

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

EFEITO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE O CITOESQUELETO
DE CÉLULAS NEURAIS:
MORFOLOGIA CELULAR, FOSFORILAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO.

Dissertação de Mestrado

Priscila Pelaez

Orientador: Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur

Porto Alegre, 2007.

Priscila Pelaez

EFEITO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE O CITOESQUELETO
DE CÉLULAS NEURAIS:
MORFOLOGIA CELULAR, FOSFORILAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito à obtenção
ao título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2007.

"Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas."
(Luis Fernando Veríssimo)

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur pela oportunidade, apoio e incentivo.

À Profa. Claudia Funchal pela contribuição na realização dessa dissertação.

Ao Prof. Moacir Wajner pela colaboração.

Às Profas. Carmem Gottfried e Alexandra Latini pela colaboração.

Às companheiras que desde o início batalhamos juntas Samanta Oliveira Loureiro e Lilian Vivian pelas constantes reuniões na ASCLIN; À Luana Heimfarth e à Ariane Zamoner que mais tarde também entraram para o grupo.

Às meninas do Lab. 31 Lilian Viana, Sofia Garcia, Bruna Lacerda, Camila Vanzin e Luiza Vidal e a todas que passaram por lá em seu caminho de aprendizado.

Ao colega Diogo Losch de Oliveira sempre disposto a ajudar e, é claro, sempre com o chamas pronto para um papo legal!

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

À coordenação e equipe do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

A todos os professores, funcionários e colegas de Mestrado, e todos aqueles que contribuíram para a realização desta dissertação.

Aos órgãos de fomento á pesquisa CNPq, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS.

A minha família, que apesar dos desentendimentos sempre comemoram minhas vitórias e me apóiam nos momentos de dificuldade. Sou muito grata por terem vocês em minha vida, tenho orgulho de fazer parte desta família, da minha família Papito, Mamita, Manão e Tobi.

LISTA DE ABREVIATURAS

AACR – aminoácidos de cadeia ramificada
BCAA – branched-chain amino acids (aminoácidos de cadeia ramificada)
BCKA – branched-chain keto acids (ceto-ácidos de cadeia ramificada)
CACR - α -cetoácidos de cadeia ramificada
CAT - catalase
CIC - α -cetoisocapróico
CIV - α -cetoisovalérico
CMV - α -ceto- β -metilvalérico
DCCR - desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada
DXB – doença do xarope do bordo
ER – espécies reativas
FI – filamentos intermedários
GFAP – (ing. glial fibrillary acid protein) proteína glial fibrilar ácida
GSH - glutationa
IF – intermediate filament (filamentos intermediários)
Ile – isoleucina
KIC – α -ketoisocaproic acid (α -cetoisocapróico)
KIV- α -ketoisovaleric acid (α -cetoisovalérico)
KMV - α -keto- β -methylvaleric acid (α -ceto- β -metilvalérico)
Leu – leucina
L-NAME – inibidor da óxido nítrico sintase
MSUD – maple syrup urine disease (doença do xarope do bordo)
NF-H – neurofilamento de alto peso molecular
NF-M – neurofilamento de médio peso molecular
NF-L – neurofilamento de baixo peso molecular
NO – nitric oxide (óxido nítrico)
PI – (ing. propidium iodide) iodeto de propídio
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
Val – valina

RESUMO

A Doença do Xarope do Bordo (DXB) é uma desordem hereditária causada pela deficiência do complexo enzimático desidrogenase dos cetoácidos de cadeia ramificada, e como consequência ocorre o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val), e seus respectivos cetoácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e α -cetoisovalérico (CIV), que caracteriza a doença. Os pacientes afetados apresentam sintomas neurológicos graves, tais como convulsões, coma, retardo psicomotor e retardo mental. Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos da doença ainda não estão esclarecidos. Em estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, observamos que os α -cetoácidos de cadeia ramificada modificaram a fosforilação dos filamentos intermediários em córtex cerebral de ratos wistar em diferentes idades, alteraram a morfologia de células gliais e provocaram estresse oxidativo em células de glioma C6. Neste estudo, nós investigamos o efeito *in vitro* dos aminoácidos de cadeia ramificada, nas concentrações encontradas nos pacientes afetados por DXB, sobre a fosforilação dos filamentos intermediários de córtex cerebral de ratos durante o desenvolvimento. Fatias de córtex cerebral de ratos wistar de 9, 12, 17 e 21 dias foram incubadas com os aminoácidos Leu, Ile e Val na presença de ^{32}P -ortofosfato, a fração citoesquelética foi extraída e a radioatividade incorporada pelas subunidades dos filamentos intermediários foi medida. Os resultados obtidos não demonstraram alterações significativas no parâmetro estudado. Também foram realizados estudos morfológicos em cultura de células C6 através de microscopia de contraste de fase e técnicas de imunocitoquímica. As células foram incubadas por 3, 12 ou 24 horas na presença ou na ausência dos AACR. Os resultados demonstraram que os AACR alteraram a morfologia das células de redondas para fusiformes com a presença de vários processos de um modo dependente do tempo e do tipo de AACR. A imunocitoquímica com anticorpos anti-actina e anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP) demonstrou que estes metabólitos induziram uma reorganização do citoesqueleto. Além disso, observamos morte celular intensa na presença dos AACR. Por outro lado, verificamos que não houve alteração de fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nas células C6, mas observamos que houve diminuição da glutathiona e aumento da produção de óxido nítrico quando as células C6 foram incubadas por 3h com os AACR. Quando as células C6 foram tratadas com glutathiona ou L-NAME e com os AACR estes antioxidantes foram capazes de prevenir as alterações metabólicas causadas por estes metabólitos, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo nas alterações causadas pelos AACR. Considerando que as células astrogliais são de fundamental importância para o desenvolvimento e o funcionamento do cérebro é provável que as alterações provocadas pelos AACR possam ter importantes consequências para a neurodegeneração característica dos pacientes portadores de DXB.

ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is a inherited disorder caused by a deficiency of the enzyme complex branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKD), and consequently occurs the accumulation of branched-chain amino acids (BCAAs) leucine (Leu), isoleucina (Ile) and valine (Val), and theirs corresponding branched-chain α -keto acids (BCKAs) α -keto-isocaproic acid (KIC), α -keto- β -methyvaleric acid (CMV) and α -keto-isovaleric (KIV), that characterize the disease. Affected patients present severe neurological symptoms such as coma, psychomotor delay and mental retardation. However, the physiopathologic mechanisms are unknown. In previous studies carried through in our laboratory we observed that the BCKAs had modified the phosphorylation of the intermediate filaments (IF) in cerebral cortex of rats wistar in different ages. We also verified that these metabolites altered the morphology of glial cells and provoked oxidative stress in C6 cells. In this study, we investigate the in vitro effect of BCAAs, in the concentrations found in the patients affected with MSUD, on the phosphorylation of the IF from cerebral cortex of rats during development. Slices from cerebral cortex of wistar rats of 9, 12, 17 and 21 days were incubated with the amino acids Leu, Ile and Val in the presence of ^{32}P -ortophosphate, the cytoskeleton fraction was extracted and the radioactivity incorporated into the subunits of the IF was measured. The results obtained do not demonstrate significant alterations in this studied parameter. We also performed morphologic studies in C6 cells through analyses of imunocitochemistry and phase contrast microscopy. The cells had been incubated for 3, 12 or 24 hours in the presence or the absence of the BCAAs. The results demonstrate that the BCAAs alter the morphology of the cells from rounded to fusiformes with the presence of some processes in a dependent way of the time and the type of BCAAs. The imunocitochemistry with anti-actin and anti-glial fibrillary acid protein (GFAP) antibodies demonstrates that these metabolites induce a reorganization of cytoskeleton. Moreover, we observe intense cellular death in the presence of the BCAAs. On the other hand, we verify that it does not involve an alteration of the phosphorylation of GFAP in C6 cells. We also observe a reduction of glutathione and a increase of nitric oxide production when the cells were incubated for 3 hours with the BCAAs. When the C6 cells were treated with glutathione or L-NAME in the presence of the BCAAs these antioxidants were capable to prevent the metabolic alterations caused by these metabolites, suggesting the involvement of oxidative stress in the alterations caused by the BCAAs. Considering that the astroglials cells are have fundamental importance on the development and functioning of the brain it is feasible that the alterations provoked by the BCAAs have important consequences for the neurodegeneration characteristic of MSUD patients.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS-----	v
RESUMO-----	vi
ABSTRACT-----	vii
1. INTRODUÇÃO-----	9
1.1 DOENÇA DO XAROPE DO BORDO-----	9
1.2 CITOESQUELETO-----	11
1.2.1 FILAMENTOS DE ACTINA-----	12
1.2.2 MICROTÚBULOS-----	13
1.2.3 FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS-----	13
1.2.3.1 NEUROFILAMENTOS-----	14
1.2.3.2 PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA-----	16
1.2.3.3 VIMENTINA-----	17
1.3 FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL-----	17
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO-----	18
1.4.1 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS-----	19
1.4.2 DEFESAS ANTOXIDANTES-----	19
2. OBJETIVO GERAL-----	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	20
3. ANEXO ARTIGO-----	21
4. DISCUSSÃO -----	50
5. CONCLUSÃO GERAL-----	57
5.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS-----	57
6. PERSPECTIVAS-----	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DO XAROPE DO BORDO

A doença do xarope do bordo (DXB) é uma desordem metabólica autossômica recessiva (Danner e Elsas, 1989; Nobukuni *et al.*, 1991), caracterizada pelo acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val) e dos seus respectivos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR) α -cetoisocapróico (CIC), α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e o α -cetoisovalérico (CIV). Esse acúmulo ocorre devido à deficiência na atividade do complexo enzimático desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR) que catalisa a descarboxilação dos α -cetoácidos aos seus respectivos acil-CoAs de cadeia ramificada (Chuang e Shih, 2001), figura 1.

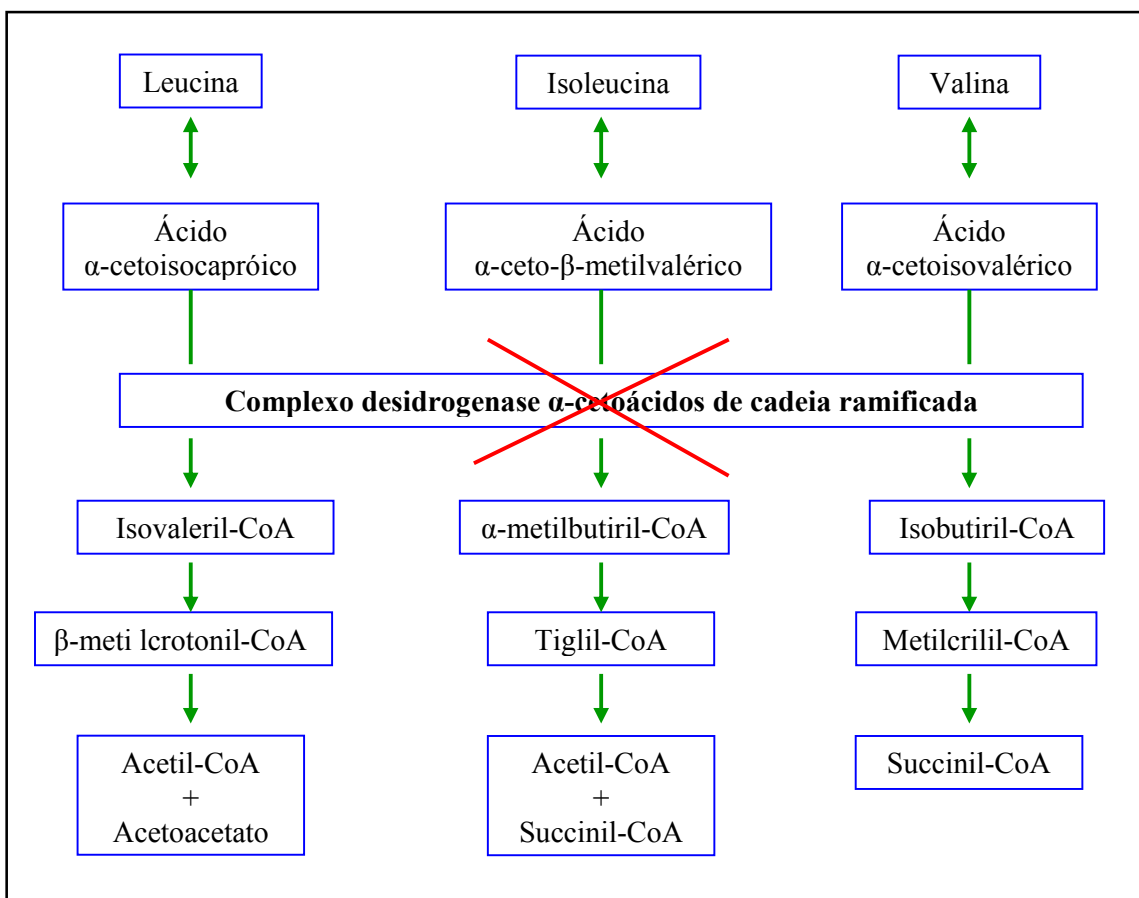


Figura 1 - Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, mostrando a etapa em que a enzima é deficiente nos pacientes com DXB. Adaptado de Scriver *et al.*, 2001.

O diagnóstico da DXB se dá através de estudos laboratoriais. A identificação de concentrações plasmáticas e urinárias elevadas de Leu, Ile e Val e de seus respectivos α -cetoácidos, através de cromatografia de aminoácidos e ácidos orgânicos, caracterizam a doença. No entanto, a Leu e o CIC são os principais metabólitos neurotóxicos acumulados na doença, atingindo níveis plasmáticos de até 5 mM; enquanto a Ile a Val e seus cetoácidos correspondentes atingem 1 mM em pacientes não tratados (Zielke *et al.*, 1996). O perfil dos aminoácidos é determinado no plasma enquanto os cetoácidos são determinados na urina (Danner e Elsas, 1989).

Para confirmar o diagnóstico de DXB é realizada a medida da atividade do complexo DCCR em leucócitos periféricos dos pacientes, a qual é determinada por cultura de células (Peinemann e Danner, 1994).

Os mecanismos tóxicos dos AACR e CACR sobre o cérebro ainda são pouco conhecidos. Alguns fatores, tais como a complexidade do desenvolvimento do cérebro, as concentrações alcançadas pelas toxinas e o estágio do desenvolvimento cerebral em que elas atuam prejudicam o esclarecimento destes efeitos.

O tratamento da DXB consiste em uma dieta restrita de AACR minimizando os efeitos do acúmulo destes metabólitos, principalmente no sistema nervoso central (SNC). O tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível e ainda no período neonatal. (Snyderman *et al.*, 1964). Durante a fase aguda (descompensação metabólica), deve-se empregar um tratamento mais agressivo, pois o aumento dos AACR e dos CACR, freqüentemente precipitados por infecções ou outros estresses, leva à deterioração das funções cerebrais. Nestes casos, utiliza-se diálise peritoneal e hemodiálise para a remoção destes metabólitos (Chuang e Shih, 2001). O transplante de fígado, órgão onde se encontra a principal atividade do complexo DCCR, também pode ser utilizado (Jan *et al.*, 1994).

1.2. CITOESQUELETO

As células eucarióticas têm a capacidade de adotar uma variedade de formas e de executar movimentos coordenados e direcionados que dependem de uma rede complexa de filamentos de proteínas fibrosas a qual se estende por todo o citoplasma e é chamada de citoesqueleto. O citoesqueleto é uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, divide-se ou responde ao seu ambiente. O citoesqueleto é o responsável direto por movimentos tais como deslocamento das células sobre um substrato, contração muscular e muitas alterações na forma de embriões de vertebrados em desenvolvimento, além de fornecer a maquinaria necessária para movimentos intracelulares, como o transporte de organelas de uma região para outra no citoplasma e a segregação de cromossomos durante a mitose (Alberts *et al.*, 2002).

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 celular (Carraway, 2000).

Três diferentes tipos de filamentos protéicos compõem o citoesqueleto, permitindo realizar suas distintas atividades, são eles: filamentos de actina (microfilamentos), microtúbulos e filamentos intermediários (figura 2) (Carraway, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Helfand *et al.*, 2004).

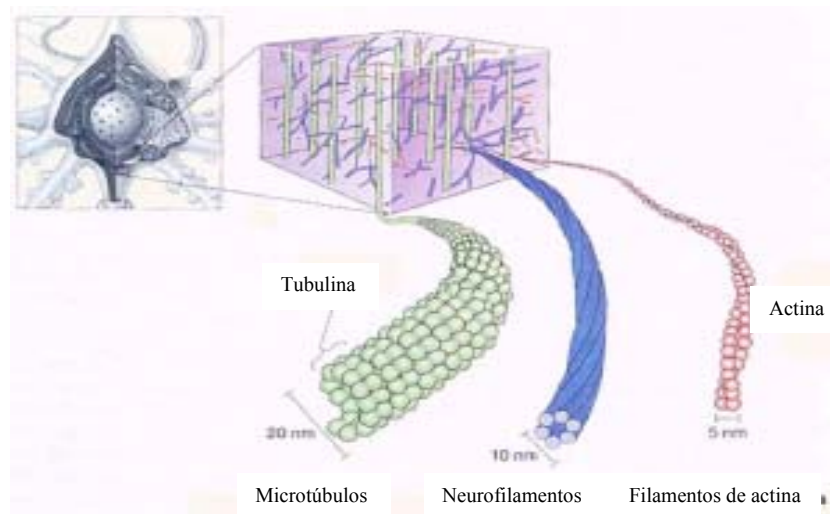


Figura 2. Representação esquemática dos constituintes do citoesqueleto. Adaptado de Bear *et al.*, 1996.

1.2.1. FILAMENTOS DE ACTINA

Os filamentos de actina, também conhecidos como microfilamentos, são estruturas flexíveis com 5 a 9 nm, constituídos de uma hélice compacta de moléculas de actina (actina globular ou actina G) uniformemente orientadas. Os microfilamentos são estruturas polares com duas extremidades diferentes - a extremidade “menos” relativamente inerte e de crescimento lento, e a extremidade “mais” de crescimento rápido. Estas estruturas flexíveis são 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. As principais funções dos filamentos de actina nas células eucariotes são a manutenção da forma e a participação nos movimentos de divisão celular (Albets *et al.*, 2002). Além disso, nas células nervosas, os filamentos de actina têm importante papel no crescimento de neuritos (Lin e Forscher, 1995) e na liberação de neurotransmissores (Marinowich *et al.*, 1997; Small *et al.*, 1999).

1.2.2. MICROTÚBULOS

Os microtúbulos são polímeros longos e rígidos, com diâmetro em torno de 25 nm, que se estendem ao longo de todo o citoplasma e coordenam a localização intracelular de outros componentes celulares. 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 da célula, chamado centróssomo. A partir desta estrutura os microtúbulos emanam por toda a célula. 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. O microtúbulo é uma estrutura polar, uma vez que os protofilamentos estão paralelamente alinhados com a mesma polaridade (Díaz *et al.*, 1998; Dowling, 2000).

Os microtúbulos 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, Sánchez *et al.*, 2000). No cérebro, estão envolvidos em várias funções celulares, incluindo transporte axonal, sinaptogênese (Vale *et al.*, 1985), crescimento e alongação de neuritos (Rieder *et al.*, 1997).

1.2.3. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os filamentos intermediários (FI) são polímeros de proteínas fibrosas, com diâmetro aproximado de 10 nm, tamanho intermediário entre os filamentos de actina (5nm) e os microtúbulos (25 nm). São filamentos longos que possuem subtipos específicos em diferentes tecidos e grande diversidade em sua seqüência. Desempenham papel estrutural na célula, mantendo sua integridade (Fuchs e Cleveland, 1998; Alberts *et al.*, 2002).

Na formação de um FI 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 FI com 10 nm de diâmetro (Alberts *et al.*, 2002).

A maioria das proteínas que formam os FI possuem um domínio central, em forma de α -hélice altamente conservado, enquanto as regiões amino-terminal e carbóxi-terminal apresentam diferenças que permitem uma subclassificação em seis tipos diferentes (Fuchs e Weber, 1994; Elder *et al.*, 1999; Inada *et al.*, 2000; Herrmann e Aebi, 2000; Lariviere e Julien, 2004). A classificação dos FI bem como sua ocorrência em células de mamíferos estão apresentadas na tabela 1.

Classe	Exemplos	Ocorrência em mamíferos
I e II	Citoqueratinas ácidas e básicas	Células epiteliais
III	Vimentina	Células mesenquimais
	Desmina	Células musculares
	Periferina	Células neurais diversas
	GFAP	Astrócitos
IV	Neurofilamentos	Neurônios
	α -internexina	Neurônios
V	Laminas A, B e C	Lâmina nuclear de células eucarióticas
VI	Nestina	Células musculares e neuroepiteliais

Tabela 1. Classificação e ocorrência dos filamentos intermediários. Adaptado de Herrmann e Aebi, 2000.

1.2.3.1. NEUROFILAMENTOS

Os neurofilamentos (NF) constituem o principal tipo de FI em neurônios adultos (Lee e Cleveland, 1996). São formados pela polimerização de três subunidades: os neurofilamentos 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 310 aminoácidos no domínio central e diferem entre si pelos seus domínios carbóxi e amino-terminal (Betts *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Ackerley, 2000; Al-Chalabi e Miller, 2003).

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 e 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 3) (Hisanga e Hirokawa, 1988; Gotow *et al.*, 1992; Kirkpatrick e Brady, 1999).

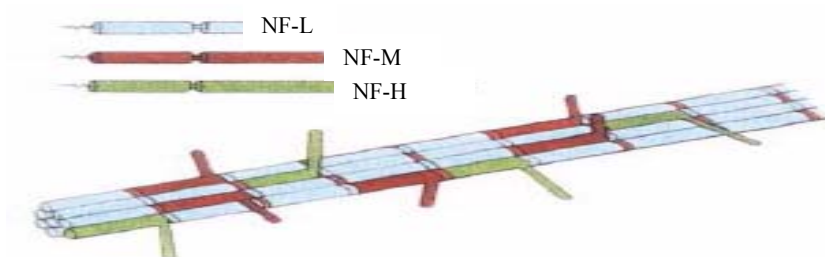


Figura 3. Representação esquemática de um neurofilamento. Adaptado de Nixon e Sihag, 1991.

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 e Brady, 1999; Elder *et al.*, 1999). 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).

O acúmulo de neurofilamentos é descrito em várias doenças neurodegenerativas, tais como: esclerose lateral amiotrófica, 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; Lariviere e Julien, 2004).

1.2.3.2. PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP)

A proteína glial fibrilar ácida (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). A GFAP 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 carbóxi-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).

A GFAP é considerada marcador de astrócitos e é importante na modulação da motilidade e forma celular por fornecer estabilidade estrutural aos astrócitos. No SNC depois de uma injúria, seja ela resultado de um trauma, doença, insulto químico ou desordens genéticas, os astrócitos ficam reativos e respondem de uma maneira típica, processo chamado de astrogliose. A astrogliose é caracterizada pela rápida síntese de GFAP (Pekny *et al.*, 1999; Eng *et al.*, 2000).

A GFAP 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).

1.2.3.3. VIMENTINA

Os filamentos de vimentina são constituídos pela subunidade de mesmo nome que possui massa molecular de 54 kDa, sendo o FI mais amplamente distribuído entre as células, 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.*, 2002). 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 (Galou *et al.*, 1996; Alberts *et al.*, 2002).

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

1.3. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A fosforilação de proteínas é um processo molecular reversível que desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo utilizado no processo de transdução de sinal (Hunter, 1995). Comum a todos os organismos eucariontes, o mecanismo de fosforilação protéica envolve pelo menos três elementos: (1) proteína quinase; (2) proteína fosfatase; (3) substrato protéico (figura 4), o qual tem suas características conformacionais e funcionais alteradas em decorrência de seu estado de fosforilação (Walaas e Greengard, 1991; Rodnight *et al.*, 1997). As proteínas quinases são fosforiltransferases que catalisam a transferência do fosfato γ do ATP ou GTP para o grupo hidroxila de resíduos serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. As proteínas fosfatases são fosforiltransferases que

catalisam a reação inversa, ou seja, a hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico (Bibb e Nestler, 1999). Deste modo, o processo de fosforilação depende de uma ação coordenada de atividades quinásicas e fosfatásicas, ambas sujeitas à regulação por diversos mensageiros celulares (Hubbard e Cohen, 1993; MacKintosh e MacKintosh, 1994; Hunter, 1995).

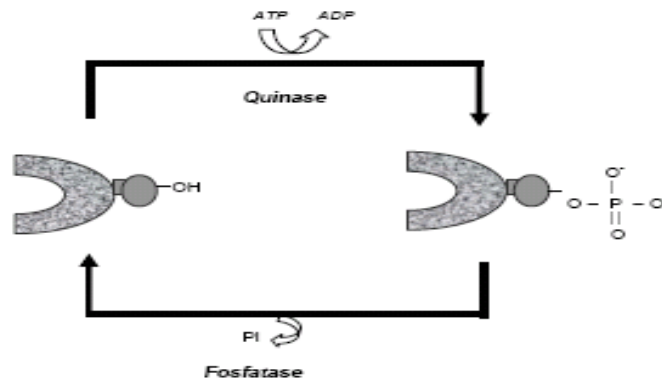


Figura 4. Representação esquemática de um sistema fosforilante. A reação de fosforilação é catalisada por uma quinase que transfere o grupo fosfato de uma molécula de ATP para o grupo hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. A remoção do grupo fosfato é catalisada por uma fosfatase. Adaptado de Alberts *et al.*, 2002.

O sistema nervoso é um tecido muito rico em enzimas fosforilantes e desfosforilantes, sendo que este processo desempenha um papel fundamental nas funções neuronais e gliais. Desta forma, uma diversidade de funções podem ser reguladas através do processo de fosforilação/desfosforilação de proteínas no SNC, incluindo a plasticidade e a reorganização dinâmica da estrutura citoesquelética das células neurais (Rodnight e Wofchuk, 1992; Inagaki *et al.*, 1994; Pasqualotto e Shaw, 1996).

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é definido como um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas (ER) e as defesas antioxidantes das células (Halliwell, 1991; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001). Algumas doenças, nas quais ocorre este desequilíbrio, incluem aterosclerose,

diabetes, câncer, arritmia, artrite reumatóide e várias doenças neurodegenerativas (Giugliano *et al.*, 1995).

O estresse oxidativo pode levar a inúmeras alterações celulares (Halliwell, 1996) entre elas a indução na mudança estrutural do citoesqueleto (Dent e Gestler, 2003) e na morfologia celular (Bellomo *et al.*, 1990; Hinshaw *et al.*, 1991; Gourlay e Ayscough, 2005).

1.4.1 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS

O radical livre é definido como um átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons na última camada eletrônica. Esse não emparelhamento de elétrons lhe confere a alta reatividade. Os radicais livres provocam ou resultam das reações de oxi-redução. Os radicais livres mais comuns são radical hidroxila (HO^\bullet), ânion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO^\bullet). Alguns intermediários, formados durante a redução do oxigênio, não são radicais livres, mas podem levar à geração destes através de várias reações químicas, esses intermediários são classificados como ER (Halliwell, 2001; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

1.4.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As defesas celulares do organismo contra as ER geradas por processos oxidativos incluem agentes que removem cataliticamente as ER, como as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons ferro, cobre e grupamentos heme) como transferrina, lactoferrina e ceruloplasmina, proteínas que protegem as biomoléculas através de outros mecanismos, por exemplo as proteínas de choque térmico e antioxidantes de baixo peso molecular capazes de inativar as ER, como glutatona (GSH), melatonina, α -tocoferol, bilirrubina e ácido úrico. (Halliwell, 2001; Cui *et al.*, 2004).

2. OBJETIVO GERAL

- Estudar os efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada, que se acumulam na Doença do Xarope do Bordo, sobre a fosforilação e morfologia de células neurais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a morfologia e reorganização do citoesqueleto em cultura de células de glioma C6.
- Investigar o efeito desses aminoácidos sobre a fosforilação dos filamentos intermediários em córtex cerebral de ratos de diferentes idades e em cultura de células C6.
- Verificar alguns parâmetros de estresse oxidativo e produção de espécies reativas possivelmente causados por esses metabólitos.
- Avaliar o possível papel protetor de antioxidantes sobre os efeitos observados.

3. ARTIGO ANEXO

Branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations in C6 glioma cells probably through reactive species.

Priscila de Lima Pelaez, Cláudia Funchal, Samanta Oliveira Loureiro, Luana Heimfarth, Ariane Zamoner, Carmem Gottfried, Alexandra Latini, Moacir Wajner and Regina Pessoa-Pureur

ACEITO: International Journal of Developmental Neuroscience.

**BRANCHED-CHAIN AMINO ACIDS ACCUMULATING IN MAPLE SYRUP URINE
DISEASE INDUCE MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN C6 GLIOMA CELLS
PROBABLY THROUGH REACTIVE SPECIES**

Priscila de Lima Pelaez, Cláudia Funchal, Samanta Oliveira Loureiro, Luana Heimfarth, Ariane Zamoner, Carmem Gottfried, Alexandra Latini, Moacir Wajner and Regina Pessoa-Pureur

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, BRASIL.

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 E-mail: rpureur@ufrgs.br

ABSTRACT

In the present study we investigated the effects of the branched-chain amino acids (BCAA) leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val), which accumulate in this disorder, on C6 glioma cell morphology and cytoskeletal reorganization by exposing the cultured cells to 1 and 5 mM BCAA. We observed that cells showed a fusiform shape with processes after 3 h treatment. Cell death was also observed when cells were incubated in the presence of the BCAA for 3 and 24 h. Val-treated cells presented the most dramatic morphological alterations. Immunocytochemistry with anti-actin and anti-GFAP antibodies revealed that all BCAA induced reorganization of actin and GFAP cytoskeleton. Although phosphorylation regulates intermediate filament (IF) assembly/disassembly, we verified that the BCAA did not change the in vitro phosphorylation of IF proteins either in C6 cells or in slices of cerebral cortex of rats during development (9-, 12-, 17- and 21-day-old). Furthermore, we observed that 3 h cell exposure to 5 mM of each BCAA resulted in a marked reduction of reduced glutathione (GSH) levels and significantly increased nitric oxide production. Finally, we observed that the morphological features caused by the BCAA on C6 cells were prevented by the use of the antioxidants GSH (1 mM) and N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.5 mM). On the basis of the present results we conclude that free radical attack might be involved in the cell morphological alterations, as well as in the cytoskeletal reorganization elicited by the BCAA. It is therefore presumed that these findings could be involved in the neuropathological features observed in patients affected by MSUD.

RUNNING TITLE: Branched-chain amino acids and cell morphology

KEY WORDS: branched-chain amino acids; cytoskeleton; cell morphology

INTRODUCTION

Maple syrup urine disease (MSUD) is an autosomal recessive disorder of the metabolism caused by severe deficiency in the activity of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex (Nord *et al.*, 1991; Chuang and Shih, 2001). As a consequence of the defect, the branched-chain keto acids (BCKA) α -ketoisocaproic acid (KIC), α -keto- β -methylvaleric acid (KMV), α -ketoisovaleric acid (KIV) and their corresponding amino acids (BCAA) leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val) accumulate in tissues and biological fluids of the affected patients. Although neurological deterioration and convulsions are common symptoms, the mechanisms underlying the brain damage of this disorder remain unclear and have been poorly studied. However, Leu and its keto acid KIC, the metabolites which most accumulate in MSUD, have been considered the main neurotoxins in this disorder, since their rapid accumulation is associated with the appearance of neurological symptoms (Efron, 1965; Danner and Elsas, 1989; Chuang and Shih, 2001). In addition, it has been postulated that brain injury associated with MSUD could be related to excitotoxicity (Tavares *et al.*, 2000; Funchal *et al.*, 2004a), energy deficit (Howell and Lee, 1963; Halestrap *et al.*, 1974; Land *et al.*, 1976; Pilla *et al.*, 2003; Sgaravatti *et al.*, 2003) and oxidative stress in brain subcellular fractions (Fontella *et al.*, 2002; Bridi *et al.*, 2003, 2005 a,b).

We have previously demonstrated that the BCKA and the BCAA accumulating in MSUD disturbed astrocyte morphology and cytoskeletal reorganization leading to cell death (Funchal *et al.*, 2004b; Funchal *et al.*, 2005a). It was also found that the BCKA modified the phosphorylation and organization of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in C6 glioma cells (Funchal *et al.*, 2005b).

The C6 glioma cell line was originally derived from rat brain tumors induced with N-nitrosomethylurea (Benda *et al.*, 1968). This cell line has oligodendrocytic, astrocytic and neuronal properties (Parker *et al.*, 1980) and has been considered as a useful model to study the effects of neurotoxicants, such as ammonium chloride, on the oxidative metabolism (Haghighat *et al.*, 2000). C6 glioma cells have a greater rate of oxidative metabolism than astrocytes (Haghighat and McCandless, 1997).

The main objective of the present investigation was to evaluate whether the BCAA accumulating in MSUD, at the concentrations found in tissues and body fluids of affected patients, could alter cell morphology, cytoskeletal reorganization, and induce death in C6 glioma cells. Since phosphorylation/dephosphorylation is known to be related to the assembly/disassembly ability and reorganization of intermediate filament (IF) proteins (Inagaki *et al.*, 1994), we initially tested the effect of the BCAA on the in vitro phosphorylation of these cytoskeletal proteins in cerebral cortex of developing rats and in C6 glioma cells. Considering that oxidative damage has been shown to induce structural changes in the cytoskeleton (Dent and Gestler, 2003) and alterations of cell morphology (Bellomo *et al.*, 1990; Hinshaw *et al.*, 1991; Gourlay and Ayscough, 2005; Funchal *et al.*, 2006), we also investigated whether the BCAA could induce oxidative stress by measuring reduced glutathione (GSH) and nitric oxide (NO) levels in C6 cell homogenates. Finally, we tested the combined effect of antioxidants and the BCAA accumulating in MSUD on C6 cell morphology.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Radiochemicals and Compounds- [³²P] Na₂HPO₄ was purchased from CNEN, São Paulo, Brazil. Leucine, isoleucine, valine, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), *N*-[2-hydroxyethyl] piperazine-*N*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), polyclonal anti-actin antibody, diaminobenzidine and material for cell culture were purchased from Sigma (St. Louis MO, USA) and polyclonal anti-GFAP was obtained from DAKO. Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Cultilab (Campinas, SP, Brazil) and peroxidase-conjugated IgG from Amersham Pharmacia Biotech, Brazil.

Animals- Wistar rats (9, 12, 17, and 21 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.

Maintenance of Cell Line- The C6 rat glioma cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). The cells were grown and maintained in DMEM (pH 7.4) containing 2.5 mg/mL Fungizone, 100 U/L gentamicin, and 5% fetal bovine serum (FBS). Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. The cells were seeded in 24-well plates (5 x 10³ cells/well) or 6-well dishes (5 x 10⁴ cells/well).

In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats and from C6 glioma cells- Rats were killed by decapitation, the cerebral cortex was dissected onto Petri dishes placed on ice and cut into 400µm thick slices with a McIlwain chopper. Tissue slices were initially preincubated at 30°C for 10 minutes in the basic medium containing 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM Na-HEPES (pH 7.4), 12 mM glucose, 1 mM CaCl₂, and the following protease inhibitors: 1 mM benzamidine, 0.1 µM leupeptin, 0.7 µM antipain, 0.7 µM

pepstatin, 0.7 μ M chymostatin. After preincubation, tissue slices were incubated with 80 μ Ci of [32 P] orthophosphate in the same medium for 30 minutes at 30°C in the absence (controls) or presence of the BCAA at 2.5 or 5 mM concentration. The labeling reaction was allowed to proceed for 30 minutes 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.

Cytoskeletal-associated IF were prepared from cerebral cortex of rats as described by Funchal *et al.*, (2003). Briefly, after the labeling reaction, slices were homogenized in the ice-cold high salt buffer containing 5 mM KH_2PO_4 , (pH 7.1), 600 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and the protease inhibitors described above. The homogenate was centrifuged at 15800 X g for 10 min at 4°C, the supernatant discarded and the pellet homogenized with the same volume of the high salt medium. The resuspended pellet was centrifuged as described and the supernatant was discarded. The Triton-insoluble IF-enriched pellet, containing neurofilament (NF) subunits, vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP), was dissolved in 1% SDS. Cytoskeletal-associated IF were also prepared from C6 cells. After cells reached confluence, the culture medium was removed by suction and the cells were incubated for 3 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 /95% air in DMEM (pH 7.4) containing 0% FBS in the absence (controls) or presence of the BCAA at 1 or 5 mM concentration. After cell treatment, the same procedure as described above was followed, however the labeling reaction was allowed to proceed for 60 min at 30°C in presence of 10 μ Ci of [32 P] orthophosphate, as described by Funchal *et al.*, (2003).

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 (T-mat G/RA) 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.

Morphological Studies- The cells were incubated for 3 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air in DMEM (pH 7.4) containing 0% FBS in the absence (controls) or presence of 1 or 5 mM Leu, Ile, or Val. C6 cells were also treated in the presence or absence (controls) of 5 mM BCAA and the antioxidants GSH (1 mM) or L-NAME (0.5 mM). Morphological studies were performed using phase contrast optics and cells were fixed for immunocytochemistry and photographed using a Nikon camera.

Immunocytochemistry- C6 cells were cultured on circular glass coverlips, treated with BCAA for 3 h and fixed for 20 minutes with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) (2.9 mM KH₂PO₄; 38 mM Na₂HPO₄·7H₂O; 130 mM NaCl; 1.2 mM KCl) , rinsed with PBS, and permeabilized for 10 min in PBS containing 0.2% Triton X-100. To reduce nonspecific background staining, the fixed cells were then blocked for 60 minutes with PBS containing 0.5% bovine serum albumin and incubated overnight with polyclonal anti-GFAP (1:200) or polyclonal anti-actin (1:200), followed by peroxidase-conjugated IgG (1:1000) for 2 h. Finally the cells were treated with 0.05% diaminobenzidine containing 0.01% hydrogen peroxide for 10 min.

Propidium Iodide- Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake. Cells were treated during 3 h with 5 mM Leu, Ile or Val and 7.5 μM PI, at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air in DMEM + 1% FBS, after which they were analyzed and photographed with a Nikon inverted microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory.

Optical density was determined with the Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company). Density values obtained were expressed as density light unit (DLU).

Reduced Glutathione (GSH) measurement- Reduced GSH levels were measured according to Browne and Armstrong, (1998). Pre-treated C6 cell homogenates were diluted in 10 volumes of 100 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 containing 5 mM EDTA. One hundred μ l of this preparation were incubated with an equal volume of o-phthaldialdehyde (1 mg/ml methanol) at room temperature during 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions (0 - 1 mM). GSH concentrations were calculated as pmol/mg protein and are represented as percentage of controls.

Nitric oxide (NO) production- NO was determined by measuring the stable product nitrite through the colorimetric assay described by Hevel and Marletta, (1994). Briefly, the Griess reagent was prepared by mixing equal volumes of 1% sulfanilamide in 0.5 N HCl and 0.1% *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine in deionized water. The reagent was added directly to the cell suspension and incubated under reduced light at room temperature during 30 min. Samples were analyzed at 550 nm on a microplate spectrophotometer. Controls and blanks were run simultaneously. Nitrite concentrations were calculated using a standard curve prepared with sodium nitrite (0-80 μ M). Results were expressed as percentage of controls.

Protein Measurement- Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.*, (1951) using serum bovine albumin as the standard.

Statistical Analysis- Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test when the *F* was significant. All analyses were performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software program in an IBM-PC compatible computer. A $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

We first evaluated whether the BCAA accumulating in MSUD, at 2.5 mM (results not shown) and 5 mM concentration were able to alter the *in vitro* phosphorylation of IF proteins in slices of cerebral cortex of rats. When cortical slices of 9-, 12-, 17- and 21-day-old rats were incubated for 30 min with the BCAA Leu, Ile and Val at 2.5 or 5 mM concentration, we did not observe any alteration of the phosphorylation pattern of the IF proteins studied, i.e., medium molecular weight neurofilament subunit (NF-M), light molecular weight neurofilament subunit (NF-L), vimentin and GFAP (Table 1). Moreover, we verified that exposure of C6 cells to 5 mM BCAA for 3 h did not change the *in vitro* incorporation of ^{32}P into GFAP nor into vimentin IF proteins (Table 2). On the other hand, when C6 cells were treated with different concentrations (1 or 5 mM) of Leu, Ile or Val and morphologically analyzed by phase contrast microscopy after different exposure times (3, 12 and 24 h), we observed that all BCAA induced morphological alterations in the cells in a time- and concentration-dependent manner (Figure 1). In basal conditions (controls), C6 glioma cells were rounded and flat. Morphologically altered cells consisting of fusiform or process-bearing cells were already observed at 3 h exposure to the BCAA. In this context, Val induced the most marked cell shape alterations, reflected by the appearance of process-bearing cells at 1 mM and higher concentrations (Figure 1A). Progressively increased cell death, evaluated by the PI method, was also evident, as verified by detached and refringent cell aggregates in the contrast phase microscopy images in cultures exposed for 24 h to the BCAA (Figure 1A). Figure 1B shows a significant cell death after exposure for 3 h (20% death) or 24 h (50% death) to 5 mM BCAA. Figure 2 shows the immunocytochemistry of C6 cells using monoclonal anti-GFAP and anti-actin antibodies. We observed that C6 cells exhibit a flat and rounded morphology with abundant cytoplasm and few

processes in basal conditions, becoming more fusiform and/or spreading with retracted cytoplasm and long processes after treatment for 3 h with 5 mM BCAA.

Next, we investigated the effect of the BCAA on two parameters of oxidative stress, by assessing reduced GSH and NO levels. Results showed that exposure of tissue slices for 3 h to Leu, Ile and Val at 1 and 5 mM provoked a significant reduction of GSH levels (to 25% of controls) (Figure 3A) and increase of NO levels (reduced by 70%) in C6 cells (Figure 3B), indicating that oxidative damage was induced by the BCAA.

We finally investigated the combined effect of 5 mM BCAA and antioxidants on C6 cell morphology. Results showed that 1 mM GSH and 0.5 mM L-NAME, a NO synthase inhibitor, prevented the morphological alterations induced by the BCAA on C6 cells (Figure 4).

DISCUSSION

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 at high concentrations in MSUD have been reported (Land *et al.*, 1976; Tashian, 1961), the mechanisms of neurotoxicity of the disorder are so far not well understood. In the present report we demonstrated that the BCAA Leu, Ile and Val, at doses similar to those found in tissues from MSUD patients (Chuang and Shih, 2001), provoked cytoskeletal reorganization and cell death probably through oxidative damage in C6 glioma cells. We initially demonstrated that the BCAA induced marked morphological alterations consisting of fusiform or process-bearing cells. We also observed that Val induced the most marked effect on cell shape, which is in agreement with previous results showing that Val was the most effective BCAA altering cell morphology and inducing cytoskeletal reorganization in rat astrocytes (Funchal *et al.*, 2005a).

On the other hand, immunocytochemistry staining with anti-GFAP and anti-actin antibodies showed a rearrangement of the cytoskeletal network, as well as altered organization of GFAP filaments after exposing C6 cells for 3 h to 5 mM of BCAA. Since it has been previously shown that the expression of GFAP has dramatic effects on cell morphology in C6 cells (Toda *et al.*, 1994; Funchal *et al.*, 2005b), our present results showing reorganization of actin cytoskeleton may be involved in BCAA-induced cell morphological alterations observed.

We recently reported that the BCKA accumulating in MSUD elicited alterations in the phosphorylation levels of IF proteins in cerebral cortex slices of rats in a developmentally regulated manner (Funchal *et al.*, 2002) and that phosphorylated GFAP was related to cytoskeletal reorganization in C6 glioma cells treated with BCKA (Funchal *et al.*, 2005b). Since aberrant cytoskeletal phosphorylation/dephosphorylation may have serious consequences for cellular function and structure, it is conceivable that the BCKA-induced altered IF phosphorylation may provoke neural damage in MSUD as it does in various neurodegenerative diseases (Grant and Pant, 2000). In contrast, we found in the present work that the BCAA did not affect the phosphorylation level of neurofilament subunits or vimentin and GFAP in cortical slices during development. Moreover, treatment of C6 glioma cells for periods as long as 3 h with high concentrations of the BCAA was not able to alter the *in vitro* ^{32}P incorporation either into GFAP or into vimentin. Therefore, considering that the BCAA were unable to alter the phosphorylation of IF proteins, it may be presumed that other mechanisms rather than the IF-associated phosphorylation system mediated the effects of the BCAA on cytoskeletal remodelling in C6 cells

We also observed necrotic cell death associated with cytoskeletal remodelling when cultivated C6 glioma cells were exposed for 3 to 24 h to 5 mM BCAA, as measured by PI method, in which the stain crosses the plasma membrane of non-viable cells causing the DNA to

become highly fluorescent (Cimarosti *et al.*, 2001). Our results are therefore in line with previous studies showing that the BCAA altered astrocyte morphology inducing cytoskeletal reorganization and cell death (Funchal *et al.*, 2005a) and that high doses of the BCAA and BCKA decrease neuronal and astrocytic viability in cell cultures (Jouvet *et al.*, 2000).

Since alterations in the cytoskeletal dynamics could result from increased RS formation (Gourlay *et al.*, 2005) and since the brain has low cerebral antioxidant defenses compared to other tissues (Halliwell and Gutteridge, 1996), we also evaluated the role of BCAA on some parameters of oxidative stress in C6 cell homogenates, as well as the effects of antioxidants on the deleterious actions provoked by these amino acids on the cytoskeleton. We observed that all BCAA at 1 and 5 mM concentrations significantly reduced GSH levels, the major naturally occurring non-enzymatic antioxidant defence in the brain (Dringen *et al.*, 2000), implying that the C6 cell antioxidant defences were compromised by BCAA exposure. We also found that all BCAA, at 1 and 5 mM concentration, markedly increased NO levels by up to 70%, indicating that NO or its highly toxic derivative peroxynitrite may potentially damage cell structures. This is an interesting finding since C6 glioma cells express inducible NO synthase (iNOS), whose activity is stimulated in pathological conditions in which NO concentrations are found increased (Won *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005). Previous findings from our laboratory have shown that the BCAA accumulating in MSUD induce oxidative stress in brain tissues (Fontela *et al.*, 2002; Bridi *et al.*, 2003, 2005b), and this is in accordance with the present findings.

Glial cells are known to protect neurons against oxidative stress and cell death by releasing GSH and keeping it in the reduced form (Sagara *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 1999). Our results showing that the BCAA provoked a marked reduction of intracellular GSH levels are probably due to increased free radical generation induced by the BCAA. In line with this, the increased NO formation could also contribute to reduce GSH levels since it could rapidly form

derivatives such as nitroso-glutathione (Stamler and Toone, 2002; Rodriguez-Martin *et al.*, 2002). Considering that excessive production of RS (NO) and reduction of GSH levels reflect oxidative stress (Sies, 1985), it may be concluded that the BCAA induced oxidative damage in C6 cells.

In order to evaluate the involvement of oxidative stress on the morphological alterations induced by BCAA, we co-incubated antioxidants with these amino acids. We observed that both GSH and L-NAME preserved the normal shape of C6 cells exposed to the BCAA, reinforcing the deleterious role of reactive species induced by these amino acids on C6 cell morphology. In this context, recent evidence emphasizes the important role of actin cytoskeleton as a physiological regulator of reactive species release from mitochondria and as a key element in the upstream activation of cell death pathways (Gourlay and Ascough, 2005). Therefore, considering that the BCAA treatment induced actin alterations and since actin reorganization is linked to cell death, it is conceivable that the BCAA-induced disorganization of the cytoskeleton could elicit death in C6 glioma cell. Previous reports from our laboratory demonstrating that BCAA accumulating in MSUD are toxic to astrocyte cells leading to morphological alterations and cell death via the RhoA signaling pathway (Funchal *et al.*, 2005a) are possibly related to our present results. Furthermore, we cannot, at present, rule out that part of our present data might be ascribed to the corresponding BCKA formed from the BCAA since we have previously observed that oxidative stress might be involved in the cell morphological alterations and death, and in the cytoskeletal reorganization induced by the BCKA in C6 glioma cells (Funchal *et al.*, 2006).

In conclusion, we showed that Leu, Ile and Val, at concentrations found in plasma and tissues of MSUD patients, compromise the cytoskeletal organization of C6 glioma cells possibly due to free radical attack. Since the cytoskeleton participates in critical cell functions, the cytoskeletal reorganization induced by the BCAA might have important consequences to cell survival and be one of the mechanisms by which the BCAA are neurotoxic in MSUD patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESq-UFRGS).

REFERENCES

- Bellomo G., Mirabelli F., Vairerri M., Iosi F. and Malomi W., (1990) Cas a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. Biochemical and immunocytochemical features. *J Cell Physiol* 143, 118-128.
- Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L. and Sweet W., (1968) Differentiated rat glial cell strain in culture. *Science* 161, 370-371.
- Bridi R., Araldi J., Sgarbi M.B., Testa C.G., Durigon K., Wajner, M. and Dutra-Filho C.S., (2003) Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci* 21, 327-332.
- Bridi R., Braun C.A., Zorzi G.K., Wannmacher C.M., Wajner M., Lissi E.G. and Dutra-Filho, C.S., (2005a) Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Met Brain Dis* 20, 155-167.
- Bridi R., Latini A., Braun C.A., Zorzi G.K., Wajner M., Lissi E.G. and Dutra-Filho CS., (2005b) Evaluation of the mechanisms involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39, 71-79.
- Browne R.W. and Armstrong D., (1998) Reduced glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108, 347-352.
- Chuang, D.T. and Shih, V.E. (2001) Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, pp. 1971-2005.

Cimarosti H., Rodnight R., Tavares A., Paiva R., Valentim L., Rocha E. and Salbego C., (2001) An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett* 315, 33-36.

Danner, D.J. and Elsas, J.L., (1989). Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, New York, Mc Graw Hill, pp. 671-692.

Davis R.L., Sanchez A.C., Lindney D.J., Williams S.C. and Syapin P.J., (2005) Effects of mechanistically distinct NF-kappaB inhibitors on glial inducible nitric-oxide synthase expression. *Nitric Oxide* 12, 200-209.

Dent E.W. and Gestler F.B., (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209-227.

Dringen R., Gutterer J.M. and Hirrlinger J., (2000) Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267, 4912-916.

Efron M.L., (1965) Aminoaciduria. *N Engl J Med* 272, 1058-1067.

Fontella F.U., Gassen E., Pulrolni, V., Wannmacher C.M.D., Klein A.B., Wajner M. and Dutra-Filho C.S., (2002) Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17, 47-54.

Funchal C., de Lima Pelaez P., Oliveira Loureiro S., Vivian L., Dall Bell Pessutto F., Vieira de Almeida L.M., Tchernin Wofchuk S., Wajner M. and Pessoa-Pureur R., (2002) α -Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Dev Brain Res* 139, 267-276.

Funchal C., Vieira de Almeida L.M., Oliveira Loureiro S., Vilian L., de Lima Pelaez P., Dall Bello Pessutto F., Meyer Rosa A., Wajner M. and Pessoa-Pureur R., (2003) In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain Res Prot* 11, 111-118.

Funchal C., Rosa A.M., Wajner M., Wofchuk S. and Pessoa-Pureur R., (2004a) Reduction of glutamate uptake into cerebral cortex of developing rats by the branched-chain α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 29, 747-753.

Funchal C., Gottfried C., Vieira de Almeida L.M., Wajner M. and Pessoa-Pureur R., (2004b) Evidence that the branched-chain α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations and death in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. *Glia* 48, 230-241.

Funchal C., Gottfried C., Vieira de Almeida L.M., Quincozes dos Santos A., Wajner M. and Pessoa-Pureur R., (2005a) Morphological alterations and cell death provoked by the branched-chain α -amino acids accumulating in maple syrup urine disease in astrocytes from rat cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol* 25, 851-867.

Funchal C., Quincozes dos Santos A., Jacques-Silva M.C., Zamoner A., Gottfried C., Wajner M. and Pessoa-Pureur R., (2005b) Branched-chain α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. *Metab Brain Dis* 20, 205-217.

Funchal C., Latini A., Jacques-Silva M.C., Quincozes dos Santos A., Buzin L., Gottfried C., Wajner M. and Pessoa-Pureur R., (2006) Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by the branched-chain α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Int* 49, 640-650.

Gourlay C.W. and Ayscough K.R., (2005) The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev* 6, 583-589.

Grant P. and Pant H.C., (2000) Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol* 29, 843-872.

Haghighat N. and McCandless D.W., (1997) Effect of ammonium chloride on energy metabolism of astrocytes and C6-glioma cells. *Met Brain Dis* 12, 287-298.

Haghighat N., McCandless D.W. and Geraminegad P., (2000) Responses in primary astrocytes and C6-glioma cells to ammonium chloride and dibutyryl cyclic-AMP. *Neurochem Res* 25, 277-284.

Halestrap A., Brand M.D. and Denton R.M., (1974) Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by phenylpyruvate and α -ketoisocaproate. *Biochem Biophys Acta* 367, 102-108.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., (1996). Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8, 22-26.

Hevel J.M. and Marlett, M.A., (1994) Nitric Oxide synthase assays. *Methods Enzymol.* 233, 250-258.

Hinshaw D.B., Burger J.M., Beails T.F., Armstrong B.C., and Hyslop P.A., (1991) Actin polymerization in cellular oxidant injury. *Arch Biochem Biophys.* 288, 311-316.

Howell R.K. and Lee M., (1963) Influence of alpha-ketoacids on the respiration of brain in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 113, 660-663.

Inagaki M., Nakamura Y., Takeda M., Nishimura T. and Inagaki M., (1994) Glial fibrillary acidic protein: Dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* 4, 239-243.

Jouvet P., Rustin P., Taylor D.L., Pocock J.M., Felderhoff-Mueser U., Mazarakis N.D., Sarrat C., Joashi U., Kozma M., Greenwood K., Edwards A.D. and Mehmet H., (2000) Branched chain

amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell* 11, 1919-1932.

Laemmli U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Land J.M., Mowbray J. and Clark J.B., (1976) Control of pyruvate and β -hydroxy-butyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J Neurochem* 26, 823-30.

Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-267.

Nord A., Van Doorninck W.J. and Greene C., (1991) Developmental profile of patients with maple syrup urine disease. *J Inher Met Dis* 14, 881-889.

Parker K.P., Norenberg M.D. and Vernadakis A., (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science* 208, 179-181.

Pilla C., Cardozo R.F., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T., Wajner M. and Wannmacher C.M., (2003) Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res* 28, 675-9.

Rodríguez-Martin E., Casajeros M.J., Canals S., de Bernardo S. and Mena M.A., (2002) Thiolic antioxidants protect from nitric oxide-induced toxicity in fetal midbrain cultures. *Neuropharmacol* 43, 877-888.

Sagara J.I., Miura K. and Bannai S., (1993). Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem*. 61, 1672-1676.

Sgaravati A.M., Rosa R.B., Schuck P.F. Ribeiro C.A.J., Wannmacher C.M.D., Wyse A.T.S., Dutra-Filho C.S. and Wajner M., (2003) Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1639. 232–238.

Sies, H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. In *Oxidative Stress*, Academic Press, London, pp 1-8.

Stamler J.S. and Toone E.J., (2002) The decomposition of thionitrites. *Curr Opin Chem Biol* 6, 779-785.

Stone R., Stewart V.C., Hurst R.D., Clark J.B. and Heales S.J., (1999) Astrocyte nitric oxide causes neuronal mitochondrial damage, but antioxidant release limits neuronal cell death. *Ann NY Acad Sci* 893, 400-403.

Tashian R.E., (1961). Inhibition of brain glutamic acid decarboxilase 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.

Tavares R.G., Santos C.E.F., Tasca C., Wajner M., Souza D.O. and Dutra-Filho C.S., (2000) Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol. Sci* 181, 44-49.

Toda M., Miura M., Asou H., Toya S. and Uyemura K., (1994) Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by GFAP cDNA transfection. *J Neurochem* 63, 1975-1978.

Won J.S., Im Y.B., Singh A.K. and Singh I. (2004) Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radic Biol Med* 37, 1834-1844.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1 Effect of the branched-chain amino acids leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val) on C6 glioma cell morphology and cell viability. (A) Cells were cultured to confluence in DMEM + 5% fetal bovine serum (FBS). The medium was then changed to DMEM + 0% FBS and cells incubated for 3, 12 and 24 h in the presence or absence of Leu, Ile or Val at different concentrations (1 or 5 mM). After incubation, phase-contrast images were recorded as described in Material and Methods. Original images were adjusted by increasing contrast. Scale bar = 50 μ m. (B). Cells were transferred to DMEM + 0% FBS containing 7.5 μ M propidium iodide in the absence or presence of 5 mM BCAA and the incubation continued for 3 and 24 h. Optical density values of three separate experiments with propidium iodide method are expressed as density light unit (DLU % of control). Values are means \pm standard deviation for three independent experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of control. * P < 0.05; ** P < 0.01, compared to controls (Tukey Test).

Figure 2. Immunostaining of C6 glioma cells exposed to the branched-chain amino acids leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val). Cells were cultured to confluence in DMEM + 10% fetal bovine serum (FBS). The medium was then changed to DMEM + 0% FBS in the presence or absence of 5 mM BCAA for 3 h after which they were fixed and immunostained with anti-actin or anti-GFAP, as described in Materials and Methods. Original images were adjusted by increasing contrast. GFAP, glial fibrillary acidic protein. Scale bar = 50 μ m.

Figure 3. Effect of 3 h exposure of C6 glioma cells to the branched-chain amino acids leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val) on glutathione (GSH) (A) and nitric oxide (NO) levels (B). Values are means \pm standard deviation for three independent experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of control. * P < 0.01 (in A); * P < 0.001 (in B); ** P < 0.001, compared to controls (Tukey Test).

Figure 4. Effect of the antioxidants glutathione (GSH; 1mM) and L-NAME (500 μ M) on the branched-chain amino acids leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val)-induced morphological alterations in C6 cells. Cells were cultured to confluence in DMEM + 5% FBS and were incubated for 3 h in the presence or absence of 10 mM BCAA, GSH or L-NAME. After incubation, cells were fixed and phase contrast images were recorded as described in Materials and Methods. Original images were adjusted by increasing contrast. Scale bar = 50 μ m.

FIGURA 1A

FIGURA 1B

FIGURA 2

FIGURA 3

FIGURA 4

Table 1. Effect of the branched-chain amino acids on the in vitro phosphorylation of IF proteins in slices of cerebral cortex of rats during development.

5 Mm Leu	9 days	12 days	17 days	21 days
NF-M	101,20 ± 39,46	111,92 ± 25,22	99,90 ± 18,75	105,38 ± 16,12
NF-L	109,53 ± 36,72	118,71 ± 31,85	97,77 ± 17,35	122,88 ± 30,57
VIM	89,75 ± 25,08	107,32 ± 35,00	99,85 ± 14,56	117,96 ± 34,62
GFAP	104,20 ± 27,23	115,30 ± 38,03	98,28 ± 16,29	112,35 ± 21,67
<hr/>				
5 mM Ile				
NF-M	104,12 ± 33,43	102,22 ± 3,33	107,94 ± 22,34	109,99 ± 17,75
NF-L	146,47 ± 54,49	96,53 ± 3,46	102,58 ± 16,94	113,26 ± 14,81
VIM	144,15 ± 52,59	94,69 ± 6,31	102,44 ± 24,20	95,51 ± 32,10
GFAP	130,72 ± 59,25	100,80 ± 4,24	103,16 ± 20,32	110,49 ± 25,23
<hr/>				
5 mM Val				
NF-M	103,90 ± 43,88	116,20 ± 33,37	100,49 ± 17,05	104,47 ± 11,04
NF-L	105,10 ± 28,17	138,85 ± 33,96	101,61 ± 19,93	110,40 ± 19,52
VIM	85,24 ± 14,98	111,16 ± 44,50	99,80 ± 17,02	121,17 ± 24,58
GFAP	78,78 ± 16,16	105,27 ± 29,18	99,25 ± 16,46	110,18 ± 16,67

Results are expressed as percentage of control ± SD from 4-12 independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA. NF-M = medium molecular weight neurofilament subunit; NF-L = light molecular weight neurofilament subunit; vim = vimentin; GFAP = glial fibrillary acidic protein; Leu = leucine; Ile = isoleucine; Val = valine

Table 2. Effect of the branched-chain amino acids on the in vitro phosphorylation of IF proteins in C6 glioma cells.

	5 mM Leu	5 mM Ile	5 mMVal
VIM	99,59±8,13	99,13±10,43	97,70±7,90
GFAP	103,79 ±10,41	98,99±9,44	90,97±16,91

Results are expressed as percentage of control \pm SD from three independent cultures. Data were analyzed by one-way ANOVA. Vim = vimentin; GFAP = glial fibrillary acidic protein; Leu = leucine; Ile = isoleucine; Val = valine

4. DISCUSSÃO

A DXB é um erro inato do metabolismo causado pela severa deficiência na atividade do complexo enzimático desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (Chuang e Shih, 2001). A incapacidade deste complexo enzimático para oxidar os CACR, CIC, CMV e CIV leva ao acúmulo desses metabólitos e de seus aminoácidos precursores Leu, Ile e Val, respectivamente, em tecidos de indivíduos portadores dessa doença. A sintomatologia desses pacientes inclui cetoacidose, falta de apetite, apnéia, convulsões, coma, retardo psicomotor e mental (Nyhan, 1984; Chuang e Shih, 2001). Imagens do SNC revelam baixa densidade da massa branca correspondendo a hipomielinização/desmielinização e atrofia cerebral (Chuang e Shih, 2001).

Embora os mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica dos pacientes portadores dessa doença sejam complexos e pouco conhecidos, tem sido demonstrado que o acúmulo desses metabólitos pode afetar o metabolismo energético em cérebro de ratos (Halestrap *et al.*, 1974; Danner e Elsas, 1989; Yudkoff *et al.*, 1994) e causar significantes alterações nas concentrações dos neurotransmissores glutamato, aspartato e ácido γ -aminobutírico (GABA) no cérebro (Prensky *et al.*, 1967; Dodd *et al.*, 1992; Yudkoff *et al.*, 1994; Tavares *et al.*, 2000). Além disso, o dano cerebral causado por essa desordem pode também ser relacionado à apoptose das células neurais (Jouvet *et al.*, 2000) e estresse oxidativo em frações subcelulares (Fontanela *et al.*, 2002; Bridi *et al.*, 2003; Bridi *et al.*, 2005a).

Apesar de estar bem descrita na literatura a relação entre as alterações no citoesqueleto de células neurais e os mecanismos de neurodegeneração, a falta de dados relacionados aos efeitos dos AACR nos levou a avaliar, no presente trabalho, os efeitos destes metabólitos sobre o citoesqueleto de células neurais utilizando um modelo experimental de DXB.

É importante salientar que as consequências de drásticas alterações no citoesqueleto podem levar a importantes implicações sobre várias funções dos astrócitos como sinalização e captação de Ca^{+2} (Cotrina *et al.*, 1998; Sergeeva *et al.*, 2000), transporte de glutamato (Duan *et al.*, 1999), endo e exocitose de vesículas e tráfego de proteínas (Ridley, 2001). Já está bem estabelecido que um ou mais desses fatores podem agir juntos comprometendo a viabilidade das células. As células de glioma C6 foram escolhidas para a realização deste trabalho por serem de fácil manuseio e um modelo muito utilizado para estudar células gliais (Mangoura *et al.*, 1989; Vernadakis *et al.*, 1991; Goya *et al.*, 1996; Haghghat e McCandees, 1997).

No presente estudo, nós demonstramos que os AACR Leu, Ile e Val, nas concentrações encontradas no plasma e urina de pacientes com DXB, provocam alterações morfológicas envolvendo uma reorganização do citoesqueleto e morte celular através de estresse oxidativo em células de glioma C6.

Nós, inicialmente, observamos que os AACR alteram a morfologia dessas células, normalmente arredondadas, deixando-as fusiformes e com a presença de processos. A Val foi o aminoácido com o efeito mais drástico sobre a forma celular, o que está de acordo com resultados anteriores apresentados por nosso grupo, que demonstraram uma alteração morfológica severa e reorganização do citoesqueleto pela Val em astrócitos de córtex cerebral de ratos (Funchal *et al.*, 2005a).

A imunocitoquímica com os anticorpos anti-GFAP e anti-actina demonstrou um rearranjo da rede de citoesqueleto após a exposição das células C6 aos AACR na concentração de 5mM por 3 horas. Observamos que essas células, em condições basais, são arredondadas e com poucos processos, enquanto que as células incubadas com os aminoácidos mostram uma reorganização dos filamentos de GFAP e actina, tornando-se fusiformes e com a presença de vários processos.

Esses resultados confirmam evidências prévias de que a expressão da GFAP tem efeitos drásticos sobre a morfologia das células C6 (Toda *et al.*, 1994; Funchal *et al.*, 2005b).

Nosso grupo demonstrou recentemente que os AACR que se acumulam na DXB induzem alterações no sistema fosforilante dos constituintes dos FI em fatias de córtex cerebral de ratos de maneira dependente do desenvolvimento (Funchal *et al.*, 2002) e que a GFAP fosforilada está relacionada com a organização do citoesqueleto das células C6 tratadas com esses metabólitos (Funchal *et al.*, 2005b). Entretanto, no presente estudo, nós não evidenciamos alteração na incorporação *in vitro* de ^{32}P na GFAP e na vimentina de células C6 expostas por 3 horas a altas concentrações desses AACR. Além disso, verificamos que estes aminoácidos não afetam a fosforilação das subunidades dos neurofilamentos, vimentina e GFAP em fatias de córtex cerebral de ratos durante o desenvolvimento (9, 12, 17 e 21 dias de idade).

Desequilíbrios no sistema de fosforilação/desfosforilação do citoesqueleto podem ocasionar sérias conseqüências para a função e estrutura celulares, e estes mecanismos podem ser responsáveis pelo dano neural em várias doenças neurodegenerativas (Grant and Pant, 2000). Além disso, reforçando o envolvimento da fosforilação das proteínas do citoesqueleto sobre a morfologia celular, nós recentemente descrevemos a hiperfosforilação da GFAP e conseqüente reorganização dos FI em células C6 tratadas com AACR (Funchal *et al.*, 2005b). Entretanto, apesar de os AACR não alterarem a fosforilação das proteínas dos FI, o presente trabalho sugere que outros mecanismos, além do sistema fosforilante associado aos FI, possam mediar os efeitos dos AACR sobre a reorganização do citoesqueleto nas células C6.

Sabe-se que a viabilidade das células neurais é mantida através de uma rede complexa de rotas de sinalização que pode ser perturbada em resposta a diversos tipos de estresse celular. Mudanças na rota de sinalização após estresse ou em resposta a uma patologia podem ter drásticas conseqüências no destino de uma célula. Há significantes evidências de que uma injúria

aguda ou uma degeneração podem levar á ativação de mecanismos de morte celular. Esse processo envolve a ativação de cascatas de sinalização, que comprometeram a estrutura da mitocôndria, o metabolismo energético e a integridade nuclear (Morrison *et al.*, 2002).

Nós também observamos morte celular associada com o remodelamento do citoesqueleto, quando células C6 em cultivo foram expostas de 3 a 24 horas a 5mM AACR, como medido pelo método de PI, no qual o corante atravessa a membrana plasmática das células não viáveis tornando o DNA altamente fluorescente (Cimarosti *et al.*, 2001). Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, realizados por nosso grupo e por outros pesquisadores, demonstrando que os AACR alteraram a morfologia de astrócitos induzindo a reorganização do citoesqueleto, levando a morte celular (Funchal *et al.*, 2005a) e que altas doses dos CACR e dos AACR diminuem a viabilidade das células neuronais e astrocítárias em cultura (Jouvet *et al.*, 2000).

As células possuem mecanismos de defesa para proteger-se dos danos causados pelas ER. Os danos podem ocorrer quando a produção de ER excede sua eliminação através dos sistemas antioxidantes de defesa. Este desequilíbrio entre a produção e a habilidade das células em inativar estas espécies é chamado estresse oxidativo (Halliwell, 1991; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001). O estresse oxidativo pode ser resultado da geração de ER em uma taxa acima do normal, de defesas antioxidantes insuficientes, da liberação de íons de metais de transição formando, por exemplo, mais radicais $\cdot\text{OH}$ e radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$) a partir de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos (LOOH), e de uma combinação desses fatores (Halliwell, 2001). O estresse oxidativo pode causar danos celulares e subsequente morte celular. Isto ocorre, por exemplo, no processo de apoptose que acompanha a neurodegeneração, onde as ER oxidam componentes celulares vitais como lipídeos, proteínas e DNA (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

As alterações na dinâmica do citoesqueleto, evidenciadas nesse trabalho, poderiam resultar da formação aumentada das ER (Gourlay *et al.*, 2005) e como o cérebro tem baixos níveis de defesas antioxidantes comparado com outros tecidos (Halliwell and Gutteridge, 1996), nós avaliamos o papel dos AACR sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de células C6, bem como o efeito de antioxidantes sobre a ação deletéria provocada por esses aminoácidos sobre o citoesqueleto. Nós observamos que todos os AACR nas concentrações de 1 e 5mM reduziram significativamente os níveis de GSH, a maior defesa antioxidante não-enzimática presente no cérebro (Dringen *et al.*, 2000) mostrando que as defesas antioxidantes das células C6 foram comprometidas pela exposição aos AACR. Nós também encontramos que todos os AACR, nas concentrações de 1 e 5 mM, aumentaram em 70% os níveis de NO o que pode “*per se*” ou pela formação do peroxinitrito (o derivado mais deletério do NO) danificar a estrutura celular. Este é um achado interessante, visto que células C6 expressam NO sintase induzível (iNOS), cuja atividade é estimulada em condições patológicas na qual a concentração do NO está aumentada (Won *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005).

Células gliais formam a maior população de células não excitáveis no SNC e estão intimamente associadas aos neurônios. Os astrócitos inicialmente eram considerados como suporte metabólico do SNC. Entretanto, sabe-se atualmente, que eles podem apresentar mais funções além de suporte estrutural e trófico para os neurônios, sendo capazes de regular a atividade neuronal e a transmissão sináptica. Essas células ainda são conhecidas por proteger os neurônios contra o estresse oxidativo e morte celular pela liberação de glutatona na forma reduzida no meio extracelular (Sagara *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 1999). Nossos resultados demonstraram que os AACR provocaram uma redução dos níveis intracelulares de glutatona, provavelmente devido ao aumento na geração de radicais livres induzido por esses aminoácidos. De acordo com isso, o aumento na formação de NO poderia também contribuir para reduzir os

níveis de GSH, podendo rapidamente formar derivados assim como nitro-glutationa (Stamler e Toone, 2002; Rodriguez-Martin *et al.*, 2002). Considerando o conjunto dessas observações e que a produção excessiva das ER e/ou perda das defesas antioxidantes, colaboram para a situação conhecida como estresse oxidativo (Sies, 1985), então podemos supor que os AACR induzem dano oxidativo nas células C6.

Para melhor avaliar o envolvimento do estresse oxidativo nas alterações morfológicas induzidas pelos AACR nas células C6, nós realizamos experimentos nos quais as células foram co-incubadas com antioxidantes e com esses aminoácidos. Nós observamos que tanto a GSH como o L-NAME (inibidor da NO sintase) preservaram a forma normal das células C6 expostas aos AACR, reforçando o papel deletério do estresse oxidativo induzido por esses aminoácidos sobre a morfologia das células C6. Neste contexto, recentes evidências enfatizam o importante papel do citoesqueleto de actina como um regulador fisiológico da liberação de espécies reativas da mitocôndria e como um elemento chave na ativação de rotas de morte celular (Gourlay and Ascough, 2005). Por isso, considerando que o tratamento com os AACR foi capaz de induzir alterações na actina e que a reorganização de actina está associada à morte celular, é provável que a desorganização do citoesqueleto induzido pelos AACR possa levar à morte das células C6. Trabalhos prévios, realizados em nosso laboratório, demonstraram que os AACR que se acumulam na DXB são tóxicos para as células astrocíticas, levando a alterações morfológicas e morte celular via a rota de sinalização mediada pela RhoA (Funchal *et al.*, 2005a) sendo essas evidências provavelmente relacionadas aos nossos resultados atuais. No entanto, nós não podemos excluir a possibilidade de que os resultados do presente trabalho possam ser atribuídos, pelo menos em parte, aos correspondentes CACR formados a partir dos AACR, desde que nós temos previamente observado que o estresse oxidativo deve estar envolvido nas alterações

morfológicas e morte das células, e na reorganização do citoesqueleto induzido pelos ACCR nas células C6 (Funchal *et al.*, 2006).

Embora seja difícil extrapolar nossos resultados *in vitro* à condição humana *in vivo*, podemos presumir que a neuropatologia da DXB, caracterizada por atrofia cerebral e hipomielinização, possa estar relacionada ao distúrbio da função das células gliais, envolvendo aumento da geração das ER, levando à morte das células neurais. Nesse cenário, o uso de antioxidantes como uma terapia adjuvante para pacientes com DXB pode ser um tratamento alternativo.

5. CONCLUSÃO GERAL

Observamos que os aminoácidos de cadeia ramificada não alteram a fosforilação de filamentos intermediários de células neurais, mas são capazes de modificar a morfologia de células gliais levando a morte celular. Além disso, verificamos que os metabólitos estudados induzem estresse oxidativo.

5.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- Os aminoácidos de cadeia ramificada são capazes de alterar a morfologia de células C6, envolvendo reorganização do citoesqueleto de actina e GFAP, levando a morte dessas células.
- Os aminoácidos de cadeia ramificada não foram capazes de induzir alterações na fosforilação das proteínas de filamentos intermediários de córtex cerebral de ratos durante o desenvolvimento. Estes metabólitos também não alteraram a fosforilação das proteínas de filamentos intermediários em células C6.
- Os metabólitos estudados causaram diminuição da glutathione e aumento na produção de óxido nítrico, indicando que esses aminoácidos estão induzindo estresse oxidativo em células neurais.
- Na presença dos antioxidantes, glutathione e L-NAME, os aminoácidos de cadeia ramificada não são capazes de alterar a morfologia celular, impedindo a morte das células gliais; indicando um possível papel protetor dessas drogas.

6. PERSPECTIVAS

- Estudar os efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a morfologia de neurônios em cultura.
- Estudar os efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a interação neurônio-glia em co-cultura.
- Estudar as vias de transdução de sinal envolvidas nos efeitos desses metabólitos em cultura de neurônios e astrócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerley, S., Grierson, A.J., Brownlees, J., Thornhiel, P., Anderton, B.H., Leight, P.N., Shew, C.E., Mielerc, C.J. Glutamate slow axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J. Cell Biol.*, v.150, p.165-175, 2000.

Alberts, B., Brat, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, JD. The cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the cell*. Alberts, B., Brat, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, JD. (eds) 3 ed. New York, Garland Publishing, p.907-982, 2002.

Al-Chalabi, A., Miller, C.C.J. Neurofilaments and neurological disease. *BioEssays.*, v.25, p.346-355, 2003.

Bellomo, G., Mirabelli, F., Vairerri, M., Iosi, F., Malomi, W. Cytoskeleton as a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. Biochemical and immunocytochemical features. *J. Cell Physiol.*, v.143, p. 118–128, 1990.

Betts, J.C., Blackstock, W.P., Wards, M.A., Anderton, B.H. Identification of phosphorylation sites on neurofilament proteins by nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.12922-12927, 1997.

Bibb, J. James, Nestler, E.J. Serine and threonine phosphorylation. In: *Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspects*. Siegel, G., Alberts, R.W., Brady, Scott T., Price, Donald L. (eds) 7 ed. Elsevier Academic Press, p. 391-414, 1999.

Bridi, R., Araldi, J., Sgarbi, M.B., Testa, C.G., Durigon, K., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v.21, p.327-332, 2003.

Bridi, R., Latini, A., Braun, C.A., Zorzi, G.K., Wajner, M., Lissi, E.G., and Dutra-Filho CS. Evaluation of the mechanisms involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of Young rats. *Free Radic. Res.*, v.39, p.71-79, 2005.

Carmignoto, G. Reciprocal communication system between astrocytes and neurones. *Prog. Neurobiol.*, v.62, p.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, p.1-7, 2000.

Chuang, D.T., Shih, V.E. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). 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, p.1971-2005, 2001.

Cimarosti, H., Rodnight, R., Tavares, A., Paiva, R., Valentim, L., Rocha, E., and Salbego, C. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Lett.*, v.315, p.33-36, 2001.

Cotrina, M. L., Lin, J. H., Nedergaard, M. Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling. *J. Neurosci.*, v.18, p.8794-8804, 1998.

Cui, K., Luo, X., Xu, K., Vem Murthy, MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, v.28, n.5, p.771-799, 2004.

Danner, D.J., 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, p. 671-692, 1989.

Davis, R.L., Sanchez, A.C., Lindney, D.J., Williams, S.C., Syapin, P.J. Effects of mechanistically distinct NF-kappaB inhibitors on glial inducible nitric-oxide synthase expression. *Nitric Oxide* 12: 200-209, 2005.

Dent, E.W., Gestler, F.B. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron.*, v.40, p.209–227, 2003.

Diáz, J.F., Valpuesta, J.M., Chacón, P., Diankun, G., Andrew, M. Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to an easy accessible site. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.33803-33810, 1998.

Dodd, P.R., Willians, S.H., Gundlach, A.L., Harper, P.A.W., Healy, P.J. Dennis, J.A., Johnston, A.R. Glutamate and γ -aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J. Neurochem.*, v.59, p.582-590, 1992.

Downing, K.H. Structural studies on tubulin and microtubules. (1998). In: *Cytoskeleton: signalling and cellular regulation*. Carraway, K.L., Carraway, C.A.C. New York, Oxford University Press, p. 159-181, 2000.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.*, v.267, p.4912-4916, 2000.

Duan, S., Anderson C. M., Stein, B. A., Swanson, R. A. Glutamate induces rapid up regulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J. Neurosci.*, v.19, p. 10193-10200, 1999.

Ecker, B., Dogric, D., Colucci-Gyon, E., Wang, N., Naniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Babinet, C., Krieg, T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell. Sci.*, v.111, p.1897-1907, 1998.

Elder, G.A., Friedrich, V.L., Margita, A., Lazzarine, A. Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in mid-sized neurofilament subunit. *J. Cell Biol.*, v.146, p.181-192, 1999.

Eliasson, C., Sahlgren, C., Berthold, C.H., Stakeleerg, J., Celis, J.E., Betshaltz, C., Eriksson, J.E., Pekny, M. (1999). Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.23996-24006, 1999.

Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.*, v.25, p.1239-1451, 2000.

Feintein, D.L., Weinmaster, G.A., Milner, R.J. Isolation of cDNA clones encoding glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. *J. Neurosci. Res.*, v.32, p.1-4, 1992.

Fontella, F.U., Gassen, E., Pulrolnik, V., Wannmacher, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.*, v.17, p.47-54, 2002.

Fuchs, E., Cleveland, D.W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.*, v.279, p.514-519, 1998.

Fuchs, E., Weber, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Ann. Rev. Biochem.*, v.63, p.345-382, 1994.

Funchal, C., de Lima Pelaez, P., Oliveira Loureiro, S., Vivian, L., Dall Bell Pessutto, F., Vieira de Almeida, L.M., Tchernin Wofchuk, S., Wajner, M., and Pessoa-Pureur, R. α -Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Dev Brain Res.*, v.139, p.267-276, 2002.

Funchal, C., Gottfried, C., Vieira de Almeida, L.M., Quincozes dos Santos, A., Wajner, M., and Pessoa-Pureur, R. Morphological alterations and cell death provoked by the branched-

chain α -amino acids accumulating in maple syrup urine disease in astrocytes from rat cerebral cortex. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v.25, p.851-867, 2005a.

Funchal C, Quincozes dos Santos A, Jacques-Silva MC, Zamoner A, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Branched-chain α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. *Metab Brain Dis.*, v.20, p.205-217, 2005b.

Funchal, C., Latini, A., Jacques-Silva, M.C., Quincozes dos Santos, A., Buzin, L., Gottfried, C., Wajner, M. and Pessoa-Pureur, R. Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by the branched-chain α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem. Int.* “*in press*”, 2006.

Galou, M., Colucci-Guyon, E., Ridet, J.L., Ensergueix, D., Gimenez, Y., Ribotta, M., Privat, A., Babinet, C., Dupouey, P. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J. Cell Biol.*, v.133, p.853-863, 1996.

Geisler, N., Weber, K. Self assembly in vitro of 68,000 MW triplet protein into intermediate- sized filaments. *J. Mol. Biol.*, v.151, p.565-571, 1981.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.*, v.40, n.8, p.959-975, 2001.

Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G., Diabetes Mellitus, hipertension, and cardiovascular disease: Which role for oxidative stress? *Metabolism.*, v. 44, p.363-388, 1995.

Gotow, T., Takeda, M., Tanaka, T., Hashimoto, P.H. Macromolecular structure of reassembled neurofilaments are revealed by the quick-freeze deep-etch mice method, differences between NF-M and NF-H subunits in their ability to form cross-bridges. *Eur. J. Cell Biol.*, v.58, p.331-345, 1992.

Gourlay, C.W., Ayscough, K.R. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat. Rev.* 6, 583–589, 2005.

Goya, L., Feng, P.T., Aliabadi, S., Tímiras, P.S. Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passages of C6 glioma cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v.14, p.409-417, 1996.

Grant, P., and Pant, H.C. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol.*, v.29, p.843-872, 2000.

Guo-Ross, S., Yang, E.Y., Walsh, T.J., Bondy, S.C. Decrease of glial fibrillary acidic protein in rat frontal cortex following aluminum treatment. *J. Neurochem.*, v.73, p.1609-1614, 1999.

Halliwell, B. Drug Antioxidant Effects. *Drugs.*, v.42, n.4, p.569-605, 1991.

Halliwell, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, v.24, p. 1023, 1996.

Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.*, v.18, n.9, p.685-716, 2001.

Haghighat, N., MacCandless, D.W. Effect of ammonium chloride on energy metabolism of astrocytes and C6-glioma cells. *Metab. Brain Dis.*, v. 12, p.287-298, 1997.

Halestrap, A. P., Brand, M. D., Denton, R. M. Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by phenylpyruvate and α -ketoisocaproate. *Biochem. Biophys. Acta*, v.367p.102–108, 1974.

Helfand, B.T., Chang, L., Goldman, R.D. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J. Cell Sci.*, v.117, p.1333-141, 2004.

Herrmann, H., Aebi, U. Intermediate filaments and their associates: multitalent structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v.12, p.79-90, 2000.

Hinshaw, D.B., Burger, J.M., Beails, T.F., Armstrong, B.C., Hyslop, P.A. Actin polymerization in cellular oxidant injury. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.288, p.11–316, 1991.

Hisanaga, S., Hirokawa, N. Structure of peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J. Mol. Biol.*, v.202, p.297-305, 1988.

Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.*, v.80, p.225-236, 1995.

Inada, H., Nagata, K.I., Goto, H., Inagaki, M. Regulation of intermediate filament dynamics: a novel approach using site and phosphorylation state specific antibodies. In: *Cytoskeleton: signalling and cellular regulation*. Carraway, K.L. and Carraway, C.A.C. New York, Oxford University Press, p. 183-207, 2000.

Inagaki, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., Ando, S., Tanabe, K., Kikuchi, K., Tsuiki, S., Nishi, Y. Phosphorylation sites linked the glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical domain. *J. Biol. Chem.*, v.265, p.4722-4729, 1990.

Inagaki, M., Nakamura, I., Takeda, M., Nishimura, T. Glial fibrillary acid protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.*, v.4, p.239-243, 1994.

Jan, D., Poggi, F., Laurent, J., Rabier, D., Jouvét, P., Lacaille, F., Beringer, A., Hubert, P., Revillon, Y., Saudubray, J.M. Liver transplantation: new indications in metabolic disorders? *Transplant Proc.*, v.26, n.1, p.189-190, 1994.

Jouvét, P., Rustin, P., Taylor, D.L., Pocock, J.M., Felderhoff-Mueser, U., Mazarakis, N.D., Sarrat, C., Joashi, U., Kozma, M., Greenwood, K., Edwards A.D., Mehmet, H. Branched

chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol. Biol. Cell*, v.11, p.1919-1932, 2000.

Jung, C., Yabe, J.T., Shea, T.B. C-terminal phosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit correlates with decrease neurofilament axonal transport velocity. *Brain Res.*, v.856, p.12-19, 2000.

Kaneko, R., Hagiwara, N., Leader, K., Suloka, N. Glial-specific cAMP response of the glial fibrillary acidic protein gene in the RT4 cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, p.4529-4533, 1994.

Kirkpatrick, L.L, 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, p.155-173, 1999.

Kosako, H., Amano, M., Yanagida, M., Tanabe, K., Nishi, Y., Kaibuchi, K., Inagaki, M. Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and rho associated kinase. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.10333-10336, 1997.

Lariviere, R.C., Julien, J.P. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J. Neurobiol.*, v.58, p.131-148, 2004.

Lee, M.K., Cleveland, D.W. Neuronal intermediate filaments. *Ann. Rev. Neurosci.*, v.19, p.187-217, 1996.

Li, B.S., Grant, V.P., Pant, H.C. Calcium influx and membrane depolarization induce phosphorylation of neurofilament (NF-M) KSP repeats in PC12 cells. *Mol. Brain Res.*, v.70, p.84-91, 1999.

Lin, C.H., Foscher, P. Growth cone advance is inversely proportional of retrograde F-actin flow. *Neuron.*, v.14, p.763-771, 1995.

Mangoura, D., Sakellaridis, N., Jones, J., Vernadakis, A. Early and late passage glial C6 cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem. Res.*, v.14, p.941-947, 1989.

Marinowich, M.; Viviani, B., Galli, C.L. Actin modifications and calcium homeostasis in neurotoxicity. The case of organotin salts. *Toxicol. in Vitro.*, v.11, p.499-503, 1997.

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., Messing, A. Target deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.93, p.6361-6369, 1996.

Morrison, R. S., Kinoshita Y., Johnson M. D., Ghatan S., Ho, J. T., Garden G. Neuronal survival and cell death signaling pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.513, p.41-86, 2002.

Nixon, R.A., Sihag, R.K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci.*, v.14, p.501-506, 1991.

Nobukuni, Y., Mitsubuchi, H., Akaboshi, I., Indo, Y., Endo, F., Yoshioka, A., Matsuda, I. Maple syrup urine disease. Complete defect of the E1 β subunit of the branched chain α -ketoacid dehydrogenase complex due to a depletion of an 11-bp repeat sequence which encodes a mitochondrial targeting leader peptide in a family with disease. *J. Clin. Invest.* 87: 1862, 1991.

Nogales, E. Structural insights into microtubule function. *Ann. Rev. Biochem.*, v.69, p.277-302, 2000.

Nyhan, W. L. Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine. Norwalk: Appleton-Century-Crofts, p.21-35, 1984.

Pasqualoto, B.A., Shaw, C.A. Regulation of ionotropic receptors by protein phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.*, v.51, p.1417-1425, 1996.

Peinemann, F., Danner, D.J. Maple syrup urine disease 1954-1993. *J. Inher. Metab. Dis.*, v.17, p.3-15, 1994.

Pekny, M., Johansson, C.B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallen, A., Perlmann, T., Lendahl, U., Betsholtz, C., Berthold, C.H., Friesen, J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol.*, v.145, p.503-514, 1999.

Prensky, A.L., Moser, H.W. Changes in amino acid composition of proteolipids of white matter during maturation of the human nervous system, *J. Neurochem.*, v.14, p.117-121, 1967.

Rieder, B.M., Pellier, V., Antonsson, B., Di Paolo, G., Stimpson, S.A., Lütjens, R., Catsicas, S., Grenningloh, G. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 741-745, 1997.

Ridley, A. J. Rho proteins: linking signaling with membrane. *Traffic*, v.2, p. 303-310, 2001.

Rodnight, R., Wofchuk, S.T. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. *Essays Biochem.* v.27, p.91-100, 1992.

Rodnight, R., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S.T., Leal, R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz. Med. Biol. Res.*, v.30, p.325-338, 1997.

Rodríguez-Martin, E. Casajeros, M.J., Canals, S., de Bernardo, S., Mena, M.A. Thiolic antioxidants protect from nitric oxide-induced toxicity in fetal midbrain cultures. *Neuropharmacol.*, v. 43, p.877-888, 2002.

Sagara JI, Miura K, Bannai S. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem.*, v.61, p.1672-1676, 1993.

Sánchez, I., Hassinger, L., Sihag, R.K., Cleveland, D.W., Mohan, P., Nixon, R.A. Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo: selective role of site-specific phosphorylation. *J. Cell Biol.*, v.151, p.1013-1024, 2000.

Schulze, E., Asai, D.J., Bulinski, J.C., Kirschner, M. Post-translational modification and microtubule stability. *J. Cell Biol.* 105: 2167-2177, 1987.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. e Valle, D. New York: McGraw-Hill, eds, 8 ed, 2001.

Sergeeva, M. M., Ubl, J. J., Reiser, G. Disruption of actin cytoskeleton in culture rat astrocytes suppresses ATP- and bradykinin induced $(Ca^{2+})_i$ oscillations by reducing the coupling efficiency between Ca^{2+} release, coma capacitative Ca^{2+} and entry, and store refilling. *Neurosci.*, v.97, p.765-769, 2000.

Sies, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: *Oxidative Stress*, ed Sies H pp 1-8. Academic Press, London, 1985.

Small, J.V., Rottner, K., Kaverina, I. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr. Opinion in Cell Biol.*, v.11, p.54-60, 1999.

Snyderman, E., Norton, P.M. e Roitman, B. Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics.*, v.34, p.454-472, 1964.

Stamler, J.S., and Toone, E.J. The decomposition of thionitrites. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.6, p.779-785, 2002.

Stone R, Stewart VC, Hurst RD, Clark JB, Heales SJ. Astrocyte nitric oxide causes neuronal mitochondrial damage, but antioxidant release limits neuronal cell death. *Ann NY Acad Sci.*, v.893, p.400-403, 1999.

Tavares, R. G., Santos, C. E. S., Tasca, C., Wajner, M., Souza, D. O., Dutra-Filho C. S. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J. Neurol. Sci.*, v.181, p.44-49, 2000.

Toda, M., Miura, M., Asou, H., Toya, S., and Uyemura, K. Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by GFAP cDNA transfection. *J Neurochem.*, v.63, p.1975-1978, 1994.

Vale, R.D., Schnmapp, B.J., Mitchison, T., Steven, E., Ruse, T.S., Sheetz, M.P. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell.*, v.43, p.623-632, 1985.

Venadakis, A., Kentroti, S., brodie, C., Mangoura, D., Sakellaridis, N. C6 glioma cells of early passage have progenitor properties in culture. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.296, p.181-195, 1991.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Lin, Z.P., Nissin, I., Stern, J., Pleasure, D., e Nissin, I. Interrelationships of leucine and glutamate metabolism in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, v.62, p.1192–11202, 1994.

Wang, N., Stamenovic, D. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stifferring and growth. *Am. J. Physiol.*, v.279, p.188-194, 2000.

Wallas, S.T., Greengard, P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p.299-349, 1991.

Won, J.S., Im, Y.B., Singh, A.K., Singh, I. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radic. Biol. Med.*, v.37, p.1834-1844, 2004.

Zielke, H.R., Huang, Y., Tildon, J.T.; Zielke, C.L., 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. *Dev. Neurosci.*, v.18, p.420-425, 1996.