

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAESTRIATAL AGUDA DE ÁCIDO
QUINOLÍNICO SOBRE O CITOESQUELETO DE CÉLULAS NEURAIS DE
RATOS**

Paula Pierozan

Porto Alegre

2010

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAESTRIATAL AGUDA DE ÁCIDO
QUINOLÍNICO SOBRE O CITOESQUELETO DE CÉLULAS NEURAIS DE
RATOS**

Paula Pierozan

Orientadora: Prof^a Dra. Regina Pessoa Pureur

Co-Orientador: Prof Dr. Moacir Wajner

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2010

Nosso cérebro é o melhor brinquedo
já criado; nele se encontram
todos os segredos,
inclusive o da felicidade;

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais, Nair e Sérgio, pelo apoio, incentivo e por estarem por perto em todos os momentos difíceis e de alegria. Agradeço por terem acreditado em mim sempre, e por me amarem incondicionalmente. Ao meu irmão, pelo companheirismo e amizade ao longo desses anos (e pela ajudinha nos momentos de aperto financeiro). Muito obrigada por formarem essa família linda que se apóia, se ama e que é um sucesso.

À Regui, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela amizade, companheirismo, ensinamentos profissionais, e pelos não menos importantes cafés regados a muitas conversas.

À Ariane, por ter me acolhido maravilhosamente bem no lab, pela parceria nos experimentos e nas conversas, pelos grandes ensinamentos das técnicas e das teorias e pela grande pessoa que ela é.

À Luana e Samanta, pelas ajudas nas técnicas, e pelas risadas que amenizam todas as frustrações.

Às bolsistas de iniciação científica do lab 31, tanto as que passaram quanto as que continuam, pela dedicação, ajuda e amizade durante o tempo que trabalhamos juntas. Em especial à Ângela, por ter sido uma ótima parceira no lab, e por compartilhar comigo todas as bizarrices que me ocorriam durante a realização dos experimentos.

Aos meus amigos, Danilo, Fernando, Paola, Pedro, Duda, e ao Rodrigo, por terem aguentado os meus estresses, encanações, por serem as pessoas maravilhosas que são, e por proporcionarem momentos únicos na minha vida.

A CAPES, pela bolsa concedida.

ÍNDICE

PARTE I

RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. CITOESQUELETO	5
1.1.1. Filamentos intermediários	6
1.1.2. Neurofilamentos	7
1.1.3. Proteína glial fibrilar ácida	9
1.2. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO	10
1.3. SINALIZAÇÃO CELULAR	12
1.3.1. Cálcio	12
1.3.2. Glutamato	15
1.3.3 Excitotoxicidade	15
1.4. METABOLISMO DO TRIPTOFANO - ROTA DAS QUINURENINAS	17
1.4.1. Ácido quinolínico	18
1.4.2. Ácido quinolínico e neurodegeneração	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21

PARTE II

1. ARTIGO – The acute intrastriatal administration of quinolinic acid provokes hyperphosphorylation of cytoskeletal intermediate filament proteins in astrocytes and neurons of rats.	23
---	----

PARTE III

1. DISCUSSÃO	65
2. CONCLUSÃO	73
2.1. CONCLUSÃO GERAL	73
2.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	75
3. PERSPECTIVAS	75
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
5. ANEXOS	95
5.1. LISTA DE FIGURAS	95

PARTE I

RESUMO

No presente estudo nós investigamos o efeito *in vivo* da injeção intraestriatal de ácido quinolínico (AQ) sobre proteínas do citoesqueleto de astrócitos e neurônios de ratos jovens 30 minutos após a infusão. Injeção intraestriatal de AQ é um modelo excitotóxico da doença de Huntington (DH). Nossos resultados mostraram que o AQ (150 μ mol/0.5 μ L) aumentou significativamente a fosforilação *in vitro* da subunidade de baixo peso molecular dos neurofilamentos (NF-L) e da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) de neurônios e astrócitos, respectivamente. Este efeito foi mediado pela proteína quinase AMPc-dependente (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase Ca²⁺/calmodulina-dependente II (PKCaMII). Em contraste, proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) não foram ativadas pela infusão com AQ. Além disso, o pré-tratamento com MK-801 (0.25 mg/kg i.p), antagonista específico dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA); com o antioxidante L-NAME (60 mg/kg/day) e com o difenildisseleneto (PheSe)₂ (0.625 mg/kg/dia) preveniram totalmente a hiperfosforilação induzida pelo AQ. Nós também observamos que o sítio de fosforilação Ser55 localizado no domínio N-terminal da NF-L, descrito como um sítio regulatório da associação dos NF *in vivo*, foi alvo da hiperfosforilação induzida pelo AQ. Este efeito foi totalmente prevenido por MK801, pelo inibidor de PKA, H89 e pelo (PheSe)₂, enquanto que staurosporina, um inibidor de PKC, preveniu apenas parcialmente a fosforilação da Ser55. O inibidor de PKCaMII (KN93) e o antioxidante L-NAME não preveniram a hiperfosforilação da Ser55 pelo AQ. Portanto, nós presumimos que a hiperfosforilação da NF-LSer55 pode representar os primeiros passos na cascata fisiopatológica dos eventos deletérios exercidos pelo AQ no estriado de ratos. Nossas observações também indicam que os eventos mediados pelo receptor NMDA e por estresse oxidativo podem estar relacionados com a hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto observadas, com importantes implicações para as funções cerebrais.

ABSTRACT

In the present study we investigated the effect of *in vivo* intrastriatal injection of quinolinic acid (QA) on rat cytoskeleton proteins in astrocytes and neurons of young rats at early stages (30 min) after infusion. Intrastriatal QA injection is an excitotoxic model of Huntington's Disease (HD). Results showed that QA (150 μ mol/0.5 μ L) significantly increased the *in vitro* phosphorylation of the low molecular weight neurofilament subunit (NF-L) and the glial fibrillary acidic protein (GFAP) of neurons and astrocytes, respectively. This effect was mediated by cAMP-dependent protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (PKCaMII). In contrast, mitogen activated protein kinases (MAPK) were not activated by QA infusion. Furthermore, the specific N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK-801 (0.25 mg/kg i.p), the antioxidant L-NAME (60 mg/kg/day), and diphenyldiselenide (PheSe)₂ (0.625 mg/kg/day) injected prior to QA infusion totally prevented QA-induced hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins. We also observed that QA-induced hyperphosphorylation was targeted at the Ser55 phosphorylating site on NF-L head domain, described as a regulatory site for NF assembly *in vivo*. This effect was fully prevented by MK801, by the PKA inhibitor H89 and by (PheSe)₂, whereas staurosporine (PKC inhibitor) only partially prevented Ser55 phosphorylation. The PKCaMII inhibitor (KN93) and the antioxidant L-NAME failed to prevent the hyperphosphorylation of Ser55 by QA infusion. Therefore, we presume that QA-elicited NF-LSer55 hyperphosphorylation of the neural cytoskeleton achieved by intrastriatal QA injection could represent an early step in the pathophysiological cascade of deleterious events exerted by QA in rat striatum. Our observations also indicate that NMDA-mediated Ca²⁺ events and oxidative stress may be related to the altered protein cytoskeleton hyperphosphorylation observed with important implications for brain function.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA, 2-amino-3(3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-yl) propionato
- AMPc, AMP cíclico
- AQ, ácido quinolínico
- ATP, Adenosina 5' - trifosfato
- DA, doença de Alzheimer
- DH, doença de Huntington
- DNA, ácido desoxirribonucléico
- DP, doença de Parkinson
- FI, filamento intermediário
- GABA, ácido γ -aminobutírico
- GFAP, proteína glial fibrilar ácida
- GPx, glutathione peroxidase
- L-NAME, éster metílico da N^o-nitro-L-arginina
- MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno
- NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NDMA, N-metil-D-aspartato
- NF, neurofilamento
- NO, óxido nítrico
- NOS, óxido nítrico sintase
- PKA, proteína quinase A
- PKC, proteína quinase C
- PKCaM, proteína quinase dependente de calmodulina
- SNC, Sistema nervoso central

1- INTRODUÇÃO

1.1. CITOESQUELETO

As células eucarióticas adotam uma variedade de formas e desenvolvem movimentos coordenados e direcionados, com capacidade de alterar sua morfologia, dividir-se, ou responder ao ambiente. Esta habilidade depende de um sistema complexo e altamente dinâmico de filamentos proteicos, denominado citoesqueleto (Alberts *et al.* 2002). No sistema nervoso central (SNC), os neurônios e células da glia possuem uma morfologia complexa que está relacionada com suas funções, sendo os componentes do citoesqueleto as principais proteínas determinantes da morfologia neural, modificando-se em resposta a uma variedade de sinais extracelulares (Sanchez *et al.* 2000). Durante a morfogênese neuronal, por exemplo, diferentes proteínas do citoesqueleto se reorganizam para promover a elongação dos neuritos e subsequente estabilização de axônios e dendritos formados (Ludin & Matus 1993, Tanaka & Sabry 1995, Letourneau 1996). Nos últimos anos, os estudos do citoesqueleto vêm sendo fortemente associados com estudos sobre transdução de sinal. Tornou-se claro que a rede de filamentos do citoesqueleto e as vias de sinalização celular funcionam cooperativamente para gerar um fenótipo adaptado às condições da célula (Hollenbeck 2001).

O citoesqueleto é formado por três sistemas de filamentos: os microfilamentos (MFs), os microtúbulos (MTs) e os filamentos intermediários (FI) (Figura 1). Esses sistemas formam uma rede dinâmica que integra mecanicamente o espaço celular, promove a organização e/ou translocação de moléculas de sinalização, bem como estabelece novos eixos de polaridade celular (Fuchs & Weber

1994, Hollenbeck 2001). As subunidades constituintes dos MFs e MTs, actina e tubulina respectivamente, são proteínas globulares altamente conservadas, enquanto que os membros da família dos FIs são compostos por subunidades de proteínas fibrosas específicas de cada tipo celular (Fuchs & Weber 1994, Szeverenyi *et al.* 2008).

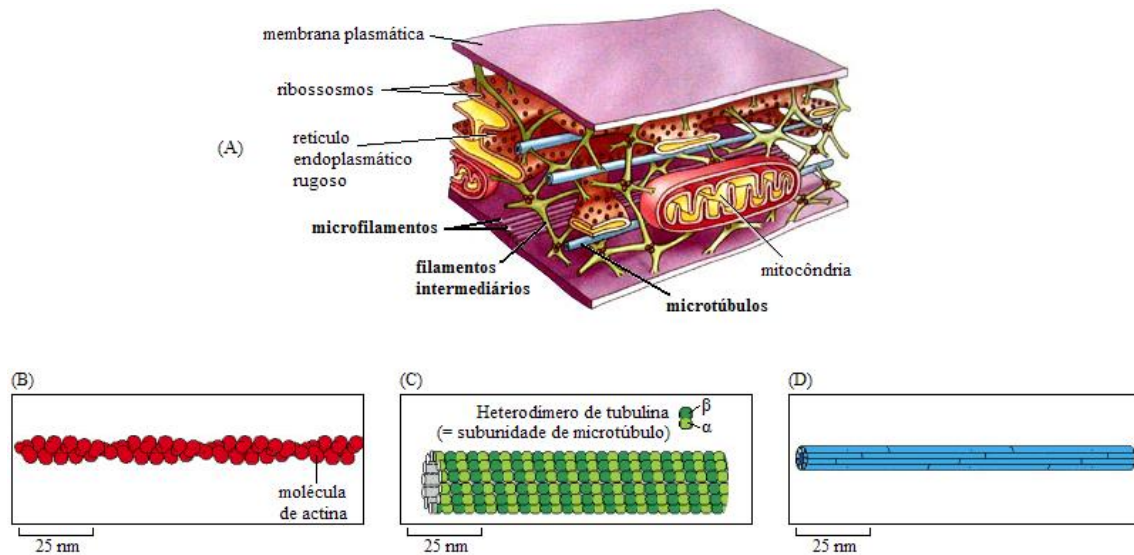


Figura 1. (A) Representação dos filamentos proteicos que constituem o citoesqueleto celular. (B) MFs, ou filamentos de actina, sendo sua subunidade formadora a molécula de actina. (C) MTs, tendo representada sua subunidade formadora, o heterodímero de tubulina. (D) FI, formados por uma família de subunidades. Adaptado de Alberts et al, 2002 e [HTTP://academic.brooklyn.cuny.edu/biology.html](http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology.html) (acesso em 19.12.2009).

1.1.1. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os FI representam um dos maiores sistemas do citoesqueleto presentes nas células eucarióticas. Esta família é codificada por aproximadamente 70 genes (Fuchs & Weber 1994) e possuem um alto grau de especificidade celular, sendo frequentemente usados como marcadores de diferenciação celular (Alberts et al. 2002, Eriksson *et al.* 2009). Os FI possuem uma estrutura que consiste em um domínio central altamente conservado em α -hélice, e domínios N-terminal e C-terminal variáveis (Figura 2). As características dos domínios terminais das subunidades com respeito à sequência de aminoácidos, de suas cargas ácidas, e de

suas estruturas secundárias permitiram a classificação dos FI em quatro grupos: Grupo I – queratinas ácidas; grupo II – queratinas básicas e neutras; grupo III – vimentina, desmina, periferina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP); grupo IV – nestina, sinemina e neurofilamentos (NF) (Eriksson et al. 2009).

Embora esteja claro que os FI são estruturas altamente dinâmicas, a visão predominante durante alguns anos era de que seu papel consistia primariamente na manutenção da integridade estrutural e mecânica da célula. Recentes estudos, porém, especialmente com a descoberta de muitas doenças associadas a mutações em genes que codificam os FI, têm mostrado que eles participam de um grande número de funções dentro da célula, estando envolvidos em processos regulatórios, metabólicos e de sinalização celular, além de possuírem efeitos citoprotetores relacionados com a sua capacidade de interagir com vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular (Eriksson et al. 2009, Ivaska *et al.* 2007). A natureza dinâmica dos FI é refletida pela sua reorganização em resposta a uma ampla variedade de estímulos, incluindo mitose, apoptose e outros estresses celulares, bem como pela sua distribuição entre um *pool* solúvel e um *pool* insolúvel filamentoso (Omary et al. 2006).

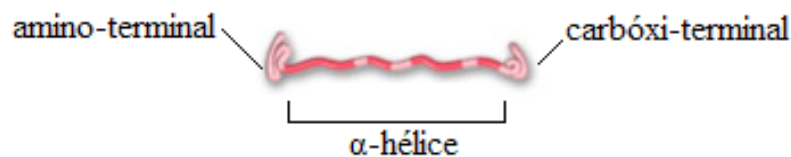


Figura 2. Representação dos domínios dos FIs, amino-terminal, carbóxi-terminal, e cadeia em α -hélice. Adaptado de <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/intermediatefilaments/intermediatefilaments.html> (acesso em 19.12.2009).

1.1.2. NEUROFILAMENTOS

Os neurofilamentos (NFs) são os maiores FIs presentes em neurônios maduros, sendo a sua expressão restrita às células neuronais. Os neurônios

expressam diferentes FIs de acordo com seu estágio de desenvolvimento e localização no SNC: nestina; as subunidades de alto (NFH), médio (NFM) e baixo (NFL) peso molecular; α -internexina e sinemina (Izmiryan *et al.* 2006, Portier *et al.* 1983, Kaplan *et al.* 1990, Lendahl *et al.* 1990). Originalmente, foi assumido que os NF eram compostos apenas pelas subunidades NFL, NFM e NFH. Porém, estudos recentes indicaram que outras proteínas, como a α -internexina e periferina, estão co-associadas aos NF (Beaulieu *et al.* 1999, Yuan *et al.* 2006). A extremidade amino-terminal juntamente com a região em alfa-hélice da subunidade NFL interagem lateralmente e longitudinalmente formando a estrutura propriamente dita do NF, enquanto que as regiões carboxi-terminais das subunidades NFM e NFH são responsáveis pelas projeções laterais, que permitem a interação dos NF entre si e com os demais constituintes do citoesqueleto (Figura 3) (Hisanaga & Hirokawa 1989, Gotow *et al.* 1992). Os domínios N e C-terminais da NFL e NFM, e especialmente suas modificações pós-traducionais são essenciais para a associação dos NFs (Wong & Cleveland 1990).

Os NF têm um papel importante no estabelecimento do calibre axonal (Friede & Samorajski 1970, Hoffman *et al.* 1987), agindo como principal determinante na velocidade de condução dos impulsos elétricos ao longo do axônio (Waxman 1980, Rao *et al.* 2003). A região carboxi-terminal das subunidades NFH e NFM formam projeções laterais nos NFs, e acredita-se que a fosforilação em sítios destas projeções, especialmente no NFH, aumenta sua carga negativa, causando repulsão entre os NFs e consequente aumento do calibre axonal (de Waegh *et al.* 1992). Estudos com animais transgênicos também demonstraram que na ausência da NFL, as subunidades NFM e NFH não são capazes de se associar formando o NF, e como consequência há uma severa hipotrofia axonal (Zhu *et al.* 1997).

Acúmulos anormais de NFs são marcadores patológicos de diversas doenças neurodegenerativas, como esclerose amiotrófica lateral (EAL), doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), doença de Charcot-Marie-Tooth (DCMT), neuropatia diabética, atrofia muscular espinhal, entre outras. Múltiplos fatores podem potencialmente induzir acúmulo de NFs no citoplasma das células, incluindo desregulação da expressão gênica, mutações nos NFs, defeitos no transporte axonal, modificações pós-traducionais e proteólise. Muitos agentes tóxicos também podem causar defeitos nos NF. Embora anormalidades dos NF nas doenças neurodegenerativas possam ser simplesmente um reflexo de uma disfunção neuronal, recentes estudos com modelos transgênicos sugerem que a desorganização dos NF pode, por si só, produzir efeitos deletérios capazes de contribuir para o processo neurodegenerativo (Perrot & Eyer 2009).

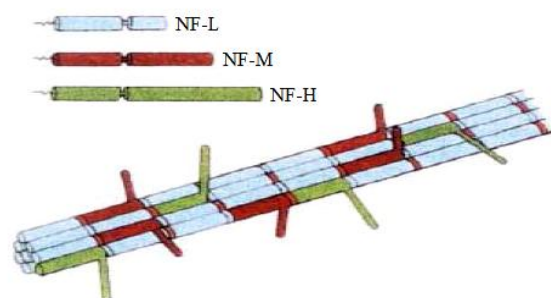


Figura 3. Estrutura de um NF. NFL, NFM e NFH formam a região central; as projeções são constituídas por regiões carboxi-terminal de NFM e NFH. Adaptado de Nixon e Sihag, 1991.

1.1.3. PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP)

A GFAP é uma proteína de 50 kDa presente predominantemente em astrócitos maduros, e por este motivo é considerada um marcador destas células. Ela tem papel na manutenção da forma e modulação da mobilidade astrocitária. Além disso, a GFAP participa de um sofisticado sistema de comunicação entre astrócitos e neurônios, regulando a liberação de neurotransmissores (NT), e desempenha um papel importante nos processos de gliose reativa, quando os astrócitos apresentam

hipertrofia e hiperplasia (McCall *et al.* 1996, Carmignoto 2000). Recentes estudos com inibição da expressão de GFAP em culturas sugerem um papel direto desta proteína no controle do crescimento dos processos astrocitários (Weinstein *et al.* 1994, Rutka & Smith 1993).

1.2. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO

A fosforilação proteica é um mecanismo molecular dinâmico de fundamental importância na regulação de muitas funções neuronais, onde diversos sinais produzem efeitos fisiológicos nas células alvo através da regulação do estado de fosforilação de determinadas fosfoproteínas do SNC (Moretto *et al.* 2005b). Essa modificação covalente regula a função de proteínas em resposta a estímulos extracelulares, chamados primeiros mensageiros, como neurotransmissores, hormônios, fatores tróficos e drogas. Segundos mensageiros típicos, como AMPc e cálcio (Ca^{+2}), regulam funções neuronais através do estado de fosforilação de proteínas intracelulares. Proteínas são fosforiladas por uma ampla variedade de proteínas quinases e os grupamentos fosfato são removidos do substrato por proteínas fosfatases, traduzindo-se na modulação de uma resposta fisiológica (Helfand *et al.* 2005).

Os FI são componentes do citoesqueleto nos quais a fosforilação é o principal mecanismo regulatório, ao contrário dos MF e MT, nos quais a regulação é mediada principalmente por associação com outras proteínas ou por outras modificações pós-traducionais (Omary *et al.* 2006). A fosforilação desempenha um papel significativo no comportamento dinâmico de associação/desassociação dos FI e regula as interações entre os FI e outras proteínas (Sanhai *et al.* 1999), a forma e o

funcionamento dos astrócitos, a forma e sobrevivência neuronal, assim como o transporte axonal e o crescimento e retração de dentritos e neurônios (Nestler & Greengard 1994). O estudo da fosforilação dos FI têm trazido enormes contribuições para o entendimento da sua dinâmica e caracterização de suas funções (Omary et al. 2006).

As três subunidades de NFs são altamente fosforiláveis nos seus domínios amino e carbóxi-terminais, sendo o domínio amino-terminal fosforilado principalmene por quinases dependentes de segundos mensageiros, e o domínio carbóxi-terminal por quinases independentes de segundos mensageiros (Sihag *et al.* 2007). A fosforilação do domínio amino-terminal em NFL e outras subunidades dos NFs têm sido relacionada com a associação\desassociação destas subunidades (Hisanaga *et al.* 1994, Hashimoto *et al.* 1998). Já a fosforilação do domínio carbóxi-terminal de NFM e NFH regula a interação dos NFs entre si e com outras estruturas do citoesqueleto (Sihag et al. 2007, Shea & Chan 2008), e está também envolvida na regulação do calibre axonal e da velocidade do transporte através do axônio (Betts *et al.* 1997, Ackerley *et al.* 2003).

A organização intracelular da rede de FI é controlada por proteínas quinases e fosfatases (Izawa & Inagaki 2006). Eles são substratos para a proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), quinase dependente de cálcio e calmodulina II (CaMKII), quinase cdc 42, quinase jun amino-terminal (JNK), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e p38 MAPK, que alteram drasticamente a estrutura destes filamentos (Chang & Goldman 2004). As fosfatases também desempenham um papel importante na manutenção da integridade estrutural dos FI (Eriksson *et al.* 1992). O balanço entre as atividades de proteínas quinases e fosfatases parece ser essencial para as funções que os FI desempenham (Inada *et al.* 1999, Goto *et al.*

1998). O estudo dos mecanismos moleculares da ação dessas proteínas é de grande importância na compreensão da dinâmica das proteínas do citoesqueleto e de seu envolvimento no funcionamento celular (Inada et al. 1999).

1.3. SINALIZAÇÃO CELULAR

A habilidade das células em receber e atuar através de sinais recebidos a partir da membrana celular é fundamental para a vida de todo o organismo. A comunicação intercelular é a base para a coordenação das reações bioquímicas intracelulares, permitindo que uma célula influencie outras de maneira específica, sendo que várias moléculas são responsáveis pela regulação dos aspectos do comportamento celular (Alberts et al. 2002, Krauss 2003). As variadas rotas de sinalização intracelular ativadas por receptores de superfície diferem em sua complexidade e modo pelo qual ativam sinais, desencadeando assim uma variedade de respostas biológicas. A ligação de moléculas sinalizadoras aos seus receptores específicos leva a alterações nos níveis de segundos mensageiros intracelulares (Ca^{2+} e AMPc, por exemplo), os quais desencadeiam uma série de reações, modificando a atividade de enzimas intermediárias de cascatas de sinalização celular. Este mecanismo é fundamental na propagação e amplificação do sinal iniciado pelo ligante extracelular (Alberts et al. 2002).

Sabe-se que o citoesqueleto é um importante alvo de diversos estímulos extracelulares, através da modulação de várias vias de sinalização (Coulombe & Wong 2004). É descrito que proteínas dos FI e suas subunidades desempenham importante papel na transdução de sinais específicos da periferia celular para o núcleo em diversos tipos celulares (Helfand et al. 2005). Proteínas quinases,

segundos mensageiros e canais iônicos estão envolvidos em muitos destes processos (Janmey 1998).

1.3.1. CÁLCIO

O íon Ca^{2+} é um importante mensageiro intracelular que controla muitas funções celulares no SNC, como diferenciação e crescimento, excitabilidade da membrana, exocitose e atividade sináptica (Sattler & Tymianski 2000). Os neurônios possuem mecanismos especializados de homeostase do Ca^{2+} para assegurar um alto controle dos níveis citosólicos deste íon (Figura 5). No estado de repouso, os níveis de Ca^{2+} livres são mantidos em concentrações baixas (100 nM), de modo que pequenos aumentos nas concentrações de Ca^{2+} que ocorrem na vizinhança dos canais iônicos ou nos sítios de liberação intracelulares podem ativar eficientemente enzimas ou canais iônicos próximos. Os neurônios controlam tanto os níveis intracelulares quanto a localização da liberação do Ca^{2+} , através da ação combinada entre a sua entrada e saída da célula, de tampões e dos estoques internos deste íon. O influxo de Ca^{2+} extracelular é mediado por canais voltagem-dependentes (VSCC) e de receptores NMDA, enquanto que a liberação dos estoques internos envolve principalmente liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} ou ativação de ligantes que levam à produção de inositol trifosfato (IP_3) (Konur & Ghosh 2005). Em condições fisiológicas, estes processos permitem que muitas cascatas de sinalização reguladas pelo Ca^{2+} ocorram independentemente dentro de uma mesma célula. No entanto, excessivo influxo ou liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares podem elevá-lo a níveis que excedem a capacidade de ação dos seus mecanismos regulatórios. Isto leva a uma ativação excessiva de processos dependentes de Ca^{2+} que estão normalmente inativos ou operando em baixos níveis, causando danos metabólicos e

afetando a viabilidade celular (Choi 1988, Tymianski & Tator 1996, Bootman *et al.* 2001). Por exemplo, elevação excessiva de Ca^{2+} intracelular pode superativar proteases, lipases, fosfatases e endonucleases que tanto podem danificar a estrutura da célula quanto mediar morte celular (Arundine & Tymianski 2003).

O citoesqueleto é um dos alvos da sinalização desencadeada por Ca^{2+} , com participação de quinases direta ou indiretamente dependentes deste íon, como PKCaMII, PKA e MAPKs, regulando a atividade das proteínas do citoesqueleto, (Dent & Gertler 2003, Kornack & Giger 2005).

Muitas doenças neurodegenerativas são caracterizadas por mecanismos patológicos causados por desequilíbrio na homeostase do Ca^{2+} , como DA, DP, doença de Huntington (DH) e esclerose múltipla (Camins *et al.* 2006, Saez *et al.* 2006). Vários estudos do nosso laboratório vêm mostrando alterações no sistema fosforilante dos FI associados com distúrbios na homeostase do Ca^{+2} (Zamoner *et al.* 2005, Zamoner *et al.* 2008, Loureiro *et al.* 2008). A identificação das vias de sinalização mediadas pelo Ca^{2+} que causam neurotoxicidade pode proporcionar um maior entendimento das bases moleculares destas patologias, contribuindo para o desenvolvimento de terapias farmacológicas contra a neurodegeneração (Arundine & Tymianski 2003).

1.3.2. GLUTAMATO

Glutamato é o maior neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos e está presente em concentrações milimolares na substância cinzenta. Ele é crucial não apenas para a transmissão sináptica, mas também em eventos de longo prazo, como formação de dendritos, modificação sináptica e controle da expressão gênica. Uma vez liberado, as respostas pós-sinápticas ocorrem via receptores ionotrópicos e

metabotrópicos, que são farmacologicamente e funcionalmente distintos (Arundine & Tymianski 2003, Sattler & Tymianski 2000). Receptores metabotrópicos medeiam suas ações através de mecanismos dependentes das proteínas ligadoras de GTP, causando mobilização de Ca^{2+} dos estoques internos, enquanto que os receptores ionotrópicos estão associados a um canal iônico, e incluem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), 2-amino-3(3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-yl) propionato (AMPA), e o receptor cainato. A ativação de receptores ionotrópicos causa permeabilidade aos íons sódio, potássio e/ou cálcio (Arundine & Tymianski 2003, Sattler & Tymianski 2000).

1.3.3. EXCITOTOXICIDADE

Em 1957, Lucas e Newhouse (Lucas & Newhouse 1957) descreveram pela primeira vez o efeito neurotóxico do glutamato na retina de camundongos. Vinte anos depois, a explanação deste efeito foi formalizada no conceito de excitotoxicidade por John Olney (Olney & de Gubareff 1978). Excitotoxicidade se refere a um processo de morte neuronal causado por excessiva ou prolongada ativação de receptores de glutamato. Estudos posteriores mostraram que estes mecanismos de excitotoxicidade estão envolvidos em muitas doenças neurodegenerativas, como DA (Shah *et al.* 2008), DP (Caudle & Zhang 2009), DH (Estrada Sanchez *et al.* 2008), EAL (Heath & Shaw 2002) e epilepsia (Greene & Greenamyre 1995), e que estes efeitos poderiam ser bloqueados por antagonistas glutamatérgicos (Olney *et al.* 1987).

Alterações na homeostase do glutamato podem afetar significativamente os neurônios através de geração de cascatas excitotóxicas e neurotóxicas. Estas cascatas se iniciam com a ativação de receptores NMDA, AMPA e de canais de Ca^{2+}

voltagem-dependente, resultando em um grande influxo de Ca^{+2} . Além disso, pode haver superestimulação dos receptores NMDA como resultado da liberação excessiva de glutamato ou da redução de sua remoção da fenda sináptica, causando liberação de Ca^{+2} dos estoques internos, e assim propagando o dano às células neurais (Caudle & Zhang 2009). Superativação de receptores metabotrópicos também pode causar dano excitotóxico (Aleppo *et al.* 1992, Sacaan & Schoepp 1992). Este influxo de cálcio pode levar a formação de óxido nítrico e outros radicais livres que potencialmente podem causar peroxidação lipídica (Bredt & Snyder 1989, Coyle & Puttfarcken 1993, Beal *et al.* 1995). Aumento no Ca^{2+} intracelular pode também levar à disfunção mitocondrial, resultando em formação local de radicais livres na mitocôndria, inabilidade em recaptar o Ca^{2+} livre e decréscimo na produção energética (Gunter & Pfeiffer 1990, Dugan *et al.* 1995). Finalmente, a elevação do Ca^{2+} intracelular pode resultar na ativação não específica de muitas enzimas, incluindo as envolvidas na sinalização celular e proteólise; causando alterações das vias de sinalização e decréscimo da integridade de elementos do citoesqueleto (Nicotera & Orrenius 1992, Gelderblom *et al.* 2004, Smith-Swintosky & Mattson 1994). Por causa da sua alta condutância ao Ca^{2+} , o receptor NMDA vem sendo o foco de muitos trabalhos sobre excitotoxicidade, mas receptores não-NMDA também podem aumentar o Ca^{2+} intracelular, tanto diretamente (Brorson *et al.* 1992), quanto indiretamente através dos canais NMDA ou voltagem-dependentes (Rothman *et al.* 1987).

1.4. METABOLISMO DO TRIPTOFANO – ROTA DAS KINURENINAS

No sistema nervoso e no intestino, o triptofano é substrato para a síntese de serotonina, enquanto que na glândula pineal ele é utilizado para a síntese de melatonina. Em situações em que o conteúdo de niacina da dieta é insuficiente para as necessidades metabólicas, o triptofano é utilizado na síntese do cofator essencial nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), através da rota das quinureninas (RQ) (Moffett & Namboodiri 2003). No SNC, esta rota ocorre nos astrócitos, macrófagos ativados e na microglia (Ruddick et al. 2006). A rota forma vários compostos que têm ações neuroativas, sendo um deles o ácido quinolínico (AQ) (Schwarcz *et al.* 1983).

As propriedades neuroativas do AQ, um seletivo, porém fraco agonista de receptores NMDA, primeiramente sugeriram que as quinureninas endógenas participariam das funções normais cerebrais, possivelmente como moduladores da neurotransmissão glutamatérgica. Porém, nos últimos anos muitas linhas de pesquisa têm estudado as ações dos metabólitos da RQ na patofisiologia de muitas doenças neurodegenerativas e imunológicas (Schwarcz et al. 1983, Stone 1993, Vamos *et al.* 2009, Zadori *et al.* 2009). Recentes estudos com modelos animais têm demonstrado que alterações no metabolismo das quinureninas podem estar relacionadas com muitas outras doenças do SNC (Nicholls *et al.* 2001, Holt *et al.* 2002, Medana *et al.* 2003, Ilzecka *et al.* 2003, Schuck *et al.* 2007).

1.4.1. ÁCIDO QUINOLÍNICO

O ácido quinolínico (AQ) é um agonista competitivo endógeno de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), agindo especificamente nas subunidades

NR2A e NR2B (Stone 1993). Sua neurotoxicidade é relatada por estar envolvida na patogênese de diversos processos neurodegenerativos associados com a idade e neuroinflamação, incluindo DA e DP (Guillemin & Brew 2002).

Durante a inflamação, há aumento da produção de AQ pelas células do sistema imunológico (Ting *et al.* 2009). O AQ está presente em concentrações nanomolares baixas no cérebro e fluido cerebrospinal (FCE) humano, raramente excedendo 1 μM . Porém, há um aumento substancial nas suas concentrações no cérebro e FCE de pacientes adultos e pediátricos com um amplo espectro de infecções e outras doenças inflamatórias neurológicas (Heyes *et al.* 1991, Brouwers *et al.* 1993, Halperin & Heyes 1992). Tais aumentos nas concentrações de AQ a níveis micromolares podem ter consequências neurológicas, pois os níveis encontrados nestes pacientes podem ser suficientes para causar dano neuronal por ativação dos receptores NMDA ou liberação de glutamato endógeno (Connick & Stone 1988, Connick & Stone 1986). Concentrações micromolares de AQ são tóxicas quando células são expostas a estas concentrações por várias horas (Kim & Choi 1987). Esta superativação de receptores NMDA causada pelo AQ está relacionada com aumento nas concentrações citosólicas de Ca^{2+} , depleção do ácido γ -amino butírico (GABA) e ATP, levando à morte de neurônios colinérgicos e GABAérgicos (Foster *et al.* 1983, Schwarcz *et al.* 1983, Stone & Perkins 1981).

Há diferenças qualitativas e farmacológicas entre as ações excitotóxicas do AQ e do NMDA, sugerindo que o AQ pode agir por mecanismos adicionais à ativação de receptores NMDA (Perkins & Stone 1983). Um destes mecanismos envolve a formação de radicais livres. Trabalhos têm mostrado que o AQ pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica no cérebro, e este

dano neuronal pode ser prevenido por agentes antioxidantes (Nakao & Brundin 1997).

1.4.2. ÁCIDO QUINOLÍNICO E NEURODEGENERAÇÃO

Nos últimos anos, muitos estudos têm evidenciado a contribuição do AQ na morte neuronal associada às doenças inflamatórias neurológicas ou secundárias a injúria cerebral (Obrenovitch & Urenjak 2003). Estudos com cultura de células expostas a 350 nM de AQ por 5 semanas mostraram que estas concentrações causaram uma perda de densidade celular e de proteína associada aos MT. Diversas células apresentaram varicosidades dendríticas e amontoados de MT anormais. Tais concentrações são comparáveis às encontradas em pacientes com demência associada à AIDS (Kerr *et al.* 1995). Além disso, Bordelon e colaboradores (Bordelon *et al.* 1999) mostraram que o AQ pode causar alterações na proteína associada aos MT (MAP2) poucas horas após a sua injeção no estriado de ratos.

Os danos neuronais causados pelo AQ são similares às características patológicas relacionados com a DA (Walton & Dodd 2007). *In vitro*, exposição crônica de culturas corticoestriatais de ratos a concentrações nanomolares de AQ causou mudanças ultraestruturais nos neurônios (Whetsell & Schwarcz 1989). Além disso, o AQ causou varicosidades dendríticas, rompimento de MTs e diminuição de organelas (Whetsell & Schwarcz 1989). Estudos de Rahman e colaboradores mostraram que tratamento *in vitro* de neurônios fetais humanos com concentrações patofisiológicas de AQ aumenta significativamente a fosforilação da tau em muitos sítios de fosforilação. Eles também mostraram um decréscimo na expressão e na atividade de proteínas fosfatases serina/treonina e envolvimento de receptores NMDA como mecanismo da hiperfosforilação da tau. (Rahman *et al.* 2009).

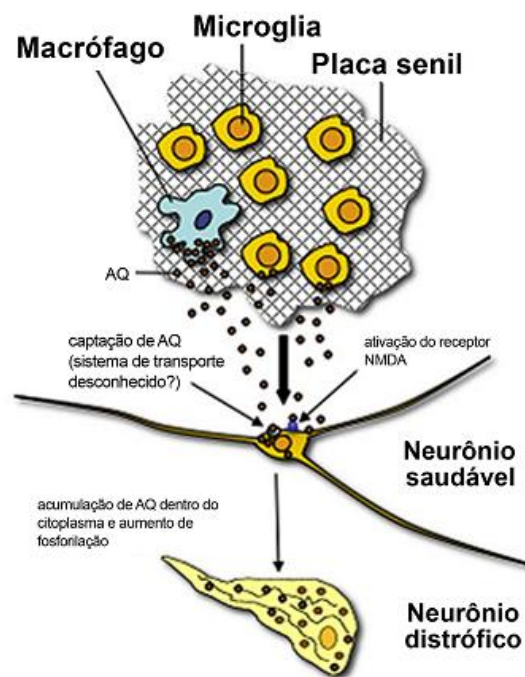


Figura 4. Modelo hipotético do efeito do Aβ na doença de Alzheimer sobre a fosforilação da Tau em neurônios primários humanos. Doi:10.1371/journal.pone.0006344.g010.

A DH é uma desordem neurodegenerativa autossômica dominante, caracterizada por demência e degeneração dos gânglios basais e córtex cerebral, produzindo declínio motor e cognitivo (Perez-De La Cruz & Santamaria 2007). Estudos têm relacionado excitotoxicidade, estresse oxidativo e alterações no metabolismo energético no cérebro de pacientes com DH (Mann *et al.* 1990, Brennan *et al.* 1985). O Aβ pode induzir o gene da huntingtina (*htt*), a qual forma agregados protéicos característicos da DH, em ratos, 6 horas após o tratamento (Tatter *et al.* 1995). A infusão crônica de Aβ no estriado de ratos induz diminuição no aprendizado espacial, levando os autores a propor que o aumento crônico de Aβ pode induzir o déficit comportamental e motor visto na DH. Várias excitotoxinas são usadas como modelos para a DH. Porém, os pesquisadores têm relatado que o Aβ possui efeitos mais seletivos e específicos, que são mais similares aos encontrados na DH (Perez-De La Cruz & Santamaria 2007).

2 – OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando-se que o citoesqueleto é um importante alvo regulador de diversas funções e vias de sinalização celular no SNC, e que o AQ é um importante agente neurotóxico em diversas doenças neurodegenerativas, o objetivo deste trabalho é estudar os efeitos deste metabólito sobre os filamentos intermediários de células neurais, investigando algumas vias de sinalização envolvidas nestes efeitos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Estudar o efeito do tratamento agudo *in vivo* sobre o conteúdo total e sobre a fosforilação dos FI do citoesqueleto neural de estriado de ratos de 30 dias de idade, e verificar se este efeito é acompanhado de morte celular.
- 2.2.2. Identificar as vias de sinalização envolvidas nos mecanismos mediados pelo AQ, com ênfase no sistema glutamatérgico e proteínas quinases.
- 2.2.3. Estudar a participação de espécies reativas de oxigênio nos efeitos do AQ e alguns dos mecanismos que levam a sua formação.
- 2.2.4. Investigar se os antioxidantes (PheSe)₂ e L-NAME possuem efeitos neuroprotetores no sentido de prevenirem os possíveis efeitos desencadeados pelo AQ sobre os FI e sobre a produção de espécies reativas de oxigênio.
- 2.2.5. Verificar os efeitos do AQ sobre o sítio de fosforilação específico NFLSer55, identificando alguns dos mecanismos envolvidos neste efeito.

PARTE II

1. ARTIGO

Artigo submetido ao periódico Experimental Neurology.

Título: Acute intrastriatal administration of quinolinic acid provokes hiperphosphorylation of cytoskeletal intermediate filament proteins in astrocytes and neurons of rats.

Autores: Paula Pierozan, Ariane Zamoner, Ângela Krombauer Soska, Roberta Bristot Silvestrin, Samanta Oliveira Loureiro, Luana Heimfarth, Tadeu Mello e Souza, Moacir Wajner, Regina Pessoa-Pureur.

Manuscript Number: EXNR-10-15

Title: ACUTE INTRASTRIATAL ADMINISTRATION OF QUINOLINIC ACID PROVOKES
HYPERPHOSPHORYLATION OF CYTOSKELETAL INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS IN
ASTROCYTES AND NEURONS OF RATS

Article Type: Regular Paper

Section/Category: Neurological Disorders

Keywords: quinolinic acid; intermediate filaments; excitotoxicity; oxidative stress; phosphoNFLSer55

Corresponding Author: Mrs Paula Pierozan,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Paula Pierozan

Order of Authors: Paula Pierozan; Ariane Zamoner, PhD; Ângela K Soska, Graduate; Roberta B
Silvestrin, Master; Samanta O Loureiro, Doctor; Luana Heimfarth, Master; Tadeu M Souza, PhD; Moacir
Wajner, PhD; Regina P Pureur, PhD

Abstract: ABSTRACT

In the present study we investigated the effect of in vivo intrastriatal injection of QA on rat cytoskeletal proteins in astrocytes and neurons of young rats at early stages (30 min) after infusion. QA (150 μmol/0.5 μL) significantly increased the in vitro phosphorylation of the low molecular weight neurofilament subunit (NFL) and the glial fibrillary acidic protein (GFAP) of neurons and astrocytes, respectively. This effect was mediated by cAMP-dependent protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (PKCaMII). In contrast, mitogen activated protein kinases were not activated by QA infusion. Furthermore, the specific N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK-801 (0.25 mg/kg i.p), the antioxidant L-NAME (60 mg/kg/day), and diphenyldiselenide (PheSe)₂ (0.625 mg/kg/day) injected prior to QA infusion totally prevented QA-induced cytoskeletal hyperphosphorylation. We also observed that QA-induced hyperphosphorylation was targeted at the Ser55 phosphorylating site on NFL head domain, described as a regulatory site for NF assembly in vivo. This effect was fully prevented by MK-801, by the PKA inhibitor H89 and by (PheSe)₂, whereas staurosporine (PKC inhibitor) only partially prevented Ser55 phosphorylation. The PKCaMII inhibitor (KN93) and the antioxidant L-NAME failed to prevent the hyperphosphorylation of Ser55 by QA infusion. Therefore, we presume that QA-elicited hyperphosphorylation of the neural cytoskeleton, and specially of NFLSer55, achieved by intrastriatal QA injection could represent an early step in the pathophysiological cascade of deleterious events exerted by QA in rat striatum. Our observations also indicate that NMDA-mediated Ca²⁺ events and oxidative stress may be related to the altered protein cytoskeleton hyperphosphorylation observed with important implications for brain function.

**ACUTE INTRASTRIATAL ADMINISTRATION OF QUINOLINIC ACID
PROVOKES HYPERPHOSPHORYLATION OF CYTOSKELETAL
INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS IN ASTROCYTES AND
NEURONS OF RATS**

Paula Pierozan, Ariane Zamoner, Ângela Krombauer Soska, Roberta Bristot
Silvestrin, Samanta Oliveira Loureiro, Luana Heimfarth, Tadeu Mello e Souza,
Moacir Wajner and Regina Pessoa-Pureur

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, 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, CEP 90035-003 Porto Alegre -
RS, BRASIL, Fax: 5551 3308 5535, Tel: 5551 3308 5565; E-mail: rpureur@ufrgs.br

Running title: Quinolinic acid and cytoskeleton

ABSTRACT

In the present study we investigated the effect of *in vivo* intrastriatal injection of QA on rat cytoskeletal proteins in astrocytes and neurons of young rats at early stages (30 min) after infusion. QA (150 μ mol/0.5 μ L) significantly increased the *in vitro* phosphorylation of the low molecular weight neurofilament subunit (NFL) and the glial fibrillary acidic protein (GFAP) of neurons and astrocytes, respectively. This effect was mediated by cAMP-dependent protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (PKCaMII). In contrast, mitogen activated protein kinases were not activated by QA infusion. Furthermore, the specific N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK-801 (0.25 mg/kg i.p), the antioxidant L-NAME (60 mg/kg/day), and diphenyldisselenide (PheSe)₂ (0.625 mg/kg/day) injected prior to QA infusion totally prevented QA-induced cytoskeletal hyperphosphorylation. We also observed that QA-induced hyperphosphorylation was targeted at the Ser55 phosphorylating site on NFL head domain, described as a regulatory site for NF assembly *in vivo*. This effect was fully prevented by MK801, by the PKA inhibitor H89 and by (PheSe)₂, whereas staurosporine (PKC inhibitor) only partially prevented Ser55 phosphorylation. The PKCaMII inhibitor (KN93) and the antioxidant L-NAME failed to prevent the hyperphosphorylation of Ser55 by QA infusion. Therefore, we presume that QA-elicited hyperphosphorylation of the neural cytoskeleton, and specially of NFLSer55, achieved by intrastriatal QA injection could represent an early step in the pathophysiological cascade of deleterious events exerted by QA in rat striatum. Our observations also indicate that NMDA-mediated Ca²⁺ events and oxidative stress may be related to the altered protein cytoskeleton hyperphosphorylation observed with important implications for brain function.

Key words: quinolinic acid, intermediate filaments, excitotoxicity, oxidative stress, phosphoNFLSer55.

INTRODUCTION

Quinolinic acid (QA) is a metabolite of the kynurenine pathway, a central route in tryptophan (TRP) metabolism in most mammalian tissues. It is present in the cerebrospinal fluid (CSF) at concentrations ranging from nanomolar (Moroni 1999) to micromolar concentrations (Schwarcz and Pellicciari 2002). QA has been reported to be associated with the pathogenesis of certain neurodegenerative diseases acting as an excitotoxic agonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (Foster et al. 1983; Klivenyi et al. 2004; Schwarcz et al. 1984; Schwarcz and Kohler 1983; Stone and Perkins 1981).

Injections of QA have been used to produce an excitotoxic model of Huntington's disease (HD) in rats since this pattern of neuronal death resembles the striatal neurodegeneration characteristic of HD (Dawbarn et al. 1985; Ferrante et al. 1985; Ferrante et al. 1986; Kowall 1987). Administration of QA to the NMDA-receptor-rich striatum causes an increase in Ca^{2+} influx, a decrease in ATP production, and corresponding excitotoxic cell death in a manner that mimics certain aspects of neurodegeneration in human HD. On the other hand, it has been shown that QA induces lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in a concentration-dependent manner (Perez-De La Cruz et al. 2005).

The first evidence that intrastriatal injection of QA can compromise the integrity of the cytoskeleton was provided by Bordelon and Chesselet (1999), who described a reduction in microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunoreactivity in the area surrounding the core of the lesion as early as 10 h after surgery. Other studies have described the action of QA on the phosphorylating system associated with cytoskeletal proteins. In this context, QA treatment induced

tau phosphorylation at multiple serine and threonine residues in cultured human foetal neurons (Rahman et al. 2009). The authors proposed that a decrease in major tau phosphatases (PP2A, PP1 and PP5) is a mechanism for the increase in tau phosphorylation in neurons exposed to QA at pathophysiological concentrations.

Intermediate filament (IF) proteins are important phosphoproteins whose phosphorylation is a dynamic process mediated by the combined action of several protein kinases and phosphatases controlling their physiological role in response to extracellular signals. Phosphorylation of the amino-terminal head domain sites on glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurofilament (NF) proteins plays a key role in the assembly/disassembly of IF subunits into 10 nm filaments and influences the phosphorylation of sites on the carboxyl-terminal tail domain. These phosphorylation events are largely under the control of second messenger-dependent protein kinases that provide the cells a mechanism to reorganize the IFs in response to the changes in second messenger levels (Sihag et al. 2007).

The importance of types III and IV IFs, including GFAP and NF subunits, on cellular function is evident from the fact that perturbation of their function accounts for several genetically determined protein misfolding/aggregation diseases (Arbustini et al. 2006; Green et al. 2005). In this scenario, studies showing increased axonal accumulation of NFs in transgenic mice or in mice expressing mutant NF subunit have shown that aberrant organization or assembly of NFs is sufficient to cause disease arising from selective dysfunction and degeneration of neurons (Beaulieu et al. 1999; Julien et al. 1995); In fact, perikaryal accumulation/aggregation of aberrantly phosphorylated neurofilaments are a pathological feature of several human neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, motor neuron diseases and

Parkinson's disease (Grant and Pant 2000; Lariviere and Julien 2004; Nixon 1993; Sasaki et al. 2006).

Studies have shown excitotoxic mechanisms with mitochondrial dysfunction (Bordelon et al. 1997; Portera-Cailliau et al. 1995) and apoptotic cell death (Ramaswamy et al. 2007) provoked by QA in the striatum several hours following the insult, otherwise, disruption of the cytoskeleton is known to precede excitotoxicity and cell death (Kim et al. 2002). Therefore, we were interested to investigate whether alterations of cytoskeletal proteins could be among the first events preceding QA-induced neurodegeneration. Therefore, in the present study we investigated early actions targeting the cytoskeleton in the excitotoxic model of HD using a single intrastriatal injection of QA in rats. We studied the involvement of NMDA and oxidative stress mechanisms on the phosphorylating system associated with IF proteins in astrocytes and neurons, and more particularly on the Ser55 phosphorylating site located on the head domain of NFL. We hypothesize that destabilization of the cytoskeleton might be one of the initial events leading to QA-induced neurotoxicity.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty-day-old Wistar rats obtained from Central Animal House of the Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, were used in the studies. The animals were maintained on a 12:12 h light\dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) colony room,

with food and water *at libitum*. The experimental protocol followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1985) and was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul.

Radiochemical and compounds

Radiolabeled sodium orthophosphate (^{32}P Na₂P₀₄) was purchased from CNEN, São Paulo, Brazil. Quinolinic acid, benzamidine, leupeptin, antipain, pepstatin, chymostatin, acrylamide, bis-acrylamide, dizocilpine maleate (MK-801), verapamil, dantrolene, H-89, N⁰-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 2',7'-dihydrochlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), and monoclonal antibodies were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). KN-93 and staurosporine were from EMD Biosciences, Inc. (La Jolla, CA, USA). Anti-p44\42 MAP kinase (anti-ERK1\2), anti-phospho-p44\42 MAP kinase (anti-phospho-ERK1\2), anti-p38 MAPK, anti-phospho p38 MAPK, anti-SAPK\JNK and anti-phospho-SAPK\JNK antibodies were from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Anti-pNF-L (Ser55) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The chemiluminescence ECL kit peroxidase and the conjugated anti-rabbit IgG were obtained from Amersham (Oakville, Ontario, Canada). The organochalcogen diphenyldisselenide (PheSe)₂ was synthesized using the method described by Paulmier (Paulmier 1986). All other chemicals were of analytical grade.

Quinolinic acid administration

The rats were deeply anesthetized with equitiesin solution (2.5 ml\Kg i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. A small hole was drilled in the skull for

microinjection, and 0.5 μ L of 300 mM quinolinic acid (150 nmol, pH 7.4 adjusted with NaOH) or saline-phosphate buffer (PBS - controls), was slowly injected over 4 min into the right striatum via a needle connected by a polythene tube to a 10 μ L Hamilton syringe (Hamilton, 701N) and an infusion pump (Insight, Brazil). The needle was left in place for another 4 min before being softly removed, so that the total procedure lasted 8 min. The coordinates for injection were as follows: 0.6 mm posterior to the bregma, 2.6 mm lateral to the midline and 4.5 ventral from dura (Paxinos et al. 1985). The correct position of the needle was tested by injecting 0.5 μ L of methylene blue injection (4% in saline solution) and carrying out histological analysis. The dose and method of QA administration were based in previous works (Qin et al. 1992). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and followed the NIH guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 85-23, revised 1985). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Preparation of slices

Thirty minutes after surgery, rats were killed by decapitation, the striatum was dissected onto Petri dishes placed on ice and cut into 400 μ m thick slices with a McIlwain chopper.

Preincubation

Tissue slices were initially preincubated at 30°C for 20 min in a Krebs-Hepes medium containing 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM Na-HEPES (pH 7.4), 12 mM glucose and 1 mM CaCl₂, and the following protease inhibitors: 1

mM benzamidine, 0.1 μM leupeptin, 0.7 μM antipain, 0.7 μM pepstatin and 0.7 μM chymostatin.

Incubation

After preincubation, the medium was changed and incubation was carried out at 30°C with 100 ml of the basic medium containing 100 μCi ^{32}P $[\text{Na}_2\text{P}_0_4]$, as previously described by Funchal et al. (Funchal et al. 2003). The labeling reaction was normally allowed to proceed for 30 min at 30°C and stopped with 1 ml of cold stop buffer (150 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.5) and the protease inhibitors described above. Slices were then washed twice with stop buffer to remove the excess of radioactivity.

Preparation of the high-salt Triton-insoluble cytoskeletal fraction from tissue slices

After treatment, IF-enriched cytoskeletal fractions were obtained from striatum. Briefly, after the labeling reaction, slices were homogenized in 400 ml of 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 15.800 x g for 10 min at 4°C in an Eppendorf centrifuge, the supernatant discarded and the pellet homogenized with the same volume of the high-salt medium. The resuspended homogenate was centrifuged as described and the supernatant was discarded. The Triton-insoluble IF-enriched pellet, containing the IFs was dissolved in 1% SDS and protein concentration was determined.

Total tissue homogenate

Tissues slices from striatum were homogenized in 100 ml of a lysis solution containing 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% (v/v) SDS. For electrophoresis analysis, samples were dissolved in 25% (v/v) of solution containing 40% glycerol, 5% mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 and boiled for 3 min.

Pharmacological approaches

In the experiments designed to evaluate the participation of NMDA-glutamate receptors and the involvement of protein kinase C (PKC) on IF phosphorylation by QA, the animals received a single intraperitoneal injection of MK-801(0.25 mg/kg) (Ribeiro et al. 2006), a NMDA blocker, staurosporine (0.1mg/kg) (Li XB 2002), a PKC inhibitor or PBS, 30 min before the intrastriatal injection with QA (150nmol/0.5µl) or PBS. In the experiments designed to assess the effects of protein kinase A (PKA) or Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII), H-89 and KN-93, PKA and PKCaMII inhibitors, respectively, rats received an intrastriatal injection of H-89 (0.1 µmol/0.5µl) (Adams and Keefe 2001), KN-93 (1.0 µg/0.5µl) (Oh et al. 1999) or PBS into the right striatum, at a rate of 0.12 µl/min, 15 minutes before the infusion with QA (150 nmol) or PBS. Rats were killed by decapitation 30 min after the QA injection.

Treatment with antioxidants

In the experiments designed to study prevention of QA effects by the antioxidant N-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), animals were divided into two groups at the beginning of the experiment and received intraperitoneal administration of saline or L-NAME 60 mg/kg/day dissolved in saline twice a day

(12/12h) for 8 days. This treatment ensures at least 95% inhibition of NOS catalytic activity (Virgili et al. 1999). In the 8th day, QA or PBS was injected unilaterally in the right striatum. Parallel groups of animals were subjected to the pharmacological treatment described above (either L-NAME or saline), and others were sham operated and used as controls. In the experiments designed to study prevention of QA effects by de antioxidant selenium, animals were treated with a subcutaneous injection of diphenyl diselenide (PheSe)₂ (0.625 mg/kg/day) or canola oil (vehicle) for 5 days. On the fifth day, they received a single injection of QA (150 nmol) into the right striatum 2 h after the last (PheSe)₂ injection, whereas controls received the same volume of canola oil (Heimfarth et al. 2008; Santamaria et al. 2003).

Protein determination

The protein concentration was determined by the method of Lowry (Lowry et al. 1951) using serum bovine albumin as the standard.

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The cytoskeletal fraction and total tissue homogenate were prepared as described above. For electrophoresis analysis, samples were dissolved in 25% (v/v) of a solution containing 40% glycerol, 5% mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 and boiled for 3 min. Equal protein concentrations were loaded onto 7% or 10% polyacrylamide gels and analyzed by SDS-PAGE according to the discontinuous system of Laemmli (Laemmli 1970). In the *in vitro* ³²P incorporation experiments, the gels containing the IF-enriched cytoskeletal fraction were exposed to X-ray films (T-mat G\RA) at -70°C with intensifying screens, and finally the autoradiograms were obtained and 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). Optical density values were obtained for the band corresponding to each protein. Protein loading was controlled by Coomassie blue R staining or actin immunoblotting. All bands being measured were within the linear range of the film.

Western blot analysis

Cytoskeletal and soluble fractions (50 µg) were analyzed by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Trans-blot SD semi-dry transfer cell, BioRad) for 1 h at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol and 0.25% SDS). The nitrocellulose membranes were washed for 10 min in Tris buffered saline (TBS; 0.5 M NaCl, 20 mM Trizma and pH 7.5), followed by 2 h incubation in blocking solution (TBS plus 5% defatted dried milk). After incubation, the blot was washed twice for 5 min with TBS plus 0.05% Tween-20 (T-TBS), and then incubated overnight at 4°C in blocking solutions containing the following monoclonal antibodies: anti-NFH (clone N52) diluted 1:1000, anti-NF-150 (clone NN-18) diluted 1:500, anti-NF-68 (clone NR-4) diluted 1:1000, anti-GFAP (clone G-A-5) diluted 1:500, anti-pNFLSer55 diluted 1:800. In experiments designated to study the MAPK cascade anti-ERK1\2, anti-phosphoERK1\2, anti-p38MAPK, anti-phosphop38MAPK, anti-SAPK\JNK or anti-phosphoSAPK\JNK antibodies were diluted 1:2000 and the animals were sacrificed 5, 15, 30 and 60 minutes after QA infusion. The blot was then washed twice for 5 min with T-TBS and incubated for 2 h in TBS containing peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG diluted 1:4000 or anti-rabbit IgG 1:2000 (for MAPK cascades). In addition, we used the following controls in the antibody experiments: primary antibody only, secondary antibody only, and negative control (lacking the sample containing the antigen of interest).

These controls (not shown) stated the specificity and sensibility of the antibodies. The blot was washed twice again for 5 min with T-TBS and twice for 5 min with TBS. The blot was then developed using a chemiluminescence ECL kit and quantified as described above.

Cell integrity

Measurement of cell integrity was determined by lactate dehydrogenase (LDH) activity using a colorimetric commercial kit (from Doles, Brazil), modified from Whitaker (Whitaker and McKay 1969). Total LDH activity was determined after adding a final concentration of 10% Triton X-100 and disrupting the slices by homogenization with a Tissue Tearor (Biospec). Results were expressed as a percentage relative to the 100% of LDH activity.

Cell Viability

Mitochondrial dehydrogenase activity to reduce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used to determine cell survival (Liu et al. 1997; Mosmann 1983). The tetrazolium ring of MTT is cleaved by various dehydrogenase enzymes in active mitochondria and then precipitated as a blue formazan product. Striatal slices were incubated with MTT (0,5 mg/mL) in KRB buffer, pH 7.4 (122 mM Na-gluconate, 5 mM K-gluconate, 2 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 1 mM MgSO₄, 1.2 mM NaH₂PO₄, 0.9 mM Ca-gluconate, 1 mM L-glutamine, 5 mM glucose; KRB buffer) for 20 min at 37°C. The medium was then aspirated, the precipitated formazan was solubilized with dimethyl sulfoxide, and viable cells were quantified spectrophotometrically at a wavelength of 550 nm.

Evaluation of Intracellular ROS Production

Brain tissue was homogenized in 10 volumes of ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing KCl (140 mM) and EDTA (1 mM) in a homogenizer. The homogenate was centrifuged at 960 x g for 10 min to remove nuclei and cell debris; the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles, was used for the assays. The procedures were performed at 4°C. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was detected using the nonfluorescent cell permeating compound, 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases and then oxidized by ROS to a fluorescent compound 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF). An aliquot of the sample was incubated with DCFH-DA (100 µM) at 37°C for 30 min. The reaction was terminated by chilling the reaction mixture in ice. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm. All procedures were performed in the dark, and blanks containing DCFH-DA (no homogenate) were processed for measurement of autofluorescence (Driver et al. 2000; Sriram et al. 1997). The content of free radicals was quantified and expressed as percentage of controls.

Statistical analysis

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

RESULTS

We have initially studied the effects of intrastrially injected QA on the *in vitro* phosphorylation of NF subunits and GFAP present in the IF-enriched cytoskeletal fraction of neurons and astrocytes, respectively. Figure 1A shows that the *in vitro* ^{32}P incorporation into GFAP and NFL was significantly increased 30 min after QA injection without affecting neither the medium molecular weight neurofilament (NFM) nor the high molecular weight neurofilament (NFH) subunits in the cytoskeletal fraction. Western blot analysis of IF subunits attest that QA treatment did not alter the levels of these proteins (Figure 1B). Moreover, the MTT and LDH assays revealed that cell viability was not altered up to 30 min after QA infusion (results not shown). MK-801 i.p. administration (0.25 mg/kg), a specific NMDA antagonist, prior to QA infusion, fully prevented QA-induced hyperphosphorylation, indicating the involvement of NMDA glutamate receptors on this effect (Figure 2A). In order to identify the protein kinases involved in IF hyperphosphorylation, we used different kinase inhibitors. First, we tested the participation of second messenger-dependent protein kinases, known to phosphorylate specific sites at the amino terminal region of IF subunits. Thus, the inhibitors of PKA, PKC and PKC α MII, namely H89, staurosporine and KN93, respectively, were administered intrastrially 15 or 30 min before QA. Results showed that H89 totally prevented QA-induced hyperphosphorylation (Figure 2B), while staurosporine partially prevented such effect on both GFAP and NFL (Figure 2C), and KN93 partially prevented GFAP hyperphosphorylation, but failed to prevent this effect on NFL (Figure 2D). In addition, we tested the ability of QA to activate MAPKs described to phosphorylate C-terminal located sites on IF subunits.

Using specific antibodies directed to total and phosphorylated forms of Erk1/2, JNK/SAPK and p38MAPK we observed that the intrastriatal infusion of QA was not able to activate the MAPK pathway at 5, 15, 30 and 60 min following the injection (results not shown).

In order to evaluate the involvement of oxidative stress on the QA-induced hyperphosphorylation, animals received infusion of the antioxidants L-NAME (60 mg/kg/day) prior to QA injection, as described in Material and Methods. Moreover, considering that (PheSe)₂ has been described to prevent the actions of QA, acting as an antioxidant (Sreekala and Indira 2009), we tested the effect of (PheSe)₂ (0.625 mg/kg/day) on QA-induced hyperphosphorylation. Results showed that both L-NAME and (PheSe)₂ prevented IF hyperphosphorylation induced by QA (Figure 3A and B). Based on these results, we also tested the effect of QA on the production of ROS by DCFH-DA. Results showed increased ROS levels 30 min following QA infusion. Moreover, MK801 and L-NAME administered before QA injection prevented the increased ROS levels (Figure 4).

In an attempt to identify a phosphorylating site on NFL head domain, for PKA and PKC, we assayed NFLSer55, described as a regulatory site for NF assembly *in vivo* (Grant and Pant 2000). Western blot assays showed that the immunoreactivity with anti-phosphoSer55 antibody was 50% increased in the total homogenate (Figure 5A) and 20% increased in the cytoskeletal fraction (Figure 5B) of striatal slices from QA injected animals. Moreover, phosphorylation of NFLSer55 was prevented by MK801, H89 and (PheSe)₂. Otherwise, staurosporine slightly attenuated, whereas the PKCaMII inhibitor (KN93) and the antioxidant L-NAME failed to prevent the QA-elicited Ser55 hyperphosphorylation (Figure 5C).

DISCUSSION

Quinolinic acid is present at high nanomolar concentrations in human and rat brain (Wolfensberger et al. 1983) and at concentrations ranging from nanomolar (Moroni 1999) to micromolar concentrations (Schwarcz and Pellicciari 2002) in CSF. This tryptophan metabolite is considered to be involved in the pathogenesis of a number of inflammatory neurological diseases through activation of NMDA-mediated mechanisms (Klivenyi et al. 2004; Schwarcz and Kohler 1983; Stone and Perkins 1981). It was also found that lipid peroxidation caused by QA toxicity is involved in the pathogenesis of neuronal damage in Alzheimer's disease (Guillemin and Brew 2002). Of most importance, based on the similarities between the effects produced by intrastrially administered QA and the neurochemistry and neuropathology of HD (Schwarcz and Kohler 1983), it has been hypothesized that QA plays a key role in HD (Beal MF 1986). QA concentrations were found to be significantly elevated in the cortex and in the neostriatum, but not in the cerebellum (Guidetti and Schwarcz 2003) in the early stages, although no changes in its levels were observed in the CSF in advanced HD patients (Reynolds et al. 1988; Schwarcz et al. 1988).

Injections of QA into the rat striatum produce a well-controlled experimental model of excitotoxic cell death *in vivo* (Bazzett 1993; Beal 1986; Bordelon et al. 1997; Perez-De La Cruz et al. 2005; Qin et al. 1992; Roberts et al. 1993). In the present work we studied the effect of acute injection of QA (150 nmol/0.5 μ L) into the striatum of rats on the phosphorylating system associated with cytoskeletal IF proteins 30 min after injection. This time is representative of an early response of the cytoskeleton to QA injury, taking into account our previous evidence showing

misregulation of the phosphorylating system associated with IF proteins 30 min following treatment of brain slices with different metabolites (Funchal et al. 2005; Zamoner et al. 2006). We first observed that the acute administration of QA elicited hyperphosphorylation of GFAP and NFL subunits, evidencing a rapid response of the cytoskeleton of astrocytes and neurons, respectively, and this effect was mediated mainly by PKA and to a lesser extent by PKC, while PKCaMII was involved only in GFAP hyperphosphorylation. It is widely known that second messenger-dependent protein kinases phosphorylate specific sites located on the head domain of IF subunits. Consistent with this, NFLSer55 appeared to be a specific phosphorylation site targeted by QA, being PKA the most prominent protein kinase mediating this effect, as evidenced by the ability of the PKA inhibitor H89 to prevent NFLSer55 hyperphosphorylation provoked by QA.

It is important to note that the PKA (Ser-55), PKC (Ser-51) and PKCaMII (Ser-57) phosphorylation sites are known to be relevant for filament assembly (Gill et al. 1990; Heins et al. 1993). Furthermore, the phosphate present in Ser55 of NFL is turned over rapidly following NFL synthesis in neurons (Sihag and Nixon 1991), suggesting a possible role in the blockade of NF assembly before their transport into neurites. Like NFL, PKA-mediated phosphorylation of the head domain of GFAP inhibits filament assembly or induces disassembly (Hisanaga et al. 1990; Hisanaga et al. 1994). Therefore, our results showing NFLSer55 hyperphosphorylation suggest a key role of QA on IF dynamics preventing filament assembly and disassembling preexisting filaments. Although QA caused PKA-mediated Ser55 hyperphosphorylation of NFL and this effect potentially lead to cytoskeleton disassembly, we observed only a slightly decreased NFL immunoccontent in the cytoskeletal fraction, as compared with total homogenate. It can be therefore

presumed that altered assembly/disassembly equilibrium may occur later as a consequence of Ser55 hyperphosphorylation after intrastriatal QA injection.

On the other hand, our results showing that the MAPK pathway was not activated up to 60 min following QA infusion is consistent with the absence of hyperphosphorylation in NFM and NFH and with the absence of cell death during this period (Craig et al. 2008). It should be emphasized that MAPKs are one of the NF-associated proline directed kinases that extensively phosphorylate lysine-serine-proline (KSP) repeats in tail domains of NFM and NFH, respectively (Grant and Pant 2000; Veeranna et al. 1998). Thus, we propose that activation of MAPK pathway following acute QA intrastriatal injection is not part of an early cell response, being probably related with long lasting events leading to late cell death. On the other hand, Ferrer et al (Ferrer et al. 2001) have described activation of the MAP kinases Erk 1/2, JNK and p38MAPK and transcription factor substrates from 1 h to 24 h following intracortical injection of QA in rats, and this effect was accompanied of neuronal shrinkage followed by cell death and neuronal loss in the area of injection of the metabolite.

Quinolinic acid is a selective agonist of the NMDA receptors (Stone 1993) and produces membrane depolarization and Ca^{2+} influx into neuronal cells increasing intracellular Ca^{2+} concentrations, lipid peroxidation, oxidative stress and apoptotic cell death (During et al. 1989; Foster et al. 1983; Santamaria and Rios 1993). Our present findings that QA-induced IF hyperphosphorylation is prevented by the NMDA antagonist MK-801, and the antioxidant L-NAME point to early excitotoxic and oxidative stress mechanisms involved in the cytoskeleton protein misregulation. This is further supported by our results correlating activation of NMDA receptors with the levels of DCF, reflecting a decrease of ROS. These results may, therefore,

reflect the action of QA on the expression and the activity of inducible NO synthase (iNOS) (Ryu et al. 2004) inducing peroxynitrite generation.

It was also found that MK-801, as well as H89 fully prevented QA-elicited hyperphosphorylation of NFLSer55, whereas L-NAME had no involvement on this effect. Therefore, the mechanisms leading to hyperphosphorylation of NFLSer55 are mediated by NMDA-dependent mechanisms, corroborating QA as a glutamate agonist targeting the cytoskeleton, and PKA as the most prominent kinase acting on this phosphorylating site. Conversely, the mechanisms leading to specific hyperphosphorylation of NFLSer55 are not induced by the increased NOS activity, although general NFL hyperphosphorylation was prevented by L-NAME. Consequently, we can suppose that hyperphosphorylation induced by QA is also directed to other N-terminal sites beyond Ser55 involving other mechanisms.

Therefore, the selective activation of cytoskeletal-associated protein kinases we are evidencing as a consequence of QA acute injection could be related to the way cells sense the frequency of Ca^{2+} spikes elicited by QA through NMDA receptors and the way cell response is induced (Alberts 2008). According to our results the insult provoked by QA lead to an increased Ca^{2+} influx which would be related with the activation of second messenger dependent protein kinases and oxidative stress. NFLSer55 is one of the phosphorylating sites targeted by these mechanisms, and due the relevance of the phosphorylation level of this amino acid residue in the regulation of NF association/disassociation and to the physiological role in the neural cells, this finding could have important implications in brain function.

Concerning the ability of $(\text{PheSe})_2$ in preventing second messenger-dependent phosphorylating sites and specifically NFLSer55 hyperphosphorylation,

our findings are in line with our previous results showing that this organoselenium compound is able to prevent IF hyperphosphorylation (Heimfarth et al. 2008; Moretto et al. 2005). However, apparently in this case the (PheSe)₂ did not act as an antioxidant agent, since this compound was not able to prevent QA-induced increase of DCF values. Further experiments are therefore necessary to clarify this point.

In summary, we report for the first time short-term effects due to *in vivo* intrastriatal QA administration causing IF hyperphosphorylation on neural cytoskeleton. We demonstrated that alterations of the phosphorylating system associated to the cytoskeleton represent an early event on the cascade of neurodegeneration, in which excitotoxicity and oxidative damage are possibly involved. Therefore, we suggest that cytoskeletal misregulation takes a central role in the initial steps of QA neurotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência” (IBN-Net) #01.06.0842-00, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

REFERENCES

- Adams AC, Keefe KA. 2001. Examination of the involvement of protein kinase A in D2 dopamine receptor antagonist-induced immediate early gene expression. *J Neurochem* 77(1):326-335.
- Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. . 2008. Mechanisms of cell communication. In: Alberts BJ, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P., editor. *Molecular Biology of the Cell*. fifth edition ed. Abingdon, UK: Garland Sciences. p 879-964.
- Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, Pellegrini C, Grasso M, Previtali S, Repetto A, Bellini O, Azan G, Scaffino M, Campana C, Piccolo G, Viganò M, Tavazzi L. 2006. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur J Heart Fail* 8(5):477-483.
- Bazzett TJ BJ, Kaatz KW and Albin RL. 1993. Chronic intrastriatal dialytic administration of quinolinic acid produces selective neural degeneration. *Expl Neurol* 120:177-185.
- Beal MF KN, Ellison DW, Mazurek WF, Swartz KJ, and Martin JB 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. 1999. Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol* 147(3):531-544.
- Bordelon YM, Chesselet MF. 1999. Early effects of intrastriatal injections of quinolinic acid on microtubule-associated protein-2 and neuropeptides in rat basal ganglia. *Neuroscience* 93(3):843-853.

- Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecinska M. 1997. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69(4):1629-1639.
- Craig EA, Stevens MV, Vaillancourt RR, Camenisch TD. 2008. MAP3Ks as central regulators of cell fate during development. *Dev Dyn* 237(11):3102-3114.
- Dawbarn D, De Quidt ME, Emson PC. 1985. Survival of basal ganglia neuropeptide Y-somatostatin neurones in Huntington's disease. *Brain Res* 340(2):251-260.
- Driver AS, Kodavanti PR, Mundy WR. 2000. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol* 22(2):175-181.
- During MJ, Heyes MP, Freese A, Markey SP, Martin JB, Roth RH. 1989. Quinolinic acid concentrations in striatal extracellular fluid reach potentially neurotoxic levels following systemic L-tryptophan loading. *Brain Res* 476(2):384-387.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Jr., Bird ED, Martin JB. 1985. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230(4725):561-563.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP, Jr., Bird ED, Martin JB. 1986. Topography of enkephalin, substance P and acetylcholinesterase staining in Huntington's disease striatum. *Neurosci Lett* 71(3):283-288.
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M. 2001. Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 94(1-2):48-58.

- Foster AC, Collins JF, Schwarcz R. 1983. On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology* 22(12A):1331-1342.
- Funchal C, de Almeida LM, Oliveira Loureiro S, Vivian L, de Lima Pelaez P, Dall Bello Pessutto F, Rosa AM, Wajner M, Pessoa Pureur R. 2003. In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 11(2):111-118.
- Funchal C, Zamoner A, dos Santos AQ, Moretto MB, Rocha JB, Wajner M, Pessoa-Pureur R. 2005. Evidence that intracellular Ca²⁺ mediates the effect of alpha-ketoisocaproic acid on the phosphorylating system of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of immature rats. *J Neurol Sci* 238(1-2):75-82.
- Gill SR, Wong PC, Monteiro MJ, Cleveland DW. 1990. Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament (NF-L) subunit. *J Cell Biol* 111(5 Pt 1):2005-2019.
- Grant P, Pant HC. 2000. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol* 29(11-12):843-872.
- Green SL, Westendorf JM, Jaffe H, Pant HC, Cork LC, Ostrander EA, Vignaux F, Ferrell JE, Jr. 2005. Allelic variants of the canine heavy neurofilament (NFH) subunit and extensive phosphorylation in dogs with motor neuron disease. *J Comp Pathol* 132(1):33-50.
- Guidetti P, Schwarcz R. 2003. 3-Hydroxykynurenine and quinolinate: pathogenic synergism in early grade Huntington's disease? *Adv Exp Med Biol* 527:137-145.
- Guillemin GJ, Brew BJ. 2002. Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep* 7(4):199-206.

- Heimfarth L, Loureiro SO, Zamoner A, Pelaez Pde L, Nogueira CW, Rocha JB, Pessoa-Pureur R. 2008. Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. *Neurotoxicology* 29(1):40-47.
- Heins S, Wong PC, Muller S, Goldie K, Cleveland DW, Aebi U. 1993. The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *J Cell Biol* 123(6 Pt 1):1517-1533.
- Hisanaga S, Gonda Y, Inagaki M, Ikai A, Hirokawa N. 1990. Effects of phosphorylation of the neurofilament L protein on filamentous structures. *Cell Regul* 1(2):237-248.
- Hisanaga S, Matsuoka Y, Nishizawa K, Saito T, Inagaki M, Hirokawa N. 1994. Phosphorylation of native and reassembled neurofilaments composed of NF-L, NF-M, and NF-H by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Biol Cell* 5(2):161-172.
- Julien JP, Cote F, Collard JF. 1995. Mice overexpressing the human neurofilament heavy gene as a model of ALS. *Neurobiol Aging* 16(3):487-490; discussion 490-482.
- Kim JA, Mitsukawa K, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N, Ikegaya Y. 2002. Cytoskeleton disruption causes apoptotic degeneration of dentate granule cells in hippocampal slice cultures. *Neuropharmacology* 42(8):1109-1118.
- Klivenyi P, Toldi J, Vecsei L. 2004. Kynurenines in neurodegenerative disorders: therapeutic consideration. *Adv Exp Med Biol* 541:169-183.
- Kowall NW FR, Martin JB 1987. Patterns of loss in Huntington's disease. *Trends Neurosci* 10:24-29.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lariviere RC, Julien JP. 2004. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 58(1):131-148.
- Li XB IT, Koyama T. 2002. Effect of chronic treatment with the protein kinase C inhibitor staurosporine on the acquisition and expression of contextual fear conditioning. *European Journal of Pharmacology* 441:151-155.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69(2):581-593.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.
- Moretto MB, Funchal C, Zeni G, Rocha JB, Pessoa-Pureur R. 2005. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* 210(2-3):213-222.
- Moroni F. 1999. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur J Pharmacol* 375(1-3):87-100.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Nixon RA. 1993. The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol* 3(1):29-38.

- Oh JD, Vaughan CL, Chase TN. 1999. Effect of dopamine denervation and dopamine agonist administration on serine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits. *Brain Res* 821(2):433-442.
- Paulmier C. 1986. Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. Pergamon Press:463.
- Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13(2):139-143.
- Perez-De La Cruz V, Gonzalez-Cortes C, Galvan-Arzate S, Medina-Campos ON, Perez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverri J, Santamaria A. 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III). *Neuroscience* 135(2):463-474.
- Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. 1995. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 15(5 Pt 2):3775-3787.
- Qin Y, Soghomonian JJ, Chesselet MF. 1992. Effects of quinolinic acid on messenger RNAs encoding somatostatin and glutamic acid decarboxylases in the striatum of adult rats. *Exp Neurol* 115(2):200-211.
- Rahman A, Ting K, Cullen KM, Braidy N, Brew BJ, Guillemin GJ. 2009. The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons. *PLoS One* 4(7):e6344.
- Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH. 2007. Animal models of Huntington's disease. *ILAR J* 48(4):356-373.

- Reynolds GP, Pearson SJ, Halket J, Sandler M. 1988. Brain quinolinic acid in Huntington's disease. *J Neurochem* 50(6):1959-1960.
- Ribeiro CA, Grando V, Dutra Filho CS, Wannmacher CM, Wajner M. 2006. Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J Neurochem* 99(6):1531-1542.
- Roberts RC, Ahn A, Swartz KJ, Beal MF, DiFiglia M. 1993. Intrastratial injections of quinolinic acid or kainic acid: differential patterns of cell survival and the effects of data analysis on outcome. *Exp Neurol* 124(2):274-282.
- Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. 2004. Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 187(1):150-159.
- Santamaria A, Rios C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett* 159(1-2):51-54.
- Santamaria A, Salvatierra-Sanchez R, Vazquez-Roman B, Santiago-Lopez D, Villeda-Hernandez J, Galvan-Arzate S, Jimenez-Capdeville ME, Ali SF. 2003. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 86(2):479-488.
- Sasaki T, Gotow T, Shiozaki M, Sakaue F, Saito T, Julien JP, Uchiyama Y, Hisanaga S. 2006. Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot-Marie-Tooth disease mutants. *Hum Mol Genet* 15(6):943-952.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Jr., Kohler C. 1984. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 35(1):19-32.

- Schwarcz R, Kohler C. 1983. Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci Lett* 38(1):85-90.
- Schwarcz R, Pellicciari R. 2002. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther* 303(1):1-10.
- Schwarcz R, Tamminga CA, Kurlan R, Shoulson I. 1988. Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann Neurol* 24(4):580-582.
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. 2007. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res* 313(10):2098-2109.
- Sihag RK, Nixon RA. 1991. Identification of Ser-55 as a major protein kinase A phosphorylation site on the 70-kDa subunit of neurofilaments. Early turnover during axonal transport. *J Biol Chem* 266(28):18861-18867.
- Sreekala S, Indira M. 2009. Impact of co administration of selenium and quinolinic acid in the rat's brain. *Brain Res* 1281:101-107.
- Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. 1997. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res* 749(1):44-52.
- Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45(3):309-379.
- Stone TW, Perkins MN. 1981. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 72(4):411-412.
- Veeranna, Amin ND, Ahn NG, Jaffe H, Winters CA, Grant P, Pant HC. 1998. Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP)

repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J Neurosci* 18(11):4008-4021.

Virgili M, Monti B, LoRusso A, Bentivogli M, Contestabile A. 1999. Developmental effects of in vivo and in vitro inhibition of nitric oxide synthase in neurons. *Brain Res* 839(1):164-172.

Whitaker AN, McKay DG. 1969. Studies of catecholamine shock. I. Disseminated intravascular coagulation. *Am J Pathol* 56(2):153-176.

Wolfensberger M, Amsler U, Cuenod M, Foster AC, Whetsell WO, Jr., Schwarcz R. 1983. Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett* 41(3):247-252.

Zamoner A, Funchal C, Heimfarth L, Silva FR, Pessoa-Pureur R. 2006. Short-term effects of thyroid hormones on cytoskeletal proteins are mediated by GABAergic mechanisms in slices of cerebral cortex from young rats. *Cell Mol Neurobiol* 26(2):209-224.

Figure 1. (A) Effect of QA on the phosphorylation of intermediate filament subunits in the cytoskeletal fraction from slices of striatum of 30-day-old rats. Rats were injected with 150 nmol of QA intrastrially. Thirty minutes later they were killed and striatal slices were incubated in the presence of ^{32}P orthophosphate for 30 min. The high-salt Triton-insoluble cytoskeletal fraction was extracted and the radioactivity incorporated into the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H), middle molecular weight neurofilament subunit (NF-M), low molecular weight neurofilament subunit (NF-L) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was measured as described in Material and Methods. Data are reported as means \pm S.D. expressed as percentage of controls. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test are indicated: $***<0,001$. B) Representative Coomassie blue stained gels and overexposed autoradiography: equal amounts of the cytoskeletal fraction from Sham (S), PBS (P) and treated (QA) samples were run in 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis. MW: molecular weight standard proteins. (C) Effect of QA (150 nmol) on the immunocontent of intermediate filament subunit of striatum slices of 30 day-old rats. The immunocontent of cytoskeletal fraction (Triton-insoluble pool) was measured. (D) Representative immunoblots.

Figure 2. Involvement of NMDA receptor and protein kinases on QA-induced IF hyperphosphorylation in striatum of 30-day-old rats. (A) Participation of NMDA receptor was tested using the NMDA inhibitor MK-801 (0.25 mg/kg i.p.). (B) Participation of PKA on QA-induced IF hyperphosphorylation was tested using H89 (0.1 μmol i.s.). (C) Participation of PKC on QA-induced IF hyperphosphorylation was tested using staurosporine (0.1mg/kg i.p). (D) Involvement of PKC α on QA-induced IF hyperphosphorylation was tested using KN93 (1.0 μg , i.s.). Striatal slices

were incubated with ^{32}P -orthophosphate as described in Material and Methods. The cytoskeletal fraction was extracted and radioactivity incorporated into NF-H, NF-M, NF-L and GFAP was measured. Data are expressed as percent of control and reported as means \pm S.D. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer are indicated: *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ and * $P < 0,05$ compared with PBS group; ### $P < 0,001$ and # $P < 0,05$ compared with QA group.

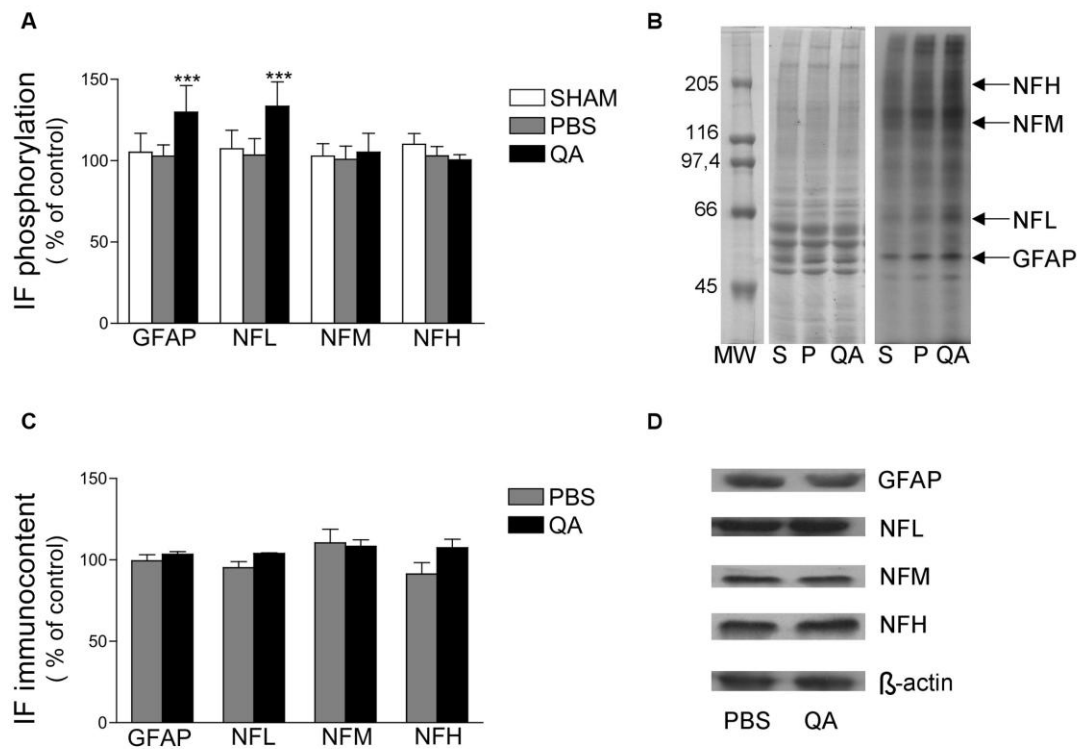
Figure 3. Effect of L-NAME and $(\text{PheSe})_2$ on the action of QA in striatum of 30-day-old rats. Animals were treated with L-NAME (60 mg/kg/day, for 8 days) or $(\text{PheSe})_2$ (0.625 mg/kg/day, for 5 days) as described in Material and Methods and injected with 150 nmol of QA in the last day of the treatment. Rats were killed and the striatum slices were incubated with ^{32}P -orthophosphate as described in Material and Methods. The cytoskeletal fraction was extracted and radioactivity incorporated into NF-H, NF-M, NF-L and GFAP was measured. Data are expressed as percent of control and reported as means \pm S.D. Statistically significant differences as determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test are indicated: *** $P < 0,001$ compared with PBS group and ### $P < 0,001$, # $P < 0,05$ compared with QA group.

Figure 4. Effects of the *in vivo* injection with QA in rat striatum on DCFH oxidation. (A) Participation of NMDA receptor was tested using the NMDA inhibitor MK-801 (0.25 mg/kg i.p.) injected 30 min before QA administration (150 nmol i.s.). (B) Effect of L-NAME on QA striatal NOS activity. Animals were treated with saline or L-NAME (60 mg/kg/day) for 8 days prior to QA injection. (C) Effect of $(\text{PheSe})_2$ on QA striatal ROS formation. Animals were treated with $(\text{PheSe})_2$ (0.625 mg/kg/day) for 5 days prior to QA injection. Thirty minutes later they were killed and striatum

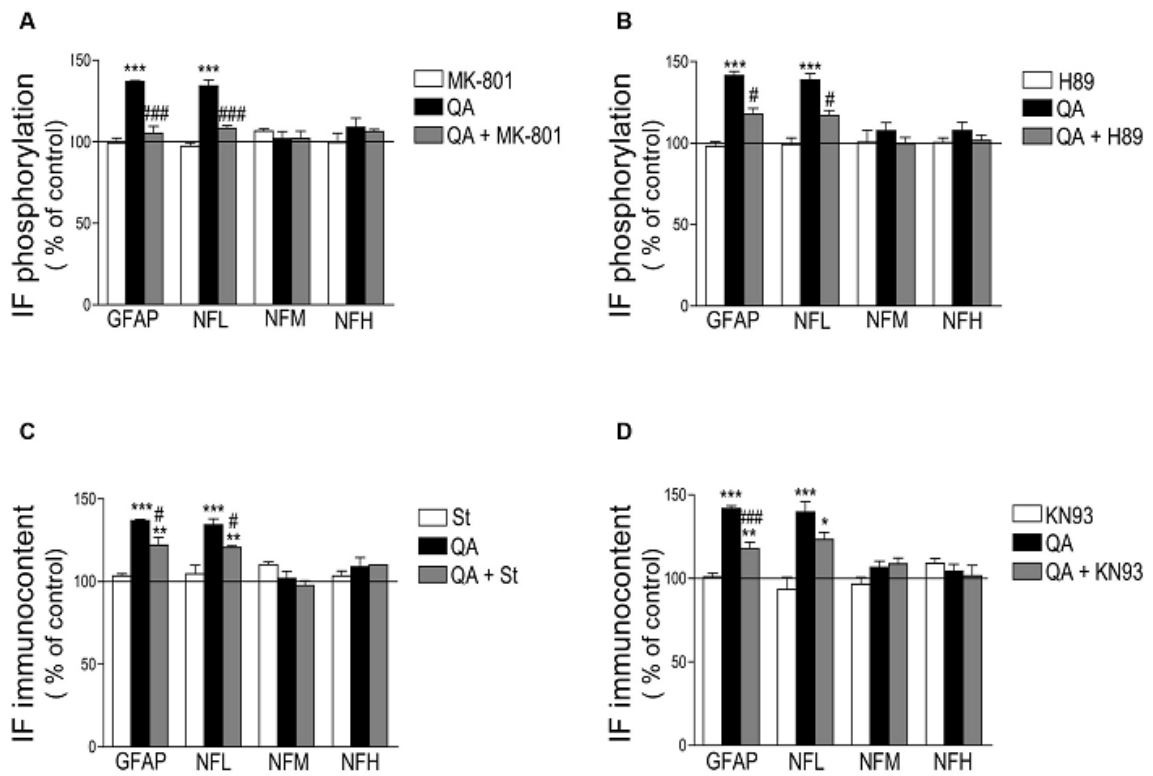
was homogenized and ROS production was detected using DCF-DA as described in Material and Methods. Data are expressed as percent of PBS group and reported as means \pm S.D. Statistically significant differences as determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test are indicated: ** $P < 0,01$ and * $P < 0,05$ compared with PBS group and ## $P < 0,01$ and # $P < 0,05$ compared with QA group.

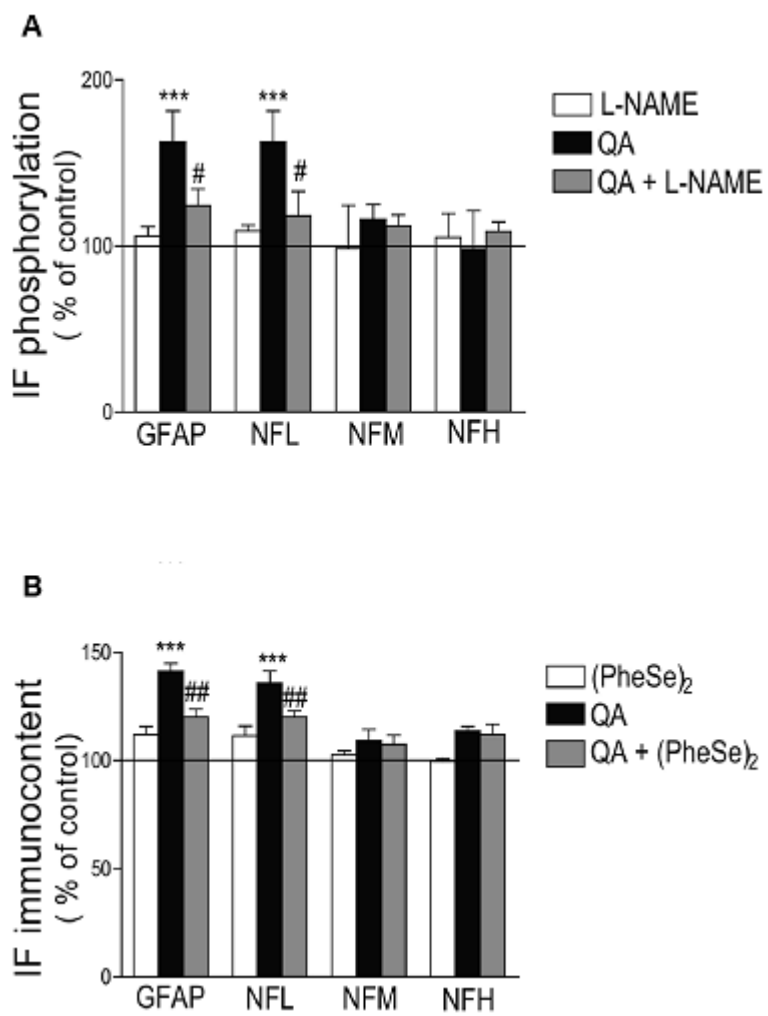
Figure 5. Effect of QA infusion on the immunocontent of total (A) and cytoskeletal-associated intermediate filament subunits (B) phosphoNF-L Ser55 of striatum of rats. The immunocontent of phosphoNF-L Ser55 was measured in slices of striatum of 30-day-old rats. Densitometric data are shown. Representative immunoblot as well as a representative loading control (β -actin) are presented. Results are expressed as mean \pm S.D. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test are indicated: *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ compared with control group. (C) Effect of different inhibitors and antioxidants on QA-hyperphosphorylation of NF-LSer55 of striatum of rats. MK-801 (0.25 mg/kg i.p.), H89 (0.1 μ mol i.s.), staurosporine (0.1mg/kg i.p), KN93 (1.0 μ g, i.s.), L-NAME (60 mg/kg/day, for 8 days) or (PheSe)₂ (0.625 mg/kg/day, for 5 days) were administered in animals prior to QA infusion, as described in Material and Methods. Rats were killed, the cytoskeletal fraction was extracted and the immunocontent of phosphoNF-L Ser55 was measured. Data are expressed as percent of control and reported as mean \pm S.D. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test are indicated: *** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ compared with PBS group and ### $P < 0,01$; ## $P < 0,01$ and # $P < 0,05$ compared with QA group. D) Representative immunoblots.

5-Figure
[Click here to download 5-Figure: Fig1.eps](#)

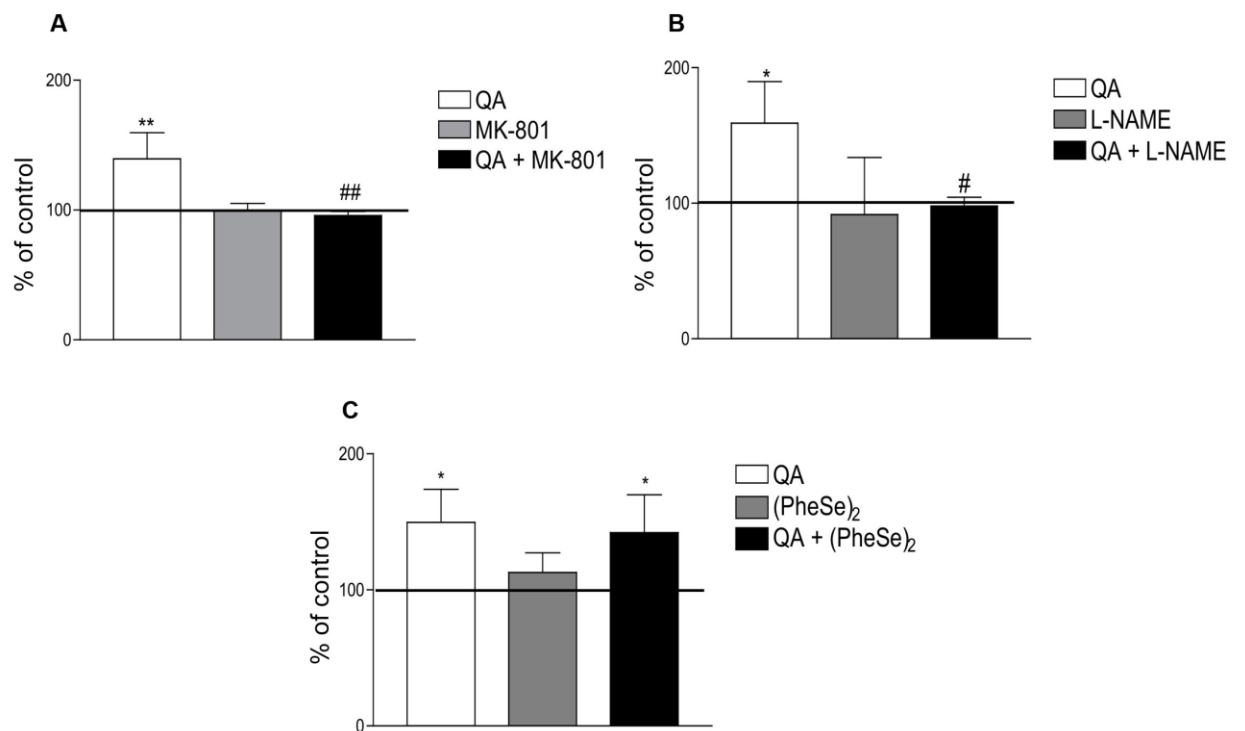


5-Figure
[Click here to download 5-Figure: Fig2.eps](#)

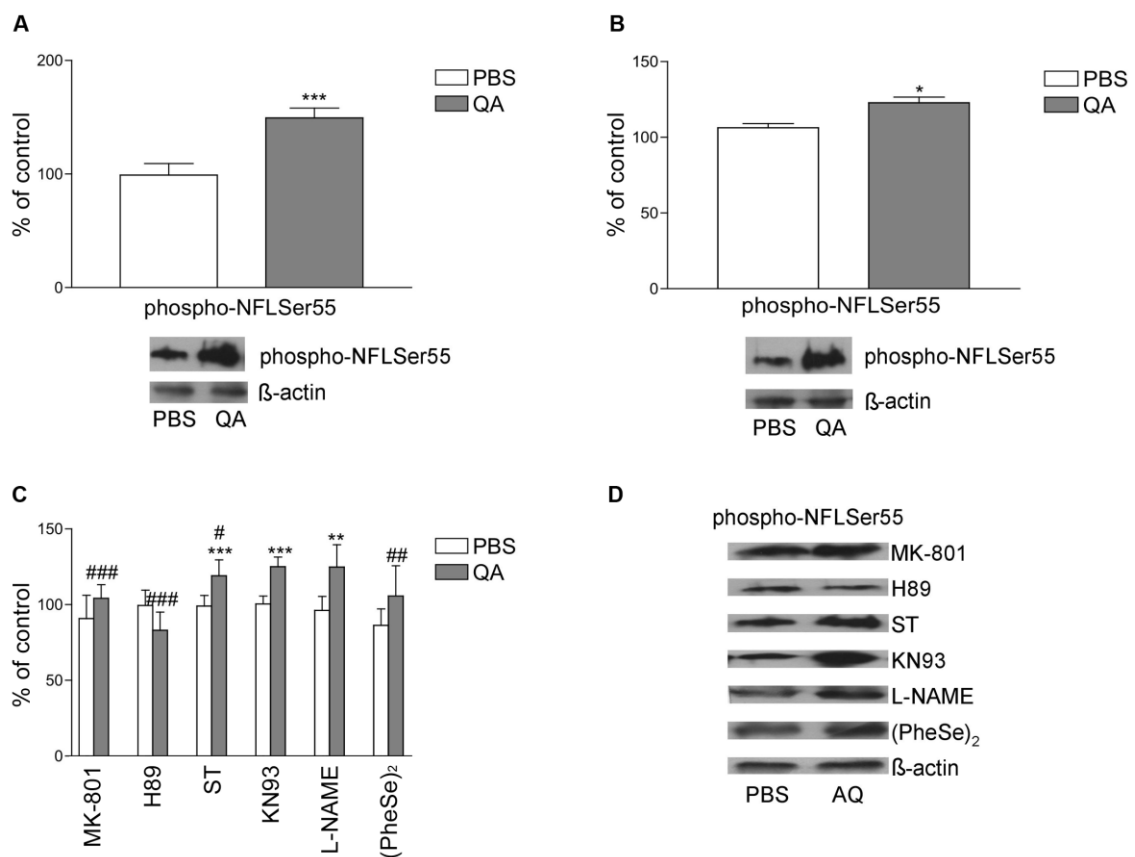




5-Figure
[Click here to download 5-Figure: Fig4.eps](#)



5-Figure
[Click here to download 5-Figure: Fig5.eps](#)



PARTE III

1 - DISCUSSÃO

O papel do AQ endógeno no cérebro permanece ainda incerto e controverso, mas há uma grande evidência de que a glia pode sintetizar e liberar altas concentrações de AQ após ativação por insultos ao cérebro ou estímulo inflamatório como infecção bacteriana. O aumento dos níveis de AQ pode produzir ou aumentar o grau do dano neuronal causado pelo insulto cerebral primário. A redução da síntese de AQ pode, ainda, limitar a severidade do dano cerebral (Walsh *et al.* 1991, Heyes & Markey 1988). Baixas quantidades de AQ no tecido cerebral (50-1000 nM) não são capazes de ativar receptores NMDA, por sua baixa afinidade a esses receptores ($ED_{50} > 100 \mu M$), mas parece que o marcado potencial *in vivo* do AQ, particularmente como uma excitotoxina, é causado por uma combinação de fatores, incluindo a ausência de mecanismos efetivos de remoção do AQ extracelular (Foster *et al.* 1983), sua habilidade de rapidamente gerar dano por formação de radicais livres (Rios & Santamaria 1991) e possivelmente, por sua interação específica com as subunidades NR2A e NR2B do receptor NMDA (de Carvalho *et al.* 1996), visto que estas subunidades estão relacionadas com a vulnerabilidade do receptor em mediar neurotoxicidade (Mitani *et al.* 1998). Estas e outras características distinguem o AQ de outras excitotoxinas, como o próprio NMDA, e podem contribuir para o perfil neuroexcitatório e neurotóxico único desta excitotoxina (Bakker & Foster 1991, Stone 1993). Injeções de AQ vêm sendo usadas pra produzir modelos de DH em ratos por seu padrão de morte neuronal ser muito parecido com a neurodegeneração característica da doença (Dawbarn *et al.* 1985, Ferrante *et al.* 1986, Kowall *et al.* 1987). Bordelon e colaboradores (Bordelon *et al.* 1999) caracterizaram em detalhes alguns dos primeiros eventos após injeção com baixas doses de AQ no estriado.

Injeção com AQ induz um rápido aumento na atividade neuronal, coincidente com um decréscimo no Ca^{2+} extracelular, presumivelmente resultante de um aumento de entrada de Ca^{2+} (Bordelon *et al.* 1998). Um declínio nas funções mitocondriais estriatais foi observado até 6 h após administração de AQ, e as concentrações de ATP diminuíram 12 horas após a cirurgia (Bordelon *et al.* 1997). Esta disfunção mitocondrial foi seguida por quebra das cadeias de DNA de neurônios estriatais 10-12 horas pós-injeção (Bordelon *et al.* 1999), como observado em uma variedade de condições experimentais (Dure *et al.* 1995, Hughes *et al.* 1996, Portera-Cailliau *et al.* 1995).

Embora existam vários estudos sobre os efeitos do AQ no SNC e nas doenças neurodegenerativas, pouco se sabe sobre seus efeitos a curto-prazo nas proteínas do citoesqueleto nas células neurais. Neste contexto, estudos de Ting *et al.* (2009) com astrócitos em cultura mostraram que o tratamento por 24 h com baixas concentrações de AQ induziu aumento nos níveis de GFAP e redução na vimentina. Ainda, Bordelon e colaboradores (1999) estudaram os efeitos do AQ 10 h após injeção no estriado e observaram uma diminuição da proteína-2 associada ao microtúbulo (MAP2), um marcador precoce de ruptura do citoesqueleto.

Tendo em vista que sinais extracelulares, hormônios e drogas são capazes de induzir alterações em intervalos de tempo curtos na estrutura do citoesqueleto, regulando o comportamento celular, e sendo a fosforilação das proteínas do citoesqueleto um mecanismo chave na regulação das vias de transdução de sinais (Inada *et al.* 1999, Helfand *et al.* 2005), no presente trabalho nós estudamos os efeitos da injeção aguda de AQ (150 nmol/0.5µL) no estriado de ratos sobre o sistema fosforilante associado com as proteínas dos FI do citoesqueleto 30 minutos após a injeção. Este tempo é representativo de respostas iniciais do citoesqueleto à

injúria causada pelo AQ, levando em conta nossas evidências prévias mostrando desregulação do sistema fosforilante associado com as proteínas do citoesqueleto 30 minutos após o tratamento de fatias cerebrais com diferentes metabólitos (Funchal *et al.* 2005, Zamoner *et al.* 2006).

A fosforilação dos FI é regulada por muitas quinases *in vivo*, o que indica que os FI são alvos modulados por muitas cascatas de sinalização (Ku *et al.* 1996). É sabido que proteínas quinases dependentes de segundos mensageiros fosforilam sítios específicos localizados na porção N-terminal das subunidades dos FI. Associação das subunidades dos NF em heteropolímeros é dependente do estado de fosforilação do domínio N-terminal da NFL e NFM (Lee *et al.* 1993, Ching & Liem 1999). É importante notar que os sítios de fosforilação para a PKA (Ser-55), PKC (Ser-51) e PKCaMII (Ser-57) são conhecidos por serem relevantes para a associação dos filamentos. Além disso, o fosfato presente na Ser55 da NFL é trocado rapidamente após a síntese de NFL nos neurônios, sugerindo um possível papel no bloqueio da associação dos NF antes do seu transporte para os neuritos. Assim como na NFL, a fosforilação mediada por PKA no domínio N-terminal da GFAP inibe a associação dos filamentos ou induz desassociação de filamentos pré-formados. Além disso, ratos transgênicos para NFL mutante, onde a Ser55 foi mutada em asparagina, mimetizando permanente fosforilação, resultou em acúmulo patológico de agregados de NF, mostrando a importância deste sítio de fosforilação na organização do NF (Gibb *et al.* 1998).

Nós observamos inicialmente que a administração aguda de AQ causou hiperfosforilação da GFAP e da NFL, evidenciando uma rápida resposta do citoesqueleto de astrócitos e neurônios, respectivamente, sendo este efeito mediado principalmente por PKA e em menor proporção pela PKC, enquanto PKCaMII se

mostrou envolvida apenas na hiperfosforilação da GFAP. Consistente com isso, NFLSer55 pareceu ser um sítio específico alvo do AQ, sendo a PKA a principal proteína quinase mediando esse efeito, como evidenciado pela habilidade do inibidor de PKA, H89, de prevenir a hiperfosforilação deste sítio pelo AQ. Portanto, nossos resultados, mostrando hiperfosforilação da NFLSer55 sugerem um papel chave do AQ na dinâmica dos FI prevenindo a associação dos filamentos e desassociando filamentos previamente formados. Embora o AQ cause hiperfosforilação da NFLSer55 mediada por PKA e este efeito potencialmente leve à desassociação do citoesqueleto, nós observamos apenas um leve decréscimo no imunoconteúdo de NFL na fração citoesquelética, se comparado com o homogeneizado total. Pode-se presumir, portanto que a alteração do equilíbrio de associação\desassociação pode ocorrer tardiamente, como uma consequência a longo prazo da hiperfosforilação da Ser55 após injeção intraestriatal de AQ.

Proteínas dos neurofilamentos de mamíferos, particularmente a NFM e NFH, são altamente fosforiláveis nos axônios. As funções dos NF dependem do estado de fosforilação de inúmeros resíduos de serina\treonina nestas proteínas. A maior parte da fosforilação ocorre nas repetições lisina-serina-prolina (KSP) nos domínios C-terminal da NFH e NFM. Fosforilação nestas repetições KSP induz a extensão de projeções laterais, afetando a habilidade dos NF de se associarem entre si e com os MT, regulando também o diâmetro axonal e a velocidade de condução do impulso nervoso. Estes sítios são fosforilados principalmente pelas MAPKs (Veeranna *et al.* 1998). Nossos resultados mostraram que a via das MAPKs não foi ativada até 60 minutos após a infusão com AQ, o que é consistente com a ausência de hiperfosforilação em NFM e NFH, e com a ausência de morte celular durante este período, pois a via das MAPK ativa efetores nucleares relacionados com a apoptose

(Craig *et al.* 2008). Ainda, nós propomos que a ativação em tempos curtos da via das MAPKs não é parte das respostas celulares iniciais à injeção estriatal aguda de AQ, sendo provavelmente relacionada com eventos de longa duração, levando à morte celular tardia. Corroborando nossas observações, Ferrer e colaboradores (2001) descreveram a ativação da ERK1/2, JNK e p38 MAPK, e de substratos para fatores de transcrição de 1 a 24 horas após injeção intracortical de AQ em ratos, sendo este efeito acompanhado de perda neuronal na área da injeção do metabólito.

Muitos estudos apontam o estresse oxidativo como mediador de morte celular por excitotoxicidade. Elevação do Ca^{2+} intracelular, através da ativação de receptores NMDA, leva à ativação da PKCaMII e da óxido nítrico sintase (NOS), com consequente formação de óxido nítrico (NO) (Bredt & Snyder 1989) e diminuição dos sistemas de defesa celular (Volterra *et al.* 1994). Alterações nos sistemas antioxidantes e nos níveis de espécies reativas podem produzir dano a lipídios, proteínas e DNA, bem como induzir necrose ou apoptose. Dados provenientes de modelos experimentais e estudos com cérebros humanos sugerem que o estresse oxidativo pode ter um importante papel na degeneração neuronal em doenças como Parkinson, Alzheimer, e esclerose amiotrófica lateral (Simonian & Coyle 1996).

As evidências de que a hiperfosforilação dos FI induzida pelo AQ foi prevenida pelo antagonista de receptores NMDA MK801, e pelo antioxidante L-NAME, salientam eventos excitotóxicos e mecanismos de estresse oxidativo precoces envolvidos na desregulação das proteínas do citoesqueleto. Isto é suportado também pelos nossos resultados correlacionando ativação de receptores NMDA com aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Estes resultados podem, ainda, refletir a ação do AQ sobre a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no estriado de ratos durante intervalos curtos de tempo.

Também foi visto que MK-801, bem como H89 preveniram totalmente a hiperfosforilação da NFLSer55 causada pelo AQ, enquanto que o L-NAME não teve envolvimento neste efeito. Portanto, os mecanismos que levam à hiperfosforilação da NFLSer55 são mediados por mecanismos dependentes do receptor NMDA, suportando o AQ como um agonista glutamatérgico agindo sobre o citoesqueleto, e a PKA como a mais importante quinase atuando neste sítio de fosforilação. Surpreendentemente, os mecanismos que levam à hiperfosforilação da NFLSer55 não são responsivos ao aumento dos níveis de espécies reativas, enquanto que a hiperfosforilação de outros sítio do N-terminal da NFL foi evitada por L-NAME. Conseqüentemente, nós podemos supor que a hiperfosforilação induzida pelo AQ é direcionada a outros sítios além da Ser55, envolvendo outros mecanismos.

A ativação seletiva de proteínas quinases associadas ao citoesqueleto que nós estamos evidenciando como consequência da injeção aguda de AQ pode estar relacionada com a maneira com que as células sentem as frequências dos picos de Ca^{2+} provocados pelo AQ através dos receptores NMDA, e pela maneira com que a resposta celular é induzida. De acordo com nossos resultados, o insulto provocado pelo AQ leva a um aumento do influxo de Ca^{2+} que pode estar relacionado com a ativação direta ou indireta de proteínas quinases dependentes de segundos mensageiros e estresse oxidativo. NFLSer55 é um dos sítios de fosforilação alvo destes mecanismos, e devido à relevância dos níveis de fosforilação deste resíduo de aminoácido na regulação da associação\desassociação dos FI e do papel fisiológico das células neurais, estes achados podem ter importantes implicações nas funções cerebrais.

O selênio é um elemento traço essencial que é parte integrante de muitas selenoproteínas, como a glutathiona peroxidase (GPx) (Tapiero *et al.* 2003). Foi

observado que o selênio tem ação antiaterogênica e suprime a peroxidação lipídica (Kurtsikidze 2006). Mudanças nas suas concentrações no sangue e no cérebro vêm sendo descritas na DA e em tumores cerebrais (Chen & Berry 2003). A GPx está presente nas células gliais, e sua expressão está aumentada nas áreas danificadas do cérebro na DP e na doença cerebral oclusiva, consistente com seu papel protetor contra o dano oxidativo. Estudos com Ebselen, um derivado do selênio com atividade similar a da glutathiona peroxidase (GPx), exibiram efeitos protetores contra dano oxidativo induzido por AQ (Rossato *et al.* 2002). Um efeito protetor dose-dependente do selênio foi observado em sinaptossomos expostos ao AQ (Santamaria *et al.* 2003). Além disso, pré-tratamento com selênio diminuiu a peroxidação lipídica *in vivo* e aumentou a atividade da GPx nos ratos tratados com AQ (Santamaria *et al.* 2003).

Disseleneto de difenila [(PheSe)₂] é um composto orgânico do selênio com atividades neuroprotetoras (Guisleni *et al.* 2003), antinociceptivas, antiinflamatórias (Nogueira *et al.* 2003) e neuroquímicas (Moretto *et al.* 2005a). Com relação à habilidade do (PheSe)₂ em prevenir a hiperfosforilação da NFLSer55, nossos achados estão de acordo com resultados prévios mostrando que este composto é capaz de prevenir a hiperfosforilação dos FI (Moretto *et al.* 2005b, Heimfarth *et al.* 2008). No entanto, no presente estudo os efeitos protetores do selênio não foram relacionados com mecanismos antioxidantes. Mais experimentos são necessários para elucidar este ponto.

Em resumo, nós propomos que os efeitos em um intervalo de tempo curto sobre a fosforilação dos FI do citoesqueleto neural evidenciados no modelo *in vivo* da DH aqui utilizado, podem ser uma consequência precoce dos mecanismos excitotóxicos causados pelo AQ no estriado de ratos. Portanto, nós sugerimos que a

desregulação do citoesqueleto assume um papel central nos passos iniciais da neurotoxicidade provocada pelo AQ.

2 – CONCLUSÕES

2.1. CONCLUSÃO GERAL

O AQ é capaz de alterar a fosforilação de FI de células neurais estriatais *in vivo*, sendo que essas alterações podem estar envolvidas com os efeitos neurotóxicos causados por esta excitotoxina.

2.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

2.2.1. O tratamento *in vivo* com AQ causa hiperfosforilação das subunidades NFL e GFAP de neurônios e astrócitos, respectivamente, não alterando o imunoconteúdo total dos FI e a fosforilação das subunidades NFM e NFH 30 minutos após a administração intraestriatal do metabólito. As alterações causadas pelo AQ sobre o citoesqueleto não foram acompanhadas de morte celular.

2.2.2. A hiperfosforilação causada pelo AQ foi dependente da ativação de receptores NMDA e da PKA, sendo parcialmente dependente da PKC e PKCaMII, enquanto que na subunidade NFL a PKCaMII não teve participação neste efeito. Também não houve ativação das enzimas da família das MAPKs nos efeitos desencadeados pelo AQ até 60 minutos após sua administração.

2.2.3. O AQ causou aumento de espécies reativas de oxigênio 30 minutos após a sua administração, sendo este efeito mediado pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

- 2.2.4 Os antioxidantes L-NAME e (PheSe)₂ preveniram totalmente a hiperfosforilação da NFL e GFAP mediada pelo AQ. Na avaliação dos efeitos destes dois compostos em prevenir o estresse oxidativo, o antioxidante L-NAME causou prevenção deste efeito, sugerindo a participação da NOS na formação das espécies reativas, enquanto que o (PheSe)₂ não foi capaz de prevenir o efeito mediado pelo AQ.
- 2.2.5. O sítio Ser55 da subunidade NFL foi um importante alvo das ações do AQ, sugerindo um efeito na associação/desassociação dos NF. Este efeito foi mediado via receptores NMDA e PKA, tendo uma participação parcial da PKC. Além disso, o antioxidante (PheSe)₂ causou prevenção da hiperfosforilação deste sítio causada pelo AQ.

3. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse trabalho abrem inúmeras perspectivas de estudo no sentido de elucidar os efeitos e os mecanismos de ação do AQ como agente neurotóxico sobre as células do SNC. Desse modo, as perspectivas para futuros trabalhos são:

- ✓ Realizar um estudo ontogenético do efeito *in vitro* e do AQ sobre a fosforilação das proteínas do citoesqueleto de estriado, hipocampo e córtex cerebral de ratos.
- ✓ Estudar as vias de sinalização intermediando as ações do AQ sobre o citoesqueleto.
- ✓ Verificar o envolvimento de diferentes sistemas de neurotransmissão nos efeitos desencadeados pelo AQ sobre o citoesqueleto.
- ✓ Avaliar alterações morfológicas causadas pelo AQ em linhagens de células C6 e em culturas primárias de astrócitos e neurônios estriatais, hipocampais e corticais de ratos.
- ✓ Realizar estudos de neuroproteção com diversos antioxidantes e agentes neuroprotetores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerley, S., Thornhill, P., Grierson, A. J., Brownlees, J., Anderton, B. H., Leigh, P. N., Shaw, C. E. and Miller, C. C. (2003) Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J Cell Biol*, **161**, 489-495.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) The cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell*, **4 ed**, . 907-982.
- Aleppo, G., Pisani, A., Copani, A., Bruno, V., Aronica, E., D'Agata, V., Canonico, P. L. and Nicoletti, F. (1992) Metabotropic glutamate receptors and neuronal toxicity. *Adv Exp Med Biol*, **318**, 137-145.
- Arundine, M. and Tymianski, M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, **34**, 325-337.
- Bakker, M. H. and Foster, A. C. (1991) An investigation of the mechanisms of delayed neurodegeneration caused by direct injection of quinolinate into the rat striatum in vivo. *Neuroscience*, **42**, 387-395.
- Beal, M. F., Ferrante, R. J., Henshaw, R., Matthews, R. T., Chan, P. H., Kowall, N. W., Epstein, C. J. and Schulz, J. B. (1995) 3-Nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurochem*, **65**, 919-922.
- Beaulieu, J. M., Robertson, J. and Julien, J. P. (1999) Interactions between peripherin and neurofilaments in cultured cells: disruption of peripherin assembly by the NF-M and NF-H subunits. *Biochem Cell Biol*, **77**, 41-45.

- Betts, J. C., Blackstock, W. P., Ward, M. A. and Anderton, B. H. (1997) Identification of phosphorylation sites on neurofilament proteins by nanoelectrospray mass spectrometry. *J Biol Chem*, **272**, 12922-12927.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M. et al. (2001) Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*, **12**, 3-10.
- Bordelon, Y. M., Chesselet, M. F., Erecinska, M. and Silver, I. A. (1998) Effects of intrastriatal injection of quinolinic acid on electrical activity and extracellular ion concentrations in rat striatum in vivo. *Neuroscience*, **83**, 459-469.
- Bordelon, Y. M., Chesselet, M. F., Nelson, D., Welsh, F. and Erecinska, M. (1997) Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem*, **69**, 1629-1639.
- Bordelon, Y. M., Mackenzie, L. and Chesselet, M. F. (1999) Morphology and compartmental location of cells exhibiting DNA damage after quinolinic acid injections into rat striatum. *J Comp Neurol*, **412**, 38-50.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9030-9033.
- Brennan, W. A., Jr., Bird, E. D. and Aprille, J. R. (1985) Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J Neurochem*, **44**, 1948-1950.
- Brorson, J. R., Bleakman, D., Chard, P. S. and Miller, R. J. (1992) Calcium directly permeates kainate/alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid receptors in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Mol Pharmacol*, **41**, 603-608.

- Brouwers, P., Heyes, M. P., Moss, H. A., Wolters, P. L., Poplack, D. G., Markey, S. P. and Pizzo, P. A. (1993) Quinolinic acid in the cerebrospinal fluid of children with symptomatic human immunodeficiency virus type 1 disease: relationships to clinical status and therapeutic response. *J Infect Dis*, **168**, 1380-1386.
- Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J. and Pallas, M. (2006) Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev*, **12**, 135-148.
- Carmignoto, G. (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol*, **62**, 561-581.
- Caudle, W. M. and Zhang, J. (2009) Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp Neurol*, **220**, 230-233.
- Chang, L. and Goldman, R. D. (2004) Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 601-613.
- Chen, J. and Berry, M. J. (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem*, **86**, 1-12.
- Ching, G. Y. and Liem, R. K. (1999) Analysis of the roles of the head domains of type IV rat neuronal intermediate filament proteins in filament assembly using domain-swapped chimeric proteins. *J Cell Sci*, **112 (Pt 13)**, 2233-2240.
- Choi, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623-634.
- Connick, J. H. and Stone, T. W. (1986) The effect of kainic, quinolinic and beta-kainic acids on the release of endogenous amino acids from rat brain slices. *Biochem Pharmacol*, **35**, 3631-3635.

- Connick, J. H. and Stone, T. W. (1988) Quinolinic acid effects on amino acid release from the rat cerebral cortex in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, **93**, 868-876.
- Coulombe, P. and Wong, P. (2004) Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nature Cell Biology*, **6**, 699-706.
- Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, **262**, 689-695.
- Craig, E. A., Stevens, M. V., Vaillancourt, R. R. and Camenisch, T. D. (2008) MAP3Ks as central regulators of cell fate during development. *Dev Dyn*, **237**, 3102-3114.
- Dawbarn, D., De Quidt, M. E. and Emson, P. C. (1985) Survival of basal ganglia neuropeptide Y-somatostatin neurones in Huntington's disease. *Brain Res*, **340**, 251-260.
- de Carvalho, L. P., Bochet, P. and Rossier, J. (1996) The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem Int*, **28**, 445-452.
- de Waegh, S. M., Lee, V. M. and Brady, S. T. (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell*, **68**, 451-463.
- Dent, E. W. and Gertler, F. B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, **40**, 209-227.
- Dugan, L. L., Sensi, S. L., Canzoniero, L. M., Handran, S. D., Rothman, S. M., Lin, T. S., Goldberg, M. P. and Choi, D. W. (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci*, **15**, 6377-6388.

- Dure, L. S. t., Wiess, S., Standaert, D. G., Rudolf, G., Testa, C. M. and Young, A. B. (1995) DNA fragmentation and immediate early gene expression in rat striatum following quinolinic acid administration. *Exp Neurol*, **133**, 207-214.
- Eriksson, J. E., Brautigan, D. L., Vallee, R., Olmsted, J., Fujiki, H. and Goldman, R. D. (1992) Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11093-11097.
- Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M. and Goldman, R. D. (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest*, **119**, 1763-1771.
- Estrada Sanchez, A. M., Mejia-Toiber, J. and Massieu, L. (2008) Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res*, **39**, 265-276.
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Richardson, E. P., Jr., Bird, E. D. and Martin, J. B. (1986) Topography of enkephalin, substance P and acetylcholinesterase staining in Huntington's disease striatum. *Neurosci Lett*, **71**, 283-288.
- Foster, A. C., Collins, J. F. and Schwarcz, R. (1983) On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology*, **22**, 1331-1342.
- Friede, R. L. and Samorajski, T. (1970) Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec*, **167**, 379-387.
- Fuchs, E. and Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, **63**, 345-382.
- Funchal, C., Zamoner, A., dos Santos, A. Q., Loureiro, S. O., Wajner, M. and Pessoa-Pureur, R. (2005) Alpha-ketoisocaproic acid increases

- phosphorylation of intermediate filament proteins from rat cerebral cortex by mechanisms involving Ca²⁺ and cAMP. *Neurochem Res*, **30**, 1139-1146.
- Gelderblom, M., Eminel, S., Herdegen, T. and Waetzig, V. (2004) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the cytoskeleton--functions beyond neurodegeneration. *Int J Dev Neurosci*, **22**, 559-564.
- Gibb, B. J., Brion, J. P., Brownlees, J., Anderton, B. H. and Miller, C. C. (1998) Neuropathological abnormalities in transgenic mice harbouring a phosphorylation mutant neurofilament transgene. *J Neurochem*, **70**, 492-500.
- Goto, H., Kosako, H., Tanabe, K., Yanagida, M., Sakurai, M., Amano, M., Kaibuchi, K. and Inagaki, M. (1998) Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *J Biol Chem*, **273**, 11728-11736.
- Gotow, T., Takeda, M., Tanaka, T. and Hashimoto, P. H. (1992) Macromolecular structure of reassembled neurofilaments as revealed by the quick-freeze deep-etch mica method: difference between NF-M and NF-H subunits in their ability to form cross-bridges. *Eur J Cell Biol*, **58**, 331-345.
- Greene, J. G. and Greenamyre, J. T. (1995) Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem*, **64**, 430-436.
- Guillemin, G. J. and Brew, B. J. (2002) Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep*, **7**, 199-206.
- Guisleni, G., Porciúncula, L. O., Cimarosti, H., Rocha, J. B. T. and Salbergo, C. G. (2003) diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res*, **986**, 196-199.

- Gunter, T. E. and Pfeiffer, D. R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, **258**, C755-786.
- Halperin, J. J. and Heyes, M. P. (1992) Neuroactive kynurenines in Lyme borreliosis. *Neurology*, **42**, 43-50.
- Hashimoto, R., Nakamura, Y., Goto, H., Wada, Y., Sakoda, S., Kaibuchi, K., Inagaki, M. and Takeda, M. (1998) Domain- and site-specific phosphorylation of bovine NF-L by Rho-associated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 407-411.
- Heath, P. R. and Shaw, P. J. (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, **26**, 438-458.
- Heimfarth, L., Loureiro, S. O., Zamoner, A., Pelaez Pde, L., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. and Pessoa-Pureur, R. (2008) Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. *Neurotoxicology*, **29**, 40-47.
- Helfand, B. T., Chou, Y. H., Shumaker, D. K. and Goldman, R. D. (2005) Intermediate filament proteins participate in signal transduction. *Trends Cell Biol*, **15**, 568-570.
- Heyes, M. P., Brew, B. J., Martin, A. et al. (1991) Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. *Ann Neurol*, **29**, 202-209.
- Heyes, M. P. and Markey, S. P. (1988) Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood, and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan

- administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. *Anal Biochem*, **174**, 349-359.
- Hisanaga, S. and Hirokawa, N. (1989) The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament. *J Neurosci*, **9**, 959-966.
- Hisanaga, S., Matsuoka, Y., Nishizawa, K., Saito, T., Inagaki, M. and Hirokawa, N. (1994) Phosphorylation of native and reassembled neurofilaments composed of NF-L, NF-M, and NF-H by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Biol Cell*, **5**, 161-172.
- Hoffman, P. N., Cleveland, D. W., Griffin, J. W., Landes, P. W., Cowan, N. J. and Price, D. L. (1987) Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3472-3476.
- Hollenbeck, P. (2001) Cytoskeleton: Microtubules get the signal. *Curr Biol*, **11**, R820-823.
- Holt, D. E., Washabau, R. J., Djali, S., Dayrell-Hart, B., Drobotz, K. J., Heyes, M. P. and Robinson, M. B. (2002) Cerebrospinal fluid glutamine, tryptophan, and tryptophan metabolite concentrations in dogs with portosystemic shunts. *Am J Vet Res*, **63**, 1167-1171.
- Hughes, P. E., Alexi, T., Yoshida, T., Schreiber, S. S. and Knusel, B. (1996) Excitotoxic lesion of rat brain with quinolinic acid induces expression of p53 messenger RNA and protein and p53-inducible genes Bax and Gadd-45 in brain areas showing DNA fragmentation. *Neuroscience*, **74**, 1143-1160.
- Ilzecka, J., Kocki, T., Stelmasiak, Z. and Turski, W. A. (2003) Endogenous protectant kynurenic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*, **107**, 412-418.

- Inada, H., Togashi, H., Nakamura, Y., Kaibuchi, K., Nagata, K. and Inagaki, M. (1999) Balance between activities of Rho kinase and type 1 protein phosphatase modulates turnover of phosphorylation and dynamics of desmin/vimentin filaments. *J Biol Chem*, **274**, 34932-34939.
- Ivaska, J., Pallari, H. M., Nevo, J. and Eriksson, J. E. (2007) Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*, **313**, 2050-2062.
- Izawa, I. and Inagaki, M. (2006) Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci*, **97**, 167-174.
- Izmiryan, A., Cheraud, Y., Khanamiryan, L. et al. (2006) Different expression of synemin isoforms in glia and neurons during nervous system development. *Glia*, **54**, 204-213.
- Janmey, P. A. (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, **78**, 763-781.
- Kaplan, M. P., Chin, S. S., Fliegner, K. H. and Liem, R. K. (1990) Alpha-internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *J Neurosci*, **10**, 2735-2748.
- Kerr, S. J., Armati, P. J. and Brew, B. J. (1995) Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain cultures. *J Neurovirol*, **1**, 375-380.
- Kim, J. P. and Choi, D. W. (1987) Quinolinic neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience*, **23**, 423-432.
- Konur, S. and Ghosh, A. (2005) Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron*, **46**, 401-405.

- Kornack, D. R. and Giger, R. J. (2005) Probing microtubule +TIPs: regulation of axon branching. *Curr Opin Neurobiol*, **15**, 58-66.
- Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Beal, M. F., Richardson, E. P., Jr., Sofroniew, M. V., Cuello, A. C. and Martin, J. B. (1987) Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience*, **20**, 817-828.
- Krauss, G. (2003) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. **3 ed.**, 115-150.
- Ku, N. O., Liao, J., Chou, C. F. and Omary, M. B. (1996) Implications of intermediate filament protein phosphorylation. *Cancer Metastasis Rev*, **15**, 429-444.
- Kurtsikidze, I. (2006) [Effect of treatment with selenium electrophoresis on biochemical indices in patients suffering from ischaemic cardiac disease with a stable stenocardia of tension]. *Georgian Med News*, 47-51.
- Lee, M. K., Xu, Z., Wong, P. C. and Cleveland, D. W. (1993) Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol*, **122**, 1337-1350.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B. and McKay, R. D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, **60**, 585-595.
- Letourneau, P. C. (1996) The cytoskeleton in nerve growth cone motility and axonal pathfinding. *Perspect Dev Neurobiol*, **4**, 111-123.
- Loureiro, S. O., Heimfarth, L., Pelaez Pde, L., Vanzin, C. S., Viana, L., Wyse, A. T. and Pessoa-Pureur, R. (2008) Homocysteine activates calcium-mediated cell signaling mechanisms targeting the cytoskeleton in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci*, **26**, 447-455.

- Lucas, D. R. and Newhouse, J. P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol*, **58**, 193-201.
- Ludin, B. and Matus, A. (1993) The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus*, **3 Spec No**, 61-71.
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Jenner, P. and Schapira, A. H. (1990) Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease. *Lancet*, **336**, 749.
- McCall, M. A., Gregg, R. G., Behringer, R. R. et al. (1996) Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6361-6366.
- Medana, I. M., Day, N. P., Salahifar-Sabet, H. et al. (2003) Metabolites of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in the cerebrospinal fluid of Malawian children with malaria. *J Infect Dis*, **188**, 844-849.
- Mitani, A., Watanabe, M. and Kataoka, K. (1998) Functional change of NMDA receptors related to enhancement of susceptibility to neurotoxicity in the developing pontine nucleus. *J Neurosci*, **18**, 7941-7952.
- Moffett, J. R. and Namboodiri, M. A. (2003) Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*, **81**, 247-265.
- Moretto, M. B., Funchal, C., Zeni, G., Pessoa-Pureur, R. and Rocha, J. B. (2005a) Selenium compounds prevent the effects of methylmercury on the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats. *Toxicol Sci*, **85**, 639-646.
- Moretto, M. B., Funchal, C., Zeni, G., Rocha, J. B. and Pessoa-Pureur, R. (2005b) Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal

- proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology*, **210**, 213-222.
- Nakao, N. and Brundin, P. (1997) Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinate or 3-nitropropionic acid. *Neuroscience*, **76**, 749-761.
- Nestler, E. J. and Greengard, P. (1994) Protein phosphorylation and neuronal function. *Basic Neurochem.*, 449-474.
- Nicholls, T., Lacey, B., Nitsos, I., Smythe, G. and Walker, D. W. (2001) Regional changes in kynurenic acid, quinolinic acid, and glial fibrillary acidic protein concentrations in the fetal sheep brain after experimentally induced placental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol*, **184**, 203-208.
- Nicotera, P. and Orrenius, S. (1992) Ca²⁺ and cell death. *Ann N Y Acad Sci*, **648**, 17-27.
- Nogueira, C. W., Quinhones, E. B., Jung, E. A., Zeni, G. and Rocha, J. B. (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res*, **52**, 56-63.
- Obrenovitch, T. P. and Urenjak, J. (2003) Accumulation of quinolinic acid with neuroinflammation: does it mean excitotoxicity? *Adv Exp Med Biol*, **527**, 147-154.
- Olney, J. W. and de Gubareff, T. (1978) The fate of synaptic receptors in the kainate-lesioned striatum. *Brain Res*, **140**, 340-343.
- Olney, J. W., Price, M. T., Labruyere, J., Salles, K. S., Frierdich, G., Mueller, M. and Silverman, E. (1987) Anti-parkinsonian agents are phencyclidine agonists and N-methyl-aspartate antagonists. *Eur J Pharmacol*, **142**, 319-320.

- Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M. and Liao, J. (2006) "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci*, **31**, 383-394.
- Perez-De La Cruz, V. and Santamaria, A. (2007) Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence. *Physiol Res*, **56**, 513-526.
- Perkins, M. N. and Stone, T. W. (1983) Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*, **226**, 551-557.
- Perrot, R. and Eyer, J. (2009) Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull*, **80**, 282-295.
- Portera-Cailliau, C., Hedreen, J. C., Price, D. L. and Koliatsos, V. E. (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci*, **15**, 3775-3787.
- Portier, M. M., de Nechaud, B. and Gros, F. (1983) Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Dev Neurosci*, **6**, 335-344.
- Rahman, A., Ting, K., Cullen, K. M., Braidy, N., Brew, B. J. and Guillemin, G. J. (2009) The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons. *PLoS One*, **4**, e6344.
- Rao, M. V., Campbell, J., Yuan, A., Kumar, A., Gotow, T., Uchiyama, Y. and Nixon, R. A. (2003) The neurofilament middle molecular mass subunit carboxyl-terminal tail domains is essential for the radial growth and cytoskeletal architecture of axons but not for regulating neurofilament transport rate. *J Cell Biol*, **163**, 1021-1031.

- Rios, C. and Santamaria, A. (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res*, **16**, 1139-1143.
- Rossato, J. I., Zeni, G., Mello, C. F., Rubin, M. A. and Rocha, J. B. (2002) Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intrastriatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci Lett*, **318**, 137-140.
- Rothman, S. M., Thurston, J. H., Hauhart, R. E., Clark, G. D. and Solomon, J. S. (1987) Ketamine protects hippocampal neurons from anoxia in vitro. *Neuroscience*, **21**, 673-678.
- Ruddick, J. P., Evans, A. K., Nutt, D. J., Lightman, S. L., Rook, G. A. and Lowry, C. A. (2006) Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med*, **8**, 1-27.
- Rutka, J. T. and Smith, S. L. (1993) Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acidic protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. *Cancer Res*, **53**, 3624-3631.
- Sacaan, A. I. and Schoepp, D. D. (1992) Activation of hippocampal metabotropic excitatory amino acid receptors leads to seizures and neuronal damage. *Neurosci Lett*, **139**, 77-82.
- Saez, M. E., Ramirez-Lorca, R., Moron, F. J. and Ruiz, A. (2006) The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discov Today*, **11**, 917-923.
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J. and Avila, J. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol*, **61**, 133-168.

- Sanhai, W. R., Eckert, B. S. and Yeagle, P. L. (1999) Altering the state of phosphorylation of rat liver keratin intermediate filaments by ethanol treatment in vivo changes their structure. *Biochim Biophys Acta*, **1429**, 459-466.
- Santamaria, A., Salvatierra-Sanchez, R., Vazquez-Roman, B., Santiago-Lopez, D., Villeda-Hernandez, J., Galvan-Arzate, S., Jimenez-Capdeville, M. E. and Ali, S. F. (2003) Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem*, **86**, 479-488.
- Sattler, R. and Tymianski, M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med*, **78**, 3-13.
- Schuck, P. F., Tonin, A., da Costa Ferreira, G., Viegas, C. M., Latini, A., Duval Wannmacher, C. M., de Souza Wyse, A. T., Dutra-Filho, C. S. and Wajner, M. (2007) Kynurenines impair energy metabolism in rat cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol*, **27**, 147-160.
- Schwarcz, R., Whetsell, W. O., Jr. and Mangano, R. M. (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, **219**, 316-318.
- Shah, R. S., Lee, H. G., Xiongwei, Z., Perry, G., Smith, M. A. and Castellani, R. J. (2008) Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, **62**, 199-207.
- Shea, T. B. and Chan, W. K. (2008) Regulation of neurofilament dynamics by phosphorylation. *Eur J Neurosci*, **27**, 1893-1901.

- Sihag, R. K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T. B. and Pant, H. C. (2007) Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res*, **313**, 2098-2109.
- Simonian, N. A. and Coyle, J. T. (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **36**, 83-106.
- Smith-Swintosky, V. L. and Mattson, M. P. (1994) Glutamate, beta-amyloid precursor proteins, and calcium mediated neurofibrillary degeneration. *J Neural Transm Suppl*, **44**, 29-45.
- Stone, T. W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*, **45**, 309-379.
- Stone, T. W. and Perkins, M. N. (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol*, **72**, 411-412.
- Szeverenyi, I., Cassidy, A. J., Chung, C. W. et al. (2008) The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat*, **29**, 351-360.
- Tanaka, E. and Sabry, J. (1995) Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell*, **83**, 171-176.
- Tapiero, H., Townsend, D. M. and Tew, K. D. (2003) The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother*, **57**, 134-144.
- Tatter, S. B., Galpern, W. R., Hoogeveen, A. T. and Isacson, O. (1995) Effects of striatal excitotoxicity on huntingtin-like immunoreactivity. *Neuroreport*, **6**, 1125-1129.
- Ting, K. K., Brew, B. J. and Guillemin, G. J. (2009) Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, **6**, 36.

- Tymianski, M. and Tator, C. H. (1996) Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*, **38**, 1176-1195.
- Vamos, E., Pardutz, A., Klivenyi, P., Toldi, J. and Vecsei, L. (2009) The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci*, **283**, 21-27.
- Veeranna, Amin, N. D., Ahn, N. G., Jaffe, H., Winters, C. A., Grant, P. and Pant, H. C. (1998) Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J Neurosci*, **18**, 4008-4021.
- Volterra, A., Trotti, D., Floridi, S. and Racagni, G. (1994) Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann N Y Acad Sci*, **738**, 153-162.
- Walsh, J. L., Todd, W. P., Carpenter, B. K. and Schwarcz, R. (1991) 4-Halo-3-hydroxyanthranilates are potent inhibitors of 3-hydroxyanthranilate oxygenase in the rat brain in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol*, **294**, 579-582.
- Walton, H. S. and Dodd, P. R. (2007) Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, **50**, 1052-1066.
- Waxman, S. G. (1980) Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. *Muscle Nerve*, **3**, 141-150.
- Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T. M. and Darnell, J. E., Jr. (1994) The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell*, **78**, 575-588.

- Whetsell, W. O., Jr. and Schwarcz, R. (1989) Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system. *Neurosci Lett*, **97**, 271-275.
- Wong, P. C. and Cleveland, D. W. (1990) Characterization of dominant and recessive assembly-defective mutations in mouse neurofilament NF-M. *J Cell Biol*, **111**, 1987-2003.
- Yuan, A., Rao, M. V., Sasaki, T. et al. (2006) Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci*, **26**, 10006-10019.
- Zadori, D., Klivenyi, P., Vamos, E., Fulop, F., Toldi, J. and Vecsei, L. (2009) Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm*, **116**, 1403-1409.
- Zamoner, A., Corbelini, P. F., Funchal, C., Menegaz, D., Silva, F. R. and Pessoa-Pureur, R. (2005) Involvement of calcium-dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. *Life Sci*, **77**, 3321-3335.
- Zamoner, A., Funchal, C., Heimfarth, L., Silva, F. R. and Pessoa-Pureur, R. (2006) Short-term effects of thyroid hormones on cytoskeletal proteins are mediated by GABAergic mechanisms in slices of cerebral cortex from young rats. *Cell Mol Neurobiol*, **26**, 209-224.
- Zamoner, A., Heimfarth, L., Oliveira Loureiro, S., Royer, C., Mena Barreto Silva, F. R. and Pessoa-Pureur, R. (2008) Nongenomic actions of thyroxine modulate intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of rats. *Neuroscience*, **156**, 640-652.

Zhu, Q., Couillard-Despres, S. and Julien, J. P. (1997) Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol*, **148**, 299-316.

5. ANEXOS

5.1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filamentos proteicos que constituem o citoesqueleto celular.

Figura 2. Representação dos domínios dos FI.

Figura 3. Estrutura de um neurofilamento.

Figura 4. Modelo hipotético do efeito do AQ na doença de Alzheimer.