULOS

Os microtúbulos são polímeros longos e rígidos que se estendem ao longo de todo o citoplasma e coordenam a localização intracelular de outros componentes citoplasmáticos. Os microtúbulos são cilindros ocos constituídos por subunidades de tubulina α e β , com pesos moleculares de 56 e 54 kDa, respectivamente. As tubulinas α e β são proteínas globulares que formam uma estrutura linear chamada protofilamento. Treze protofilamentos se dispõem lado a lado formando um microtúbulo com aproximadamente 25 nm de diâmetro (figura 4). O microtúbulo é uma estrutura polar, uma vez que os protofilamentos estão paralelamente alinhados com a mesma polaridade (De Mattos-Dutra et al, 1997; Díaz et al, 1998; Dowing, 2000).

As moléculas de tubulina são submetidas a várias modificações pós-traducionais que incluem tirosinação/detirosinação (Mullins et al, 1994), acetilação da subunidade α (Hampen & Brion, 1996) e ainda glutamilação e fosforilação/desfosforilação das subunidades α e β . Estas modificações pós-traducionais estão relacionadas com a capacidade de polimerização destas subunidades e com a estabilidade dos microtúbulos (Khan & Ludueña, 1996; MacRae, 1997).

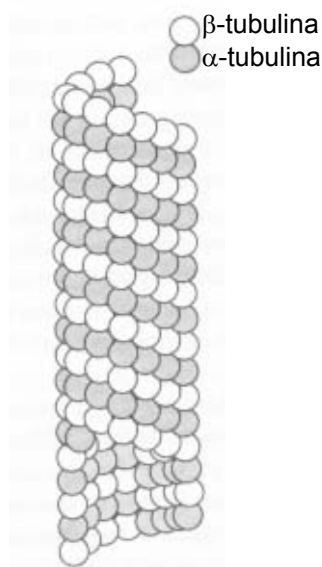


Figura 4: Representação esquemática de um microtúbulo. Adaptado de Carraway & Carraway, 2000.

As proteínas associadas aos microtúbulos, ou MAPs, servem tanto para estabilizar os microtúbulos contra a desagregação, como para mediar sua interação com outros componentes celulares. Duas principais classes de MAPs podem ser isoladas de cérebro em associação com microtúbulos: proteínas de alto peso molecular que incluem MAP₁ e MAP₂, cujos pesos moleculares variam de 200 a 300 kDa, respectivamente, e as MAPs de baixo peso molecular, conhecidas como proteínas tau, com pesos moleculares de 55 e 62 kDa. Devido às várias funções exercidas pelos microtúbulos dentro das células, existem muitos tipos diferentes de MAPs. Algumas estão amplamente distribuídas na maioria das células, enquanto outras são encontradas somente em tipos celulares específicos, como por exemplo MAP₂ que é encontrado nos dendritos e corpo celular, enquanto tau é preferencialmente uma proteína axonal (Alberts et al, 1994; Maccioni & Cambiazo, 1995).

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

1.3 - FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os filamentos intermediários são polímeros de proteínas fibrosas, com diâmetro aproximado de 10 nm, tamanho intermediário entre os filamentos de actina (μ 6nm) e os microtúbulos (μ 23nm). São filamentos longos que possuem subtipos específicos em diferentes tecidos e grande diversidade em sua seqüência. Geralmente constituem 1% do total de proteínas, mas em algumas células, como os queratinócitos e neurônios, são muito abundantes, chegando a atingir 85% do total de proteínas (Fuchs & Cleveland, 1998). Desempenham papel estrutural na célula, mantendo sua integridade (Alberts et al, 1994).

A maioria das proteínas que formam os filamentos intermediários possuem um domínio central, em forma de α -hélice, que possui 310 aminoácidos de comprimento, um domínio amino-terminal e um carbóxi-terminal que são bastante variáveis em tamanho e seqüência de aminoácidos (Elder et al, 1999).

Na formação de um filamento intermediário um monômero interage com outro monômero idêntico para formar um dímero, no qual os domínios centrais se alinham paralelamente enrolando-se em uma estrutura torcida. Dois dímeros alinham-se lado a lado para formar um tetrâmero antiparalelo com quatro cadeias polipeptídicas. Oito tetrâmeros enrolam-se para formar a estrutura do filamento intermediário com 10 nm de diâmetro (figura 5) (Alberts et al, 1994).

Com base na seqüência de aminoácidos, expressão específica para cada tipo celular e estruturas de genes de cada subunidade, os filamentos intermediários podem ser classificados em seis classes: subtipo I- queratinas ácidas; subtipo II- queratinas básicas e neutras; subtipo III- desmina, vimentina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP); subtipo IV- neurofilamentos; subtipo V- lâminas nucleares e subtipo VI- nestina (Fuchs & Weber, 1994; Inada et al, 2000).

As células epiteliais expressam queratinas; as células musculares, desmina; as células de origem mesenquimal, vimentina; as células gliais, GFAP e os neurônios, neurofilamentos (Inada et al, 2000).

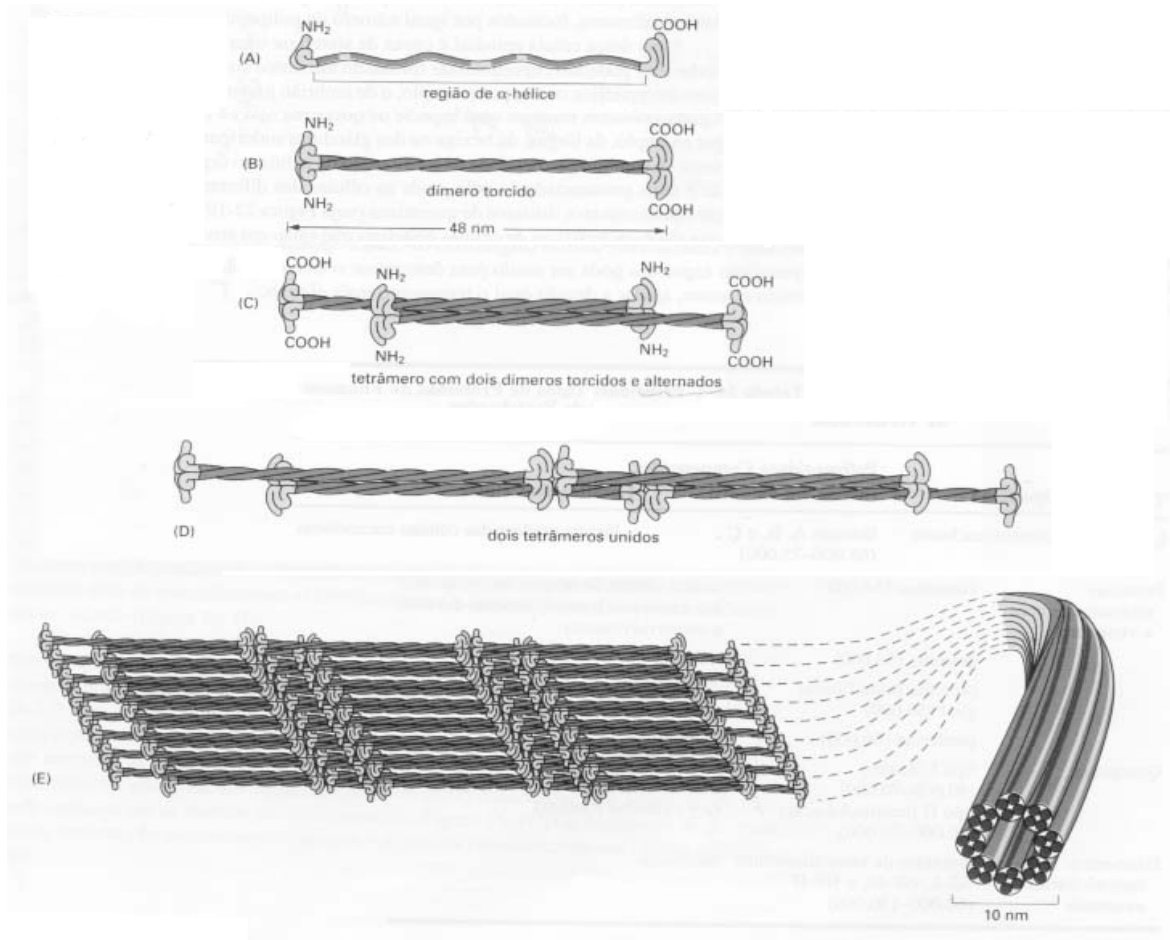


Figura 5: Representação esquemática da formação de um filamento intermediário: A) monômero; B) dímero; C) tetrâmero, formado de dois dímeros dispostos antiparalelamente; D) dois tetrâmeros associados; E) filamento intermediário com 10 nm de diâmetro. Segundo Alberts et al, 1994.

NEUROFILAMENTOS

Os neurofilamentos, filamentos intermediários encontrados especificamente nos neurônios, são compostos por três subunidades: de alto peso molecular (NF-H), de médio peso molecular (NF-M) e de baixo peso molecular (NF-L), com pesos moleculares aparentes de 200, 150 e 68 kDa, respectivamente, determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida. As três subunidades possuem os mesmos 310 aminoácidos no domínio central e diferem entre si pelo seus domínios carbóxi e amino-terminal (De Freital et al, 1997; Li et al, 1999; Ackerley, 2000).

Embora as três subunidades polimerizem contribuindo para a formação do neurofilamento, a mais abundante delas é a NF-L que foi descrita como sendo a responsável, juntamente com a extremidade amino-terminal, pela formação do filamento propriamente dito (Geisler & Weber, 1981), enquanto, as regiões carbóxi-terminais das subunidades NF-M e NF-H são responsáveis pela formação das projeções laterais. Estas se estendem perpendicularmente ao filamento central, permitindo a interação dos neurofilamentos entre si e com os demais constituintes do citoesqueleto (figura 6) (Hisanga & Hirokawa, 1988; Gotow et al, 1992; Kirkpatrick & Brady, 1999).

Durante o desenvolvimento, as subunidades NF-L e NF-M são coexpressas primeiramente, enquanto a subunidade NF-H começa a ser expressa mais tarde (Shaw & Weber, 1982; Carden et al, 1987), sugerindo que as subunidades NF-M e NF-H devam ter funções específicas durante o desenvolvimento (Elder et al, 1999).

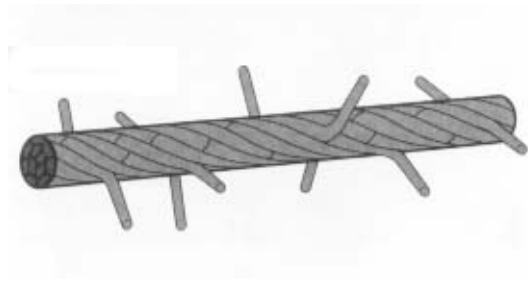


Figura 6: Representação esquemática de um neurofilamento. Adaptado de Kirkpatrick & Brady, 1999.

Os neurofilamentos determinam o calibre axonal, auxiliam na manutenção da morfologia neuronal e participam do transporte axonal de metabólitos do corpo celular até a sinapse (Kirkpatrick & Brady, 1999; Elder et al, 1999). Estudos com camundongos transgênicos demonstram que animais que super expressam NF-L apresentam um aumento na densidade de neurofilamentos, mas nenhum aumento no calibre axonal (Monteiro et al, 1990). Enquanto que animais que não expressam NF-L e NF-M têm o número de neurofilamentos e o calibre axonal significativamente diminuídos (Zhu et al, 1997; Elder et al, 1998). Nos animais que não expressam NF-H foram observadas modestas reduções no calibre axonal, mas os efeitos da depleção de NF-H foram em parte compensados pelo aumento dos níveis de NF-M e do número de microtúbulos (Zhu et al, 1998).

Os neurofilamentos são sintetizados no corpo celular e transportados para o axônio em processo denominado transporte axonal, o qual é regulado por fosforilação (Ackerley et al, 2000; Jung et al, 2000). Os neurofilamentos são extremamente fosforilados *in vivo*, predominantemente nos domínios carbóxi-terminais. A fosforilação

modifica a afinidade dos neurofilamentos de interagirem entre si e com outros componentes do citoesqueleto (Li et al, 1999).

O acúmulo de neurofilamentos é descrito em várias doenças neurodegenerativas, tais como: esclerose amiotrófica lateral, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Ainda não está claro como esse acúmulo de neurofilamentos contribui para o processo neurodegenerativo nessas doenças, mas sugere-se que o transporte de neurofilamentos esteja interrompido nos neurônios afetados (Ackerley et al, 2000).

PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP)

A GFAP é uma proteína estrutural sintetizada nos astrócitos e algumas células de Schwann (Kaneko et al, 1994; Kosako et al, 1997; Guo-Ross et al, 1999). Possui um peso molecular aparente de 50 kDa, sendo composta por três regiões distintas. A região amino-terminal é composta de 35 resíduos de aminoácidos e possui uma estrutura em conformação β que contém oito resíduos de arginina, caracterizando esta região como básica. A região carboxi-terminal contém cerca de 50 resíduos de aminoácidos, possuindo uma estrutura globular que pode estar envolvida em interações da GFAP com outras proteínas (Inagaki et al, 1990; Feintein et al, 1992).

Os astrócitos, entre outras funções, fornecem suporte estrutural para as células ao seu redor, regulam os níveis de neurotransmissores no fluido extracelular e secretam fatores de crescimento (Hansson & Rönnbäck, 1995). A GFAP é considerada um marcador citoplasmático de astrócitos, sendo a sua expressão um dos principais eventos na diferenciação destas

células. Os astrócitos imaturos expressam vimentina e quando se tornam maduros passam a expressar GFAP (McCall et al, 1996).

A GFAP exerce importante papel no processo de cicatrização nervosa, conhecida como gliose reativa. Também é importante para as interações astrócito-neurônio (McCall et al, 1996; Eliasson et al, 1999), as quais apresentam um sofisticado sistema de comunicação recíproca que pode regular a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Carmignoto, 2000).

VIMENTINA

A vimentina é uma subunidade de filamento intermediário de 54 kDa, sendo a proteína estrutural mais amplamente distribuída entre as células dos filamentos intermediários, ocorrendo em muitas células de origem mesenquimal, incluindo fibroblastos, células endoteliais e glóbulos brancos, além disso, muitas células expressam vimentina de forma transitória durante o desenvolvimento (Alberts et al, 1994). A vimentina também é encontrada em astrócitos imaturos, em alguns astrócitos maduros, como a glia de Bergmann no cerebelo e em subpopulações de astrócitos do corpo caloso (Alberts et al, 1994; Galou et al, 1996).

A vimentina tem papel importante nas funções de deformabilidade, migração e contractilidade dos fibroblastos. Células deficientes em vimentina são menos contráteis e com menos motilidade (Ecker et al, 1998; Wang & Stamenovic, 2000). A vimentina, assim como a GFAP, é necessária no processo de cicatrização da glia após traumas no SNC (Eliasson et al, 1999).

2– FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS

A fosforilação de proteínas é de fundamental importância na regulação biológica. Funções celulares são reguladas através de reações de fosforilação e desfosforilação de substratos protéicos endógenos (Cohen, 1992). Vários sinais extracelulares, chamados de primeiros mensageiros, tais como: impulsos nervosos, neurotransmissores, hormônios, fatores tróficos e drogas induzem a formação de segundos mensageiros (AMPc, GMPc, Ca^{+2} , fosfolipídeos) que irão modular a atividade das enzimas envolvidas na fosforilação de proteínas (figura 7) (Walaas & Greengard, 1991; Rodnight & Wofchuk, 1992).

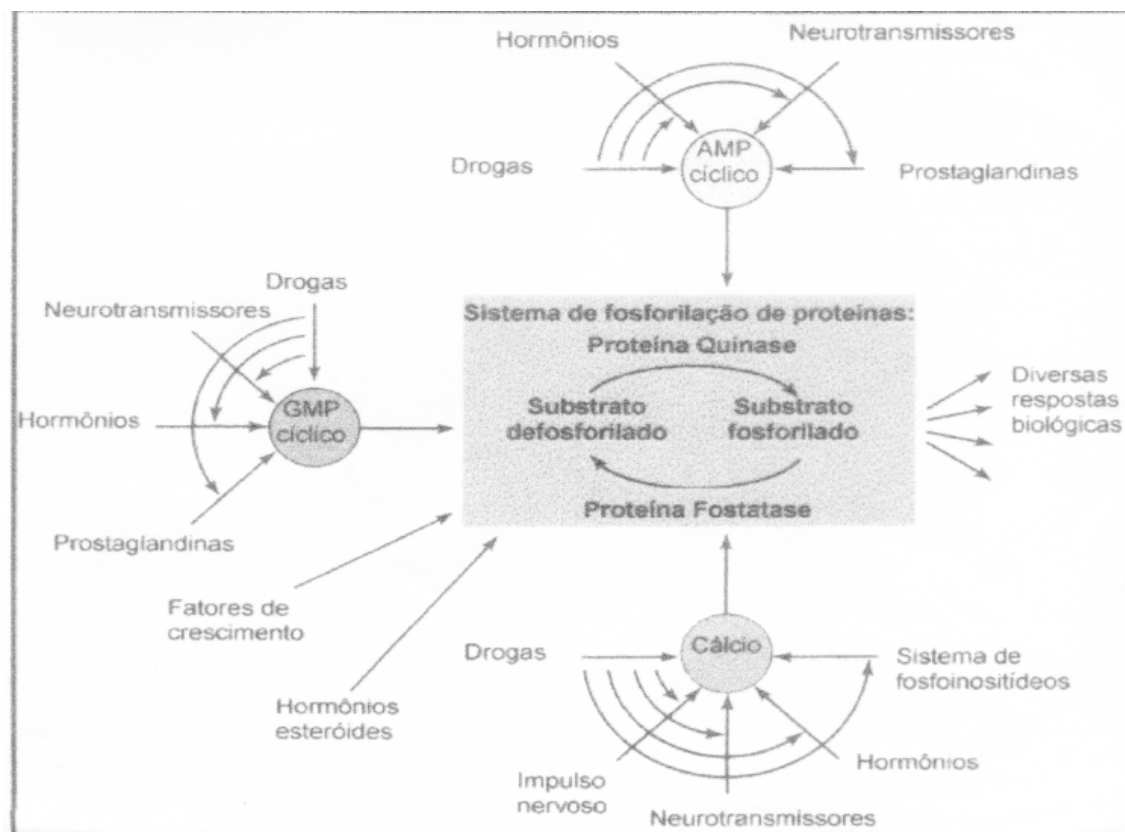


Figura 7: Representação esquemática do sistema de fosforilação de proteínas e alguns de seus agentes regulatórios. Adaptado de Nestler & Greengard, 1994.

A fosforilação protéica é um mecanismo reversível de regulação intracelular. A dinâmica da reação de fosforilação/desfosforilação se deve à participação de sistemas fosforilantes intracelulares que consistem de uma proteína quinase, um substrato protéico - também chamado de fosfoproteína - e de uma proteína fosfatase. As proteínas quinases são fosforiltransferases que catalisam a transferência do fosfato γ do ATP para o grupo hidroxila dos resíduos de serina, treonina ou tirosina de um substrato protéico em uma reação que requer Mg^{+2} como cofator. As fosfatases são fosfoesterases que catalisam a hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico, permitindo a reversibilidade do processo (figura 8) (Nestler & Greengard, 1999).

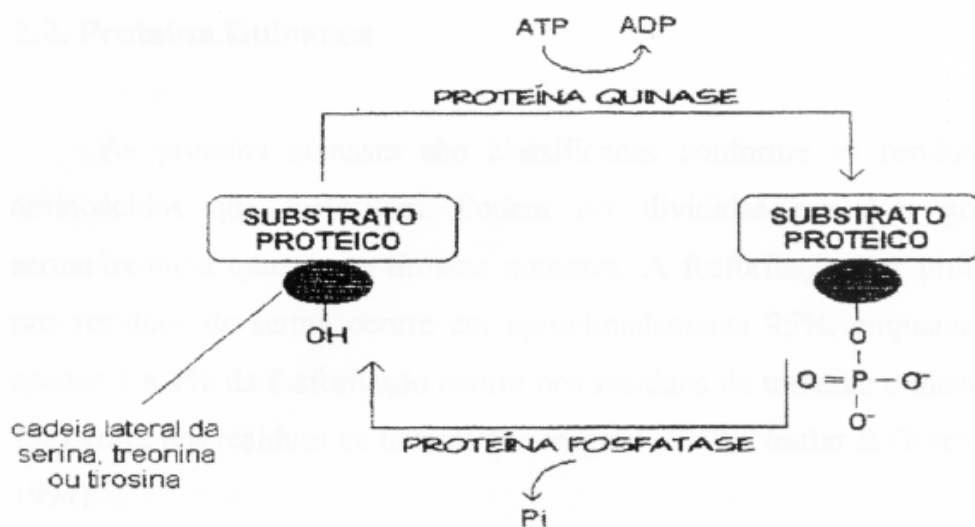


Figura 8: Representação esquemática de um sistema fosforilante. Adaptado de Alberts et al, 1994.

A fosforilação de uma proteína altera sua carga, pois os grupos fosfato sendo carregados negativamente, determinam uma mudança na sua conformação e conseqüentemente na sua atividade funcional. A relação entre a concentração intracelular e a atividade de quinases e fosfatases determina o estado de fosforilação do substrato (Walaas & Greengard, 1991; Nestler e Greengard, 1999).

2.1 – FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SNC

A fosforilação de proteínas no SNC está associada à regulação de vários processos que envolvem a plasticidade de células neuronais (Sculman, 1995; Bhat, 1995), como, por exemplo, o início da potenciação de longa duração (LTP) e da depressão de longa duração (LTD) (Adams et al, 2000), além de eventos de aprendizado e memória (Izquierdo & Medina, 1997; Viola et al, 2000).

O processo de fosforilação e desfosforilação protéica no SNC é responsável por inúmeras sinalizações celulares, como, por exemplo, controle da expressão gênica, síntese protéica, controle do ciclo celular e regulação de várias etapas do metabolismo intermediário. A alta concentração dos componentes dos sistemas fosforilantes (fosfoproteínas, quinases e fosfatases) no cérebro, em relação a outros tecidos, comprova a importância desse mecanismo na integração do

funcionamento do SNC. Praticamente todas as classes de proteínas neuronais são reguladas por fosforilação, tais como: enzimas envolvidas na biossíntese de neurotransmissores, proteínas que regulam os níveis intracelulares de segundos mensageiros, quinases autofosforiláveis, inibidores de fosfatases, proteínas envolvidas na regulação da transcrição e tradução, proteínas associadas a vesículas sinápticas, receptores de neurotransmissores, canais de íons e proteínas do citoesqueleto (Sim, 1991; Rodnight & Wofchuk, 1992).

As proteínas quinases são classificadas conforme os resíduos de aminoácidos que fosforilam em serina/treonina ou tirosina quinases. A fosforilação das proteínas nos resíduos de serina ocorre em aproximadamente 95% do total de fosfoproteínas, enquanto que apenas 3 a 4% ocorre nos resíduos de treonina e menos de 1% nos resíduos tirosina. O mecanismo de ativação mais comum às serina/treonina quinases é mediado por segundos mensageiros, tais como: AMPc, GMPc, Ca^{+2} , fosfolipídios e ácido araquidônico. As tirosina quinases são frequentemente associadas a receptores de superfície e ativadas diretamente por ligação ao primeiro mensageiro. Além desses mecanismos, sabe-se que a maioria das tirosina quinases apresentam sítios autofosforiláveis que atuam na regulação de sua atividade (Nestler & Greengard, 1999; Lau & Hugani, 1999).

As principais serina/treonina quinases dependentes de segundos mensageiros são: proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA), proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), proteínas quinases dependentes de cálcio e calmodulina (PKCaM) e proteínas quinases dependentes de cálcio e fosfolipídios (PKC) (Walaas & Greengard, 1991).

O SNC apresenta uma série de serina/treonina quinases que aparentemente não são reguladas diretamente por segundos mensageiros. Os mecanismos de ação e as funções destas quinases ainda não estão bem

estabelecidos. Alguns exemplos desta classe de quinases são: caseína quinases (CK) ativadas por fatores mitogênicos, que promovem a fosforilação da DARP-32 (Giralt et al, 1989), MAP1 e tubulinas (Serrano et al, 1989), estando relacionadas com inúmeros processos de sinalização celular e proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que desempenham funções ligadas à regulação do ciclo celular (Matsuoka et al, 1992).

As tirosina quinases são responsáveis pela fosforilação de uma pequena parcela de proteínas cerebrais, mas apesar disto, têm um papel regulatório importante no SNC, pois além de participarem no crescimento e diferenciação celulares, estão envolvidas na transdução de sinais (Greengard, 1987; Lau & Hugani, 1999).

As fosfatases, assim como as quinases, desempenham um importante papel no processo de fosforilação, pois a ação regulada das duas enzimas assegura a dinâmica do sistema fosforilante (Douglas et al, 2001).

Algumas fosfatases têm sua atividade regulada no SNC, direta ou indiretamente, por segundos mensageiros, tais como: AMPc, GMPc e Ca^{+2} . Estes diferentes sistemas regulatórios possuem distintas distribuições celulares. Além disso, certos neurotransmissores podem produzir alguns de seus efeitos fisiológicos no cérebro regulando os inibidores de fosfatases específicas (Walaas & Greengard, 1991).

As proteínas fosfatases podem ser classificadas em ácidas, básicas e neutras, no entanto, os dois primeiros tipos estão presentes em pequenas quantidades no SNC, onde aparentemente não desempenham papel significativo. Enquanto, as fosfatases neutras apresentam-se em grandes quantidades no SNC, sendo classificadas em serina/treonina e tirosina fosfatases, de acordo com os resíduos de aminoácidos que desfosforilam (Nestler & Greengard, 1999). Apesar desta classificação, algumas

fosfatases são capazes de atuar sobre outros sítios de modo que pode ocorrer uma certa sobreposição de sítios desfosforiláveis em um mesmo substrato protéico (Vinadé et al, 1997).

As principais fosfatases com atividade no SNC são: proteína fosfatase do tipo 1 (PP1), proteína fosfatase do tipo 2A (PP2A), proteína fosfatase do tipo 2B (PP2B) e proteína fosfatase do tipo 2C (PP2C) (Walaas & Greengard, 1991).

2.2– FOSFORILAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE CÉLULAS DO SNC

Apesar da fosforilação protéica ser a modificação pós-traducional mais importante na regulação do funcionamento do SNC, isto não significa que este seja um mecanismo inespecífico, ao contrário, a alta especificidade deste processo é assegurada pela existência de enzimas que fosforilam ou desfosforilam substratos específicos em resposta a estímulos bem determinados (O' Callagam, 1994).

A fosforilação das subunidades dos filamentos intermediários está relacionada com a sua capacidade de polimerização e de interação com outras proteínas do citoesqueleto (Kirkpatrick & Brady, 1999; Inada et al, 2000).

O estado de fosforilação dos neurofilamentos tem papel importante no controle da integridade do citoesqueleto, transporte e diâmetro axonal (Strack et al, 1997). Neurofilamentos altamente fosforilados são encontrados nos axônios, enquanto que os do corpo celular e dos dendritos contém poucos grupos fosfato.

A incorporação de fosfato nos neurofilamentos é característica para cada subunidade. A subunidade de menor peso molecular, NF-L, incorpora poucos grupos fosfato, a subunidade de peso molecular médio, NF-M, 9-24, enquanto a subunidade de alto peso molecular, NF-H, 22-104 grupos fosfato (Wong et al, 1984; Carden et al, 1985).

As regiões amino e carboxi-terminais das três subunidades dos neurofilamentos são sítios em potencial para fosforilação. Os domínios amino-terminais são fosforilados por proteínas quinases dependentes de segundos mensageiros - incluindo PKC, PKA, PKCaM -, sendo que a fosforilação desse domínio está relacionada com a capacidade de polimerização dos neurofilamentos (Nixon & Sihag, 1990; De Mattos-Dutra et al ,2000; Branco et al, 2000). No entanto, os domínios carboxi-terminais são substratos para quinases independentes de segundos mensageiros, sendo que nas subunidades NF-M e NF-H este domínio é considerado sítio de interação entre neurofilamentos, microtúbulos e outras organelas (Nixon & Sihag, 1991; Jung et al, 2000). As fosfatases PP1 e PP2A parecem ser as principais envolvidas na defosforilação destas proteínas (Vinadé & Rodnight, 1996; Strack et al, 1997).

É descrito que os neurofilamentos são os maiores constituintes dos axônios mielinizados, sendo a fosforilação destes filamentos o maior determinante na regulação do calibre axonal (Hirokawa & Takeda, 1998; Martin et al, 1998), e conseqüentemente o principal determinante da velocidade de condução dos impulsos nervosos ao longo do axônio (Hirokawa & Takeda, 1998).

Nos neurofilamentos a fosforilação das regiões amino e carbóxi-terminais das três subunidades (NF-H; NF-M; NF-L) ocorre em sítios de fosforilação envolvendo diferentes quinases (Nixon & Sihag, 1991).

As projeções laterais das extremidades carbóxi-terminais das subunidades NF-M e NF-H quando estão fosforiladas se estendem perpendicularmente ao filamento central, sendo responsáveis pela manutenção da distância entre os filamentos. Essas projeções não são encontradas em outras proteínas de filamento intermediário como a desmina, a GFAP ou a vimentina (Elder et al, 1998).

Durante as primeiras etapas do desenvolvimento pós-natal, as projeções laterais das subunidades NF-M e NF-H tornam-se extremamente fosforiladas em regiões que contêm a seqüência de aminoácidos lisina-serina-prolina (KSP) (Clark & Lee, 1991). Na subunidade NF-H as regiões KSP podem ser divididas em duas categorias KSPXX e KSPXK, onde o último X é qualquer aminoácido exceto a lisina. Acredita-se que essas duas regiões são reguladas por diferentes proteínas quinases, tais como: PKC e CDK (Sánchez et al, 2000).

A fosforilação do domínio carbóxi-terminal das subunidades NF-M e NF-H *in vitro* promove o alinhamento dos neurofilamentos em feixes (Leterrier et al, 1996) e *in vivo* aumenta a distância entre os filamentos (Nixon et al, 1994). No entanto, o transporte axonal diminui quando as subunidades NF-M e NF-H estão extremamente fosforiladas (Archer et al, 1994), e quando estas subunidades estão no mais alto nível de fosforilação os neurofilamentos podem parar de mover-se por longos períodos (Lewis & Nixon, 1988).

A fosforilação da região amino-terminal das subunidades NF-L e NF-M ocorre imediatamente após a sua síntese e a remoção dos grupamentos fosfato inicia-se após 6 a 12 horas. Essa regulação impede que as subunidades polimerizem imediatamente após a síntese, permitindo um período adequado para a associação entre as mesmas. A fosforilação da região carbóxi-terminal das subunidades NF-L e NF-M ocorre alguns dias

após a síntese e a desfosforilação ocorre lentamente. A subunidade NF-H também sofre uma extensa fosforilação logo após a sua síntese, regulando sua incorporação nos neurofilamentos. A despolimerização regional ou troca de subunidades é regulada por ciclos de fosforilação e desfosforilação para atingir uma configuração apropriada (Nixon & Sihag, 1991, Shea, 1994).

Estudos *in vitro* com GFAP de porco mostraram a presença de seis sítios fosforiláveis, cinco deles na porção N-terminal (Thr 7, Ser 8, Ser 13, Ser 17 e Ser 34) e um na porção C-terminal (Ser 389). Estes sítios mostraram-se fosforiláveis pelas quinases PKA, PKCaM II e PKC (Inagaki et al, 1994). Os sítios fosforiláveis de GFAP de ratos ainda não foram identificados, mas a grande homologia entre os domínios N-terminais de ambas as espécies é suficiente para assumir que possivelmente estes sítios estejam presentes na GFAP de ratos e que neles atuem as mesmas quinases indicadas para GFAP de porco (Rodnight et al, 1997).

Estudos *in vitro* demonstram que a vimentina pode ser fosforilada pela PKA, PKC e PKCaM e desfosforilada de uma maneira dependente de cálcio (Inada et al, 2000).

3 – DOENÇA DO XAROPE DO BORDO (DXB)

A Doença do Xarope do Bordo (DXB) ou cetoacidúria de cadeia ramificada é causada pela deficiência da atividade do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada. O bloqueio desse complexo resulta no acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina e de seus correspondentes α -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR) ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e ácido α -cetoisovalérico (CIV) nos tecidos de pacientes afetados (Chuang & Shih, 1995).

A DXB é um distúrbio metabólico hereditário de transmissão autossômica recessiva. A frequência desta doença é de aproximadamente 1:185.000 nascimentos (Chuang & Shih, 1995).

Os AACR são transportados para o interior da célula fundamentalmente através do sistema L de transporte Na^+ -independente na membrana plasmática, onde sofrem três reações iniciais em comum: transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação (figura 9) (Oxender, 1963; Prentki, 1965).

A transaminação dos AACR, catalisada pelas aminotransferases dos AACR, que são tanto citosólicas quanto mitocondriais, produz os seus respectivos α -cetoácidos. Quando ocorre no citosol, os α -cetoácidos são transportados para o interior da mitocôndria pelo transportador dos α -cetoácidos. A descarboxilação oxidativa dos CACR, catalisada pelo complexo α -cetoácido desidrogenase mitocondrial, gera isovaleril CoA, α -metilbutiril CoA, e isobutiril CoA dos α -cetoácidos CIC, CMV e CIV, respectivamente. Estas acetil CoA de cadeia ramificada sofrem desidrogenação pelas desidrogenases acil CoA específicas que seguem

diferentes vias de degradação. Os produtos finais do catabolismo da leucina são acetil CoA e acetoacetato (cetogênicos), a valina produz succinil CoA (glicogênico), enquanto a isoleucina, acetil CoA e succinil CoA (cetogênico e glicogênico, respectivamente) (Ichiara, 1984; Hutson, 1985; Ikeda, 1988; Chuang & Shih, 1995).

Uma característica dos pacientes com DXB é o odor de açúcar queimado na urina, atribuído aos AACR e CACR encontrados em alta quantidade. Em geral, os pacientes apresentam manifestações neurológicas severas, tais como: letargia, apnéia, hipotonia ou hipertonia, convulsões, coma, retardo mental, acidose metabólica, encefalopatia e atraso no desenvolvimento psicomotor (Wendel et al, 1982; Nord et al, 1991; Chuang & Shih, 1995; Zielke et al, 1996; Huang et al, 1996; Tavares et al, 2000).

Apesar da fisiopatologia da disfunção neurológica da DXB ser pouco compreendida, há grandes evidências associando leucina e CIC como sendo os principais agentes neurotóxicos da doença. Concentrações aumentadas de leucina no plasma estão associadas com o aparecimento dos sintomas neurológicos, enquanto concentrações elevadas de isoleucina levam à intensificação do odor de açúcar queimado na urina desses pacientes (Chuang & Shih, 1995; Wajner et al, 2000).

As concentrações plasmáticas dos CACR descritos na DXB não tratada variam de 0.6 a 4.6 mM para o CIC, 0.2 a 1.5 mM para CMV e 0.02 a 0.35 mM para CIV (Tanaka et al, 1983). A concentração desses metabólitos nas células neuronais é desconhecida, mas tem sido postulado que durante as crises de descompensação metabólica eles devam atingir níveis cerebrais iguais ou maiores aos encontrados no plasma (Chuang & Shih, 1995).

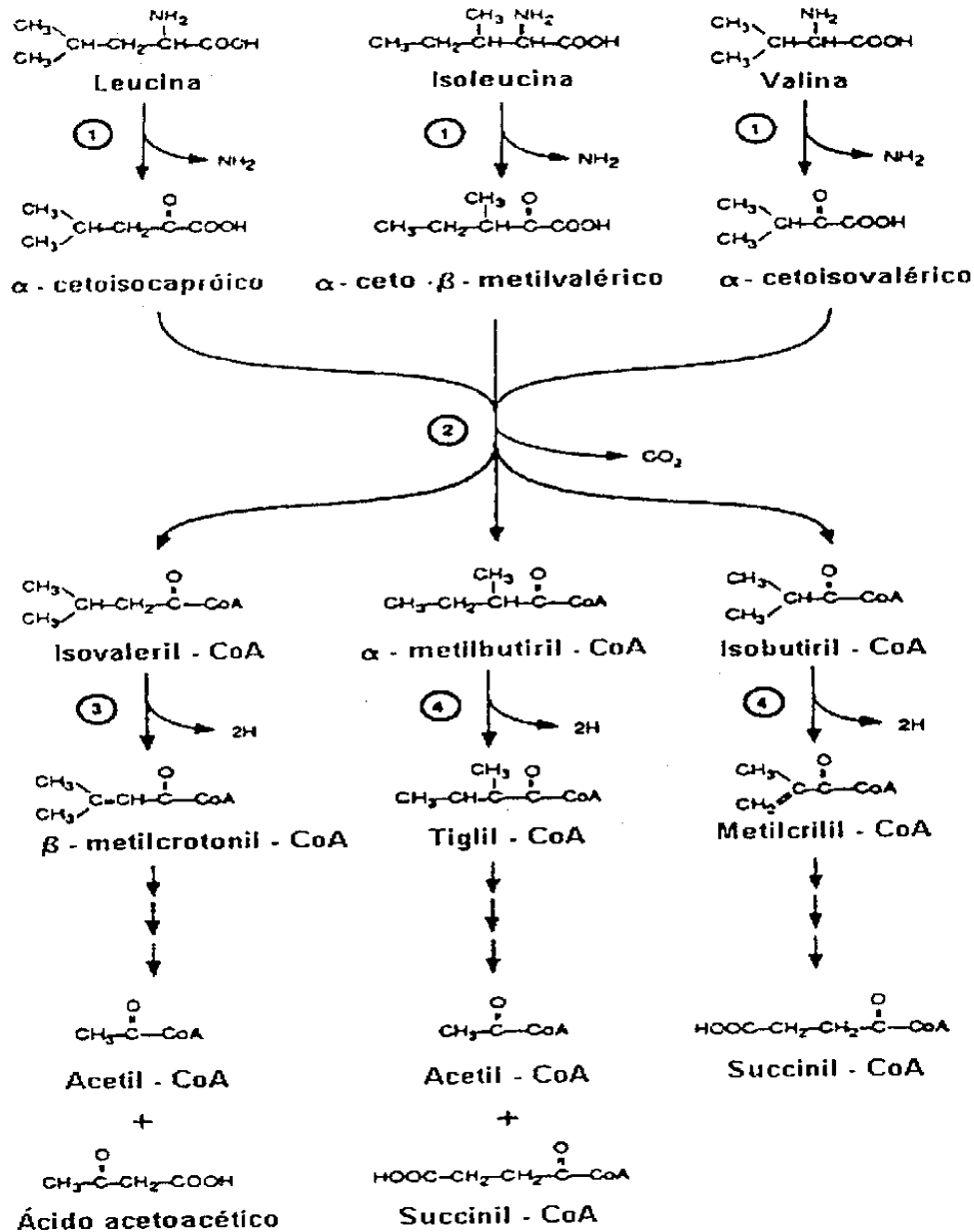


Figura 9 : Representação esquemática da via catabólica dos AACR. As enzimas que catalisam as reações são indicadas por números. (1) transaminação por aminotransferases, (2) descarboxilação oxidativa por um complexo α -cetodesidrogenase, (3) desidrogenação pela isovaleril-CoA desidrogenase, (4) desidrogenação pela metilacil-CoA desidrogenase. Adaptado de Scriver et al, 1995.

Os pacientes com DXB podem ser classificados em cinco fenótipos, dependendo da apresentação clínica, da tolerância à leucina e da atividade residual da enzima medida *in vitro* em fibroblastos da pele ou de células brancas do sangue (Schadewaldt et al, 1998).

1) Forma Clássica

Representa a forma mais severa e comum da doença. Os níveis dos AACR, particularmente leucina, estão muito aumentados no sangue, líquido cefaloraquidiano e urina. Na DXB clássica 50% ou mais dos AACR são derivados da leucina. Os recém nascidos afetados parecem normais no nascimento, os sintomas começam a se desenvolver entre os 4-7 dias após o nascimento. Letargia e perda de apetite são os primeiros sintomas, seguidos por perda de peso e alteração progressiva dos sinais neurológicos. Cetoacidose e odor de açúcar queimado são observados. A maioria dos pacientes morre nos primeiros meses de vida devido as crises metabólicas e deterioração neurológica (Pienemann & Danner, 1994; Chuang & Shih, 1995).

2) Forma Intermediária

Os pacientes com a forma intermediária da doença apresentam elevação persistente dos AACR, porém em níveis mais baixos que os da forma clássica. Geralmente não possuem sintomatologia aguda no período neonatal. A atividade residual da enzima é geralmente maior que a da forma clássica, em torno de 3 a 30% do normal (Chuang & Shih, 1995).

3) Forma Intermitente

Os pacientes com a forma intermitente da doença apresentam desenvolvimento normal com crescimento e desenvolvimento cognitivos normais. Apresentam risco de descompensação metabólica aguda durante situações de estresse. Quando assintomáticos, os dados laboratoriais desse pacientes são normais, incluindo os níveis plasmáticos dos AACR. A

atividade do complexo enzimático encontra-se em torno de 5 a 20% do normal. Os sintomas geralmente aparecem entre 5 meses e 2 anos de idade associados, geralmente, a otite média ou outras infecções (Chuang & Shih, 1995).

4) Forma Tiamina-Responsível

Geralmente, estes pacientes não apresentam doença neonatal aguda. O distúrbio é detectado devido a um atraso no desenvolvimento psicomotor. A atividade da enzima está em torno de 30 a 40% do normal. A concentração plasmática dos AACR é cerca de 5 vezes maior que o normal, essa concentração pode retornar aos níveis normais com doses de 10 a 1000 mg/dia de tiamina e com dieta restrita em proteínas (Chuang & Shih, 1995).

5) Forma Di-hidrolipoil Desidrogenase (E₃)-Deficiente

A deficiência de E₃ é um distúrbio raro. O fenótipo clínico é similar ao da forma intermediária, mas é acompanhada de acidose láctica severa. Os níveis de lactato, piruvato, α -cetogluturato, α -hidroxiisovalerato e α -hidroxiglutarato estão aumentados. Os níveis dos AACR estão leve ou moderadamente aumentados no plasma se comparados com os pacientes com a forma clássica. Esses pacientes têm uma deficiência combinada das desidrogenases do piruvato, α -cetogluturato e AACR. Na presença de acidose láctica persistente ocorre deterioração neurológica progressiva, incluindo hipotonia (Chuang & Shih, 1995).

O diagnóstico da DXB é feito através da análise de aminoácidos e/ou ácidos orgânicos no sangue. A triagem desta doença deve ser feita através de métodos qualitativos de análise de aminoácidos por cromatografia em papel ou em camada delgada. O diagnóstico definitivo é feito pela quantificação dos aminoácidos no plasma e urina por HPLC ou autoanalisador de aminoácidos (cromatografia líquida de troca iônica)

(Nyhan, 1984). Além dos AACR e seus respectivos cetoácidos, a urina dos pacientes portadores desta doença possui consideráveis quantidades de ácido láctico, ácido acetoacético e ácido 3-hidroxi-butírico, principalmente durante os episódios agudos, nos quais a cetoacidose está presente. Estes achados são importantes, uma vez que os CACR são inibidores da piruvato e da α -cetoglutarato desidrogenase (Johnson, 1972).

Para evitar danos neurológicos irreversíveis, o tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível e no período neonatal. O tratamento baseia-se, principalmente, na restrição dos AACR, evitando o acúmulo dos metabólitos tóxicos para o organismo. A terapia consiste no tratamento dietético contínuo e na intervenção vigorosa durante os episódios de descompensação metabólica aguda (Chuang & Shih, 1995). Os pacientes recebem uma dieta pobre nos AACR, mas que supra as necessidades mínimas para manter o crescimento e desenvolvimento normais. A terapia com tiamina (50 a 300 mg/dia) deve ser usada por três semanas para se detectar pacientes com DXB tiamina-responsíveis (Elsas et al, 1981). Transplante de fígado também pode ser utilizado para os casos mais graves (Chuang & Shih, 1995).

Durante a descompensação metabólica, fase aguda da doença desencadeada por infecções, cirurgias ou outra forma de estresse, ocorre deterioração cerebral. Desta forma, durante este período, o tratamento deve ser mais agressivo, pois os níveis dos aminoácidos e seus cetoácidos elevam-se muito rapidamente. A remoção dos metabólitos tóxicos deve ser rápida, devendo haver suporte nutricional para evitar o estado catabólico e promover o anabolismo (Chuang & Shih, 1995).

Estudos vêm sendo realizados em modelos animais para a aplicação da terapia gênica em seres humanos para o tratamento destes pacientes (Chuang & Shih, 1995).

Alterações estruturais são detectadas freqüentemente no SNC de pacientes afetados por DXB, caracterizando atrofia cerebral por comprometimento da mielinização (Danner & Elsas, 1989).

Embora as principais manifestações da DXB sejam neurológicas, os mecanismos neurotóxicos dos AACR e dos CACR permanecem praticamente obscuros. Acredita-se que a severidade destas manifestações dependam do grau e da duração da exposição cerebral aos metabólitos, bem como do período do desenvolvimento do SNC em que isto ocorre (Chuang & Shih, 1995). Alguns estudos citam a deficiência de produção de energia, bem como a redução de neurotransmissores, devido às elevadas concentrações de metabólitos acumulados na doença (Tashian, 1961; Yuwiler et al, 1965; Land et al, 1976; Huang et al, 1996; Zielke et al, 1996; McKenna et al, 1998).

4 - TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, onde media vários processos vitais, tais como: desenvolvimento das células nervosas, incluindo proliferação e migração (Mc Donald & Johnson, 1990), modulação de mecanismos de aprendizado e memória (Izquierdo & Medina, 1997) e envelhecimento (Sergovia et al, 2001). Os receptores glutamatérgicos (GluRs) têm papel fundamental na plasticidade e no desenvolvimento neural, bem como nos processos de neurodegeneração e transmissão sináptica. A ativação excessiva dos GluRs durante episódios de estresse cerebral tais como: isquemia, traumatismo craniano e surtos epiléticos levam à morte de neurônios (neurotoxicidade). Os GluRs estão envolvidos intimamente na fisiologia e na patologia das funções cerebrais (Nakanishi et al, 1998; Ozawa et al, 1998).

Os GluRs estão amplamente distribuídos no SNC tanto de jovens quanto de adultos, no entanto, a expressão de subtipos de receptores glutamatérgicos apresenta uma variação regional e desenvolvimental específicas, indicando que diferentes subtipos podem exercer funções variadas quanto à ontogenia e ao sinal modulatório produzido no SNC (Vencil et al, 1992; Schoepp, 1994).

Existem duas classes distintas de GluRs, os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs são canais iônicos de membrana (Michaelis, 1998; Schoepp, et al, 1995). Os mGluRs são acoplados a vias de transdução de sinal, envolvendo proteínas G e regulam a produção de mensageiros intracelulares (Nakanishi et al, 1998; Ozawa et al, 1998).

4.1 - RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS

Os iGlurs são classificados em NMDA (N-metil-D-aspartato) e não NMDA, que compreendem os receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazolenopropionato) e cainato (Nansen et al, 2000). Estruturalmente, o receptor glutamatérgico ionotrópico (figura 10) apresenta suas regiões amino e carboxiterminais voltadas para o meio extracelular. Os segmentos transmembrana são posicionados de modo a formar o poro do canal iônico (Nakanishi, 1992).

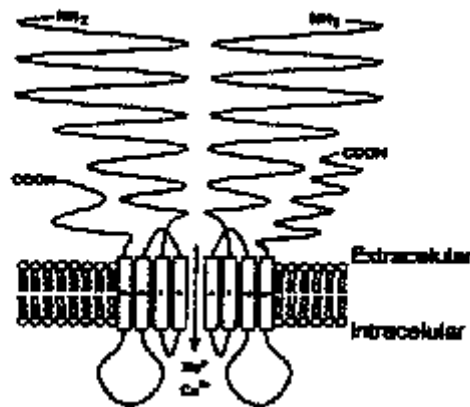


Figura 10: Representação esquemática de um receptor glutamatérgico ionotrópico. Os segmentos transmembrana se posicionam formando o poro do canal iônico. Adaptado de Nakanishi et al, 1998.

Em uma única sinapse no SNC, geralmente, encontram-se os três tipos coexistindo e envolvidos na ampliação do sinal glutamatérgico (Ozawa et al, 1998).

Os receptores AMPA e kainato mediam a transmissão excitatória rápida, respostas sinápticas voltagem independentes e são permeáveis aos íons sódio e potássio. No entanto, os receptores NMDA mediam influxos de cálcio, respostas sinápticas voltagem dependentes, propriedade relacionada com o bloqueio transitório e efetivo do canal pelo íon magnésio. Estes receptores são permeáveis aos íons sódio, potássio e cálcio, sendo a alta condutância de cálcio responsável pela possível neurotoxicidade causada pela superativação dos receptores glutamatérgicos (Sans et al, 2000; Constantible, 2000).

Os receptores AMPA são subdivididos em GluR1-GluR4 e os kainato em GluR5-GluR7 e Ka1 e Ka2. Os receptores NMDA são formados por três famílias de genes NR1, NR2 e NR3. A subunidade NR1 é formada por um único gene e dá origem a oito isoformas com propriedades distintas, é essencial para a funcionalidade do receptor NMDA. As subunidade NR2 e NR3 são coexpressas com a NR1, parecem exercer papel modulador e ter distribuição regional específica no cérebro conferindo propriedades farmacológicas distintas às do receptor final (Sun et al, 1998; Ritter et al, 2001).

Estudos recentes demonstram o envolvimento dos receptores glutamatérgicos, particularmente os receptores ionotrópicos, em diversos aspectos do desenvolvimento cerebral. Os receptores ionotrópicos são importantes nos mecanismos de corticogênese, plasticidade sináptica, sinaptogênese, migração e sobrevivência neuronal (Ritter et al, 2001).

A expressão dos genes dos receptores glutamatérgicos se modifica durante a ontogenia cerebral. Os receptores NMDA são os primeiros a serem detectados no cérebro em desenvolvimento e subunidades distintas do receptor NMDA podem estar expressas em tipos específicos de neurônios

em diferenciação. Os receptores AMPA se formam após os NMDA e demonstram um aumento em sua expressão com a idade (Sans et al, 2000).

Há evidências de que os receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA expressam plasticidade sináptica dependente do desenvolvimento cerebral e de que esta característica não seja somente uma propriedade deste subtipo, mas também de outros receptores, incluindo outros tipos de receptores glutamatérgicos (Contestabile, 2000).

4.2 – RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS METABOTRÓPICOS

A estrutura dos mGluRs (Figura 11) apresenta três domínios: a porção N-terminal, que apresenta uma grande seqüência hidrofílica, sete domínios transmembrana separados por alças intra e extracelulares e uma seqüência intracelular hidrofílica na porção C-terminal (Ozawa et al, 1998; Nakanishi et al, 1998).

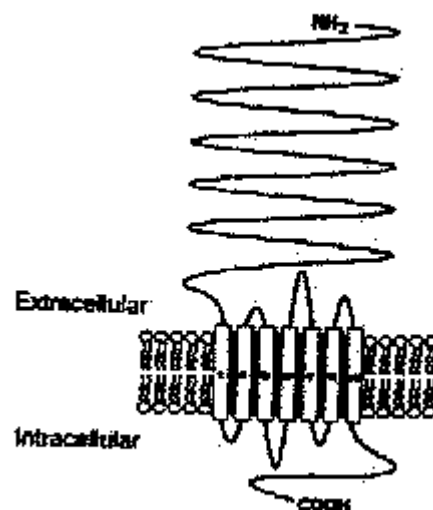


Figura 11: Representação esquemática de um receptor glutamatérgico metabotrópico. Adaptado de Nakanishi et al, 1998.

Existem oito subtipos de mGluRs - mGluR1-mGluR8. Esses oito subtipos são classificados em três grupos de acordo com sua homologia de aminoácidos - que é de aproximadamente 70% dentro de cada grupo - farmacologia e mecanismos de transdução de sinal (Pin et al, 1995; Ozawa et al, 1998).

O grupo I compreende os subtipos mGluR1 e mGluR5, os quais são acoplados à ativação da fosfolipase C. Os grupos II e III são ligados à formação de AMPc, sendo que o grupo II inclui os subtipos mGluR2 e mGluR3 e o III inclui os subtipos mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (Tanabe et al, 1993; Duvoisin et al, 1995; Nakanishi et al, 1998).

Agonistas altamente seletivos têm sido identificados para cada um dos três grupos. O quisqualato e o ácido (1S, 3R)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico (1S, 3R-ACPD) são agonistas potentes para o grupo I. Os receptores do grupo II são também ativados por 1S, 3R-ACPD e por (2S, 1'R, 2'R, 3'R)-2-(2'-3'-dicarboxiciclopropil)glicina (DCG IV), (2S, 1'S, 2'S)-2(2'-carboxiciclopropil)glicina (CCG-I). Os receptores do grupo III são seletivamente ativados pelo ácido L-2-amino-4-fosfanobutírico (L-AP4) (Schoepp, 1994; Bruno et al, 1996; Osawa et al, 1998; Dingledine and McBain, 1999).

5 - OBJETIVOS

A fosforilação protéica é o principal mecanismo molecular através do qual a função protéica é regulada em resposta a estímulos extracelulares, além disso, o estado de fosforilação das diferentes proteínas do citoesqueleto parece estar diretamente envolvido com a morfogênese e plasticidade do SNC. Considerando resultados prévios obtidos em nosso laboratório de que o modelo experimental da Doença do Xarope do Bordo afeta a fosforilação de proteínas do citoesqueleto em córtex cerebral de ratos de 17 dias, os principais objetivos deste trabalho são:

- 1- Fazer um estudo ontogenético dos efeitos do ácido α -cetoisocapróico sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P em proteínas de filamento intermediário - NF-M, NF-L, vimentina e GFAP – em fatias de córtex cerebral de ratos de 09, 12, 15, 17, 21 e 60 dias de idade.
- 2- Verificar os efeitos do glutamato sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P em proteínas de filamento intermediário - NF-M, NF-L, vimentina e GFAP – em fatias de córtex cerebral de ratos nas diferentes idades estudadas.
- 3- Verificar a participação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos sobre os efeitos causados pelo ácido α -cetoisocapróico na fosforilação de proteínas de filamento intermediário - NF-M, NF-L, vimentina e GFAP em diferentes idades.

6 - ANEXO 1

Artigo submetido ao periódico *Developmental Neuroscience*.

Título: Pharmacological evidence that α -ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments from cerebral cortex of rats during postnatal development through the glutamatergic system *in vitro*.

Autores: Cláudia Funchal, Priscila de Lima Pelaez, Samanta Oliveira Loureiro, Lilian Vivian, Franciele Dall Bello Pessutto, Lúcia Maria Vieira de Almeida, Susana Tchernin Wofchuk, Moacir Wajner and Regina Pessoa Pureur

Pharmacological evidence that α -ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments from cerebral cortex of rats during postnatal development through the glutamatergic system in vitro

Cláudia Funchal, Priscila de Lima Pelaez, Samanta Oliveira Loureiro, Lilian Vivian, Franciele Dall Bello Pessutto, Lúcia Maria Vieira de Almeida, Susana Tchernin Wofchuk, Moacir Wajner and Regina Pessoa Pureur

AUTHOR'S ADDRESS: 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

Fax: 5551 3316 5535 Tel: 5551 3316 5565

KEY WORDS: Maple syrup urine disease, cytoskeleton, development, phosphorylation, glutamatergic receptors

RUNNING HEAD: α -ketoisocaproic acid and cytoskeleton phosphorylation

CORRESPONDENCE ADDRESS: 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

Fax: 5551 3316 5535 Tel: 5551 3316 5565

Abstract

In this study we investigated the effects of α -ketoisocaproic acid (KIC), the main keto acid accumulating in the inherited neurometabolic disorder maple syrup urine disease (MSUD), on the in vitro incorporation of ^{32}P into intermediate filament (IF) proteins from cerebral cortex of rats during development. KIC decreased the in vitro incorporation of ^{32}P into the IF proteins studied up to day 12, had no effect on day 15, and increased this phosphorylation in cortical slices of 17, 21 and 60-day-old rats. A similar effect on IF phosphorylation was achieved along development by incubating cortical slices with glutamate. This effect was mediated by the ionotropic receptors NMDA, AMPA and kainate up to day 12 and by NMDA and AMPA in tissue slices from 17 and 21-day-old rats. In contrast, glutamate did not affect the in vitro incorporation of ^{32}P into the IF in slices of 60-day-old rats. The results suggest that alterations of IF phosphorylation may be associated with the neuropathology of MSUD.

Introduction

The neuronal cytoskeleton comprises a protein network formed mainly by neurofilaments (NF) and microtubules (MT). Neurofilaments are composed of three different polypeptides whose approximate molecular masses are 200, 160, and 68 kDa, commonly referred to as heavy (NF-H), medium (NF-M) and light (NF-L) neurofilament subunits (Soussan et al 1994).

The amino and the carboxy-terminal tail domains of NF subunits are potential phosphorylation sites, (Nixon and Sihag 1991). The phosphorylation sites located on the amino terminal domain of the neurofilament subunits are phosphorylated by second messenger-dependent protein kinases including protein kinase C, cyclic AMP- (PKA) and Ca^{2+} /calmodulin-dependent (CaMK II) protein kinase (Sihag and Nixon 1990). The functional role of neurofilament phosphorylation is not completely clear. However, the regulation of intermediate filaments (IF) polymerization by phosphorylation is largely described in the literature. Vimentin filaments reconstituted in vitro undergo complete disassembly when phosphorylated by purified protein kinase A or protein kinase C (Inagaki et al 1987). A similar in vitro disassembly induced by phosphorylation was noted for almost all major IF proteins, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Inagaki et al 1990), desmin (Inada et al 1998), keratin (Ku et al 1997), α -internexin (Tanaka et al 1993), NF-L (Hashimoto et al 1998) and lamin (Peter et al 1992).

Furthermore, changes in the phosphorylation of neurofilaments and other cytoskeletal proteins inducing cytoskeletal remodeling have been described in various neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease, as well as in neuronal injury and regeneration (Hirano 1991; Trojanowski et al 1993; Schmidt et al 1996).

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS) and plays an important role in a wide variety of CNS functions. Glutamate receptors are divided into two groups, ionotropic (iGLURs) and metabotropic (mGLURs) receptors (Holmann and Heinemann 1994, Nakanishi and Masu 1994). iGLURs contain cation-specific ion channels and are subdivided into NMDA (N-methyl-D-aspartate) and non-NMDA receptors [(R,S)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and kainate receptors]. mGLURs are coupled to G-proteins and modulate the production of intracellular messengers. There are 8 subtypes of mGLURs classified into 3 groups on the basis of their homology, pharmacology and signal transduction mechanism (Pin and Duvoisin 1995). Group I mGLURs (mGLUR₁ and mGLUR₅ subtypes) are coupled with the activation of the phospholipase C pathway and selectively activated by 3,5-dihydroxy-phenylglycine and potently activated by quisqualate and (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R-ACPD) (1,2). Group II (mGLUR₂ and mGLUR₃) and group III (mGLUR₄, mGLUR₆, mGLUR₇ and mGLUR₈) mGluRs are coupled with the adenylyl cyclase system (Duvoisin et al 1995, Tanabe et al 1993). Group II receptors are potently activated by (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2'-3'-dicarboxycyclopropyl) glycine (DCG IV), (2S,1'S,2'S)-2(2'-carboxycyclopropyl)glycine (CCG-I) and ACPD, whereas those from group III are selectively activated by 2-amino-4-phosphonobutanoate (L-AP4) (Duvoisin et al 1995, Ishida et al 1993, Nakajima et al 1993, Ozawa et al 1998).

There is compelling evidence showing that stimulation of glutamate receptors can induce changes in the phosphorylation system of cerebral cytoskeletal proteins. In this context, it has been demonstrated that phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampal slices is stimulated via mGLUR (Wofchuk and Rodnight 1994). It has also been reported that glutamate can activate CaM kinase II

through stimulation of both the metabotropic and the non-NMDA receptors, and that the concomitant phosphorylation of vimentin and GFAP may in turn regulate the functions of intermediate filament proteins in intact astrocytes (Yano et al 1994). Induction of cytoskeletal protein phosphorylation through glutamatergic receptors by metabolites accumulating in the inherited metabolic disorders methylmalonic and propionic acidemias has also been described (Mattos-Dutra et al 2000).

Maple syrup urine disease (MSUD), or branched chain ketoaciduria is an inherited neurometabolic disorder caused by severe deficiency of the branched-chain L- α -ketoacid dehydrogenase complex activity (Chuang and Shih 2001). The inability of this enzyme complex to oxidize α -ketoisocaproic acid (KIC), α -keto- β -methylvaleric acid (KMV) and α -ketoisovaleric acid (KIV) leads to tissue accumulation of these metabolites and their precursor amino acids leucine, isoleucine and valine in the affected individuals, which is the biochemical hallmark of the disorder. Patients with MSUD present predominantly neurological dysfunction. CNS imaging reveals low density of white matter in cerebral hemispheres and other brain structures corresponding to dysmyelination and atrophy (Chuang and Shih 2001). Although the neurological features of this disorder are severe, consisting of coma, convulsions and cerebral edema and atrophy, the underlying etiopathogenic mechanisms leading to neurological dysfunction in MSUD are poorly understood. However, Leu and/or its ketoacid α -ketoisocaproic acid (KIC) have been considered the main neurotoxic metabolites in MSUD since increased plasma concentrations of these metabolites are associated with the appearance of neurologic symptoms (Snyderman et al., 1964, Chuang and Shih, 2001).

We have recently demonstrated that KIC, but not KIV or KMV, increases phosphorylation of medium and low molecular weight neurofilament subunits (NF-M

and NF-L), as well as vimentin and glial fibrillary acidic protein from slices of cerebral cortex of 17-day-old rats (Branco et al 2000). In the present report we studied the effects of KIC on the in vitro phosphorylation of the intermediate filament proteins of cerebral cortex during development by using cortical slices of 9, 12, 15, 17, 21 and 60 day-old rats. We also investigated the role of the glutamatergic system on these effects by using glutamate and various ionotropic and metabotropic glutamate agonists and antagonists.

Material and Methods

Radiochemicals and compounds- [^{32}P] Na_2HPO_4 was purchased from CNEN, São Paulo, Brazil. L-glutamic acid, α -ketoisocaproic acid, benzamidine, leupeptin, antipain, pepstatin, chymostatin, D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (DL-AP5), N-methyl-D-aspartate(NMDA), kainate, acrylamide and bis-acrylamide were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1,3-carboxylic acid (1S,3R-ACPD), L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4), and (R,S)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) were purchased from Tocris Neuramin (Bristol, UK).

Animals- Wistar rats (9, 12, 15, 17, 21 and 60 days of age) were obtained from our breeding stock. Rats were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle in a constant temperature (22° C) colony room. Free water and a 20% (w/w) protein commercial chow were provided.

Preparation and labelling of slices- Rats were killed by decapitation, the cerebral cortex was dissected onto Petri dishes placed on ice and cut into 400 μm thick slices with a McIlwain chopper.

Preincubation- Tissue slices were initially preincubated at 30°C for 10 min in 124 mM NaCl, 4mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM Na-HEPES (pH 7.4), 12 mM glucose, 1mM CaCl_2 , and the following protease inhibitors: 1 mM benzamidine, 0.1 μM leupeptin, 0.7 μM antipain, 0.7 μM pepstatin, 0.7 μM chymostatin. In the experiments using glutamate receptor antagonists, 100 μM D-amino-5-phosphonopentanoic acid (DL-AP5) or 50 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) was added to the medium during preincubation.

Incubation- After preincubation, the medium was changed and incubation was carried out at 30 °C with 100 µl of the basic medium containing 80 µCi of [³²P] orthophosphate with or without addition of the different drugs. When indicated, 1 mM glutamate, 100 µM 1S,3R-ACPD, 100 µM L-AP4, 100 µM NMDA, 100 µM AMPA, 100µM kainate, 0.5, 0.75 or 1.0 mM α-ketoisocaproate was added to the incubation medium. In some experiments, glutamate plus α-ketoisocaproate was added to the incubation medium. In the experiments using the glutamate receptor antagonists, they were added to the medium during preincubation and incubation in the presence or absence of α-ketoisocaproate. The labelling reaction was normally allowed to proceed for 30 min at 30 °C and stopped with 1 ml of cold stop buffer (150 mM NaF, 5 mM, EDTA, 5 mM EGTA, Tris-HCl 50 mM, pH 6.5, and the protease inhibitors described above). Slices were then washed twice by decantation with stop buffer to remove excess radioactivity.

Preparation of the high salt-Triton insoluble cytoskeletal fraction from slices of cerebral cortex- After treatment, preparations of total IF were obtained from cerebral cortex of 9-, 12-, 15-, 17-, 21- and 60- day-old rats as described by Paz et al (1991). Briefly, after the labelling reaction, slices were homogenized in 400 µl of ice-cold high salt buffer containing 5 mM KH₂PO₄, (pH 7.1), 600 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 and the protease inhibitors described above. The homogenate was centrifuged at 13,000 x g for 10 min at 4 °C, in an Eppendorf centrifuge, the supernatant discarded and the pellet homogenized with the same volume of the high salt medium. The resuspended homogenate was centrifuged as described and the supernatant was discarded. The Triton-insoluble intermediate filament-enriched

pellet, containing neurofilament subunits, vimentin and GFAP, was dissolved in 1% SDS and protein concentration was determined by the method of Lowry et al (1951).

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)- The cytoskeletal fraction was prepared as described above. Equal protein concentrations were loaded onto 10 % polyacrylamide gels and analyzed by SDS-PAGE according to the discontinuous system of Laemmli (1970). After drying the gels were exposed to X-ray films (X-Omat XK1) at -70 °C with intensifying screens and finally the autoradiograms were obtained. Cytoskeletal proteins were quantified by scanning the films with a Hewlett-Packard Scanjet 6100C scanner and determining optical densities with an Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company). Density values were obtained for the studied proteins.

Statistical analysis- Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test when the F-test was significant. All analyses were performed using the SPSS software program on an IBM-PC compatible computer.

Results

Figure 1A shows a Coomassie blue stained SDS-PAGE of the IF-enriched cytoskeletal fraction extracted from cerebral cortex slices of 17-day-old rats. The autoradiograph of a similar IF-enriched cytoskeletal fraction is shown in Figure 1B. It can be seen that this fraction contains phosphoproteins corresponding to the molecular weights of the neurofilament subunits (NF-M and NF-L) along with GFAP and vimentin, as previously identified by us using monoclonal antibodies (Branco et al 2000). It can also be seen in the autoradiograph that the 150- (NF-M) and 68-kDa (NF-L) neurofilament subunits as well as vimentin and GFAP are good substrates for the endogenous phosphorylation system.

When cortical slices were incubated with ^{32}P -orthophosphate and KIC at different concentrations (0.5, 0.75 or 1.0 mM), we observed that the phosphorylation pattern of all cytoskeletal proteins studied were altered in a developmentally regulated manner (Figure 2). It can be seen that KIC inhibited the ^{32}P in vitro incorporation into IF proteins from cerebral cortex of 9- and 12-day old-rats (Figure 2 A and B), while it caused no effect in cortical slices of 15-day-old animals (Figure 2 C). Conversely, KIC increased ^{32}P in vitro incorporation into IFs from cerebral cortex of 17-, 21- and 60-day-old animals at concentrations as low as 0.5 mM (Figure D, E and F). It can also be observed that most effects elicited by KIC are dose-dependent.

In order to test whether the effects of KIC on the phosphorylation of the cytoskeletal proteins studied observed in our experimental model were mediated by glutamatergic receptors, we incubated tissue slices with 1 mM KIC, 1 mM glutamate or 1 mM KIC plus 1 mM glutamate and determined the ^{32}P in vitro incorporation into the IF proteins. Results showed that in young animals (9 to 21-day-old rats) the effects of

KIC on the in vitro phosphorylation were mimicked by those provoked by glutamate (Figure 3). Thus, in cortical slices from 9- and 12-day-old rats, glutamate induced a decreased ^{32}P in vitro incorporation (Figure 3 A and B), whereas in 15-day-old rats (Figure 3 C) this acid was ineffective in altering phosphorylation, and in 17- and 21-day-old animals (Figure 3 D and E) it increased the in vitro ^{32}P incorporation. Furthermore, by incubating cortical slices together with 1 mM KIC plus 1 mM glutamate, no additive effect on the in vitro phosphorylation was observed, indicating that KIC and glutamate probably act through the same mechanism (Figure 3 A-E). Surprisingly, in adulthood (60-day-old animals) the stimulatory effect of KIC on the in vitro ^{32}P incorporation into IF proteins was still observed, nonetheless glutamate was ineffective in altering the in vitro phosphorylation of the IF proteins (Figure 3 F). These findings suggest that at this age KIC effect occurs through a different mechanism from that of glutamate.

Next, experiments were designed to verify what kind of glutamate receptors were involved in the effect produced by KIC on the the ^{32}P in vitro incorporation into IF proteins. Therefore, cortical slices from rats of two representative ages (9- and 21-day-old) were preincubated with ^{32}P -orthophosphate in the presence of KIC and ionotropic (NMDA, AMPA and kainate) or metabotropic (1S,3R-ACPD and L-AP4) glutamatergic receptor agonists. The results demonstrate that NMDA, AMPA and kainate mimicked the inhibitory effect of KIC, whereas ACPD and L-AP4 were unable to modify the ^{32}P in vitro incorporation into the proteins studied in 9-day-old animals (Figure 4 A and B). In addition, in 21-day-old rats, only the ionotropic agonists NMDA and AMPA were able to mimic the stimulatory effect of the α -keto acid (Figure 4 C and D). Furthermore, there was no additive effect on the in vitro phosphorylation when the ionotropic agonists were incubated with KIC, pointing to a similar mechanism of action.

Next, we tested the influence of ionotropic glutamate receptor antagonists on the effects of KIC, in order to better evaluate the involvement of ionotropic receptors in such effect. Cortical slices from 9- and 21- day-old rats were incubated with 1 mM KIC following preincubation with DL-AP5 (competitive NMDA ionotropic antagonist) or CNQX (kainate and AMPA ionotropic antagonist). The results show that the inhibitory effect of the acid on the ^{32}P in vitro incorporation into the cytoskeletal proteins in 9-day-old and the stimulatory effect in 21-day-old rats were reversed (Figure 5 A and B). Taken together, these results strongly indicate that KIC alters the in vitro phosphorylation of IF proteins in the cerebral cortex of rats in a developmentally regulated manner, and that such effects are mediated by specific ionotropic receptors in young animals. On the other hand, in adult animals, KIC alters the ^{32}P in vitro incorporation into IF proteins by mechanisms other than glutamatergic mediated ionic channels.

Discussion

There is considerable evidence in the literature that phosphorylation of cytoskeletal proteins modulates the reciprocal interactions of their filamentous components, such as microfilaments, microtubules and intermediate filaments (Pedrotti and Islam 1996). In this scenario, it has been demonstrated that the cAMP-dependent phosphorylation of the neurofilament proteins NF-L and NF-M inhibits their coassembly into filaments *in vitro* (Streifel et al 1996). It is also known that the phosphorylation level of the substrate protein regulates calpain-mediated hydrolysis (Litersky and Johnson 1995). Besides, a recent study demonstrated a close relationship between neurofilament phosphorylation and axonal caliber (Martin et al 1998) and alterations in protein phosphorylation have been shown in Alzheimer's disease (Iqbal et al 1994) and following exposure to various neurotoxicants, such as tri-*o*-cresyl phosphate, carbon disulfide and glycidamide (Jensen et al 1992, Reagan et al 1995, Wilmarth et al 1993). All this strongly indicates that aberrant cytoskeletal phosphorylation/dephosphorylation have serious consequences for cellular function and structure and may be one of the mechanisms causing neuronal damage in neurodegenerative pathologies.

In the present study we demonstrated that KIC affects the *in vitro* ³²P incorporation into the IF proteins NF-M, NF-L, vimentin and GFAP from cerebral cortex of young rats in a developmentally regulated manner. The *in vitro* phosphorylation of the cytoskeletal proteins studied decreased up to day 12, was not altered at day 15, and increased in cerebral cortex of 17- and 21- day-old rats incubated in the presence of various concentrations of KIC similar to those found in physiological fluids of MSUD patients. We also observed that 1 mM glutamate mimicked KIC effects

in cortical slices of young animals. However, differently from glutamate, KIC continued to stimulate the in vitro ^{32}P incorporation into the proteins from cerebral cortex of 60-day-old animals. When we incubated cortical slices of young animals (9- to 21-day-old) with KIC plus glutamate, the effect was not additive, suggesting that KIC and glutamate act through the same mechanism. Moreover, by using glutamate receptor agonists and antagonists, we showed that the inhibitory effect observed in cerebral cortex from rats aged up to 12 days was mediated by the ionotropic receptors NMDA, AMPA and kainate, whereas at days 17 and 21 the stimulatory effect of KIC was only mediated by NMDA and AMPA receptors. On the other hand, metabotropic glutamate receptors did not influence the in vitro ^{32}P incorporation into the IF proteins NF-M, NF-L, vimentin and GFAP per se or produced by KIC, indicating the specificity of the mechanism of KIC action directed towards ionotropic receptors.

Our findings are in line with other studies demonstrating that phosphorylation of cytoskeletal proteins can be modulated by glutamate receptors activation in a developmentally regulated manner. Studies using specific agonists of glutamate receptors have shown that glutamate activates GFAP phosphorylation in immature but not in adult rats via group II metabotropic glutamate receptor (mGluR) in hippocampus (Rodnight et al 1997).

We have recently demonstrated that two other toxic metabolites – methylmalonate and propionate – accumulating in the neurometabolic disorders methylmalonic and propionic acidemia respectively stimulated the phosphorylation system associated with cytoskeletal proteins in cerebral cortex of 17-day-old rats. We demonstrated that NMDA receptors are involved in such effects (de Mattos-Dutra et al 2000). Therefore, it appears that activation of different receptors in brain may elicit distinct responses in protein phosphorylation.

The exact consequences of the effects of KIC on the in vitro phosphorylation of IF proteins through the glutamatergic system are still obscure. However, taking into consideration that 1) glutamate receptors (GluRs) play a major role in processes of synaptic plasticity such as long-term potentiation related to learning/memory and synapse formation during development; 2) that excessive activation of GluRs leading to cell damage and death occurs in acute pathological situations such as ischemia, head trauma and epileptic seizures (Ozawa et al 1998) and is associated with the cerebral pathology of chronic neurodegenerative disorders (Choi, 1988, Sharp and Ross, 1996), and; 3) that glutamate elicits second-messenger systems that ultimately serve to activate protein kinases, it is plausible that deregulation (under or overstimulation) of these receptors may affect phosphorylation of key proteins closely linked to cell structure and function which will ultimately give rise to brain damage.

MSUD is an inherited neurodegenerative metabolic disorder characterized by severe impairment of CNS function (Chuang and Shih, 2001). Although some neurochemical effects of the metabolites appearing in high concentrations in MSUD have been reported, the mechanisms of neurotoxicity of the disorder are not well understood (Tashian, 1961, Howell and Lee, 1963, Land et al., 1976). However, since elevation of plasma concentrations of Leu and its alpha-keto acid KIC, the major metabolites accumulating in this disorder, are correlated with the appearance of neurological symptomatology, they are considered to be the main neurotoxic metabolites in MSUD (Chuang and Shih, 2001).

Thus, our present results, showing that KIC inhibits or stimulates the phosphorylation of important brain proteins related to cellular structure and function in a developmentally-controlled manner and that these effects are probably mediated by

ionotropic glutamate receptors, may help to elucidate the molecular and regulatory mechanisms related to the neurological damage of MSUD patients.

The exact explanation for the differential effects of KIC (and glutamate) on the cytoskeletal protein phosphorylation as a function of postnatal age is unknown and still needs to be established. However, it may be related to the distinct regional and temporal patterns of expression of types and subtypes of glutamate receptors, even though a direct relationship between our results and the ontogenetic expression of the ionotropic receptors described in the literature is not always evident. Thus, Sanderson and Murphy (1981) described a significant rise in the total number of glutamate binding sites up to 20 days postnatally in cerebral cortex of rats, followed by a more gradual rise to adult levels at 50 days. Greenamyre et al (1990) in turn described a progressive 500-1100% increase in glutamate binding in entorhinal cortex of rats during development. Therefore, although the developmentally regulated function of these receptors is controversial and depends on the cerebral region and the cell type, it has been shown that the expression patterns of glutamate receptor subunit genes change during the ontogeny of the brain (McDonald et al 1988, Pellegrini-Giampietro et al 1991, Ozawa et al 1998, McDonald et al 1988) and this may be related to the findings of the present study.

In addition to the importance of the ontogenetic development of glutamate receptors on the phosphorylating system associated to the cytoskeleton, we cannot exclude variable activities of protein kinases and phosphatases during postnatal development.

The reasons why glutamate does not mimick the effect of KIC in the cerebral cortex of adult rats is not yet clear. On the other hand, the alterations of phosphorylation of the cytoskeletal proteins studied mediated by ionotropic glutamate receptors rather

than metabotropic receptors indicate that these alterations were related to changes in intracellular ions (Ca^{2+} and Na^+) which could lead to activation of protein kinases and/or phosphatases. Studies are underway in our laboratory to elucidate what enzyme activities are involved.

It is difficult to extrapolate our results to the human condition. However, considering the evidences in the literature showing that alterations of cytoskeletal proteins may lead to disorganization of cellular structure, it is tempting to speculate that this may be one of the factors associated with the neurodegeneration and cerebral atrophy characteristic of MSUD patients. Whether this effect or other abnormalities are the principal cause of the neurologic manifestations of these patients remains an open question. Nevertheless, these findings may be of value to understand the neurological features observed in affected individuals.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESq-UFRGS).

References

- Branco T, Meirelles R, Bevilaqua da Rocha B, de Mattos-Dutra A, Wajner M and Pessoa-Pureur R (2000): Alpha-ketoisocaproate increases the in vitro ³²P Incorporation into intermediate filaments in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11: 3546-3550.
- Choi DW (1988): Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.
- Chuang DT and Shih VE (2001): Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism., in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WL, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York. pp 1971-2005.
- Duvoisin RM, Zhang C and Ramonell K (1995): A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci* 15: 3075-3083.
- Greenamyre JT, Higgins DS, Young AB and Penney JB (1990): Regional ontogeny of a unique glutamate recognition site in rat brain: an autoradiographic study. *Int J Dev Neurosci* 8: 437-445.
- Hashimoto R, Nakamura Y, Goto H, Wada Y, Sakoda S, Kaibuchi K, et al (1998): Domain- and site- specific phosphorylation of bovine NF-L by Rho-associated kinase. *Biochem. Biophys Res Commun* 245: 407411.
- Hirano A (1991): Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland L.P., ed. *Advances in Neurology: Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases*. New York, Raven Press, vol 56, pp 91-101.
- Holmann M and Heinemann SH (1994): Clone glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.

- Howell RK and Lee M (1963): Influence of alpha-ketoacids on the respiration of brain in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 113: 660-663.
- Inada H, Goto H, Tanabe K, Nishi Y, Kaibuchi K and Inagaki M (1998): Rho-associated kinase phosphorylates desmin, the myogenic intermediate filament protein, at unique amino-terminal sites. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 21-25.
- Inagaki M, Nishi Y, Nishizawa K, Matsuyama M and Sato C (1987): Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature* 328: 649-652.
- Inagaki M, Gonda Y, Nishizawa K, Kitamura S, Sato C, Ando S et al (1990): Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro located in a non-alpha-helical head domain. *J Biol Chem* 265: 4722-4729.
- Iqbal K, Zaidi T, Bancher C and Grudke-Iqbal I (1994): Alzheimer paired helical filaments: Restoration of the biological activity by dephosphorylation. *FEBS Letters* 349: 104-108.
- Ishida M, Saitoh T and Shinozaki H (1993): A new metabotropic glutamate receptor agonist: developmental change of its sensitivity to receptors in the newborn rat spinal cord. *Neurosci Lett* 160: 156-158.
- Jensen K F, Lapadula DM, Knoth-Anderson J, Haykal-Coates N and Abou-Donia MB (1992): Anomalous phosphorylated neurofilament aggregations in central and peripheral axons of hens treated with tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP). *J. Neurosci Res* 33: 455-460.
- Ku N-O and Omary MB (1997): Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. *J Biol Chem* 272: 7556-7564.

- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277 : 680-685.
- Land JM, Mowbray J, Clark JB (1976): Control of pyruvate and β -hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J Neurochem* 26: 823-830.
- Litersky JM and Johnson GVW (1995): Phosphorylation of tau in situ: Inhibition of calcium-dependent proteolysis. *J. Neurochem.* 65 : 903-911.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-267.
- Martin R, Door R, Ziegler A, Warchol W, Hahn J and Breitig D (1998): Neurofilament phosphorylation and axon diameter in the squid giant fibre system. *Neuroscience* 88: (1998) 327-336.
- de Mattos-Dutra A, Meirelles R, da Rocha BB, Kommers T, Wofchuk ST, Wajner M and Pessoa-Pureur R (2000): Methylmalonic and propionic acids increase the in vitro incorporation of ^{32}P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats through NMDA glutamate receptors. *Brain Res.* 856: 111-118.
- McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV (1988): Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res* 459: 200-203.
- Nakajima Y, Ikawabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno ON and Nakanishi S (1993): Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGLUR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-Phosphonobutyrate. *J Biol Chem* 268: 11868-11873.

- Nakanishi S and Masu M (1994): Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Ann Rev Biophys Biomol Structure* 23: 319-348.
- Nixon RA and Sihag RK (1991): Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci* 14: 501-506.
- Ozawa S, Kamyia H and Tsuzuki K (1998): Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progr Neurobiol* 54: 581.
- Paz, MM, Valente GB, Tasca C, de Mattos AG and Pessoa-Pureur R (1991): Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex. *J Nutr* 121: 1349-1354.
- Pedrotti B and Islam K (1996): Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microtubules. *FEBS lett* 388: 131-133.
- Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MVL, Zukin RS (1991): Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: An in situ hybridization study. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4157-4161.
- Peter M, Sanghera JS, Pelech SS and Nigg EA (1992): Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34 cdc2. *Eur J Biochem* 205: 287-294.
- Pin JP and Duvoisin R (1995): Neurotransmitter receptors I -The metabotropic glutamate receptors:structure and functions. *Neuropharmacol* 34: 1-26.
- Reagan KE, Wilmarth KR, Friedman MA and Abou-Donia MB (1995): In vitro calcium and calmodulin-dependent kinase-mediated phosphorylation of rat brain and spinal cord neurofilament proteins is increased by glycidamide administration. *Brain Res* 671: 12-20.

- Rodnight R, Gonçalves CA, Wofchuk ST and Leal R (1997): Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidid protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res* 30: 325-338.
- Sanderson C and Murphy S (1981): Glutamate binding in the rat cerebral cortex during ontogeny. *Brain Res* 254: 329-339.
- Schmidt ML, Martin JÁ, Lee VMY, Trojanowski JQ, (1996): Convergence of Lewy bodies and neurofibrillary tangles in amygdala neurons of Alzheimer's disease and Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 91: 475-481.
- Sharp AH and Ross CA (1996): Neurobiology of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 3: 3-15.
- Sihag RK and Nixon RA (1990): Phosphorylation of the amino terminal head domain of the middle molecular mass 145 kDa subunit of neurofilaments. *J Biol Chem* 265: 4166-4171.
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman B (1964): Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454-472.
- Soussan L, Barzilai A, and Michaelson DM (1994): Distinctly phosphorylated neurofilaments in different classes of neurons. *J Neurochem* 62: 770-776.
- Streifel DT, Avalos RT and Cohlberg JÁ (1996): CAMP dependent phosphorylation of neurofilament proteins NF-L and NF-M inhibits their coassembly into filaments in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 646-651.
- Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N and Nakanishi S (1993): Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGLUR3 and

mGLUR4. *J Neurosci* 13: 1372-1378.

Tanaka J, Ogawara M, Ando S, Shibata M, Yatani R, Kusagawa M, et al (1993): Phosphorylation of a 62 kd porcine alpha-internexin, a newly identified intermediate filament protein. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 115-123.

Tashian RE (1961): Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. *Metabolism* 10: 393-402.

Trojanowski JQ, Schmidt ML, Shin R-W, Bramblett GT, Rao D, Lee VM (1993): Altered tau and neurofilament proteins in neurodegenerative diseases: diagnostic for Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Brain Pathol* 3: 137-143.

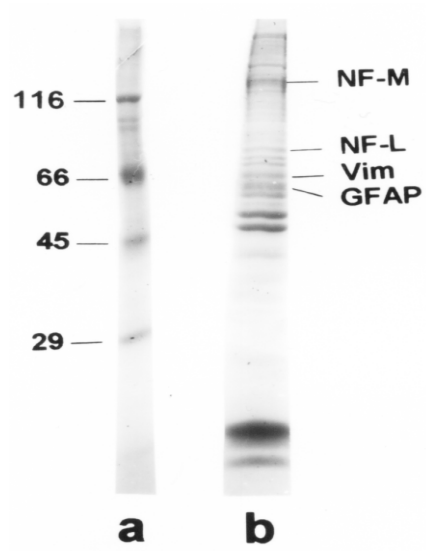
Yano S, Fukunaga K, Ushio Y, and Miyamoto E (1994): Activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and phosphorylation of intermediate filament proteins by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 269: 5428-5439.

Wilmarth KR, Viana ME and Abou-Donia MB (1993): Carbon disulfide inhalation increases Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase phosphorylation of cytoskeletal proteins in the rat central nervous system. *Brain Res* 628: 293-300.

Wofchuk ST and Rodnight R (1994): Glutamate stimulates the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of immature hippocampus via a metabotropic receptor. *Neurochem Int* 24: 517-523.

Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and autoradiograph of the cytoskeletal fraction. A) Lane a, SDS-PAGE of molecular weight standards (kDa). lane b, SDS-PAGE of the cytoskeletal fraction of cerebral cortex of 17-day-old rats. The gel was stained with Coomassie blue R-250. NF-M, middle molecular weight neurofilament subunit; NF-L, low molecular weight neurofilament subunit; Vim, vimentin, GFAP, glial fibrillary acidic protein. B) autoradiograph of the Triton-insoluble intermediate filament enriched cytoskeletal fraction from a 21 day-old rat.

A



B

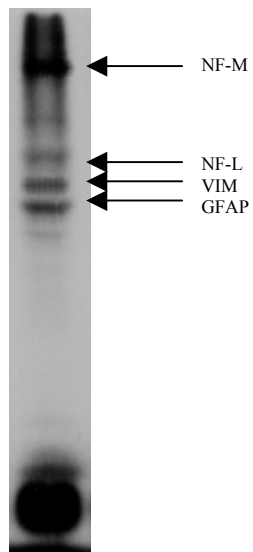
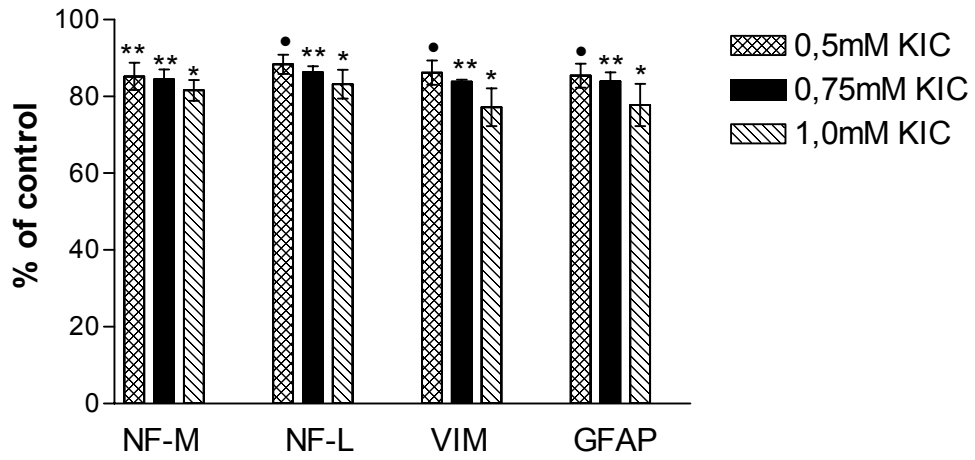
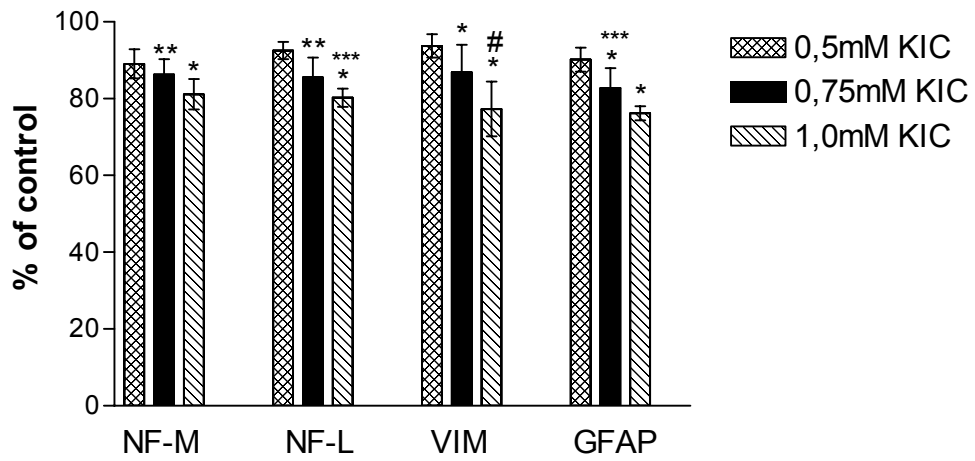
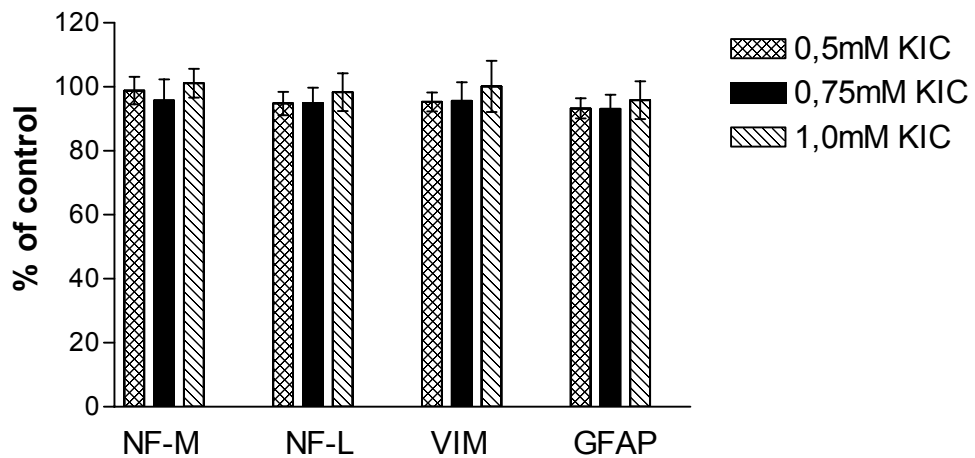


Figure 2. Effect of different concentrations of KIC on the in vitro phosphorylation of neurofilament subunits, vimentin and glial fibrillary acidic protein of the cerebral cortex of (A) 9-, (B) 12-, (C) 15-, (D) 17-, (E) 21- and (F) 60-day-old rats. Slices of cerebral cortex were incubated with 0.5, 0.75 or 1 mM KIC in the presence of ^{32}P -orthophosphate. The cytoskeletal fraction was extracted and the radioactivity incorporated into middle molecular neurofilament subunit (NF-M), low molecular neurofilament subunit (NF-L), vimentin (vim) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was measured as described in Material and Methods. Data are reported as means \pm SEM of 8-10 animals in each group expressed as percentage of controls. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple variation test, are indicated. Control: * $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. KIC 0.5 mM: # $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, *** $P < 0.05$.

A**B****C**

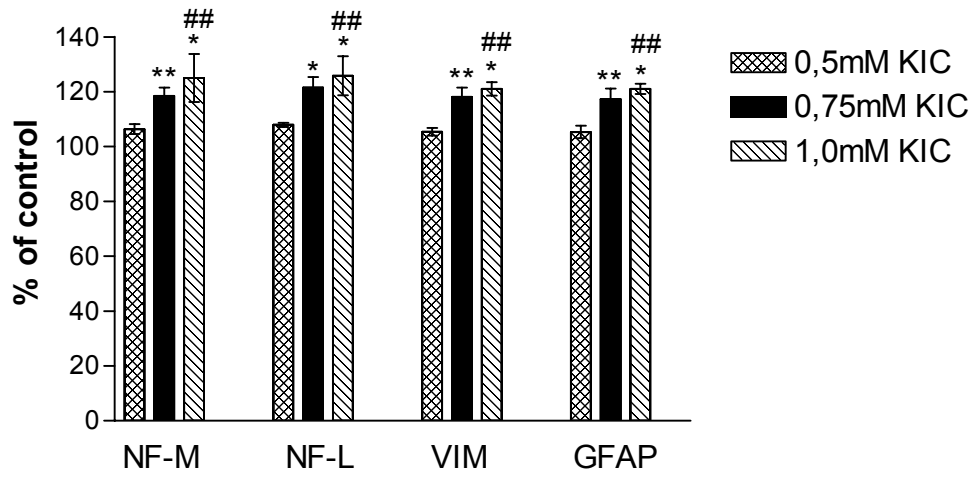
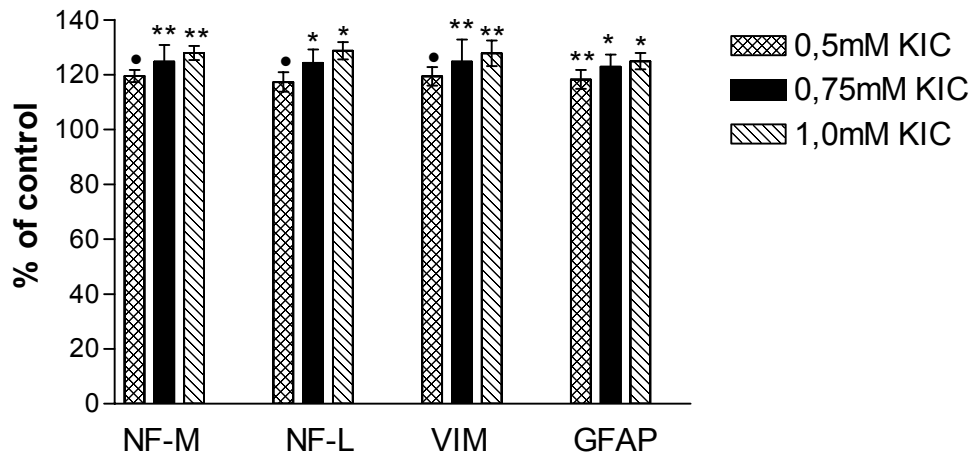
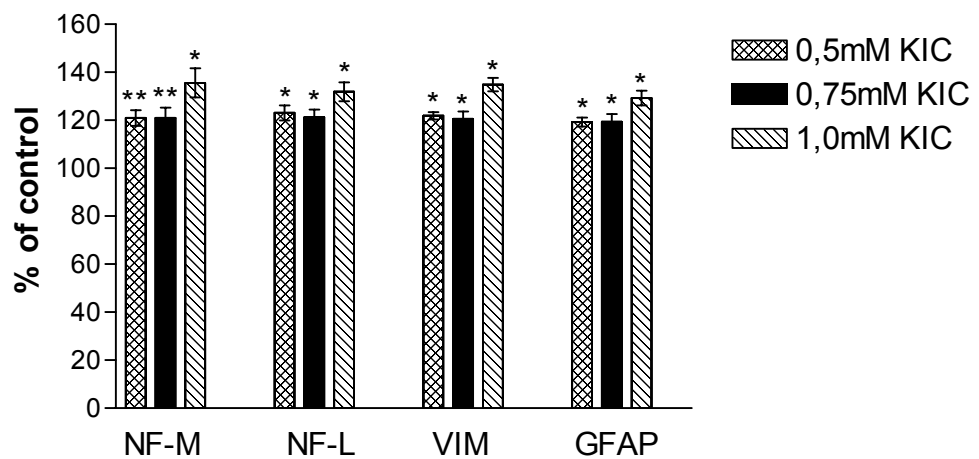
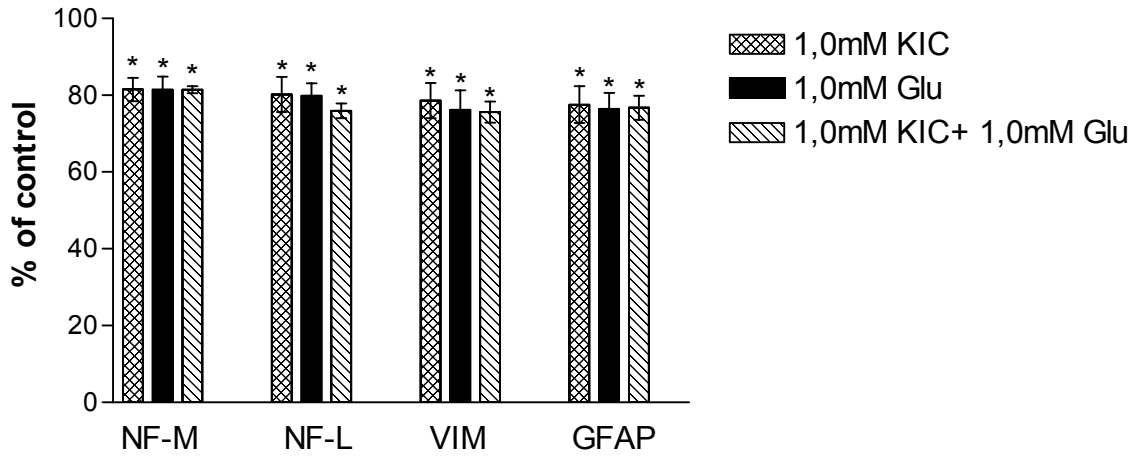
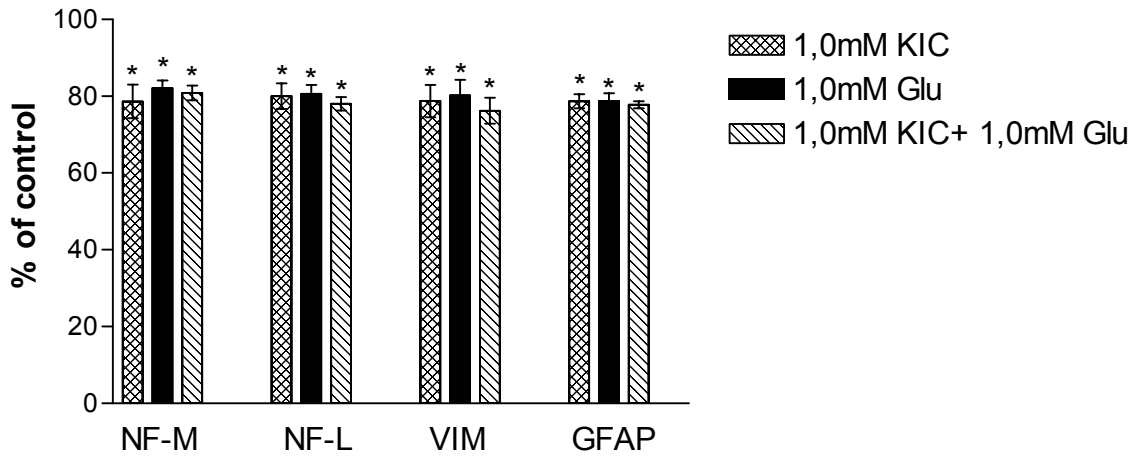
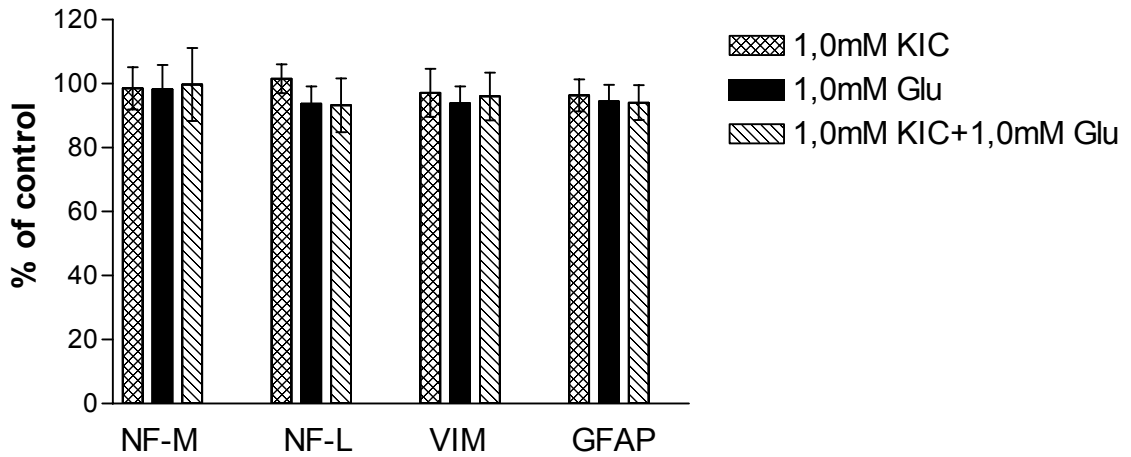
D**E****F**

Figure 3. Effect of KIC and glutamate on the phosphorylation of neurofilament subunits, vimentin and glial fibrillary acidic protein of the cerebral cortex of (A) 9-, (B) 12-, (C) 15-, (D) 17-, (E) 21- and (F) 60-day-old rats. Slices of cerebral cortex were incubated with 1.0 mM KIC or 1.0 mM glutamate in the presence of ^{32}P -orthophosphate. In some experiments slices were incubated with KIC plus glutamate. The cytoskeletal fraction was extracted and the radioactivity incorporated into middle molecular neurofilament subunit (NF-M), low molecular neurofilament subunit (NF-L), vimentin (vim) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was measured as described in Material and Methods. Data are reported as means \pm SEM of 8-10 animals in each group expressed as percentage of controls. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple variation test, are indicated: * $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

A**B****C**

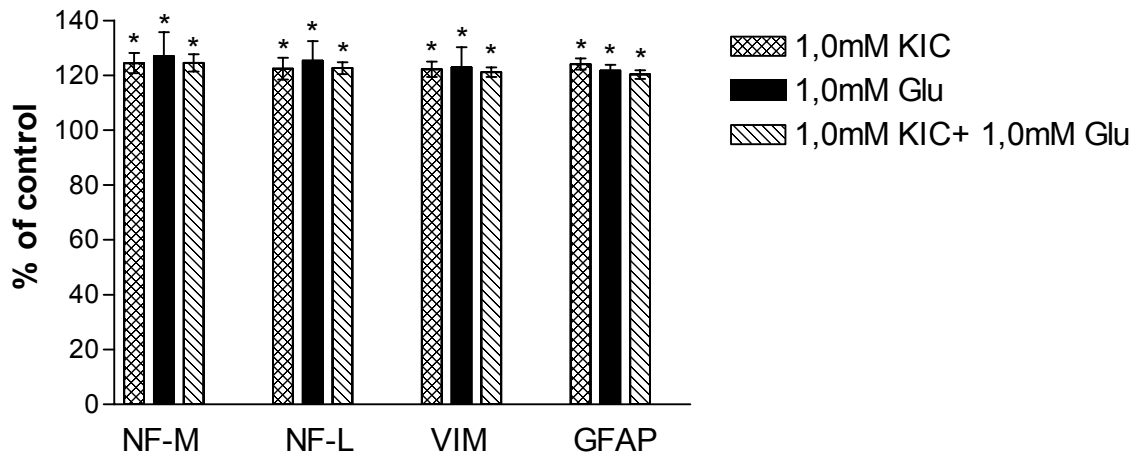
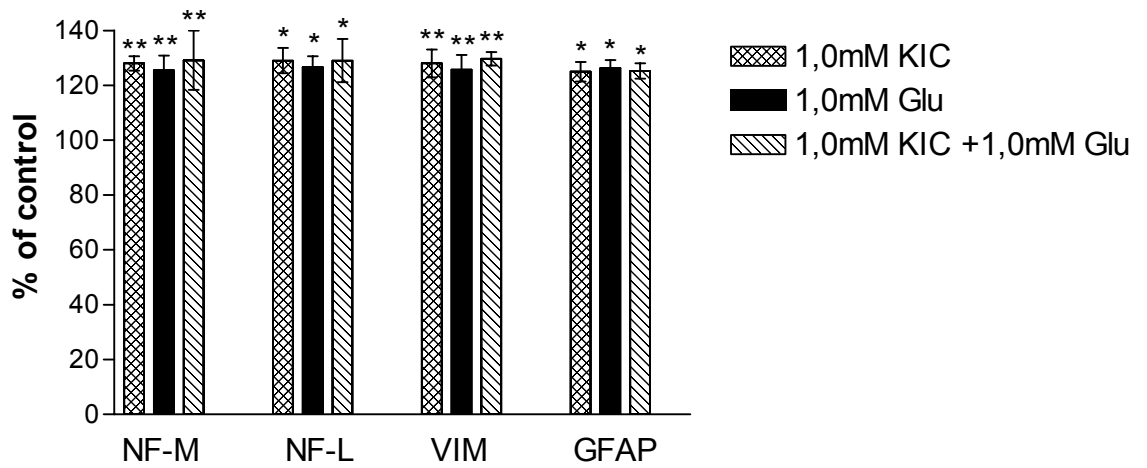
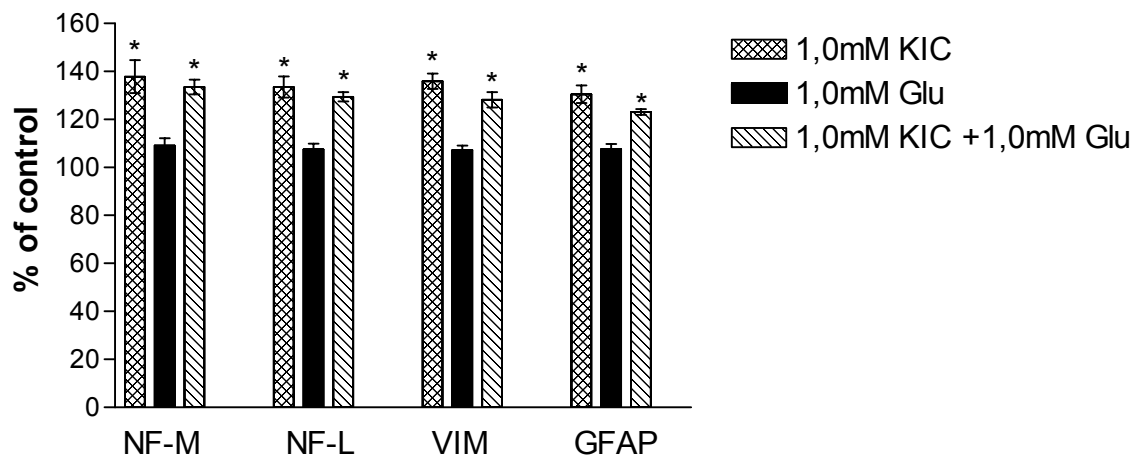
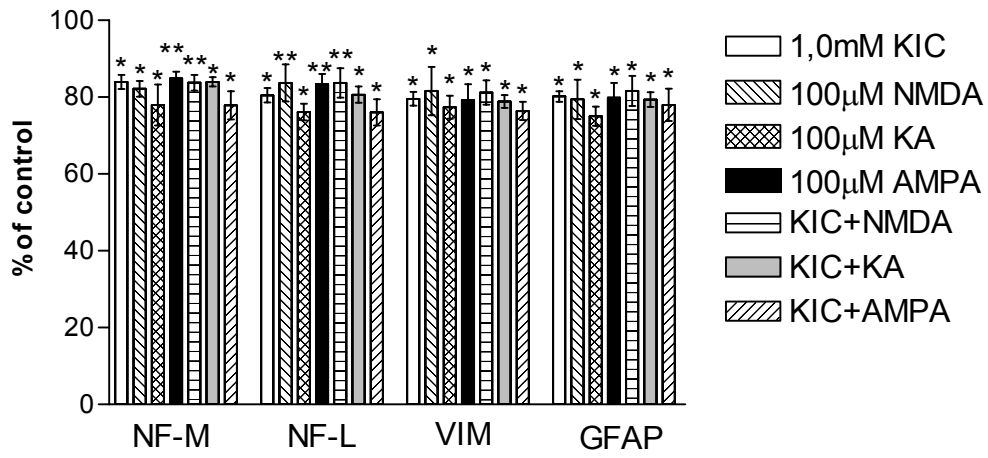
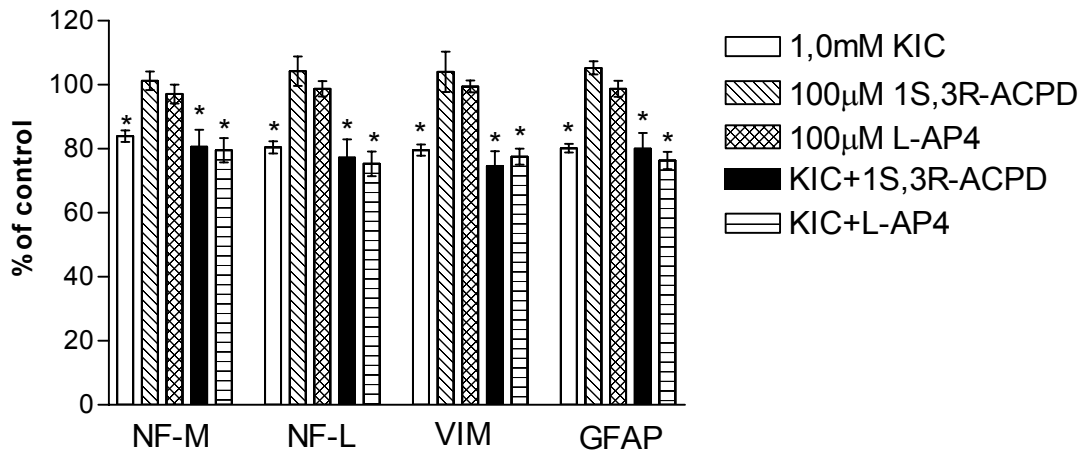
D**E****F**

Figure 4. Influence of ionotropic or metabotropic glutamatergic agonists on the effects elicited by KIC on the in vitro phosphorylation of neurofilament subunits, vimentin and glial fibrillary acidic protein. Slices of cerebral cortex of 9- (A and B) or 21- (C and D) day-old rats were incubated with either 1 mM KIC, one of the ionotropic agonists 100 μ M NMDA, 100 μ M AMPA or 100 μ M kainate (A and C), or the metabotropic agonists 100 μ M (1S,3R) ACPD or 100 μ M L-AP4 (B and D), or with KIC plus one of the specific glutamatergic agonists in the presence of 32 P-orthophosphate. The cytoskeletal fraction was extracted and the radioactivity incorporated into middle molecular weight neurofilament subunit (NF-M), low molecular weight neurofilament subunit (NF-L), vimentin (vim) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was measured as described in Material and Methods. Data are reported as means \pm SEM of 6-8 animals in each group, expressed as percentage of controls. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple variation test, are indicated: *P<0.001, **P<0.01

A**B**

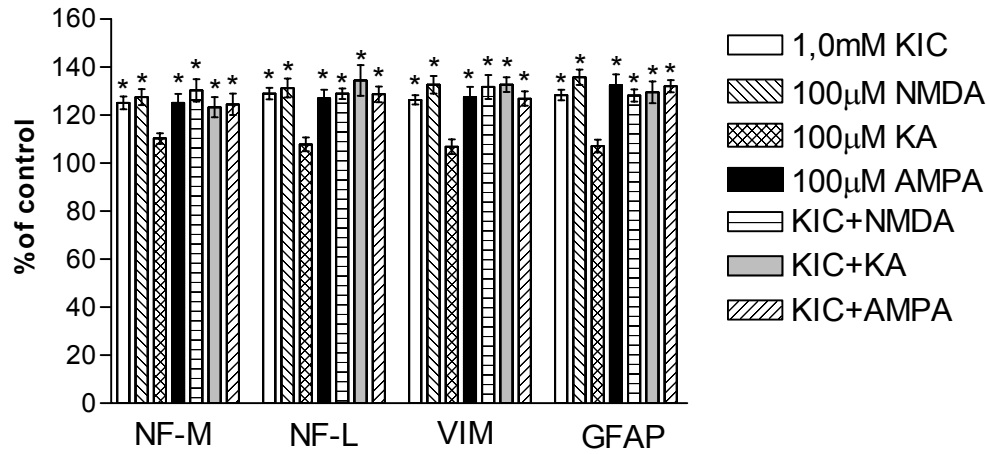
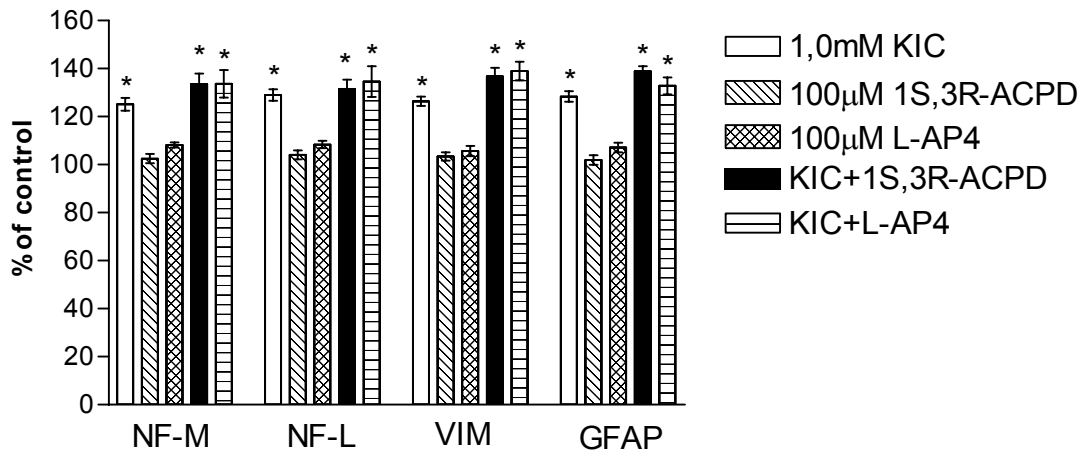
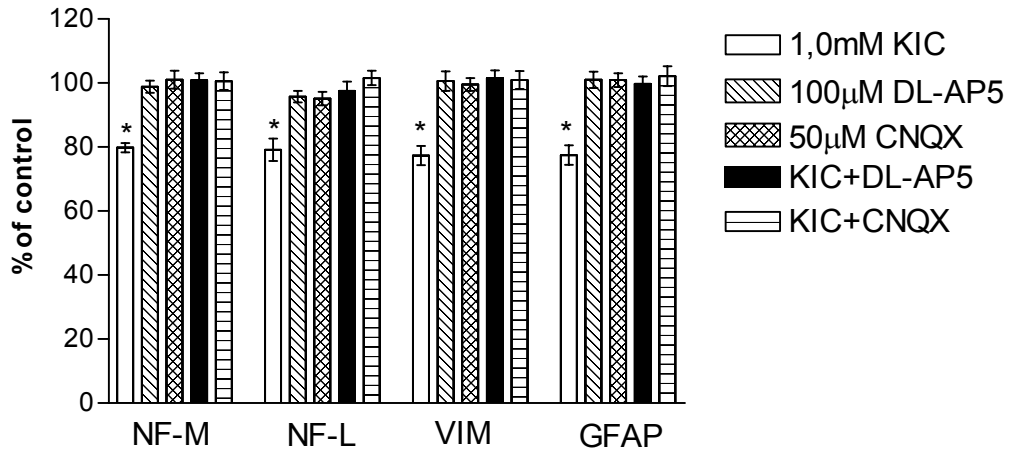
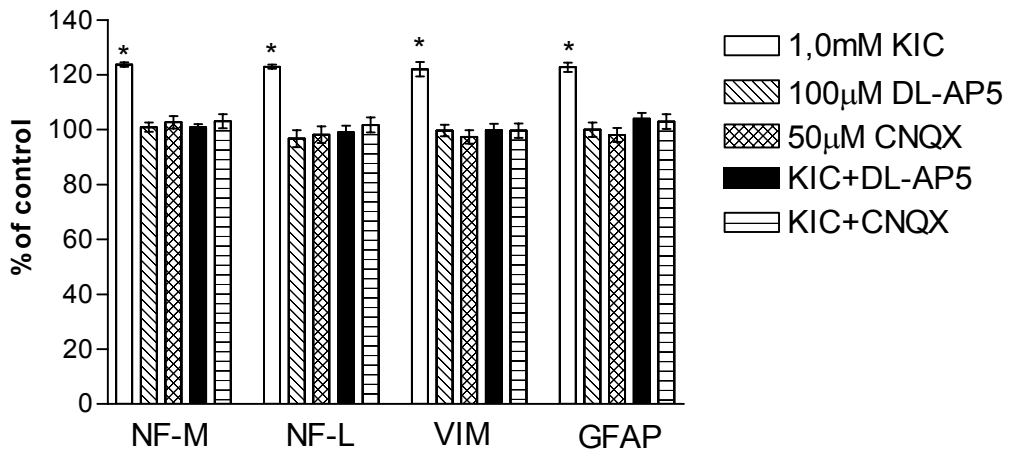
C**D**

Figure 5. Influence of the NMDA antagonist DL-AP5 and the AMPA and kainate antagonist CNQX on the effects elicited by KIC on the in vitro phosphorylation of neurofilament subunits, vimentin and glial fibrillary acidic protein. Slices of cerebral cortex of 9- (A) and 21- (B) day-old rats were first preincubated with 100 μ M DL-AP5 or 50 μ M CNQX, the medium was changed and slices were incubated again with either KIC, one of the antagonists and KIC plus the antagonists in the presence of 32 P-orthophosphate. The cytoskeletal fraction was obtained and the radioactivity incorporated into NF-M, NF-L, vimentin and GFAP was measured as described in Material and Methods. Data are reported as means \pm SEM of 6-8 animals in each group, expressed as percentage of controls. Statistically significant differences from controls, as determined by the one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple variation test, are indicated: * $P < 0.001$.

A**B**

7- DISCUSSÃO

Existem várias evidências na literatura de que a fosforilação das proteínas do citoesqueleto modula as interações entre os seus próprios componentes, tais como microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários (Pedrotti & Islam, 1996). Desta forma, tem sido demonstrado que a fosforilação dependente de AMPc dos neurofilamentos NF-L e NF-M inibe sua polimerização *in vitro* (Streifel et al, 1996). Sabe-se também que o nível de fosforilação dos substratos protéicos é regulado por hidrólise mediada por calpaína (Litersky & Johnson, 1995).

Além disso, estudos recentes demonstram que há uma relação entre fosforilação dos neurofilamentos e calibre axonal (Martin et al, 1998) e que existem alterações de fosforilação de proteínas na Doença de Alzheimer (Iqbal et al, 1994) e também quando estas são expostas a várias neurotoxinas, como fosfato de tri-*o*-cresil, disulfato de carbono e glicidamida (Jensen et al, 1992; Reagan et al, 1995, Wilmarth et al, 1983). Ainda, substâncias como o alumínio (Jonhson & Jope, 1988), β , β -iminodipropilnitrila (IDPN) e 2,5-hexanediona (Carden et al, 1986; Carden et al, 1987) induzem o acúmulo de neurofilamentos e aumentam o seu estado de fosforilação, o que pode estar relacionado com a capacidade de polimerização ou com a diminuição de proteólise que ocorre quando os neurofilamentos encontram-se altamente fosforilados (Pant, 1988).

Além da sensibilidade a agentes neurotóxicos e o envolvimento com doenças neurodegenerativas, as proteínas do citoesqueleto podem ser afetadas pela restrição protéica imposta durante o período de rápido crescimento cerebral. Modelos experimentais de desnutrição protéica em animais foram desenvolvidos para estudar seu efeito sobre a expressão e regulação das proteínas do citoesqueleto. A desnutrição protéica imposta

durante o período crítico de desenvolvimento aumenta a expressão das subunidades dos neurofilamentos em diferentes estruturas cerebrais (De Mattos et al, 1993).

Diferenças no estado de fosforilação dos neurofilamentos podem estar relacionadas à mudança de estrutura e de organização observadas nos neurofilamentos (Gotow et al, 1992).

Todos estes fatores indicam que a fosforilação/desfosforilação aberrante das proteínas do citoesqueleto têm sérias conseqüências na função e estrutura celular e podem ser um dos mecanismos que causam dano neural nas doenças neurodegenerativas.

No presente trabalho nós demonstramos que o CIC afeta a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas de filamento intermediário NF-M, NF-L, vimentina e GFAP de córtex cerebral de ratos de maneira dependente do desenvolvimento. A fosforilação *in vitro* das proteínas de citoesqueleto estudadas diminuiu até 12 dias, não foi alterada em ratos de 15 dias e aumentou em ratos de 17, 21 e 60 dias, quando as fatias de córtex cerebral eram incubadas na presença de várias concentrações de CIC. As concentrações utilizadas neste trabalho são similares às encontradas nos fluidos fisiológicos de pacientes com DXB (Chuang & Shih, 2001). Nós também observamos que o glutamato 1mM mimetizou os efeitos do CIC em fatias cerebrais nos animais jovens. Entretanto, diferentemente do glutamato, o CIC continuou a estimular a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas de córtex cerebral de animais de 60 dias.

Por outro lado, quando incubamos fatias de córtex cerebral de animais jovens (9 a 21 dias) com CIC mais glutamato, o efeito não foi aditivo, sugerindo que o CIC e o glutamato agem através dos mesmos mecanismos. Além disso, usando agonistas e antagonistas dos receptores glutamatérgicos, nós demonstramos que o efeito inibitório observado em

córtex cerebral de ratos até 12 dias era mediado por receptores ionotrópicos dos subtipos NMDA, AMPA e cainato, enquanto que nos animais de 21 dias o efeito estimulatório do CIC foi somente mediado pelos receptores ionotrópicos dos subtipos NMDA e AMPA. Entretanto, receptores glutamatérgicos metabotrópicos não influenciaram a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas de filamento intermediário NF-M, NF-L, vimentina e GFAP, indicando a especificidade do mecanismo de ação do CIC envolvendo receptores ionotrópicos.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que demonstram que a fosforilação das proteínas do citoesqueleto pode ser modulada por ativação de receptores glutamatérgicos de maneira dependente do desenvolvimento. Estudos usando agonistas específicos dos receptores glutamatérgicos demonstram que o glutamato ativa a fosforilação de GFAP em hipocampo de ratos imaturos, mas não em adultos, via receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo II (Rodnight et al, 1997).

Nós recentemente demonstramos que dois outros metabólitos tóxicos - metilmalonato e propionato - que se acumulam nas desordens metabólicas conhecidas como acidemias metilmalônica e propiônica, respectivamente, estimulam o sistema de fosforilação associado com as proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos de 17 dias. Nós demonstramos que somente os receptores NMDA estão envolvidos nesses efeitos (De Mattos-Dutra et al, 2000). Portanto, sugere-se que a ativação de diferentes receptores no cérebro pode levar a diferentes respostas na fosforilação de proteínas.

A fisiopatologia dos efeitos do CIC na fosforilação *in vitro* de proteínas de filamento intermediário, através do sistema glutamatérgico, ainda é obscura. Entretanto, levando-se em consideração que: 1) os

receptores glutamatérgicos (GluRs) têm papel fundamental nos processos de plasticidade sináptica tais como potenciação de longa duração, aprendizado e memória e formação da sinapse durante o desenvolvimento; 2) a ativação excessiva dos GluRs leva à lesão e até à morte celular em situações patológicas agudas, como a isquemia, o traumatismo craniano e o choque epiléptico (Ozawa et al, 1998) e é associada com patologias cerebrais de doenças neurodegenerativas crônicas (Choi, 1988; Sharp & Ross, 1996), e; 3) o glutamato evoca sistemas dependentes de segundos mensageiros que ativam proteínas quinases, sendo plausível que a desregulação desses receptores possa afetar a fosforilação de proteínas chaves, as quais são intimamente ligadas à estrutura e função celular, iniciando assim a lesão cerebral.

Os erros inatos do metabolismo formam um grupo heterogêneo de patologias originadas a partir de mutações (alterações do material genético). Determinam um defeito ou ausência na síntese de uma proteína, geralmente uma enzima, e, conseqüentemente, prejuízo da função por ela exercida. No caso do defeito estar localizado em uma enzima, ocasiona bloqueio na rota metabólica de degradação de aminoácidos, carboidratos ou lipídios. O resultado deste bloqueio pode levar ao acúmulo de substâncias tóxicas ou à falta de substâncias essenciais, ocasionando distúrbios no desenvolvimento mental e/ou físico do indivíduo (Del Rio, 1962). As doenças do metabolismo de aminoácidos têm sido muito pesquisadas em todo o mundo, principalmente por sua possibilidade de detecção precoce em recém nascidos e eventual tratamento adequado através de dietas específicas.

A DXB é uma desordem metabólica neurodegenerativa caracterizada pela severa perda de função do SNC e pelo acúmulo tecidual dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina e de seus

correspondentes α -cetoácidos de cadeia ramificada CIC, CMV e CIV (Chuang & Shih, 2001). Apesar de alguns efeitos neuroquímicos dos metabólitos que se apresentam em altas concentrações na DXB estarem sendo descritos, os mecanismos da neurotoxicidade desta doença não estão muito bem compreendidos (Tashian, 1961; Howell & Lee, 1963; Land et al, 1976). Entretanto, a elevação das concentrações plasmáticas de leucina e de seu alfa-cetoácido CIC, os metabólitos que mais se acumulam nesta desordem, está relacionada com o aparecimento dos sintomas neurológicos, sendo estes considerados os metabólitos mais tóxicos da DXB (Chuang & Shih, 2001).

Os cetoácidos de cadeia ramificada têm importante função no metabolismo cerebral. Tem sido postulado que um déficit de energia cerebral em pacientes com DXB, especialmente durante as crises, possa contribuir para o dano cerebral. Esse pressuposto baseia-se no fato de que o CIC e o CIV prejudicam a respiração celular em fatias de cérebro de ratos (Howell & Lee, 1963; Danner & Elsas, 1989). Além disso, o CIC inibe as atividades dos complexos enzimáticos piruvato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase em mitocôndrias cerebrais humanas e de ratos (Danner & Elsas, 1989).

Deste modo, nossos resultados demonstram que o CIC inibe ou estimula a fosforilação de importantes proteínas cerebrais relacionadas com a estrutura e função celular de maneira regulada pelo desenvolvimento e que estes efeitos são provavelmente mediados por receptores glutamatérgicos ionotrópicos, ajudando a elucidar os mecanismos moleculares e regulatórios relacionados com a lesão neurológica dos pacientes com DXB.

A explicação exata para os diferentes efeitos do CIC (e do glutamato) na fosforilação de proteínas do citoesqueleto em função da

idade pós-natal não é clara e ainda deve ser estabelecida. Contudo, pode ser relacionada com a expressão regional e temporal distinta dos tipos e subtipos de receptores glutamatérgicos. Uma relação direta entre nossos resultados e a expressão ontogenética dos receptores ionotrópicos descrita na literatura também não é sempre evidente. Sanderson & Murphy (1981) descreveram um aumento significativo do número total de sítios de ligação para o glutamato até 20 dias de idade, em córtex cerebral de ratos, seguido por um aumento mais gradual nos adultos até 50 dias. Greenamyre et al (1990) descreveram um aumento progressivo de 500-1100% nos sítios de ligação de glutamato em córtex entorrinal de ratos durante o desenvolvimento. Portanto, ainda que a regulação desses receptores ao longo do desenvolvimento seja controversa e dependa da região cerebral e do tipo de célula envolvida, é demonstrado que o padrão de expressão dos genes que codificam as subunidades dos receptores glutamatérgicos se modifica durante a ontogenia cerebral (McDonald et al, 1988, Pellegrini-Giampeiro et al, 1991; Ozawa et al, 1998; Mc Donald et al, 1988), podendo ser relacionada com os resultados do presente trabalho.

Além da importância da ontogenia no desenvolvimento dos receptores glutamatérgicos do sistema fosforilante associado com o citoesqueleto, nós não podemos excluir as variações nas atividades de proteínas quinases e fosfatases durante o desenvolvimento pós-natal.

As razões pelas quais o glutamato não mimetiza os efeitos do CIC no córtex cerebral dos animais adultos ainda não estão claras. Por outro lado, as alterações de fosforilação das proteínas do citoesqueleto estudadas, mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos e não por receptores metabotrópicos, indicam que as mesmas estão relacionadas com alterações nas concentrações de íons intracelulares (Ca^{+2} e Na^{+}). Estas alterações poderiam levar á ativação de proteínas quinases e/ou fosfatases. Estudos

estão em desenvolvimento em nosso laboratório para elucidar qual a atividade enzimática envolvida neste processo.

É importante salientar que nossos resultados constituem uma abordagem inédita capaz de evidenciar alterações no citoesqueleto de células de córtex cerebral de ratos em resposta a diversas concentrações de CIC em diferentes idades. Apesar das limitações inerentes aos modelos experimentais, do nosso ponto de vista, estes resultados são de grande relevância, pois abordam importantes questões a respeito do envolvimento de proteínas do citoesqueleto neuronal e células gliais na fisiopatologia das doenças genéticas.

É difícil extrapolar nossos resultados para as condições humanas. Entretanto, considerando as evidências na literatura, mostrando que alterações nas proteínas do citoesqueleto podem conduzir à desorganização da estrutura celular, é tentador especular que a alteração de fosforilação destas proteínas possa ser um dos fatores associados com a neurodegeneração e atrofia cerebral característica dos pacientes com DXB. Se estes efeitos ou outras anormalidades são as principais causas das manifestações neurológicas desses pacientes ainda não se sabe, contudo, esses resultados são muito importantes para a compreensão do aspecto neurológico observado nos indivíduos afetados.

8 – CONCLUSÕES

- 1- O ácido α -cetoisocapróico inibe a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas subunidades NF-M, NF-L, vimentina e GFAP em fatias de córtex cerebral de ratos de 09 e 12 dias, não apresenta nenhum efeito nos animais de 15 dias e aumenta a incorporação nos ratos de 17, 21 e 60 dias.
- 2- O glutamato apresenta um efeito similar ao observado para o ácido α -cetoisocapróico sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas subunidades NF-M, NF-L, vimentina e GFAP em fatias de córtex cerebral de ratos até 21 dias, sugerindo o envolvimento de receptores glutamatérgicos nesse processo, entretanto, nos animais de 60 dias, não apresenta efeito, sugerindo que na fase adulta o efeito causado pelo ácido seja mediado por outros tipos de mecanismos.
- 3- O ácido α -cetoisocapróico diminui a fosforilação das proteínas estudadas em animais de 09 dias através de receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos subtipos NMDA, AMPA e cainato e aumenta a fosforilação em ratos de 21 dias via receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos subtipos NMDA e AMPA.

9 - PERSPECTIVAS

Este trabalho abre inúmeras oportunidades de novos estudos sobre a fosforilação de proteínas de filamento intermediário no modelo experimental da Doença do Xarope do Bordo. Os principais estudos a serem seguidos são:

- ✓ Realizar estudos ontogenéticos dos efeitos do CMV e CIV sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P em proteínas de filamento intermediário de córtex cerebral de ratos.
- ✓ Caracterização dos mecanismos de ação do CMV e CIV.
- ✓ Efeitos de tratamento agudo e crônico com CIC, CIV e CMV na fosforilação *in vitro* de filamentos intermediários de fatias de córtex cerebral de ratos.
- ✓ Verificar a ação do CIC, CMV e CIV sobre a atividade de proteínas quinases e fosfatases, utilizando ativadores e inibidores específicos de quinases e fosfatases.
- ✓ Início de uma nova abordagem utilizando neuroprotetores para tentar reverter as ações causadas pelo CIC.

10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERLEY, S.; GRIERSON, A.J.; BROWNLEES, J.; THORNHIEL, P.; ANDERTON, B.H.; LEIGHT, P.N.; SHEW, C.E. AND MIELERC, C.J. Glutamate slow axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. **Journal of Cell Biology** **150**: 165-175, 2000.

ADAMS, J.P.; ROBERSON, E.D.; ENGLISH, J.D.; SELCHER, J.C. AND SWEATT, J.D. MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. **Acta Experimental Neurobiology** **60**: 377-394, 2000.

ALBERTS, B.; BRAT, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. AND WATSON, J.D. The cytoskeleton. In: **Molecular Biology of the Cell**. Alberts, B.; Brat, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J.D. (eds) 3 ed. New York, Garland Publishing, 1994. p. 787-847.

ARCHER, D.R.; WATSON, D.F. AND GRIFFIN, J.W. Phosphorylation-dependent immunoreactivity of neurofilaments and the rate of slow axonal transport in the central and peripheral axons of the rat dorsal root ganglion. **Journal of Neurochemistry** **62**: 1119-1125, 1994.

BHAT, N.R. Signal transduction mechanisms in glial cells. **Developmental Neuroscience** **17**: 267-284, 1995.

BRANCO, T.; MEIRELLES, R., BEVILAQUA DA ROCHA, B.; DE MATTOS-DUTRA, A.; WAJNER, M. AND PESSOA-PUREUR, R. Alpha-ketoisocaproate increases the in vitro ^{32}P incorporation into

intermediate filaments in cerebral cortex of rats. **Neuroreport 11:** 3546-3550, 2000.

BRUNO, V.; BONANNO, L.; KNOPFEL, T.; KUHN, R.; ROBERTS, P. AND NICOLETTI, F. Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures. **European Journal of Pharmacology 310:** 61-66, 1996.

CALAKOS, N. AND SCHELLER, R.H. Synaptic vesicle biogenesis, docking and fusion: a molecular description. **Physiology Reviews 76:** 1-29, 1996.

CARDEN, M.J.; SCHLAEPFER, W.W. AND LEE, V.M. The structure, biochemical properties and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. **Journal of Biological Chemistry 259:** 9805-9817, 1985.

CARDEN, M.J.; LEE, V.M. AND SCHLAEPFER, W.W. 2,5-Hexanedione neuropathy is associated with covalent crosslinking of neurofilament proteins. **Neurochemistry Pathology 5:** 15-35, 1986.

CARDEN, M.J.; TROJANOWSKI, J.Q.; SCHLAEPFER, W.W. AND LEE, V.M.Y. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation. **Journal of Neuroscience 7:** 3489-3505, 1987a.

CARDEN, M.J.; GOLDSTEIN, M.; BRUCE, J.; COOPER, H. AND SCHLAEPFER, W.W. Studies of neurofilaments that accumulate in

proximal axon of rat intoxicated with β,β' -iminodipropionitrile (IDPN).
Neurochemistry Pathology 7: 189-205, 1987b.

CARMIGNOTO, G. Reciprocal communication system between astrocytes and neurones. **Progress in Neurobiology 62:** 561-581, 2000.

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

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron 1:** 623-634, 1988.

CHUANG, D.T. AND SHIH, V.E.. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds). Mc Graw Hill, New York , 1995. p. 1239-1277.

CHUANG, D.T. AND SHIH, V.E. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism.. In: **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.L.; Valle, D. (eds). McGraw-Hill, New York, 2001. p. 1971-2005.

CLARK, E.A. AND LEE, V.M. Dynamics of mammalian high molecular weight neurofilament subunit phosphorylation in cultured rat sympathetic neurons. **Journal of Neuroscience Research 30:** 116-123, 1991.

COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. **Trends in Biochemical Science** **17**: 408-413, 1992.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Research Reviews** **32**: 476-509, 2000.

COULOMBE, P.A., BOUSQUET, O.; MA, L.; YAMADA, S. AND WIRTZ, D. The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. **Trends Cell Biology** **10**: 420-428, 2000.

DANNER, D.J. AND ELSAS, J.L. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds). New York: Mc Graw Hill, 1989. p. 671-692.

DE FREITAS, M.S.; DE MATTOS-DUTRA, A.; SCHRÖDER, N.; WANNMACHER, C.M.D. AND PESSOA-PUREUR, R. Effect of hiperphenylalaninemia chemically induced on in vitro incorporation of developing rats. **Experimental Neurobiology** **143**: 188-195, 1997.

DE MATTOS, A.G.; CAMARGO, M.M.; DE FREITAS, M.S. AND PUREUR, R.P. Malnutrition increases neurofilament subunit concentration in rat cerebellum. **Jounal of Nutritional Biochemistry** **4**: 644-650, 1993.

DE MATTOS-DUTRA, A.; DE FREITAS, M.S.; SCHRÖDER, N.; ZIELES, A.C.; WAJNER, M. AND PESSOA-PUREUR, R. Methylmalonic acid reduces the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in the cerebral cortex of rats. **Brain Research 763**: 221-231, 1997.

DE MATTOS-DUTRA, A.; MEIRELLES, R.; DA ROCHA, B.B.; KOMMERS, T.; WOFCHUK, S.T.; WAJNER, M. AND PESSOA-PUREUR, R. Methylmalonic and propionic acids increase the in vitro incorporation of ³²P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats through NMDA glutamate receptors. **Brain Research 856**: 111-118, 2000.

DEL RIO, R.M. **Aminoacidopatias congenitas y sus repercusiones en el desarrollo del SNC**, Madrid, 1962.

DIÁZ, J.F.; VALPUESTA, J.M.; CHACÓN, P.; DIANKUN, G. AND ANDREW, M. Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to an easy accessible site. **Journal of Biological Chemistry 273**: 33803-33810, 1998.

DINGLEDINE, R. AND MCBAIN, C.J. Glutamate and aspartate. In: **Basic Neurochemistry- Molecular, cellular and medical aspects**. Siegel, G.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Fisher, S.K. and Ulher, M.D. (eds) 6 ed. New York, Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 313-333.

DOUGLAS, P.; MOORHEAD, G.B.G.; YE, R. AND LEES-MILLER, S.P.
Protein phosphatases regulates DNA-dependent protein kinase activity.
Journal of Biological Chemistry **276**: 18992-18998, 2001

DOWNING, K.H. Structural studies on tubulin and microtubules. In:
Cytoskeleton: signalling and cellular regulation. Carraway, K.L. and
Carraway, C.A.C. New York, Oxford University Press, 2000. p. 159-
181.

DUVOISIN, R.M.; ZHANG, C. AND RAMONELL, K. A novel
metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory
bulb. **Journal of Neuroscience** **15**: 3075-3083, 1995.

ECKER, B.; DOGRIC, D.; COLUCCI-GRYON, E.; WANG, N.;
NANIOTIS, A.; INGBER, D.; MERCKLING, A.; BABINET, C. AND
KRIEG, T. Impaired mechanical stability, migration and contractile
capacity in vimentin-deficient fibroblasts. **Journal of Cellular Science**
111: 1897-1907, 1998.

ELDER, G.A.; FRIEDRICH, V.L.; BASCO, P.; KANG, C.; GOUROV, A.;
TU, P.H.; LEE, V.M.Y. AND LAZZARINI, R.A. Absence of the mid-
sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light
neurofilament (NF-L), and neurofilament content. **Journal of Cell
Biology** **141**: 727-739, 1998.

ELDER, G.A.; FRIEDRICH, V.L.; MARGITA, A. AND LAZZARINI, R.A.
Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in mid-sized
neurofilament subunit. **Journal of Cell Biology** **146**: 181-192, 1999.

ELIASSON, C.; SAHLGREN, C.; BERTHOLD, C.H.; STAKELEERG, J.; CELIS, J.E.; BETSHALTZ, C.; ERIKSSON, J.E. AND PEKNY, M. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. **Journal of Biological Chemistry** **274**: 23996-24006, 1999.

ELSAS, L.; DANNER, D.; LUBITZ, D.; FERNHOFF, P. AND DEMBURE, P. Metabolic consequences of inherited defects in branched chain alpha-ketoacid dehydrogenases: Mecanism of thiamine action. In: **Metabolism and Clinical Implications of Branched Chain Amino and Ketoacids**. Walsser, M. and Williamsom, J.R. (eds). New York: Elsevier/North Holland, 1981. p. 369-382.

FEINTEIN, D.L.; WEINMASTER, G.A. AND MILNER, R.J. Isolation of cDNA clones encoding glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. **Journal of Neuroscience Research** **32**: 1-4, 1992.

FUCHS, E. AND WEBER, K. Intermediate filaments: struture, dynamics, function and disease. **Annual Review of Biochemistry** **63**: 345-382, 1994.

FUCHS, E. AND CLEVELAND, D.W. A strutural scaffolding of intermediates filaments in health and disease. **Science** **279**: 514-519, 1998.

GALOU, M.; COLUCCI-GUYON, E.; RIDET, J.L.; ENSERGUEIX, D.; GIMENEZ, Y.; RIBOTTA, M.; PRIVAT, A.; BABINET, C. AND

DUPOUEY, P. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. **Journal of Cell Biology** **133**: 853-863, 1996.

GEISLER, N. AND WEBER, K. Self assembly in vitro of 68,000 MW triplet protein into intermediate- sized filaments. **Journal of Molecular Biology** **151**: 565-571, 1981.

GIRAULT, J.A.; HEMMINGNS JR,H.C.; WILLIANS, R.R.; NAIRN, A.C. AND GEENGARD, P. Phosphorylation of DARP-32, a dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II with microtubules. **Journal of Biological Chemistry** **264**: 21748-21759, 1989.

GOTOW, T.; TAKEDA, M.; TANAKA, T. AND HASHIMOTO, P.H. Macromolecular struture of reassembled neurofilaments are revealed by the quick-freeze deep-etch mice method, diferences between NF-M and NF-H subunits in their ability to form cross-bridges. **European Journal of Cell Biology** **58**: 331-345, 1992.

GREENAMYRE, J.T.; HIGGINS, D.S.; YOUNG, A.B. AND PENNEY, J.B. Regional ontogeny of a unique glutamate recognition site in rat brain: na autoradiographic study. **International Journal of Developmental Neuroscience** **8**: 437-445, 1990.

GREENGARD, P. Neuronal phosphoproteins: mediators of signal transduction. **Molecular Neurobiology** **1**: 81-118, 1987.

GREENGARD, P.; VALTOTORFA, F.; CZERNIK, A.J. AND BENFENATI, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science** **259**: 780-785, 1993.

GUO-ROSS, S.; YANG, E.Y.; WALSH, T.J. AND BONDY, S.C. Decrease of glial fibrillary acidic protein in rat frontal cortex following aluminum treatment. **Journal of Neurochemistry** **73**: 1609-1614, 1999.

HANSSON, E. AND RÖNNBÄCK, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. **FASEB Journal** **9**: 343-350, 1995.

HEMPEN, B. AND BRION, J.P. Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. **Journal of Neuropathology** **55**: 964-972, 1996.

HIROKAWA, N. AND TAKEDA, S. Gene targeting studies begin to reveal the function of neurofilament proteins. **Journal of Cell Biology** **143**: 1-4, 1998.

HISANAGA, S. AND HIROKAWA, N. Structure of peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. **Journal of Molecular Biology** **202**: 297-305, 1988.

HOWELL, R.K. AND LEE, M. Influence of alpha-ketoacids on the respiration of brain in vitro. **Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine** **113**: 660-663, 1963.

HUANG, Y.; ZIELKE, H.R.; TILDON, J.T.; ZIELKE, C.L.; BAAB, P.J.
Elevation of amino acids in the interstitial space of rat brain following
infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis:
Leucine infusion. **Developmental Neuroscience 18**: 415-419, 1996.

HUTON, S. AND RANNELS, S.L. Characterization of mitochondrial
transport system for branched chain α -keto acids. **Journal of Biological
Chemistry 260**: 14189-14195, 1985.

ICHIARA, A. Aminotransferases of branched-chain amino acids. In:
Transaminases. Chistie, P. and Metzler, D.E. (eds). New York: John
Wiley, 1984. p. 437-565.

IKEDA, Y. AND TANAKA, K. 2-methyl branches-chain acyl-CoA
dehydrogenase from rat liver. **Methods Enzimology 166**: 360-373,
1988.

INADA, H.; NAGATA, K.I.; GOTO, H. AND INAGAKI, M. Regulation
of intermediate filament dynamics: a novel approach using site and
phosphorilation state specific antibodies. In: **Cytoskeleton: signalling
and cellular regulation**. Carraway, K.L. and Carraway, C.A.C. New
York, Oxford University Press, 2000. p. 183-207.

INAGAKI, M.; GONDA, Y.; NISHIZAWA, K.; KITAMURA, S.; SATO,
C.; ANDO, S.; TANABE, K.; KIKUCHI, K.; TSUIKI, S. AND NISHI,
Y. Phosphorylation sytes linked the glial filament dissembly in vitro
locate in a non-alpha-helicoidal hel domain. **Journal of Biological
Chemistry 265**: 4722-4729, 1990.

INAGAKI, M.; NAKAMURA, I.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T. AND INAGAKI, M. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. **Brain Pathology** **4**: 239-243, 1994.

INGBER, D.E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. **Journal of Cell Science** **104**: 613-627, 1993.

IQBAL, K.; ZAIDI, T.; BANCHER, C. AND GRUDKE-IQBAL, I. Alzheimer paired helical filaments: Restoration of the biological activity by dephosphorylation. **FEBS Letters** **349**: 104-108, 1994.

IZQUIERDO, I.I. AND MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology Learn and Memory** **68**: 285-316, 1997.

JENSEN, K.F.; LAPADULA, D.M.; KNOTH-ANDERSON, J., HAYKAL- COATES, N. AND ABOU-DONIA, M.B. Anomalous phosphorylated neurofilament aggregations in central and peripheral axons of hens treated with tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP). **Journal of Neuroscience Research** **33**: 455-460, 1992.

JONHSON, W.A. AND CONNELLY, J.L. studies on the mutual influences of substrates on bovine α -keto acid metabolism. **Biochemistry** **11**: 2416, 1972.

JONHSON, G. AND JOPE, R. Phosphorylation of rat brain cytoskeletal proteins is increased after orally administered aluminium. **Brain Research** **456**: 95-103, 1988.

JUNG, C.; YABE, J.T. AND SHEA, T.B. C-terminal phosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit correlates with decrease neurofilament axonal transport velocity. **Brain Research** **856**: 12-19, 2000.

KAN, I.A. AND LUDUEÑA, R.F. Phosphorylation of β III tubulin. **Biochemistry** **35**: 3704-3711, 1996.

KANEKO, R.; HAGIWARA, N.; LEADER, K. AND SULOKA, N. Glial-specific cAMP response of the glial fibrillary acidic protein gene in the RT4 cell lines. **Proceedings of the National Academy of Science** **91**: 4529-4533, 1994.

KIM, C.H. AND LISMAN, J.E. A role of actin filament in synaptic transmission and long term potentiation. **The Journal of Neuroscience** **19**: 4314-4324, 1999.

KIRKPATRICK, L.L AND BRADY, S.T. Cytoskeleton of neurons and glia. In: **Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspects**. Siegel, G.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Fisher, S.K. and Ulher, M.D. (eds) 6 ed. New York, Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 155-173.

KOSAKO, H.; AMANO, M.; YANAGIDA, M. TANABE, K.; NISHI, Y.; KAIBUCHI, K. AND INAGAKI, M. Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and rho associated kinase. **Journal of Biological Chemistry** **272**: 10333-10336, 1997.

LAND, J.M.; MOWBRAY, J. AND CLARK, J.B. Control of pyruvate and β -hydroxybutirate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. **Journal of Neurochemistry** **26**: 823,830, 1976.

LAU, L.F.; HUGANI, R. Tyrosine phosphorylation. In: **Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspects**. Siegel, G.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Fisher, S.K. and Ulher, M.D. (eds) 6 ed. New York, Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 497-522.

LETERRIER, J.F.; KAS, J.; HATWIG, J.; VEGNERS, R. AND JANMEY, P.A. Mechanical effects of neurofilament cross-bridges. Modulation by phosphorylation, lipids and interactions with F-actin. **Journal of Biological Chemistry** **271**: 15687-15694, 1996.

LEWIS, S.E. AND NIXON, R.A. Multiple phosphorylated variants of the hight molecular mass subunit of neurofilaments in axons of retinal cell neurons: characterization and evidence for their differential association with stationary and moving neurofilaments. **Journal of Cell Biology** **107**: 2689-2701, 1988.

LI, B.S.; GRANT, V.P. AND PANT, H.C. Calcium influx and membrane depolarization induce phosphorylation of neurofilament (NF-M) KSP repeats in PC12 cells. **Molecular Brain Research 70**: 84-91, 1999.

LIN, C.H. AND FOSCHER, P. Growth cone advance is inversely proportional of retrograde F-actin flow. **Neuron 14**: 763-771, 1995.

LITERSKY, J.M. AND JOHNSON, G.V.W. Phosphorylation of tau in situ: Inhibition of calcium-dependent proteolysis. *Journal of Neurochemistry* 65: 903-911, 1995.

MACCIONI, R.B. AND CAMBIAZO, V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. **Physiological Reviews 75**: 835-863, 1995.

MACKAE, T.H. Tubulin post-translational modifications. Enzymes and their mechanisms of action. **European Journal of Biochemistry 244**: 265-278, 1997.

MARINOWICH, M.; VIVIANI, B. AND GALLI, C.L. Actin modifications and calcium homeostasis in neurotoxicity. The case of organotin salts. **Toxicology in Vitro 11**: 499-503, 1997.

MARTIN, R.; DOOR, R.; ZIEGLER, A.; WARCHOL, W.; HAHN, J. AND BREITIG, D. Neurofilament phosphorylation and axon diameter in the squid giant fibre system. **Neuroscience 88**: 327-336, 1998.

MATSUOKA, Y.; NISHIZAWA, K.; YANO, T.; SHIBATA, M.; ANDO, S.; TAKAHASHI, T AND INAGAKI, M. Two different protein kinase act on a different time schedule as glial filament kinases during mitosis. **EMBO Journal 11**: 2895-2902, 1992.

McCALL, M.A.; GREGG, R.G.; BEHRINGER, R.R.; BRENNER, M.; DELANEY, C.L.; GALBREATH, E.J.; ZHANG, C.L.; PEARCE, R.A.; CHIU, S.Y. AND MESSING, A. Target deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. **Proceedings of the National Academy of Science 93**: 6361-6369, 1996.

McDONALD, J.W.; SILVERSTEIN, F.S.; JOHNSTON, M.V. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. **Brain Research 459**: 200-203, 1988.

McDONALD, J. AND JOHNSON, M. Physiological and patophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Progress in Neurobiology 28**: 197-276, 1990.

McKENNA, M.C.; SONNEWALD, U.; HUANG, X.; STEVENSON, J.; JOHNSEN, S.; SANDE, L.M. AND ZIELKE, H.R. α -ketoisocaproate alters the production of both lactate and aspartate from [U-¹³C] glutamate in astrocytes: A ¹³C NMR study. **Journal of Neurochemistry 70**: 1001-1008, 1998.

MICHAELIS, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progress in Neurobiology** **54**: 369-415, 1998.

MONTEIRO, M.J.; HOFFMAN, P.N.; GEARHART, J.D. AND CLEVELAND, D.W. Expression of NF-L in both neuronal and nonneuronal cells of transgenic mice: increased neurofilament density in axons without affecting caliber. **Journal of Cell Biology** **111**: 1543-1557, 1990.

MULLINS, F.H.; HARGREVES, A.J.; LI, J.Y.; DAHLST-RÖM, A. AND McLEAN, W.G. Tyrosination states of alpha-tubulin in regenerating peripheral nerve. **Journal of Neurochemistry** **62**: 227-234, 1994.

NANSEN, E.A.; JOKEL, E.S.; LOBO, M.K.; MICEVYCH,, P.E.; ARIANO, M.A. AND LEVINE, M.S. Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in rat. **Developmental Neuroscience** **22**: 597-603, 1992.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions. **Science**, **258**: 597-603, 1992.

NAKANISHI, S.; NAKAJIMA, Y.; MASSU, M.; UEDA, Y.; NAKAHARA, K.; WATANABE, D; YAMAGUCHI, S. KAWABATA, S. AND OKADA, M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. **Brain Research Reviews** **26**: 230-235, 1998.

NESTLER, E.J. AND GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. In: **Basic Neurochemistry**. Siegel, G.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W. and Molinoff, P.B. (eds) 5 ed. New York, Raven Press, 1994. p. 449-474.

NESTLER, E.J. AND GREENGARD, P. Serine and threonine phosphorylation. In: **Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspects**. Siegel, G.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Fisher, S.K. and Ulher, M.D. (eds) 6 ed. New York, Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 471-495.

NIXON, R.A. AND SIHAG, R.K. Phosphorylation of the amino terminus head domain of the middle molecular mass 145 kDa subunit of neurofilaments. **Journal of Biological Chemistry** **265**: 4166-4171, 1990.

NIXON, R.A. AND SIHAG, R.K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. **Trends Neuroscience** **14**: 501-506, 1991.

NIXON, R.A.; PASKEVICH, P.A.; SIHAG, R.K. AND THAYER, C.Y. Phosphorylation on COOH terminus domains of neurofilament protein in retinal ganglion cell neurons in vivo: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber. **Journal of Cell Biology** **126**: 1031-1046, 1994.

NOGALES, E. Structural insights into microtubule function. **Annual Review of Biochemistry** **69**: 277-302, 2000.

NORD, A.; VAN DOORNINCK, W.J. AND GREENE, C. Developmental profile of patients with maple syrup urine disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease 14**: 881-889, 1991.

NYHAN, W.L. Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine. Appletion-Century-Crofts. Norwalk, Connecticut. p. 21, 1984.

O'CALLAGHAM, J.P. A potencial role for altered protein phosphorylation in the mediation of developmental neurotoxicology. **Neurotoxicology 15**: 29-40, 1994.

OXENDER, D.L. AND CHRISTENSEN, H.N. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. **Journal of Biological Chemistry 238**: 3686-3895, 1963.

OZAWA, S.; KAMYIA, H. AND TSUKI, K. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology 54**: 581-618, 1998.

PANT, H.C. Dephosphorylation of neurofilaments proteins enhaces their suscetibility to degradation by calpain. **Biochemistry Journal 256**: 665-668, 1988.

PEDROTTI, B. AND ISLAM K. Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microtubules. **FEBS Letters 388**: 131-133, 1996.

PEINEMANN, F. AND DANNER, D.J. Maple syrup urine disease 1954-1993. **Journal of Inherited Metabolic Disease 17:** 3-15, 1994.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; BENNETT, M.V.L. AND ZUKIN, R.S. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: An in situ hybridization study. **Proceedings of the National Academy of Science 88:** 4157-4161, 1991.

PIN, J.P. AND DUVOISIN, R. Neurotransmitter receptors I – The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology 34:** 1-26, 1995.

PRENTIK, M AND RENOLD, A.E. neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets. **Journal of Biological Chemistry 58:** 14239-14244, 1965.

REAGAN, K.E.; WILMARTH, K.R.; FRIEDMAN, M.A. AND ABOUDONIA, M.B. In vitro calcium and calmodulin-dependent kinase-mediated phosphorylation of rat brain and spinal cord neurofilament proteins is increased by glycidamide administration. **Brain Reserch 671:** 12-20, 1995.

RIEDER, B.M.; PELLIER, V.; ANTONSSON, B.; DI PAOLO, G.; STIMPSON, S.A.; LÜTJENS, R.; CATSICAS, S. AND GRENNINGLOH, G. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG 10. **Proceedings of the National Academy of Science 94:** 741-745, 1997.

RITTER L.M.; UNIS A.S.; AND MEADOR-WOODRUFF J.H. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. **Developmental Brain Research** **127**: 123-133, 2001.

RODNIGHT, R. AND WOFCHUK, S.T. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. **Essays in Biochemistry** **27**: 91-100, 1992.

RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C.A.; WOFCHUK, S.T. AND LEAL, R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidid protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **30**: 325-338, 1997.

SÁNCHEZ, I.; HASSINGER, L.; SIHAG, R.K.; CLEVELAND, D.W.; MOHAN, P. AND NIXON, R.A. Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo: selective role of site-specific phosphorylation. **Journal of Cell Biology** **151**: 1013-1024, 2000.

SANDERSON, C. AND MURPHY, S. Glutamate binding in the rat cerebral cortex during ontogeny. **Brain Research** **254**: 329-339, 1981.

SANS, N.A.; MONTCOUQUIOL M.E. AND RAYMOND, J. Postnatal developmental changes in AMPA and NMDA receptors in the rat vestibular nuclei. **Developmental Brain Research** **123**: 41-52, 2000.

SCHOEPP, D.D. Novel functions of subtypes of metabotropic glutamate receptors. **Neurochemistry International** **24**: 439-449, 1994.

SCHOEPP, D.D.; JONHSON, B.G.; SALHOFF, C.R.; WRIGTH, R.A.; GOLDWORTHY, J.S. AND BAKER, S.R. Second messenger responses in brain slices to elucidate novel glutamate receptors. **Journal of Neuroscience Methabolism 59**: 105-110, 1995.

SCHULMAN, H. Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. **Current Opinion in Neurobiology 5**: 375-381, 1995.

SCHULZE, E.; ASAI, D.J.; BULINSKI, J.C. AND KIRSCHNER, M. Post-translational modification and microtubule stability. **Journal of Cell Biology 105**: 2167-2177, 1987.

SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A. AND MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mechanisms of Aging and Development 122**: 1-29, 2001.

SERRANO, L.; HERNÁNDEZ, M.A.; DIAZ NIDO, J. AND AVILA, J. Association of casein kinase II with microtubules. **Experimental Cell Research 181**: 263-272, 1989.

SHADEWALDT, P.; BODNER, A.; BRÖSICKE, H.; HAMMANEN, H.W. AND WENDEL, U. Assesment of whole body L-leucine oxidation by noninvasive L-[1-¹³C] leucine breath tests: a reappraisal in patients with maple syrup urine disease, obligate heterozigotes, and healthy subjects. **Pediatrics Research 43 (5)**: 592-560, 1998.

SHARP, A.H; AND ROSS, C.A. Neurobiology of Huntington's disease. **Neurobiol Dis** **3**: 3-15, 1996.

SHAW, G. AND WEBER, K. Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. **Nature** **298**: 277-279, 1982.

SHEA, T.B. Triton-soluble phosphovariants of the high molecular weight neurofilament subunit from NB2a/dl cells are assembly-competent. Implications for normal and abnormal neurofilament assembly. **FEBS Letters** **343**: 131-136, 1994.

SHELANSKI, M.L.; FRAPPIER, T.; GEORGIEFF, I.; TROY, C. AND MALLADO, W. Cytoskeleton of central and peripheral neurons. **Journal of the Neurological Sciences** **124**: 33-36, 1994.

SIM, A.T. The regulation and function of protein phosphatases in the brain. **Molecular Neurobiology** **5**: 229-246, 1991.

SMALL, J.V.; ROTTNER, K. AND KAVERINA, I. Functional desing in the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology** **11**: 54-60, 1999.

STRACK, S.; WESTPHAE, R.S.; CALIBRAN, R.J.; ELENA, F.F. AND WADZINSKI, B.E. Protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A associated with dephosphorylated neurofilaments. **Molecular Brain Research** **49**: 15-28, 1997.

STREIFEL, D.T.; AVALOS, R.T. AND COHLBERG, J.A. CAMP dependent phosphorylation of neurofilament proteins NF-L and NF-M inhibits their coassembly into filaments in vitro. **Biochemica. Et Biophysica Research Communication** **222**: 646-651, 1996.

SUDHOF, T.C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature** **375**: 645-653, 1995.

SUN, L.; MARGOLIS, F.L.; SHIPLEY, M.T. AND LIDOW, M.S. Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. **FEBS Letters** **441**: 392-396, 1998.

TANABE, Y.; NOMURA, A.; MASU, M.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N. AND NAKANISHI, S. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGLUR3 and mGLUR4. **Journal of Neuroscience** **13**: 1372-1378, 1993.

TANAKA, K. AND ROSEMBERG, L.E. Disorders of branched chain amino acid and organic acid metabolism. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. Stanbury, S.B.; Wydngarden, J.B.; Fredrickson, D.S.; Goldstain, J.L. and Brown, M.S. (eds). New York: McGraw-Hill, 1983. p. 440-473.

TASHIAN, R. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenilalanine, leucine and vailine derivates: A suggestion concerning

the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain keto aciduria. **Metabolism 10**: 393-400, 1961.

TAVARES, R.G.; SANTOS, C.E.S.; TASCÁ, C.I.; WAJNER, M; SOUZA, D.O. AND DUTRA-FILHO, C.S. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **Journal of the Neurological Sciences 181**: 44-49, 2000.

VALE, R.D.; SCHNMAPP, B.J.; MITEHISON, T.; STEVEN, E.; RUSE, T.S. AND SHEETZ, M.P. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. **Cell 43**: 623-632, 1985.

VENCIL, G.G.; LI, P.P. AND WARSH, J.J. Evidence for metabotropic excitatory amino acid receptor heterogeneity: developmental and brain regional studies. **Journal of Neurochemistry 59**: 252-258, 1992.

VINADÉ, L. AND RODNIGHT, R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. **Brain Research 723**: 195-200, 1996.

VINADÉ, L.; GONÇALVES C.A.; WOFCHUK, S.; GOTTFIED, C. AND RODNIGHT, R. Evidence for a role for calcium ions in the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and astrocyte cultures from rat brain. **Brain Research 104**: 11-17, 1997.

VIOLA, H.; FURMAN, M.; IZQUIERDO, L.A.; ALONSO, M.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, I.I. AND MEDINA, J.H. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. **Journal of Neuroscience** 1,20 (23) RC 112, 2000.

WAJNER, M.; COELHO, D.M.; BARSCHAK, A.G.; ARAÚJO, P.R.; PIRES, R.F.; LULHIER, F.L.G. AND VARGAS, C.R. Reduction of large neutral amino acid concentration in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 23: 505-512, 2000.

WALLAS, S.T. AND GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. **Pharmacological Reviews** 43: 299-349, 1991.

WANG, N. AND STAMENOVIC, D. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening and growth. **American Journal of Physiology** 279: 188-194, 2000.

WENDEL, U.; LAUGENBECK, U.; LOMBECK, I. AND BEMER, H.J. Maple syrup urine disease – Therapeutic use of insulin in catabolic states. **European Journal of Pediatric** 139: 172-175, 1982.

WILMARTH, K.R.; VIANA, M.E. AND ABOU-DONIA, M.B. Carbon disulfide inhalation increases Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase phosphorylation of cytoskeletal proteins in the rat central nervous system. **Brain Research** 628: 293-300, 1983.

WONG, J.; HUTCHISON, S.B. AND LIEM, R.H.K. An isoelectric variant of the 150,000-dalton neurofilament polypeptide. Evidence that phosphorylation affects its association with the filament. **Journal of Biological Chemistry** **259**: 10867-10874, 1984.

YUWILER, S.H. AND FIELDS, K.L. Serotonin depletion by dietary leucine. **Nature** **208**: 83-83, 1965.

ZIELKE, H.R.; HUANG, Y.; TILDON, J.T.; ZIELKE, C. L AND BAAB, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of the large neutral amino and keto acids by microdialysis: Alpha-ketoisocaproate infusion. **Developmental Neuroscience** **18**: 420-425, 1996.

ZHU, Q.S.; DESPRES, C. AND JULIEN, J.P. Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. **Experimental Neurology** **148**: 299-316, 1997.

ZHU, Q.S.; LINDENBAUM, M.; LEVAVASSEU, F.; JACONY, H. AND JULIEN, J.P. Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta-iminodipropionitrile. **Journal of Cell Biology** **143**: 183-193, 1998.