

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**EFEITO DAS TAREFAS COMPORTAMENTAIS DE HABITUAÇÃO E ESQUIVA
INIBITÓRIA SOBRE A FOSFORILAÇÃO *IN VITRO* DE PROTEÍNAS DO
CITOESQUELETO DE HIPOCAMPO DE RATOS**

NADJA SCHRÖDER

ORIENTADORA: Prof.^ª REGINA PESSOA PUREUR

CO-ORIENTADOR: Prof. IVAN ANTÔNIO IZQUIERDO

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

Porto Alegre

1995

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Eduardo e à Carina por todo o amor, carinho e paciência que eles tiveram comigo durante a realização deste trabalho. Aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo que sempre recebi, desde o início.

À Profa. Regina, pela orientação deste trabalho.

À Marta por ter sempre ajudado na realização deste trabalho, além de ter me incentivado a ingressar no curso de mestrado.

Agradeço à Ângela especialmente pela grande amizade, além de ter tido participação direta na realização do trabalho, sempre contribuindo e auxiliando nos momentos difíceis.

Às bolsistas de Iniciação Científica, Carla e Ana Carina que muito me auxiliaram.

A todo o pessoal do Lab. 5, especialmente ao Rodrigo pela realização da IEF; à Carmem e ao C.A. por terem sempre auxiliado no que foi necessário.

Ao Prof. Izquierdo pela co-orientação deste trabalho, pelo apoio, pela sensibilidade e amizade.

Enfim, a todos os colegas que estiveram sempre presentes durante todo este tempo, especialmente àqueles que se tornaram amigos.

RESUMO

Neste trabalho utilizamos uma fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 obtida a partir de hipocampo de ratos adultos a qual era incubada com ^{32}P -ATP *in vitro*. As fosfoproteínas foram identificadas através de eletroforese bidimensional em condições de não equilíbrio, imunodeteção e através da utilização de um padrão de tubulina. São elas : NF-M, sinapsina 1, NF-L, α tubulina e GFAP.

As atividades quinásicas endógenas dependentes de 2º mensageiro associadas à fração citoesquelética foram estudadas através da utilização de seus ativadores específicos. Os resultados indicaram que a fração citoesquelética possui duas atividades quinásicas endógenas dependentes de 2º mensageiro, as quais são : a quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaM quinase) e a quinase dependente de AMP cíclico (quinase A).

Para o estudo da atividade fosfatásica foi utilizada uma curva de concentrações crescentes (0,05; 0,5 e 5 μM) de ácido ocadaico, um potente inibidor de fosfatases. Os resultados mostraram que a PP2A encontra-se associada à fração citoesquelética, defosforilando as proteínas da fração citoesquelética.

As tarefas comportamentais estudadas neste trabalho alteraram a fosforilação *in vitro* de quatro fosfoproteínas constituintes da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100. A tarefa de habituação diminuiu a incorporação de ^{32}P -ATP *in vitro* na α tubulina e na GFAP, enquanto que a esQUIVA inibitória aumentou a fosforilação *in vitro* nas duas subunidades dos neurofilamentos (NF-M e NF-L). Nenhuma das duas tarefas teve efeito sobre a incorporação de ^{32}P na sinapsina 1. Além disso, o choque não foi capaz de alterar a fosforilação *in vitro* de nenhuma das fosfoproteínas estudadas.

Com o objetivo de verificar se as alterações encontradas na incorporação de ^{32}P *in vitro* nestas proteínas, deviam-se a alterações na atividade quinásica ou

fosfatásica, foram feitas as curvas de defosforilação, nas quais os sistemas foram incubados durante os seguintes tempos: 5, 10, 20 e 30 minutos. Nenhuma alteração foi detectada nas curvas de defosforilação de frações citoesqueléticas obtidas de ratos submetidos às tarefas comportamentais. Este resultado sugere que a alteração encontrada na incorporação de ^{32}P *in vitro* aos 5 minutos de incubação pode ser atribuída a alterações nas atividades quinásicas associadas a fração citoesquelética de hipocampo de ratos.

SUMÁRIO

I	- INTRODUÇÃO	01
I.1	- O CITOESQUELETO	02
I.2	- A FOSFORILAÇÃO	10
I.3	- A MEMÓRIA	15
II	- OBJETIVOS	20
III	- MATERIAL E MÉTODOS	22
III.1	- ANIMAIS	23
III.2	- TAREFAS COMPORTAMENTAIS	23
III.2.a	- ESQUIVA INIBITÓRIA	23
III.2.b	- HABITUAÇÃO	23
III.2.c	- CHOQUE	23
III.3	- OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100	24
III.4	- DOSAGEM DE PROTEÍNA	24
III.5	- INCORPORAÇÃO DE ³² P-ATP IN VITRO NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	26
III.6	- ENSAIOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES QUINÁSICAS DEPENDENTES DE 2 ^o MENSAGEIRO ASSOCIADAS À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	26
III.6.a	- ENSAIOS PARA A DETECÇÃO DA ATIVIDADE QUINÁSICA DEPENDENTE DE CÁLCIO E CALMODULINA (CaM QUINASE)	26
III.6.b	- ENSAIOS PARA A DETECÇÃO DA ATIVIDADE QUINÁSICA DEPENDENTE DE AMP CÍCLICO (QUINASE A)	27
III.6.c	- ENSAIOS PARA A DETECÇÃO DA ATIVIDADE QUINÁSICA DEPENDENTE DE CÁLCIO E FOSFOLIPÍDIOS	27
III.7	- ENSAIOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FOSFATASES ASSOCIADAS À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	28

III.8	- CURVA DE DEFOSFORILAÇÃO	28
III.9	- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	28
III.10	- AUTORADIOGRAFIA E MEDIDA DA RADIOATIVIDADE INCORPORADA ÀS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	29
III.11	- IMUNODETECÇÃO	30
III.12	- ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM CONDIÇÕES DE NÃO EQUILÍBRIO	31
III.12.a	- PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	31
III.12.b	- FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) NÃO EQUILIBRADA - I DIMENSÃO	31
III.12.c	- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) - II DIMENSÃO	32
III.13	- PURIFICAÇÃO DA TUBULINA	32
III.14	- ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
IV	- RESULTADOS	36
IV.1	- IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	37
IV.2	- IDENTIFICAÇÃO DO SISTEMA FOSFORILANTE ASSOCIADO À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	41
IV.2.a	- ENSAIOS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUINASES ASSOCIADAS À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	41
IV.2.b	- ENSAIOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FOSFATASES ASSOCIADAS À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	44
IV.3	- EFEITO DAS TAREFAS COMPORTAMENTAIS SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	48
V	- DISCUSSÃO	56
VI	- CONCLUSÕES	69
VII	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

SUMÁRIO DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MICROTÚBULOS	04
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRANSPORTE DOS CONSTITUINTES DO CITOESQUELETO NO AXÔNIO	06
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ASSOCIAÇÃO DAS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS	07
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MICROFILAMENTOS .	09
FIGURA 5 - ESQUEMA DO PAPEL DA FOSFORILAÇÃO EM VÁRIOS PROCESSOS CEREBRAIS	13
FIGURA 6 - ESQUEMA DA EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100	25
FIGURA 7 - ESQUEMA DA PURIFICAÇÃO DA TUBULINA	35
FIGURA 8 - SDS-PAGE DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100 CORADA POR COOMASSIE BLUE E AUTORADIOGRAFIA DA FRAÇÃO INCUBADA COM ³² P-ATP IN VITRO	38
FIGURA 9 - AUTORADIOGRAFIA DA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM CONDIÇÕES DE NÃO EQUILÍBRIO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INCUBADA COM ³² P-ATP IN VITRO	39
FIGURA 10 - IMUNODETECÇÃO DAS SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100	40
FIGURA 11 - AUTORADIOGRAFIA DA SDS-PAGE DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INCUBADA COM ³² P-ATP IN VITRO E TUBULINA PURIFICADA CORADA POR COOMASSIE BLUE	42
FIGURA 12 - EFEITO DO CÁLCIO E CALMODULINA SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ³² P-ATP IN VITRO NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	43

FIGURA 13 - EFEITO DO AMP CÍCLICO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{32}P - ATP IN VITRO NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA . . .	45
FIGURA 14 - EFEITO DA ADIÇÃO DE CÁLCIO, FOSFATIDILSERINA E PDBU SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{32}P -ATP IN VITRO SOBRE AS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	46
FIGURA 15 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO OCADAICO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{32}P -ATP IN VITRO NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	47
FIGURA 16 - EFEITO DA TAREFA DE HABITUAÇÃO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{32}P -ATP IN VITRO NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	49
FIGURA 17 - EFEITO DA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{32}P -ATP IN VITRO NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	50
FIGURA 18 - EFEITO DO CHOQUE SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{32}P -ATP IN VITRO NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA.	51
FIGURA 19 - CURVAS DE TEMPO DE DEFOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA	53

I-INTRODUÇÃO

I - 1 O CITOESQUELETO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O Sistema Nervoso Central é composto essencialmente por neurônios e células gliais (astrócitos e oligodendrócitos entre outros), sendo os neurônios células altamente especializadas. Tal especialização envolve a extensão e a arborização de processos (axônios e dendritos), sua subsequente maturação e o estabelecimento de contatos sinápticos funcionais; a especialização ocorre às expensas da capacidade de se reproduzir (Díaz-Nido et al, 1990). Isto é, cada célula neuronal possui um "aniversário", definido como o final de um processo de mitose que a gerou a partir de uma célula precursora. Após, o neurônio maduro é incapaz de se dividir (Alberts et al, 1994). As células gliais não possuem contatos sinápticos e podem se reproduzir ao longo da vida. Sua função está relacionada com a manutenção do pH e balanço iônico local, formação de mielina e manutenção da barreira hemato-encefálica, entre outras (Hammerschlag et al, 1994).

A geração de células com forma polar como o neurônio, requer proteínas estruturais altamente especializadas e mecanismos complexos para regulação da associação e transporte destas proteínas (Nixon et al, 1994). A maquinaria biossintética do neurônio encontra-se no corpo celular e há sistemas que transportam ao longo do axônio as substâncias que o mantêm, além de outras substâncias que são necessárias nos terminais nervosos, tais como organelas e macromoléculas.

Considerando-se que o citoesqueleto das células eucarióticas serve a uma variedade de funções incluindo a geração e preservação da forma da célula e o movimento de partículas de um ponto a outro dentro da célula (Shelanski et al, 1994), é crítica a presença destas proteínas para a funcionalidade celular dos neurônios.

O citoesqueleto neuronal é constituído de três tipos de filamentos protéicos: os microtúbulos formados de tubulina, os filamentos intermediários, chamados de neurofilamentos, formados por três subunidades proteicas e os microfilamentos formados por actina.

Os microtúbulos são estruturas de 24 nm de diâmetro compostas por 12-14 protofilamentos os quais são constituídos por um heterodímero formado por 2 subunidades globulares altamente conservadas, ligadas entre si, a alfa e beta tubulina com peso molecular de aproximadamente 56 a 54 KDa, respectivamente (fig.1).

Os microtúbulos são também estruturas extremamente dinâmicas as quais fácil e rapidamente polimerizam e despolimerizam, podendo no entanto atingir uma condição mais estável no neurônio pela sua interação com proteínas acessórias (MAPs) ou por modificações pós-traducionais como detirosinação, acetilação e fosforilação (Shelanski et al,1994). As principais MAPs presentes no cérebro incluem MAP 1A, MAP 1B, MAP2 e um grupo de proteínas de baixo peso molecular (entre 37 e 46 kDa) conhecidas como TAU. A MAP2 é a principal proteína associada aos microtúbulos no cérebro e está envolvida no processo de polimerização da tubulina. Além disso, os microtúbulos podem apresentar braços laterais que interagem com outros elementos do citoesqueleto ou organelas. Eles constituem os elementos estruturais mais importantes para a iniciação e o crescimento do axônio. Na formação do axônio ocorre um aumento em torno de 10 vezes na massa dos microtúbulos , evento que parece ser determinante na diferenciação axonal (Yu e Bass, 1994).

Outro importante papel para os microtúbulos neuronais é o transporte axonal. Esse processo tem por finalidade transportar macromoléculas, organelas e outros elementos a partir do corpo celular até o terminal sináptico, onde serão utilizados. Duas famílias de motores moleculares encontrados no Sistema Nervoso

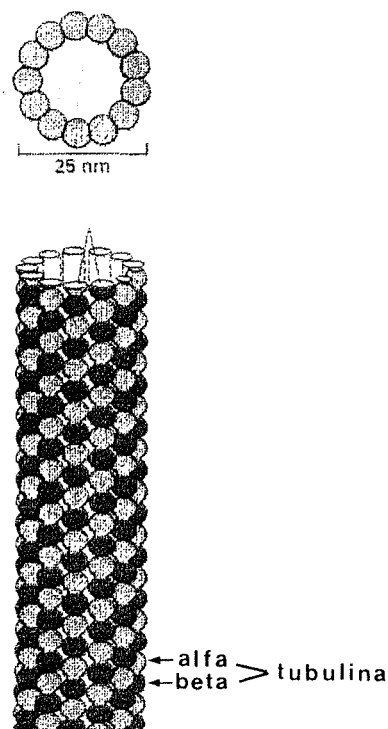


Figura 1-A) Representação esquemática das treze moléculas de tubulina formando treze protofilamentos em um corte transversal B) Vista lateral de um pequeno corte de um microtúbulo, com as moléculas de tubulina alinhadas formando o protofilamento. Cada um dos treze protofilamentos é composto de séries de moléculas de tubulina, um heterodímero formado por α e β tubulina (Alberts et al, 1994).

Central (cinesina e dineína) mediam o transporte axonal rápido de organelas através de sua interação simultânea com microtúbulos e com organelas a serem deslocadas, tanto em movimento anterógrado (do corpo celular em direção a sinapse), quanto em movimento retrógrado (da sinapse em direção ao corpo celular). Além disso, os microtúbulos estão envolvidos no transporte axonal lento de outros elementos do citoesqueleto bem como de substâncias solúveis do citoplasma (Brady, 1991) (figura 2).

Os filamentos intermediários dos neurônios, chamados neurofilamentos, são constituídos por um triplete de subunidades protéicas conhecidas como NF-H (200 KDa), NF-M (150 KDa) e NF-L (68 KDa). Embora as três subunidades possuam uma região central alfa-helicoidal altamente conservada e poucas variações no domínio amino-terminal, as duas subunidades de mais alto peso molecular, NF-H e NF-M, distinguem-se da NF-L e das demais subunidades de outros filamentos intermediários pelo excepcional tamanho de seu domínio carboxi-terminal (Nixon et al, 1994).

A estrutura dos neurofilamentos foi determinada através de microscopia eletrônica e técnicas imunológicas utilizando anticorpos monoclonais contra cada subunidade dos neurofilamentos. Tais estudos indicaram que o NF-L forma um filamento central, enquanto que o NF-M dispõe-se helicoidalmente ao redor deste filamento central e o NF-H apresenta braços laterais constituídos pela cauda carboxi-terminal, localizada periféricamente ao longo do eixo central do filamento. Estas projeções laterais mantêm um espaço mínimo entre os filamentos individuais e participam da conexão entre filamentos adjacentes (Tokutake, 1990) (figura 3).

Os neurofilamentos desempenham um importante papel na manutenção da forma neuronal e do calibre axonal (Greenwood et al, 1993), além de participarem do transporte axonal.

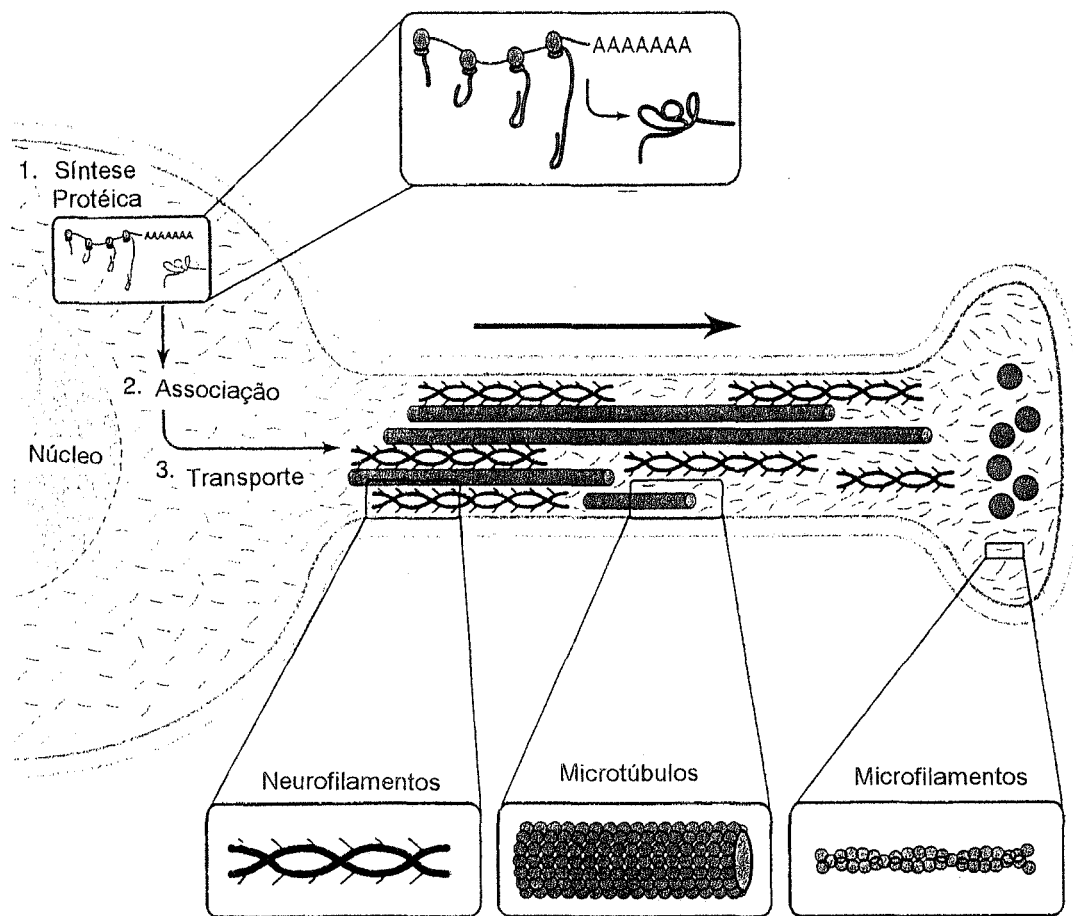


Figura 2 - Ilustração esquemática da organização longitudinal dos elementos do citoesqueleto no axônio. Os polipeptídeos do citoesqueleto são traduzidos nos polissomos citoplasmáticos e então associam-se em polímeros antes de serem transportados para o axônio. Dentro do axônio os neurofilamentos e os microtúbulos dispõem-se longitudinalmente interagindo entre si através de proteínas associadas, conferindo suporte mecânico ao axônio e participando do transporte axonal. Os microfilamentos constituem o citoesqueleto da sinapse (Hammerschlag et al, 1994).

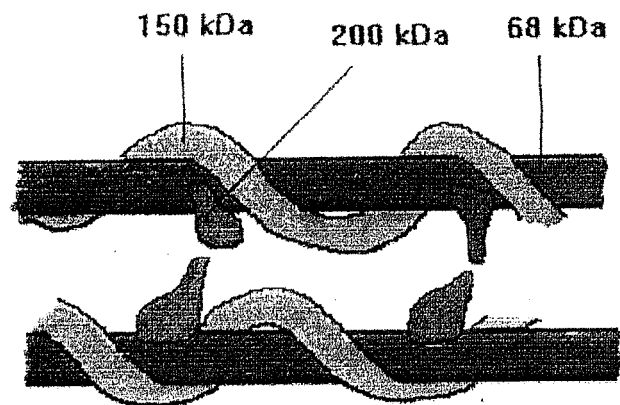


Figura 3 - Esquema da organização dos componentes do triplete proteico dos neurofilamentos (Tokutake, 1990), onde aparece a disposição periférica das subunidades de 150 e 200 kDa. Observa-se também a interação entre dois neurofilamentos através da subunidade de 200 kDa.

O perfil de expressão dos neurofilamentos sugere que os mesmos contribuem para a plasticidade do citoesqueleto neuronal e auxiliam na determinação da estabilidade da morfologia neuronal, pois, enquanto baixos níveis de NF-L e NF-M são expressos durante o desenvolvimento embrionário (Carden et al, 1987), uma expressão coordenada de altos níveis das três subunidades ocorre no período pós-natal, coincidindo com o crescimento e mielização axonal (Schlaepfer and Bruce, 1990).

Os neurofilamentos constiuem os elementos mais abundantes do citoesqueleto axonal. Eles se dispõem longitudinalmente ao longo do axônio, regularmente espaçados devido a presença das projeções laterias. Os microtúbulos alinham-se também de modo longitudinal, formando pequenos grupamentos compactos inseridos na massa de neurofilamentos axonais. Todos os elementos do citoesqueleto interagem entre si e com organelas membranosas que são transportadas ao longo do axônio (figura 2).

Em astrócitos, os filamentos intermediários são constituídos pela proteína glial fibrilar ácida (GFAP). A GFAP possui massa molecular de 50 kDa e forma filamentos de 10 nm no citoplasma de astrócitos, arranjados em feixes compactos. Os filamentos gliais distinguem-se dos neurofilamentos pelo arranjo extremamente compacto e pela ausência de projeções laterais (Hammerschlag et al, 1994).

A terceira principal classe de elementos do citoesqueleto é a dos microfilamentos. Os microfilamentos são constituídos de subunidades de G-actina que se unem formando duas hélices entrelaçadas como um cordão (figura 4). Essas estruturas são encontrados tanto em neurônios quanto nas células gliais, mas encontram-se particularmente concentrados nos terminais pré-sinápticos, espinhos dendríticos e cones de crescimento (Hammerschlag et al, 1994). Os cones de crescimento das células neuronais em desenvolvimento possuem feixes longitudinais de actina ancorados à membrana, capazes de responder a

actina



Figura 4 - Representação esquemática do arranjo das moléculas de actina nos microfilamentos (Alberts et al, 1994). As moléculas de actina globular (actina G) associam-se formando os segmentos que se enrolam sobre si mesmos como um cordão formando os filamentos de actina (actina F).

informações do meio extracelular através de ciclos de polimerização/despolimerização orientando o neurito crescente em direção a célula alvo (Hammerschlag et al, 1994).

Outra importante função dos microfilamentos em neurônios é o ancoramento de vesículas sinápticas à rede citoesquelética do terminal pré-sináptico. Isto ocorre através da ligação da F-actina com a fosfoproteína sinapsina, a qual encontra-se associada com a superfície de pequenas vesículas sinápticas (Haas e DeGennaro, 1988) e são exclusivamente expressas em terminais pré-sinápticos de neurônios.

As sinapsinas constituem uma família de quatro fosfoproteínas associadas a vesículas sinápticas. As sinapsinas 1a e 1b (chamadas coletivamente de sinapsina 1) possuem peso molecular de 86 e 80 kDa, enquanto que as sinapsinas 2a e 2b possuem pesos moleculares de 74 e 55 kDa respectivamente.

I - 2 A FOSFORILAÇÃO

A fosforilação e defosforilação de proteínas são amplamente reconhecidas como importantes mecanismos para regulação da função celular por uma variedade de estímulos fisiológicos (Kurosawa, 1994).

Muitos processos bioquímicos no cérebro são regulados pela fosforilação/defosforilação. Estes incluem a excitabilidade neuronal, transdução de sinais mediados por receptor, biossíntese e liberação de neurotransmissores, regulação do metabolismo intermediário e regulação do crescimento, diferenciação e morfologia neuronal (Walaas e Greengard, 1991) .

Em especial, a fosforilação de proteínas do Sistema Nervoso Central desempenha importantes funções na integração de sinais extracelulares. A célula neural recebe um estímulo externo representado por um primeiro mensageiro, como neurotransmissores, hormônios ou drogas. Os primeiros mensageiros liberam

informação para o compartimento intracelular através de segundos mensageiros, como o cálcio ou AMP cíclico. Estes segundos mensageiros, por sua vez, regulam os sistemas fosforilantes de proteínas específicas (O'Callaghan, 1994) (figura 5).

Existem três componentes essenciais para todos os sistemas de fosforilação: uma proteína quinase específica, que na presença de ATP e magnésio catalisa a reação de fosforilação; um substrato protéico que pode existir tanto na forma fosforilada ou defosforilada e uma proteína fosfatase que catalisa a remoção do grupo fosfato (O'Callaghan, 1994).

As quinases dependentes de segundo mensageiros como mediadores do estímulo externo são as mais abundantes no SNC. Estas quinases fosforilam preferencialmente resíduos de serina e/ou treonina na molécula do substrato. Existem, no entanto, quinases independentes de segundo mensageiro, que respondem diretamente ao sinal extracelular. Como exemplo temos a tirosina quinase, ligada a receptores de membrana, que em resposta a um estímulo extracelular fosforila resíduos de tirosina em substratos específicos (O'Callaghan, 1994).

As principais quinases dependentes de segundo mensageiro no SNC são : a quinase dependente de AMP cíclico (proteína quinase A ou PKA), a quinase ativada por GMP cíclico (proteína quinase G ou PKG), a proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaM quinase) e a quinase dependente de cálcio e fosfolipídios (proteína quinase C ou PKC).

Diversos estudos têm demonstrado a presença de atividades fosfatásicas em extratos de cérebro. Diferentes fosfatases que defosforilam resíduos de serina ou treonina têm sido descritas no cérebro e são classificadas em quatro grupos : PP1, PP2A, PP2B e PP2C, de acordo com sua especificidade pelo substrato, sensibilidade a inibidores específicos e dependência de íons. A PP1 e a PP2A são ativas na ausência de cátions divalentes. A PP2B, também chamada de calcineurina, necessita de cálcio para exercer sua atividade fisiológica, enquanto

que a PP2C é dependente de magnésio. Um importante avanço no estudo de fosfatases foi a descoberta do ácido ocadaico, uma toxina marinha que age como inibidor específico de fosfatases. Em relação às quatro principais fosfatases específicas para resíduos de serina e treonina, o ácido ocadaico tem maior afinidade pela PP1 e PP2A. A PP2B é inibida somente em concentrações bem mais altas do inibidor e a PP2C não é afetada pelo ácido ocadaico.

O SNC possui uma grande variedade de fosfoproteínas que são substratos para reações de fosforilação. Entre elas podemos citar: enzimas biossintéticas dos neurotransmissores (tirosina hidroxilase); proteínas do terminal nervoso tais como a sinapsina, a GAP-43 e a MARCKS; proteínas de receptores (receptor para acetilcolina, receptor para GABA entre outros) e proteínas do citoesqueleto (neurofilamentos, GFAP, tubulinas, MAP2, proteína tau e actina) (O'Callaghan, 1994).

A fosforilação de proteínas do citoesqueleto está relacionada com sua capacidade de polimerização e despolimerização, bem como de sua interação com outros elementos do citoesqueleto, regulando portanto a dinâmica de sua participação em diversos processos fisiológicos.

O efeito da polimerização sobre a estrutura e a função das subunidades dos filamentos intermediários não é bem definida. No entanto, foi demonstrado que a GFAP não polimeriza quando fosforilada pela proteína quinase C ou pela proteína quinase A e que os filamentos polimerizados tendem a despolimerizar depois da fosforilação (Harrison e Mobley, 1992).

O comportamento dos neurofilamentos também é regulado de uma maneira complexa através da fosforilação. O grau de fosforilação dos neurofilamentos pode alterar diretamente a sua associação ao citoesqueleto, sua degradação e transporte (Lahning et al, 1994). Cada subunidade dos neurofilamentos é fosforilada, mas o NF-M e o NF-H, são as subunidades proteicas dos neurofilamentos mais extensivamente fosforiladas no cérebro (Nixon et al, 1994).

SISTEMAS DE FOSFORILAÇÃO PROTÉICA : MEDIADORES BIOQUÍMICOS DE SINAIS

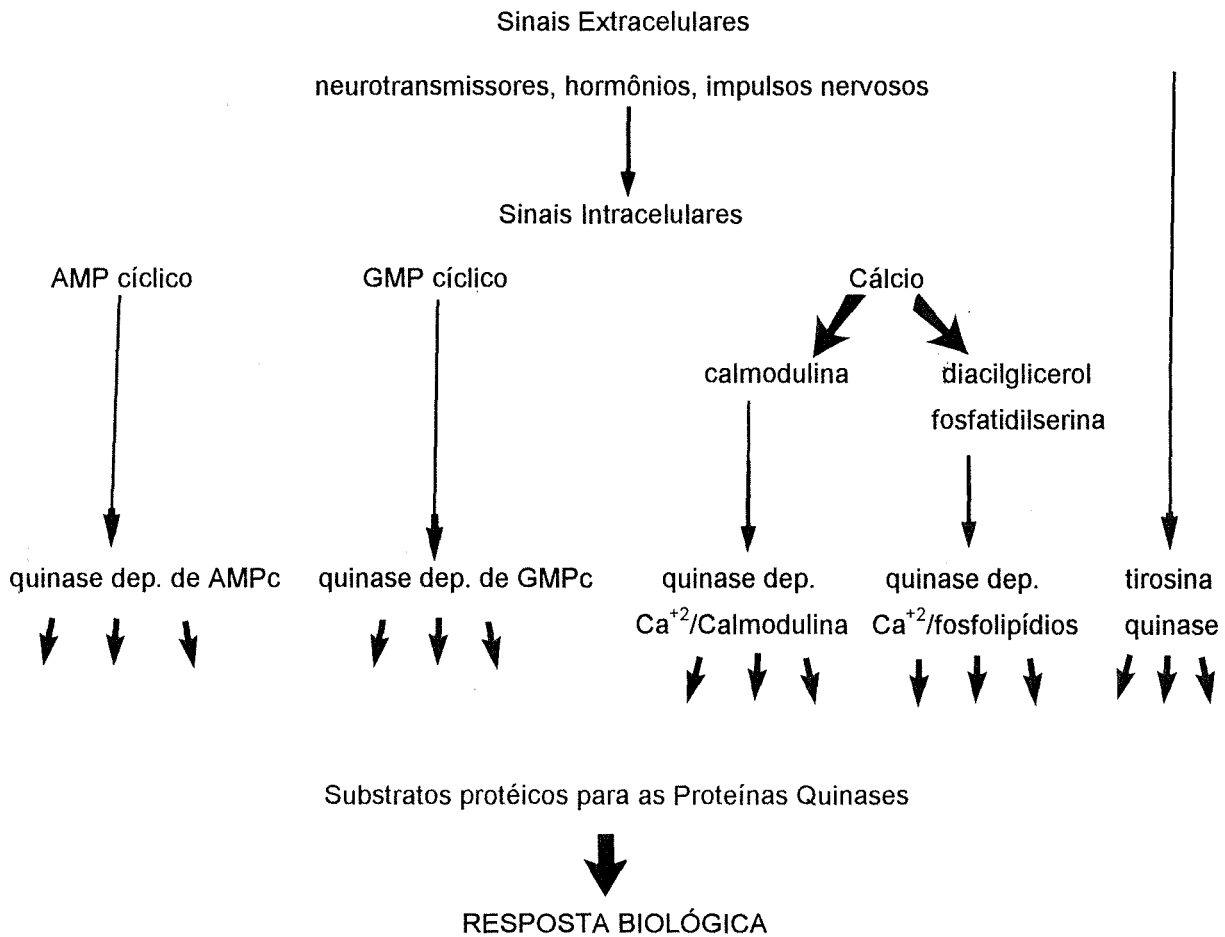


Figura 5 - Diagrama esquemático dos diferentes sistemas de fosforilação. Sinais extracelulares produzem efeitos biológicos através de segundos mensageiros específicos que regulam proteínas quinases as quais catalisam a fosforilação de substratos proteicos específicos. A resposta biológica pode resultar diretamente da proteína que é fosforilada ou pode requerer uma série de outros passos. Nem todas as quinases são ativadas através de segundos mensageiros (ex. tirosina quinase). As flechas múltiplas mostram que cada quinase pode catalisar a fosforilação de vários substratos. Adaptado de Nestler et al, 1989.

O domínio carboxi-terminal dos neurofilamentos contém múltiplas repetições da sequência Lis-Ser-Pro a qual aparece aproximadamente 10 vezes no NF-M e mais do que 50 vezes no NF-H. Estas sequências representam os sítios potenciais de fosforilação *in vivo* dos neurofilamentos. Em adição a estes sítios, as subunidades dos NF são também fosforiladas na região amino terminal (Soussan et al, 1994).

A fosforilação do domínio amino-terminal parece estar envolvida com a polimerização das subunidades, enquanto que a fosforilação da porção carbóxi-terminal regula a relativa interação dos NF com transportadores axonais e com estruturas estacionárias, controlando portanto, a velocidade de movimento e tempo de permanência dos NF no axônio (Nixon et al, 1994).

Estudos realizados por Pant (1988) indicaram que a defosforilação dos neurofilamentos por fosfatases no terminal nervoso acelera sua degradação proteolítica pela calpaína, sugerindo que uma das funções do elevado grau de fosforilação dos NF no axônio é aumentar sua resistência à digestão pela calpaína e portanto, prevenir sua prematura degradação.

Hisanaga e Hirokawa (1990) demonstraram que a defosforilação dos neurofilamentos altera sua afinidade pelos microtúbulos e que a subunidade dos neurofilamentos responsável na ligação aos microtúbulos é a NF-H, a mais altamente fosforilada.

A fosforilação das subunidades alfa e beta tubulina por diferentes proteínas quinases em resposta a segundo-mensageiros (a qual pode ser gerada pela ligação de hormônios, fatores neurotróficos, neurotransmissores, proteases e moléculas de adesão a receptores neuronais) está envolvida com a morfogênese e plasticidade da célula neural (Diaz-Nido et al, 1990). Além disso, foi demonstrado que a fosforilação das proteínas constituintes dos microtúbulos, principalmente MAP-1 e tubulina resulta na promoção da associação e estabilização dos microtúbulos nos processos neuronais (Serrano et al, 1989).

A propriedade de ancoramento de vesículas sinápticas é regulada pelo estado de fosforilação da sinapsina (Yagamata et al, 1995). Quando esta proteína é fosforilada diminui a sua interação com a membrana da vesícula e com os filamentos de F-actina. Simultaneamente ocorre a despolimerização da rede citoesquelética de F-actina, permitindo a migração das vesículas e fusão com a membrana pré-sináptica, liberando o neurotransmissor na fenda sináptica (Hammerschlag et al, 1994).

A fosforilação de muitos tipos de proteínas está envolvida no desenvolvimento ou regulação de diversos processos no sistema nervoso.

O aprendizado e a memória podem ser estabelecidos através do acúmulo de muitos tipos de eventos de fosforilação. A memória a curto prazo pode envolver a fosforilação de proteínas pré e pós-sinápticas, a qual resultaria numa facilitação transitória ou numa inibição da transmissão sináptica. A memória de longo prazo pode envolver a fosforilação de proteínas que participam da regulação da expressão gênica, tendo como consequência modificações mais permanentes na transmissão sináptica. Por exemplo, a Potenciação de Longa Duração (LTP) um dos modelos eletrofisiológicos de memória mais estudados, parece ser iniciado por variações na fosforilação dependente de cálcio de certas proteínas e mantida por modificações posteriores na expressão gênica (Hammerschlag et al, 1994).

I- 3 A M E M Ó R I A

Aprendizado pode ser definido como a aquisição de uma modificação adaptativa de um organismo em resposta a um estímulo ambiental. A memória seria o armazenamento e evocação apropriada de um comportamento novo aprendido, portanto, aprendizado e memória estão intimamente relacionados.

Estudos cognitivo-fisiológicos têm demonstrado que o aprendizado consiste em pelo menos dois processos mentais distintos: aprendizado sobre pessoas,

lugares e coisas (forma explícita ou declarativa), e aprendizado motor de estratégias perceptuais (forma implícita ou forma de procedimento). (Huang et al, 1994).

Hebb propôs, em 1949, que memórias são estocadas no cérebro de mamíferos como conexões sinápticas fortalecidas entre neurônios ativos durante o aprendizado. Nos anos seguintes a esta publicação um crescente corpo de evidências tem demonstrado que memórias são representadas como mudanças duradouras em circuitos funcionais cerebrais e que os contatos sinápticos entre neurônios são os substratos para o "traço de memória" (Maren & Baudry, 1995).

Desde sua descoberta, a potenciação de longa duração (LTP) das sinapses excitatórias tornou-se um modelo experimental para examinar o mecanismo sináptico do aprendizado, possuindo várias propriedades que confirmam as previsões teóricas, originalmente feitas por Hebb (Malenka, 1995).

A LTP ocorre principal ou exclusivamente em sinapses glutamatérgicas (Bliss e Collingridge, 1993). Há três tipos principais de receptores ao glutamato: dois ionotrópicos, NMDA (também sensível ao N-metil D-aspartato) e AMPA/kainato (também sensível ao ácido amino-hidroximetil propiônico e/ou ao ácido kaínico, e os receptores metabotrópicos (Bliss e Collingridge, 1993; Izquierdo e Medina, 1995).

A LTP possui muitas características comuns ao aprendizado e à memória tais como a rápida indução (aquisição), grande labilidade no período recente após a indução (consolidação), especificidade ao estímulo, manutenção por longos períodos na ausência de nova estimulação e fácil expressão em resposta ao estímulo original (Bliss e Collingridge, 1993).

Assim como a LTP, as memórias de longa duração são inicialmente lábeis e após poucos minutos tornam-se estáveis por longos períodos de tempo. A fase de indução da LTP é mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Em estudos realizados por Izquierdo (1992), comprovou-se que a participação dos receptores NMDA na memória, uma vez que a infusão pré ou pós-treino no

hipocampo e na amígdala do antagonista do receptor glutamatérgico do tipo NMDA, o amino-fosfonopropionato (AP5) teve efeito amnésico em ratos. O agonista, glutamato, tem efeito exatamente oposto ao do AP5. Sua infusão na amígdala ou hipocampo imediatamente pós-treino causa facilitação retrógrada na tarefa esquivada inibitória, enquanto que a infusão apenas no hipocampo, mas não na amígdala, causa facilitação retrógrada na habituação.

Além disso, foi verificado que a fase inicial da memória, como a da LTP, é também regulada por receptores glutamatérgicos metabotrópicos, uma vez que a infusão intra-hipocampal do agonista para estes receptores, o ACPD (dicarboxilato de 1S, 2 R-aminociclopentano), imediatamente pós-treino foi facilitador da memória. Já a infusão intra-hipocampal do antagonista do receptor metabotrópico, o MCPG ([RS]-alfa metil-delta-carbóxicifenilglicina) apresentou efeito amnésico na tarefa de esquivada inibitória. A infusão das drogas 180 minutos pós-treino não apresentou efeito sobre a memória indicando que somente a fase inicial da memória é regulada por receptores glutamatérgicos metabotrópicos no hipocampo (Bianchin et al, 1994). Como aconteceu com a memória, a administração de ACPD no hipocampo facilita e de MCPG bloqueia o desenvolvimento da LTP (Bortolotto and Collingridge, 1993).

A importância do receptor glutamatérgico do tipo AMPA também foi estudada (Jerusalinsky et al, 1992) através da infusão intra-hipocampal do antagonista CNQX (cianonitro -quinoxalinodiona). Quando administrado tardiamente (90-180 min) pós-treino o CNQX apresentou efeito amnésico na expressão da memória (Izquierdo, 1993).

Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA representam uma importante maneira de integrar informações pré-sinápticas (liberação de glutamato) com informações pós-sinápticas (potencial de membrana, níveis de 2^{os} mensageiros, conformação do citoesqueleto). Sua ativação resulta em um influxo de cálcio nas estruturas pós-sinápticas, o qual desencadeia uma série de cascatas enzimáticas que levam à modificação da eficácia sináptica (Maren e Baudry, 1995). Este influxo

de cálcio é considerado suficiente para causar alteração em elementos citoesqueléticos no terminal pós-sináptico alterando sua forma (Petit, 1988). Além do aumento da concentração do cálcio intracelular, o aumento de outros 2^{os} mensageiros é capaz de ativar proteínas quinases. Há evidências para a participação de quinases na LTP, uma vez que foi demonstrado que a mesma é bloqueada ou abortada pelos inibidores seletivos da quinase dependente de cálcio e calmodulina (Ito et al, 1991), de PKC (Colley e Routtenberg, 1993) e tirosina quinase (O'Dell et al, 1991).

Assim como na LTP, os inibidores de proteínas quinases também têm efeito sobre a memória. A infusão intra-hipocampal ou intra-amígdala de KN62 (1-CN.O-bis(5-isoquinolinosulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenil piperazina), um inibidor específico da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, imediatamente pós-treino, causou amnésia retrógrada completa. Quando administrado 30 minutos após o treino no hipocampo, o efeito amnésico foi um pouco menor. Estes resultados indicam que a atividade da quinase dependente de cálcio e calmodulina no hipocampo e na amígdala é necessária para o estabelecimento da memória na tarefa de esquiva inibitória (Wolfman et al, 1994).

Além disso, Jerusalinsky e colaboradores (1994) realizaram estudos investigando o efeito sobre a memória de dois inibidores da proteína quinase C, a staurosporina e o CGP41231. As drogas foram injetadas bilateralmente na região CA1 do hipocampo nos tempos de 0, 30, 120 ou 180 minutos após o treino na tarefa de esquiva inibitória. Os resultados mostraram que a administração das drogas nos tempos de 0 e 30 minutos pós-treino causou amnésia retrógrada completa, enquanto que, quando administradas no tempo de 120 minutos o efeito amnésico das drogas foi parcial. Já administração a 180 minutos pós-treino não apresentou efeito. Estes dados sugerem que a atividade da PKC nas primeiras 2 horas após a aquisição é necessária para o estabelecimento da memória na tarefa de esquiva inibitória.

Sabe-se que as reações de fosforilação mediadas por estas proteínas quinases podem modificar canais iônicos, receptores de neurotransmissores ou proteínas sinápticas envolvidas na regulação da liberação de neurotransmissores, as quais são candidatas para regular a eficácia sináptica, pelo menos em um período de curta duração (Maren e Baudry, 1995). A fosforilação de fatores de transcrição pode permitir a regulação genômica da expressão de proteínas específicas (Morgan e Curran, 1991).

II-OBJETIVOS

Identificar as fosfoproteínas constituintes da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 obtida de hipocampo de ratos adultos e fosforilada *in vitro* através de seu sistema fosforilante endógeno.

Identificar as atividades quinásicas e fosfatásicas endógenas, responsáveis pela fosforilação/defosforilação das proteínas da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100.

Verificar o efeito das tarefas comportamentais de habituação e esquiva inibitória sobre o sistema fosforilante endógeno da fração citoesquelética.

III-MATERIAL E MÉTODOS

III.1-ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar com idade de 60 dias, de ambos os sexos. Os animais recebiam ração comercial (Germania) e água "ad libitum" e eram mantidos em ambiente climatizado (25 °C) com ciclos consecutivos de 12 horas claro e 12 horas escuro.

III.2-TAREFAS COMPORTAMENTAIS

III.2.a-Esquiva Inibitória

Nesta tarefa utilizou-se uma caixa de condicionamento automática (Albarsch) de acrílico medindo 50x25x25 cm com uma face frontal de vidro. O assoalho era constituído de barras de bronze paralelas com 1 mm de diâmetro. A caixa possuía, no extremo esquerdo, uma plataforma de fórmica medindo 8 cm de largura e 5 cm de altura. Os ratos eram gentilmente colocados sobre a plataforma e, ao descerem, colocando as quatro patas sobre as barras recebiam um choque de 0,5 mA e eram então, imediatamente retirados da caixa (Wolfman et al., 1991).

III.2.b-Habituação

Os ratos eram gentilmente colocados na plataforma da mesma caixa utilizada para a tarefa de esquiva inibitória. Após um minuto de livre exploração, os ratos eram retirados da caixa (Wolfman et al., 1991).

III.2.c-Choque

Os ratos eram colocados diretamente sobre as barras de bronze da caixa descrita nas tarefas anteriores e recebiam o choque de 0,5 mA. Logo após, eram retirados da caixa. Este procedimento foi utilizado como controle para a tarefa de esquiva inibitória. Os animais eram sacrificados uma hora após terem sido submetidos a estas tarefas comportamentais.

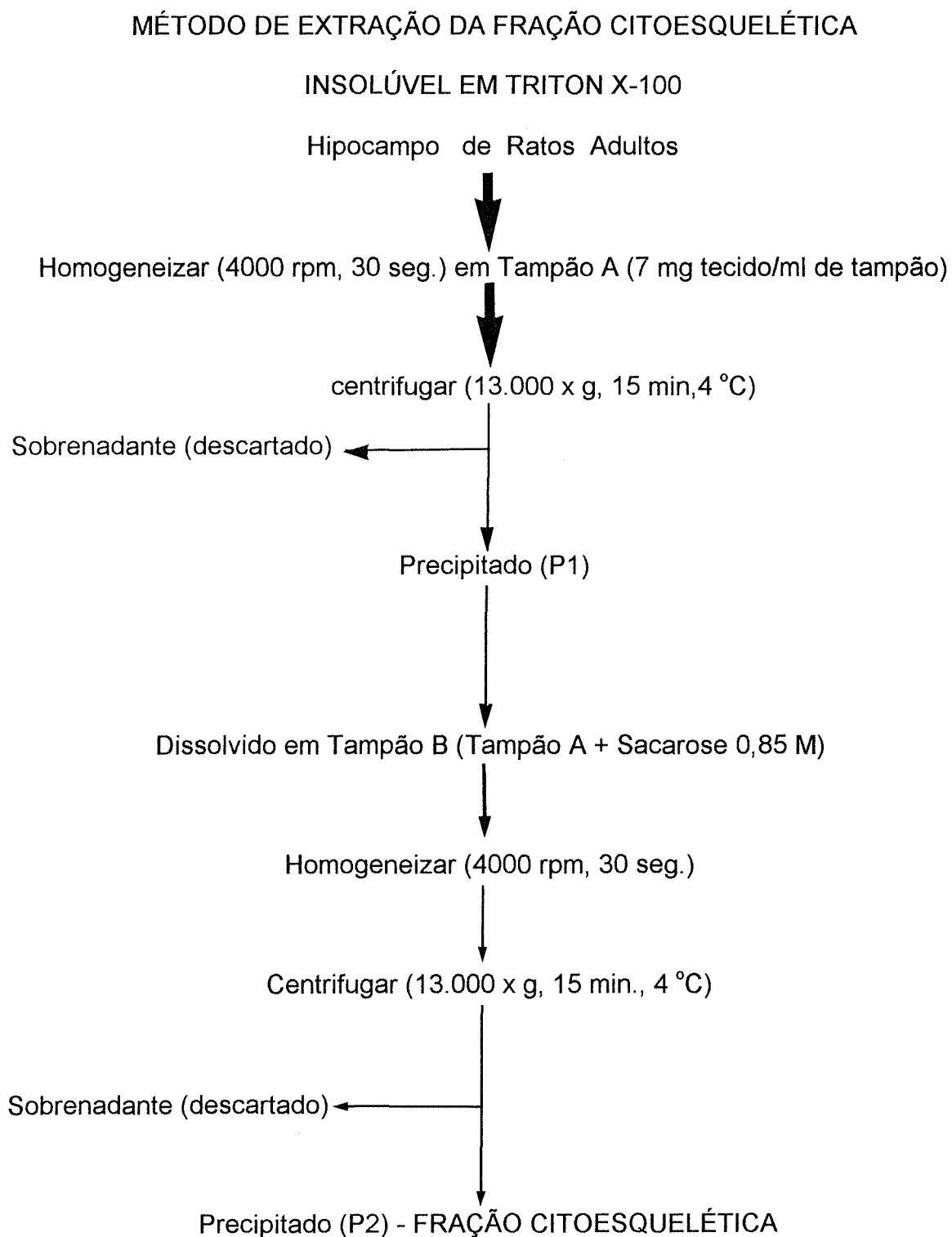
III.3- OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100

Para obtenção da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 utilizou-se a técnica descrita por de Mattos et al (1994), conforme o esquema da figura 6. Após o sacrifício dos ratos, o hipocampo era rapidamente removido e homogeneizado em tampão A contendo Tris-HCl 50mM pH 6,8, EGTA 5mM, Triton X-100 1%, e ainda os seguintes inibidores de proteases: PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) (SIGMA) 1 mM, leupeptina 1 μ M, antipaína 0,7 μ M, pepstatina 0,7 μ M e quimostatina (SIGMA) 0,7 pM. A homogeneização foi realizada em homogeneizador Potter Elvehjem e êmbolo de teflon a uma velocidade de aproximadamente 4000 rpm por 30 segundos. O homogenato foi centrifugado a 13.000 x g por 15 minutos a 4 °C em uma centrífuga Sorvall RC 5B rotor SS34. A fração insolúvel foi dissolvida em tampão B (tampão A contendo sacarose 0,85 M) e novamente centrifugada nas mesmas condições. O precipitado obtido continha as proteínas do citoesqueleto que são insolúveis em Triton X-100. Este precipitado foi dissolvido em tampão MES (ácido 2[N-morfolino] etanosulfônico) (SIGMA) 50 mM pH 6,5, MgCl₂ 10 mM (de Mattos et al, 1994).

III.4-DOSAGEM DE PROTEÍNA

A proteína da fração citoesquelética foi dosada pelo método de Bradford (1977) utilizando o corante Coomassie Blue G250 (Riedel). Como padrão de proteína foi utilizada albumina bovina (SIGMA) 1 mg/ml em água e as leituras foram determinadas em 620 nm.

Figura 6



III.5-INCORPORAÇÃO DE ^{32}P *IN VITRO* NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

Uma alíquota contendo 10 μg de proteína foi retirada da fração citoesquelética obtida como descrito na seção III.3, com a qual foi preparado o sistema de incubação com ^{32}P . Este sistema, continha ainda, MES 50 mM, pH 6,5, ATP 25 μM , MgCl_2 10 mM em um volume final de 60 μl . A reação foi iniciada com a adição de 2 μCi [^{32}P]ATP (5 μM ^{32}P -ATP) ($5,5 \times 10^{-10}$ Bq nmol) (ICN Radiochemicals, Irvine, CA) a cada sistema de incubação na proporção de 2 μCi /10 μg de proteína. O sistema foi incubado a 30 °C durante 5 minutos. Após este período a reação foi interrompida pela adição de tampão de amostra concentrado (glicerol, 2-mercaptoetanol, SDS 10% na proporção de 2:1:3 e 20 μl de NaOH) 20% (v/v) (Laemmli,1970) seguida de fervura em banho maria por 3 minutos.

III.6-ENSAIOS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES QUINÁSICAS DEPENDENTES DE 2º MENSAGEIRO ASSOCIADAS À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

III.6.a-Ensaio para identificação da proteína quinase dependente de Cálcio e Calmodulina (CaM quinase)

Para testar a atividade endógena da proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina foram adicionados ao sistema de incubação basal descrito na seção III.5 os ativadores: calmodulina (SIGMA) 1 μM e CaCl_2 1 mM. Os resultados obtidos foram comparados com os do sistema de fosforilação basal descrito na seção III.5 não contendo os ativadores.

III.6.b-Ensaio para identificação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA)

Para testar a atividade endógena da quinase dependente de AMP cíclico na fração citoesquelética foi adicionado ao sistema de incubação basal o ativador AMP cíclico (SIGMA) 20 μ M. EGTA 2 mM foi adicionado a este sistema com o objetivo de quelar o cálcio endógeno, inativando assim, as quinases dependentes de cálcio (proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina e proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídios).

III.6.c-Ensaio para identificação da proteína quinase dependente de Cálcio e Fosfolipídios (PKC)

Para testar a atividade endógena da proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídios associada à fração citoesquelética foram adicionados ao sistema basal os seguintes ativadores exógenos: 12,13-dibutirato de forbol (PDBU) (SIGMA) 0,5 μ M, fosfatidilserina (SIGMA) 0,2 mM e CaCl_2 1 mM.

Aos ensaios para identificação da proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina e proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídios foi adicionado o inibidor de calpaína (SIGMA) 1 μ M uma vez que a atividade proteolítica da calpaína associada à fração citoesquelética é ativada na presença de cálcio. Todos os ensaios realizados para identificação das atividades quinásicas dependentes de 2^o mensageiro associadas à fração citoesquelética foram realizados como descrito por de Freitas et al, 1995b.

III.7-ENSAIOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FOSFATASES ASSOCIADAS À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

No sentido de verificar a presença de atividades fosfatásicas associadas à fração citoesquelética foi utilizado o ácido ocadaico, um inibidor específico de fosfatases do tipo serina/treonina.

Foi preparada uma solução mãe de ácido ocadaico (SIGMA) 50 μM em DMSO 10 %, a qual foi adicionada aos sistemas de incubação de maneira a produzir uma curva com as seguintes concentrações finais: 0,05 μM , 0,5 μM e 5 μM .

Na concentração de 0,05 μM o ácido ocadaico é capaz de inibir seletivamente a fosfatase do tipo 2A (PP2A). Para a inibição da fosfatase do tipo 1 (PP1), utilizou-se a concentração final de 0,5 μM de ácido ocadaico no sistema de incubação. E, finalmente, na concentração de 5 μM de ácido ocadaico é inibida seletivamente a fosfatase do tipo 2B (PP2B) (de Freitas et al, 1995b).

III.8- CURVA DE TEMPO DE FOSFORILAÇÃO

Amostras obtidas de hipocampos de animais submetidos a esquia inibitória, habituação e choque foram incubadas com ^{32}P -ATP como descrito na seção III.5. As reações de fosforilação foram interrompidas pela adição de tampão de amostra concentrado após diferentes tempos de incubação, os quais foram de 5, 10, 20 e 30 minutos.

III.9-ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras, submetidas a incorporação *in vitro* de ^{32}P como descrito na seção III.5, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % em

placas com dimensões de 17x17x1 cm (Laemmli, 1970). A corrente elétrica foi gerada por uma fonte de marca Shandon Southern com corrente inicial de 60 V e 12 mA por placa, passando a 100 V e 50 mA após 90 minutos do início da migração. A duração média de cada corrida foi de sete horas, sendo a migração acompanhada com o corante azul de bromofenol a 2 % em água.

Ao término da migração o gel era embebido em solução de secagem (metanol 50 % e glicerol 1 %) durante uma hora. Em seguida o gel era colocado entre duas folhas de papel celofane previamente banhadas na mesma solução e o conjunto firmemente adaptado a uma placa de vidro. A secagem ocorreu com auxílio de uma lâmpada de raios infra-vermelhos (INFRAPHIL) disposta a 40 cm da placa durante duas horas.

III.10-AUTO-RADIOGRAFIA E MEDIDA DA RADIOATIVIDADE INCORPORADA ÀS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

Os géis secos, foram expostos a filmes de auto-radiografia (KODAK X-Omat K) e colocados em freezer à uma temperatura de -70°C , durante duas horas e trinta minutos. Feito este procedimento o filme foi revelado e então sobreposto ao gel de maneira a possibilitar a visualização das bandas correspondentes às proteínas que apresentaram incorporação de ^{32}P . As bandas do gel foram cortadas e dissolvidas por incubação em 0,5 ml de H_2O_2 (Merck) 30 % a 60°C durante a noite (Garner,1988). Três mililitros de líquido de cintilação (tolueno 5,06 M, etanol 2,05 M, PPO ([2,5-difeniloxazol]benzeno) 12,4 mM, POPOP (1,4-bis[5-fenil-2-oxazol]benzeno) 0,6 mM e Triton X-100 34,5 %) foram adicionados e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida Wallac 1409.

III.11-IMUNODETECÇÃO

Este método foi utilizado para caracterização das subunidades dos neurofilamentos presentes na fração citoesquelética obtida pelo processo de extração descrito na seção III.3. Esta fração foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como descrito na seção III.9. A eletrotransferência do gel para a nitrocelulose foi realizada utilizando-se um sistema "semidry electroblotting" como descrito por Svoboda et al, 1985 utilizando tampão Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 1,3 mM, metanol 20 % v/v (Bjerrum e Schafer-Nielsen,1986) com uma densidade de corrente de 1,2 mA/cm², durante 60 minutos. Após este processo a nitrocelulose foi lavada com um tampão TBS (NaCl 0,5 M, Tris 20 mM pH 7,5) por 10 minutos, em seguida foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos da nitrocelulose através de incubação com o tampão TBS contendo leite em pó desnatado a 5 % (solução bloqueadora), por duas horas à temperatura ambiente. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens de cinco minutos com tampão TBS contendo Tween 20 (SIGMA) 0,05 % (T-TBS). Em seguida, a nitrocelulose foi incubada durante a noite à temperatura ambiente com anticorpos monoclonais anti-NF-H (N-5389, clone NE 14), anti-NF-M (N5264, clone NN18) e anti-NF-L (N5139, clone NR4) (SIGMA) obtidos de camundongo diluídos 1:100 em solução bloqueadora. Após, realizaram-se mais duas lavagens com T-TBS. Em seguida, foi realizada a reação com o conjugado anti-IgG obtido de rato, marcado com peroxidase (SIGMA), diluído 1:4000 em solução bloqueadora por duas horas à temperatura ambiente. Após, foram realizadas duas lavagens de cinco minutos com T-TBS. A nitrocelulose foi revelada com 4-

cloro-1-naftol (INLAB) na concentração de 0,6 mg/ml em TBS contendo 0,01 % (v/v) de H₂O₂ 30 %, segundo Hawkes et al, 1992.

III.12-ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

III.12.a-Preparação da Amostra

Para a realização da eletroforese bidimensional a amostra foi incubada com ³²P-ATP como descrito na seção III.5 e a reação foi interrompida com TCA (Ácido tricloroacético) 10 %. As amostras foram deixadas em gelo durante 30 minutos e logo após foram lavadas com álcool e dissolvidas em uma parte de solução A (uréia 9,5 M, lisina 12,5 mM, SDS 1 %, 2-mercaptoetanol 2 % e azul de bromofenol 0,005 %) e cinco partes de solução B (composição similar a solução A, exceto pela substituição do SDS pelo Nonidet P-40 5 %).

III.12.b-Focalização Isoelétrica (IEF) não equilibrada - I Dimensão

A amostra era aplicada sobre um gel cilíndrico de poliacrilamida com 1,0 mm de diâmetro e comprimento de 11,5 cm contendo acrilamida/bis-acrilamida (29/1) 3,5 %, uréia 9,5 M, anfólinas 2-4, 3,5-10 e 5-7 com concentração de 0,5 %, 4,0 % e 0,5 % respectivamente; Nonidet P-40 4,0 %.

O volume de amostra aplicado foi de 15 µl. Sobre a amostra eram colocados 20 a 25 µl de uma solução de uréia 8 M contendo citocromo C (aproximadamente 8 g%), usado como marcador da frente da focalização isoeletrica não equilibrada.

NaOH 20 mM foi utilizado como católito e H₃PO₄ 10 mM como anólito.

Após a corrida, os géis eram congelados (-20 °C) até a transferência para a segunda dimensão.

III.12.c-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)- II Dimensão

O gel da IEF era descongelado e expulso do tubo cilíndrico, com auxílio de uma seringa, para um tampão de equilíbrio contendo: Tris-Glicina 25 e 190 mM respectivamente, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 0,1 % e azul de bromofenol 0,005 %. Após ter sido equilibrado, o gel de IEF era transferido para o gel da segunda dimensão, colocando-se a extremidade ácida do gel no centro da placa e a extremidade básica do gel na lateral da placa. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada como descrito na seção III.9.

III.13- PURIFICAÇÃO DA TUBULINA

Tubulina purificada, foi obtida a partir de córtex cerebral de ratos através dos ciclos de polimerização/despolimerização como descrito por Shelansky et al, 1973, com algumas modificações (figura 7). A tubulina purificada foi utilizada como padrão .

O tecido foi homogeneizado por trinta segundos a 4000 rpm em tampão MEM (Mes 0,1 M, EGTA 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM) pH 6,75 contendo os seguintes inibidores de proteases: PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, antipaína 0,5 µg/ml, pepstatina 0,5 µg/ml e quimostatina 0,5 µg/ml. O homogeneizado foi centrifugado a 100.000 x g por uma hora a 4 °C (Centrífuga Beckman Optima TLX). O precipitado P1 foi desprezado e o sobrenadante S1 rico em tubulina foi submetido aos ciclos de polimerização/despolimerização.

I Ciclo de polimerização: o sobrenadante S1 foi misturado com igual volume de tampão MEM contendo glicerol 8 M e GTP (SIGMA) 1 mM. As amostras foram incubadas a 37 °C por trinta minutos e centrifugadas a 100.000 x g por uma hora

a 25 °C. O sobrenadante S2 obtido foi descartado e o precipitado P2 foi utilizado na etapa seguinte.

I Ciclo de despolimerização: o precipitado P2 foi suspenso com bastão de vidro em tampão MEM a frio e deixado em banho de gelo por trinta minutos com agitações ocasionais. As amostras foram então centrifugadas novamente a 100.000 x g por uma hora a 4 °C. O precipitado P3 foi descartado e o sobrenadante S3 foi utilizado como padrão.

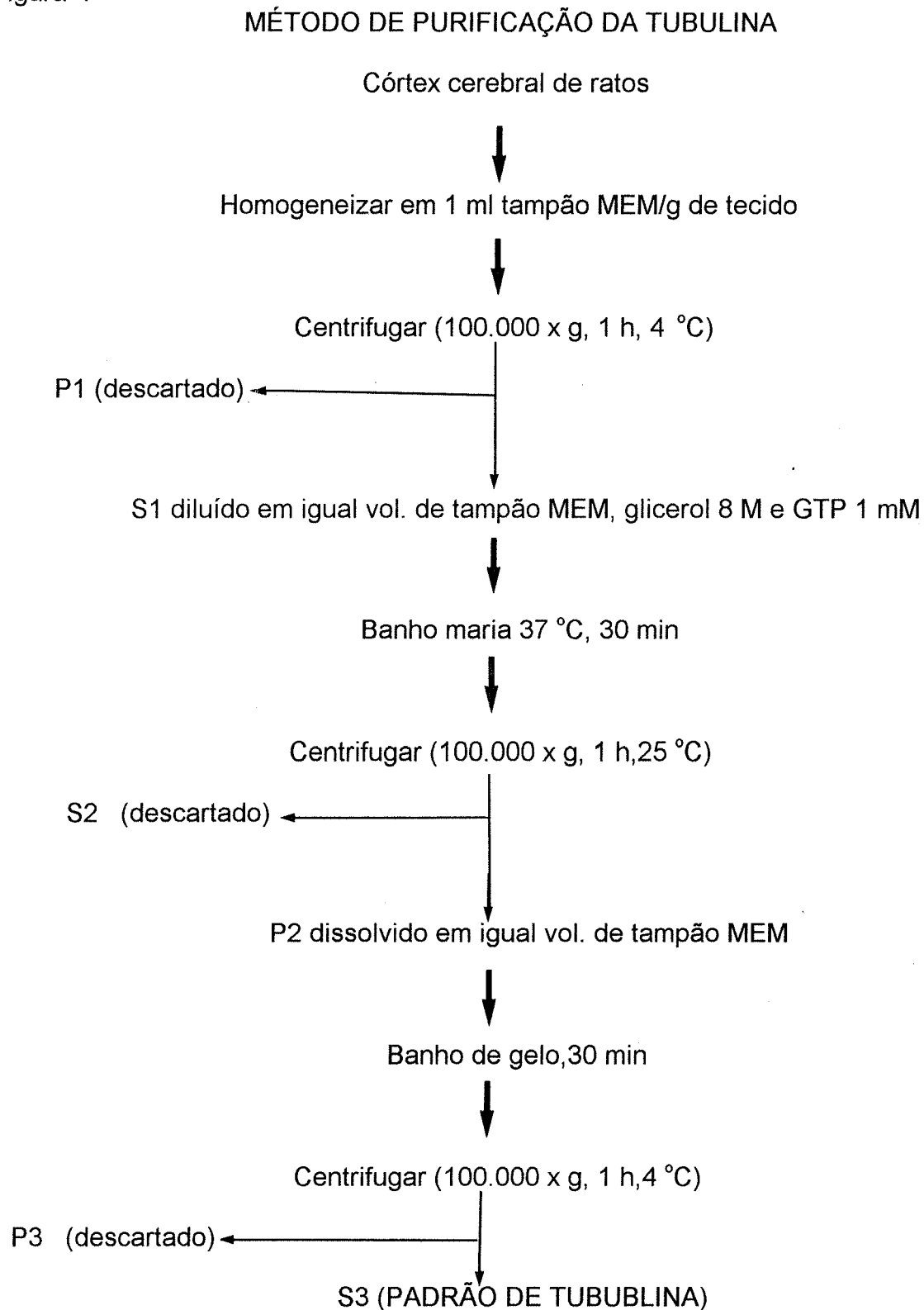
O conteúdo proteico da fração S3 foi dosado pelo método de Bradford como descrito na seção III.4.

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% como descrito na seção III.9. Como padrão de peso molecular foi utilizado o KIT MW-SDS-200/6H (SIGMA) com as seguintes proteínas : anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina bovina (66 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), galactosidase (116 kDa) e miosina (205 kDa). Ao término da migração, os géis foram corados durante uma hora com uma solução de Coomassie Blue R-250 (SIGMA) a 0,2 % em metanol 50 % e ácido acético 10 %. A descoloração foi realizada com sucessivas lavagens em etanol 50 % e ácido acético 10 %.

II-14-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo teste t de Student pareado e por análise de variância de uma via. Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$.

Figura 7



IV - RESULTADOS

IV.1 - IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

A extração da fração citoesquelética baseou-se no comportamento geral destas proteínas de serem insolúveis na presença de Triton X-100 1%. A figura 8A mostra o perfil da fração citoesquelética obtida como descrito em "Material e Métodos" na seção III-3, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e corada por Coomassie Blue. Esta fração apresenta um sistema fosforilante endógeno o qual, quando acrescido de ^{32}P -ATP exógeno, é capaz de fosforilar algumas proteínas *in vitro*. Na figura 8B pode ser vista uma autoradiografia representativa da fração citoesquelética fosforilada *in vitro* com ^{32}P -ATP como descrito em Material e Métodos na seção III-5, onde são indicadas as principais fosfoproteínas (150 kDa, 80 kDa, 68 kDa, 56 kDa e 50 kDa), as quais são bons substratos para o sistema fosforilante endógeno.

Através de uma eletroforese bidimensional em condições de não equilíbrio (Material e Métodos, seção III-12) da mesma fração citoesquelética fosforilada *in vitro* podemos identificar as principais fosfoproteínas constituintes da fração : NF-M (150 kDa), sinapsina 1 (80 kDa), NF-L (68 kDa), alfa tubulina (56 kDa) e GFAP (50 kDa), além de uma fosfoproteína não caracterizada aqui, altamente fosforilada, com peso molecular de aproximadamente 63 kDa (figura 9).

Além disso, a fração citoesquelética de hipocampo foi submetida à análise imunológica por "immunoblotting" como descrito em Materiais e Métodos, seção III-11. Foram utilizados anti-corpos monoclonais anti-NF-H, anti-NF-M, anti NF-L e anti GFAP. Na figura 10 podemos verificar que as três subunidades dos neurofilamentos e a GFAP foram detectadas imunologicamente na fração. Embora a proteína NF-H tenha sido detectada na fração citoesquelética não é fosforilada nas nossas condições experimentais, explicando o fato do não aparecimento desta proteína nas autoradiografias da fração submetida à fosforilação.

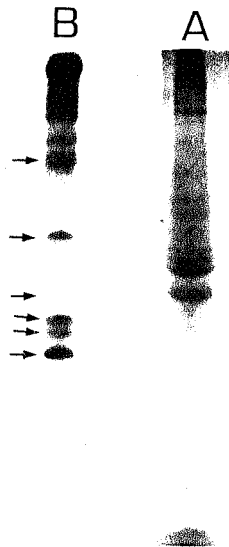


Figura 8 - A) Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 corado por Coomassie Blue. B) Autoradiografia de um gel da SDS-PAGE obtido a partir de uma fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100, incubada com ^{32}P -ATP ($2\mu\text{Ci}/10\ \mu\text{g}$ de proteína). À esquerda estão indicadas com as setas as principais fosfoproteínas desta fração, apresentando os seguintes pesos moleculares em ordem crescente : 50 kDa, 56 kDa, 63 kDa, 68 kDa, 80 kDa e 150 kDa.

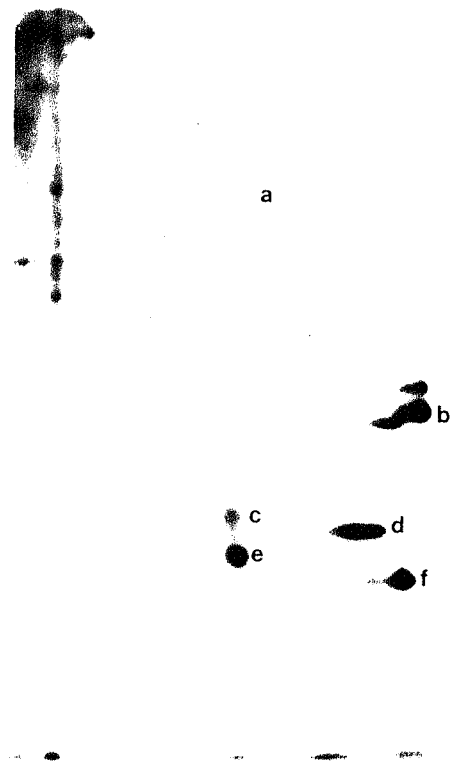


Figura 9 - Autoradiografia da eletroforese bidimensional em condições de não equilíbrio da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100, incubada com ^{32}P -ATP *in vitro*. As fosfoproteínas identificadas nesta fração estão indicadas. São elas: (a) NF-M (150 kDa), (b) sinapsina 1 (80 kDa), (c) NF-L (68 kDa), (d) uma fosfoproteína desconhecida (63 kDa), (e) α -tubulina (56 kDa) e (f) a GFAP (50 kDa).

A B C D



Figura 10 - Imunodeteccção das subunidades dos filamentos intermediários na fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-NF-H (A), anti-NF-M (B), anti-NF-L (C) e anti-GFAP (D). A imunodeteccção foi feita através do conjugado anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase e revelada com 4-cloro-1-naftol.

Ainda, a fração citoesquelética fosforilada foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida concomitantemente com um padrão de tubulina preparado como descrito em Material e Métodos, seção III-13. A figura 11A mostra a autoradiografia da fração citoesquelética indicando a fosfoproteína alfa tubulina correspondendo à alfa tubulina pura corada por Coomassie Blue (figura 11B).

IV - 2 IDENTIFICAÇÃO DO SISTEMA FOSFORILANTE ASSOCIADO À FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

Tendo sido identificadas as principais proteínas da fração que representavam bons substratos para o sistema fosforilante endógeno, as quais eram, a subunidade de 150 kDa dos neurofilamentos (NF-M), a sinapsina 1, a subunidade de 68 kDa dos neurofilamentos (NF-L), a alfa tubulina e a GFAP, foram realizados ensaios no sentido de caracterizar o sistema fosforilante associado a esta fração.

IV - 2a Ensaios para identificação de proteínas quinases associadas à fração citoesquelética.

Realizamos experimentos para a identificação da atividade das principais quinases dependentes de 2º mensageiro, associadas à fração citoesquelética. Tais experimentos foram realizados em condições consideradas ideais para cada quinase, na presença de ativadores específicos. Os resultados foram expressos em percentagem do controle.

Quando os ensaios de fosforilação *in vitro* foram realizados na presença de cálcio e calmodulina (condições para ativação da CaM quinase), ocorreu um aumento estatisticamente significativo na incorporação de ^{32}P em todas as proteínas da fração (NF-M, sinapsina 1, NF-L e GFAP), exceto na alfa-tubulina (figura 12B). Na figura 12A é mostrado o autoradiograma de um experimento representativo onde pode ser visto o aumento na incorporação de ^{32}P -ATP nas proteínas da fração

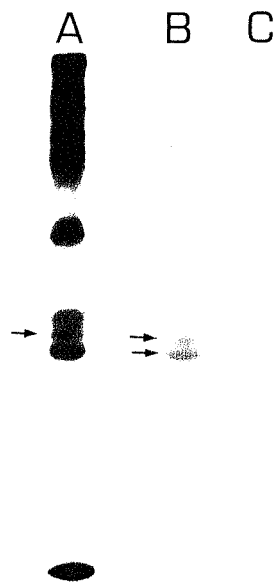


Figura 11-A) Autoradiografia de uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100, incubada com ^{32}P -ATP *in vitro*. A seta indica a α tubulina da fração. B) Padrão de tubulina obtido por ciclos de polimerização/despolimerização corado por Coomassie Blue. As setas indicam a α e a β tubulina. C) Padrão de pesos moleculares em ordem decrescente: miosina (205 kDa), alfa-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

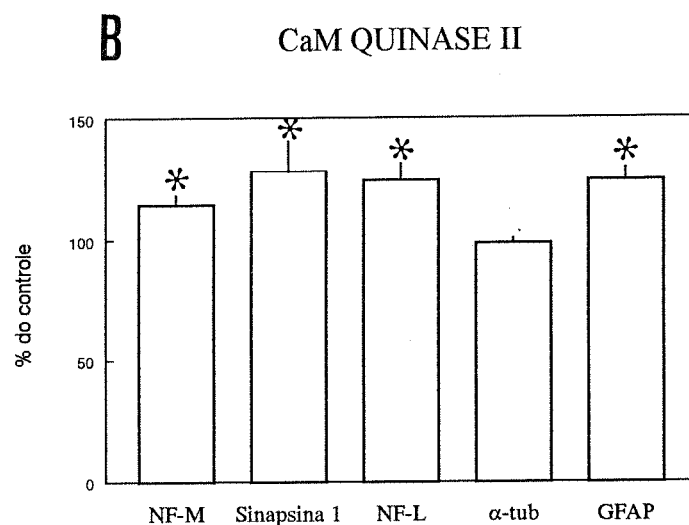
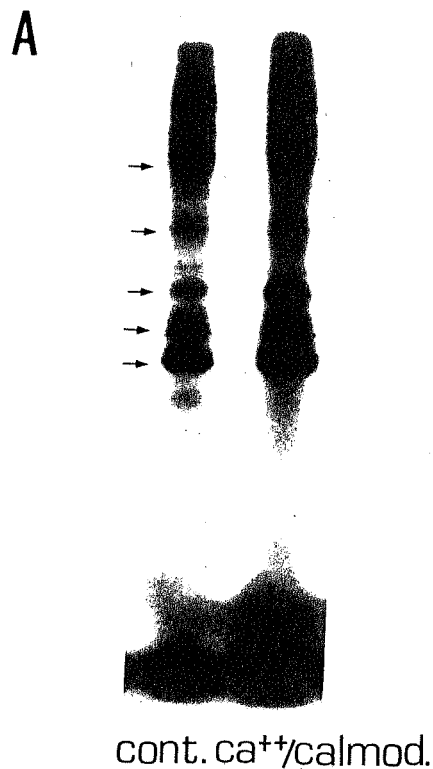


Figura 12- Efeito da adição de cálcio e calmodulina (condições de ativação da CaM quinase) sobre a incorporação de ³²P-ATP *in vitro* nas proteínas da fração citoesquelética. Frações citoesqueléticas obtidas de hipocampus de ratos foram incubadas com ³²P-ATP na ausência e presença de Ca⁺² e calmodulina e analisados por SDS-PAGE. Os géis foram secos e expostos a filmes de autoradiografia (A). As bandas foram cortadas e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida (B). Os resultados são expressos como média ± erro padrão e foram analisados por teste T pareado. Foram considerados significativos os valores de p < 0,05 (*) e p < 0,001 (#).

citoesquelética na qual foram adicionados cálcio e calmodulina, quando comparado com o sistema de fosforilação basal.

A figura 13B mostra que houve um aumento significativo na incorporação de ^{32}P na subunidade NF-M, sinapsina 1, subunidade NF-L e alfa-tubulina quando AMP cíclico (ativador da quinase A) foi adicionado ao sistema de incubação, o que também pode ser visualizado através do auto-radiograma de um experimento representativo (figura 13A).

Entretanto, quando os ensaios de fosforilação foram realizados na presença de cálcio, fosfatidilserina e phorbol ester, condições utilizadas para estimular a PKC, não foi observada nenhuma alteração significativa na incorporação de ^{32}P nas proteínas da fração citoesquelética (figura 14).

Podemos concluir então que o sistema fosforilante endógeno associado à fração insolúvel em Triton X-100 possui duas atividades quinásicas que são : a proteína quinase A e a proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina.

IV.2b - Ensaios para identificação de fosfatases associadas à fração citoesquelética

A atividade fosfatásica associada à fração citoesquelética foi estudada na presença das seguintes concentrações de ácido ocadaico: 0,05 μM , 0,5 μM e 5 μM . Sabe-se que o ácido ocadaico na concentração de 0,05 μM inibe a PP2A; na concentração de 0,5 μM inibe a PP1 e na concentração de 5 μM inibe a PP2B. O ácido ocadaico produziu uma inibição das atividades fosfatásicas, acarretando em um aumento na incorporação de ^{32}P em todas as proteínas da fração citoesquelética. A figura 15A mostra que houve um aumento significativo na incorporação de ^{32}P em todas as proteínas já na concentração de 0,05 μM de ácido

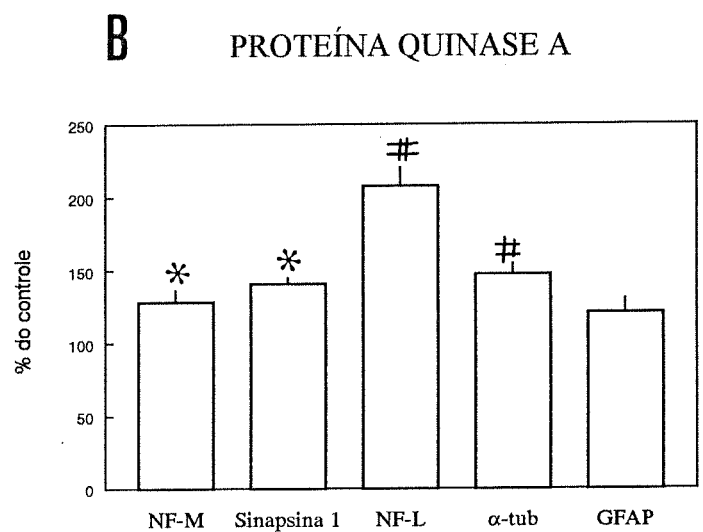
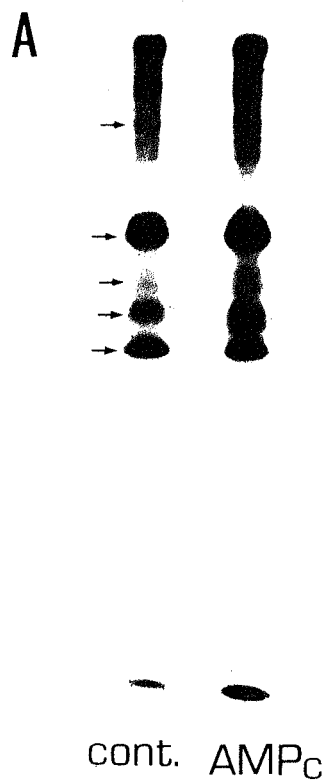


Figura 13 - Efeito da adição de AMP cíclico (condição de ativação da quinase A) sobre a incorporação de ^{32}P *in vitro* nas proteínas da fração citoesquelética. Frações citoesqueléticas obtidas de hipocampos de ratos foram incubadas com ^{32}P -ATP *in vitro* na ausência ou presença de AMP cíclico e analisadas por SDS-PAGE. Os géis foram secos e expostos a filmes de autoradiografia (A). As bandas do gel foram cortadas e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida (B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão e foram analisados por teste T pareado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (#).

PROTEÍNA QUINASE C

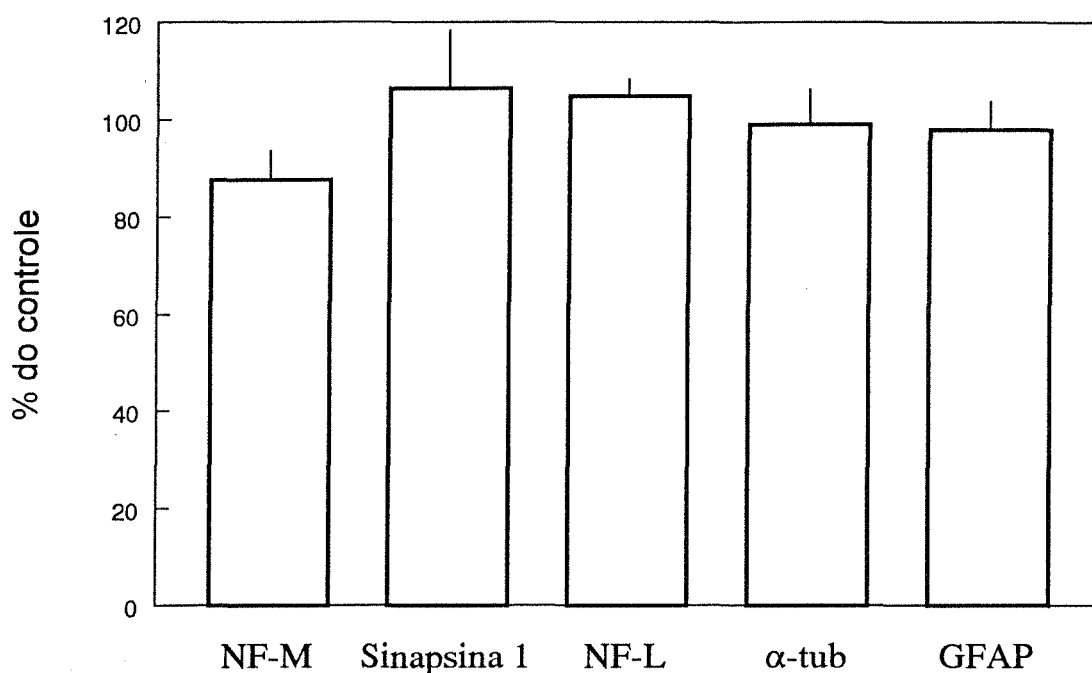


Figura 14 - Efeito da adição de cálcio, fosfatidilserina e 12, 13 Dibutirato de Forbol (PDBU) (condições de ativação da quinase C) sobre a incorporação de ^{32}P *in vitro* nas proteínas da fração citoesquelética. Frações citoesqueléticas obtidas de hipocampo de ratos foram incubadas com ^{32}P -ATP na ausência ou presença de Ca^{+2} , fosfatidilserina e PDBU e analisadas por SDS-PAGE. Após a autoradiografia, as bandas foram cortadas e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão e foram analisados por teste T pareado.

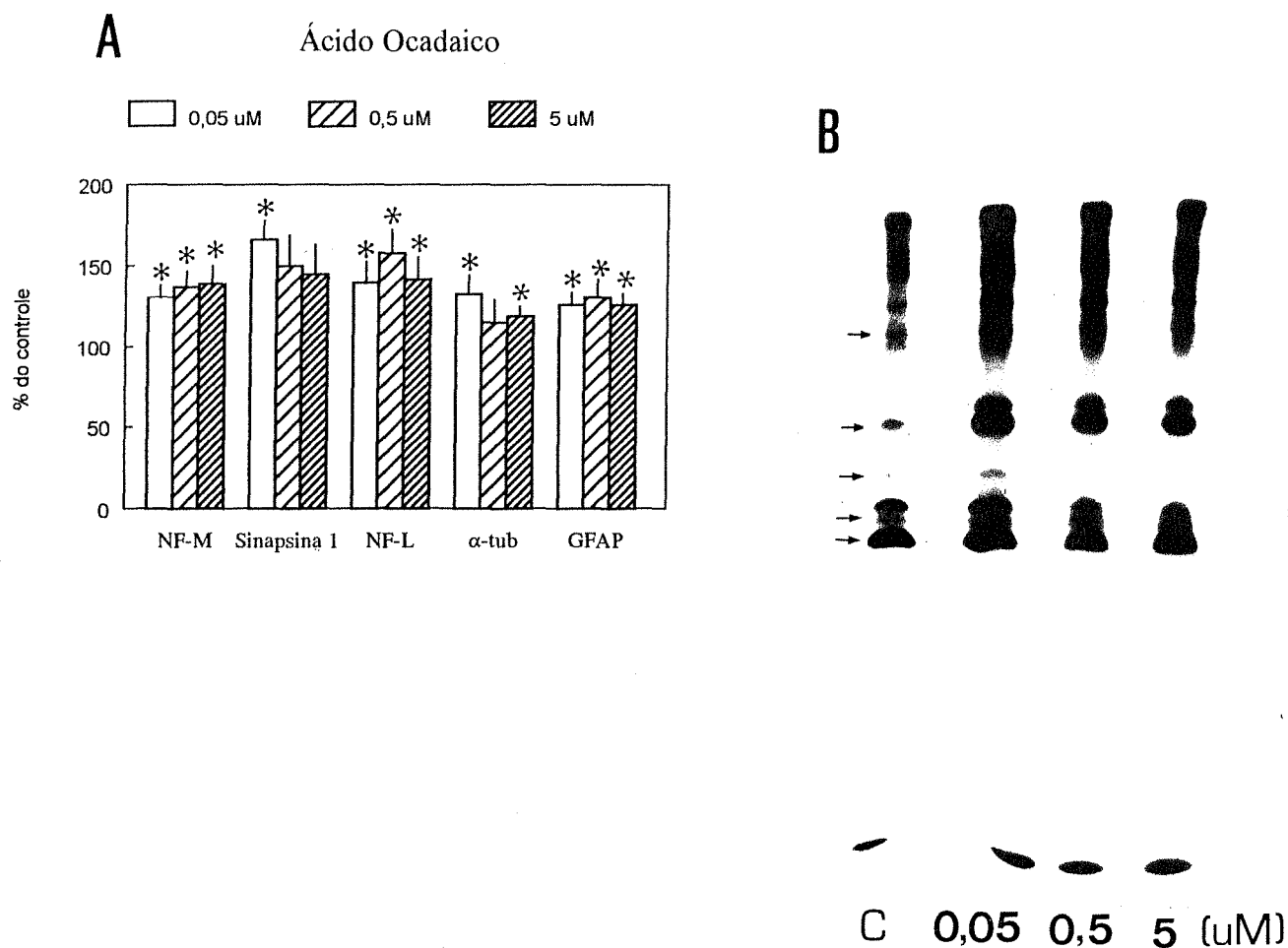


Figura 15 - Efeito da adição de concentrações crescentes de ácido ocadaico sobre a incorporação de ^{32}P *in vitro* nas proteínas da fração citoesquelética. A) O ácido ocadaico foi utilizado nas concentrações de 0,05 μM (inibição da PP2A), 0,5 μM (inibição da PP1) e 5 μM (inibição da PP2B). B) Autoradiografia representativa de uma SDS-PAGE da fração citoesquelética incubada com ^{32}P -ATP *in vitro* nas condições basais (C) e na presença de 0,05; 0,5 e 5 μM . Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e foram analisados por teste T pareado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (*) em relação ao controle. Os grupos foram comparados entre si através da análise de variância de uma via, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

ocadaico. O aumento encontrado nas concentrações de 0,5 e 5 μM foi similar ao aumento encontrado na concentração de 0,05 μM de ácido ocadaico, indicando a ausência de outras atividades fosfatásicas. A figura 15B mostra o auto-radiograma representativo de uma curva de concentrações crescentes de ácido ocadaico, no qual pode ser visto o aumento na incorporação de ^{32}P nos sistemas contendo concentrações de ácido ocadaico a partir de 0,05 μM .

IV.3 - EFEITO DAS TAREFAS COMPORTAMENTAIS SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

Conhecendo-se as proteínas da fração citoesquelética e seu sistema fosforilante endógeno, resolveu-se estudar o efeito de tarefas comportamentais (esquiva inibitória e habituação) sobre a fosforilação *in vitro* destas proteínas.

Na fração citoesquelética obtida de ratos submetidos à habituação observou-se um aumento significativo na incorporação de ^{32}P na subunidade de 150 kDa (NF-M) e na subunidade de 68 kDa (NF-L) dos neurofilamentos (figura 16).

Entretanto, a fração citoesquelética obtida de hipocampo de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória apresentou uma diminuição significativa na incorporação de ^{32}P na alfa tubulina e na GFAP (figura 17).

No sentido de controlar a possibilidade do efeito encontrado na esquiva inibitória sobre a fosforilação ser devido ao choque e não ao aprendizado, um grupo de animais recebeu apenas choque. Através da figura 18 podemos observar que o choque não foi capaz de alterar significativamente a incorporação de ^{32}P *in vitro* em nenhuma das proteínas da fração citoesquelética.

Com a finalidade de verificar se as tarefas comportamentais alteram a atividade das quinases ou das fosfatases, ou ainda, verificar alguma possível alteração no comportamento da defosforilação das proteínas da fração

HABITUAÇÃO

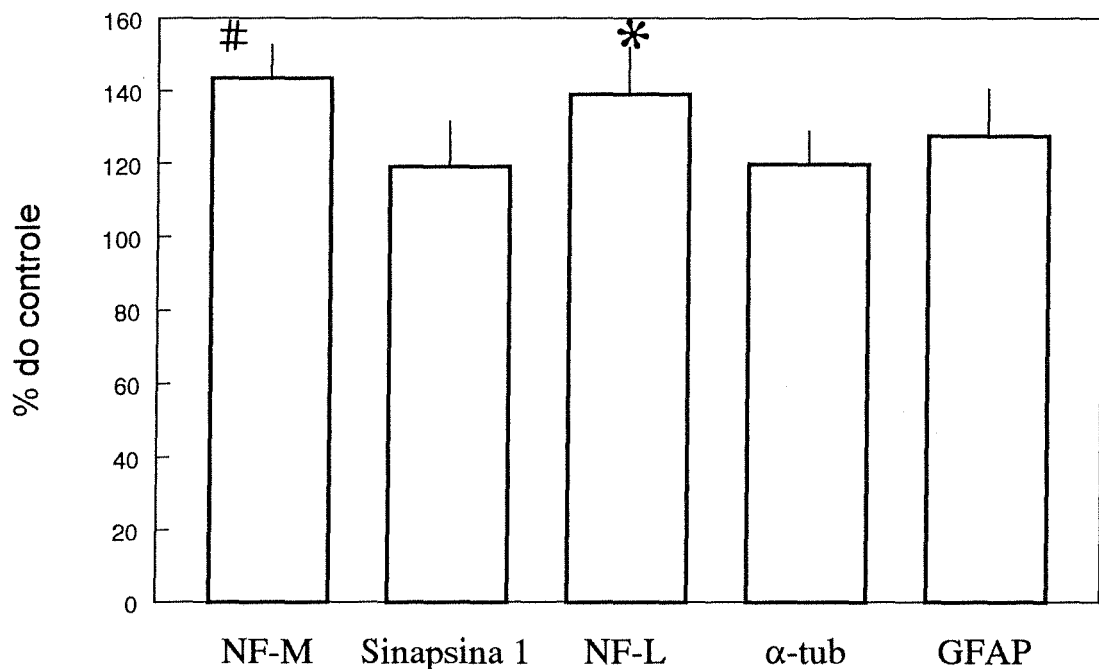


Figura 16 - Efeito da tarefa de habituação sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas da fração citoesquelética. Frações citoesqueléticas obtidas de hipocampo de ratos submetidos à habituação, foram incubadas com ^{32}P *in vitro* e analisadas por SDS-PAGE. Os géis foram secos e expostos a filmes de autoradiografia. As bandas foram cortadas e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão e foram analisados por teste T pareado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (#).

ESQUIVA INIBITÓRIA

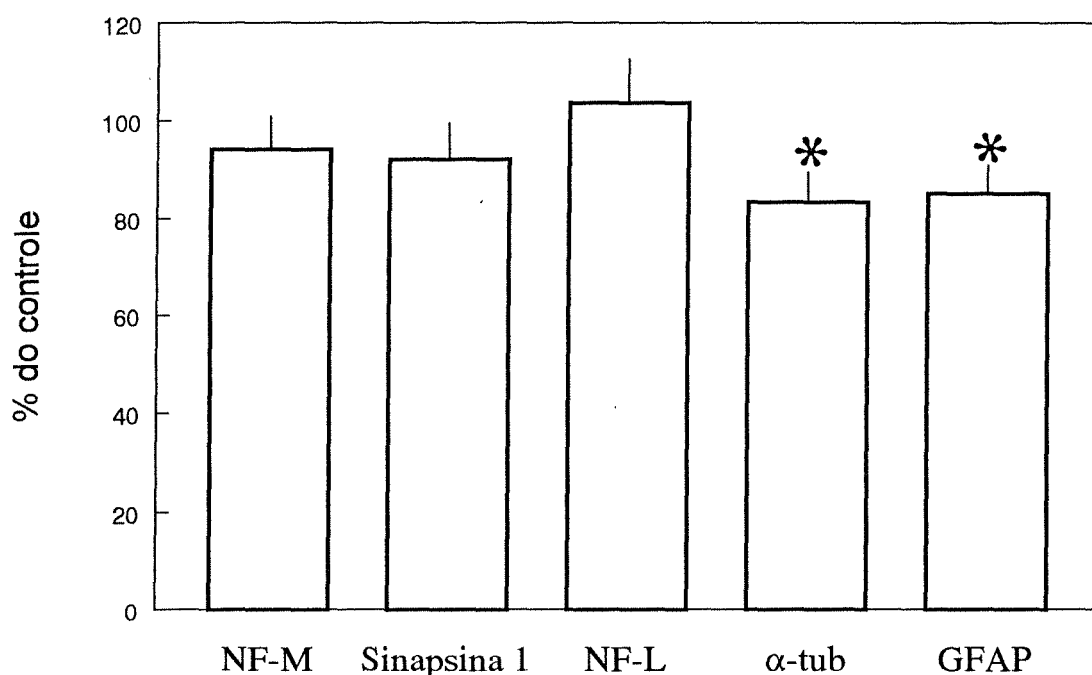


Figura 17 - Efeito da tarefa de esQUIVA inibitória sobre a incorporação de ^{32}P *in vitro* nas proteínas da fração citoesquelética. Frações citoesqueléticas obtidas de hipocampos de ratos submetidos à esQUIVA inibitória foram incubadas com ^{32}P -ATP *in vitro* e analisadas por SDS-PAGE. Os géis foram secos e expostos a filmes de autoradiografia. As bandas foram cortadas e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e foram analisadas por teste T pareado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (*).

CHOQUE

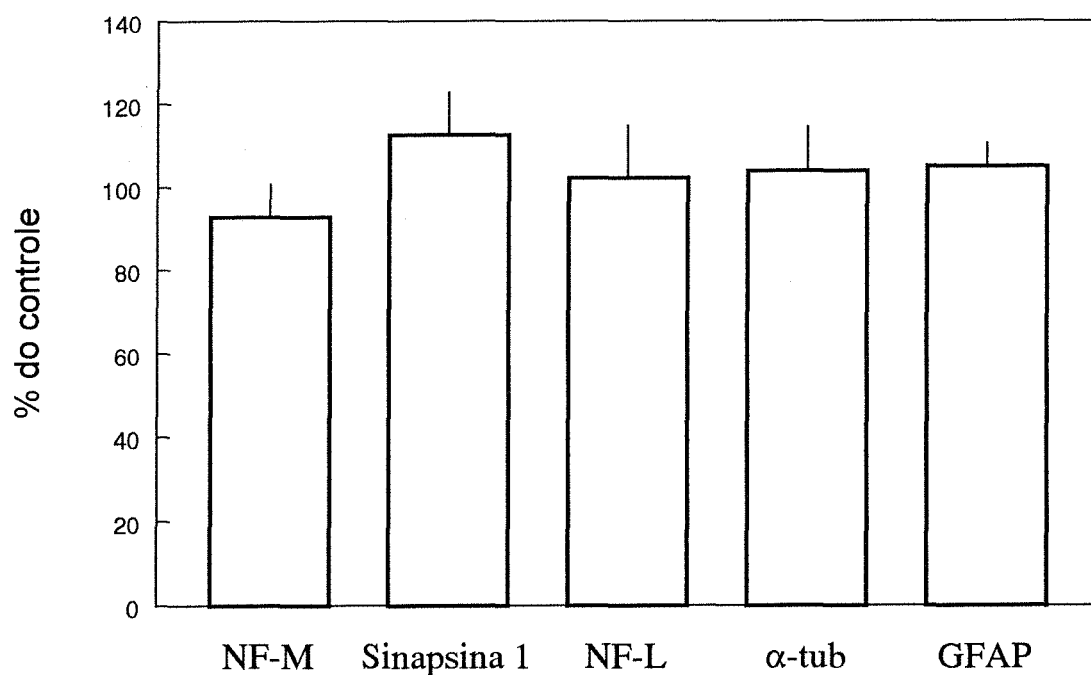
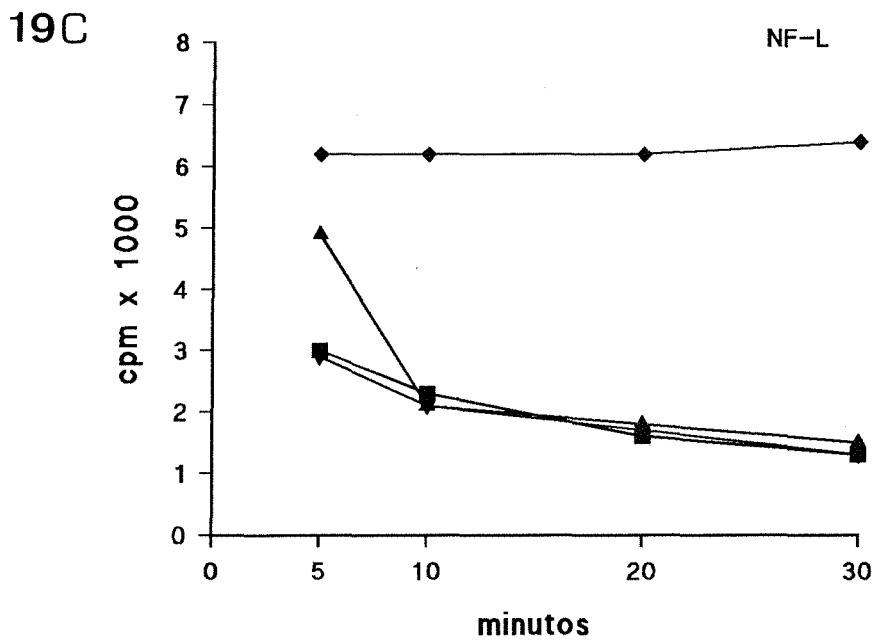
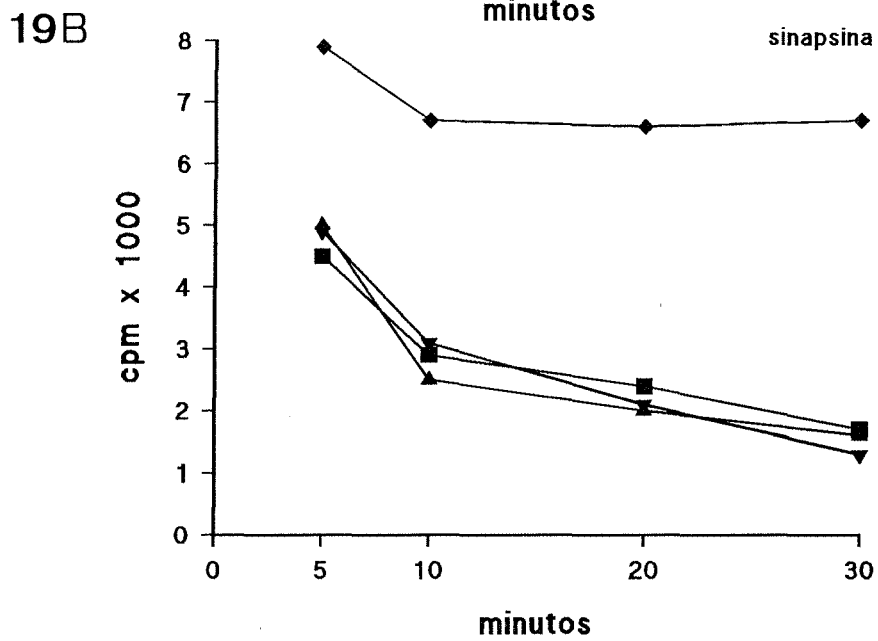
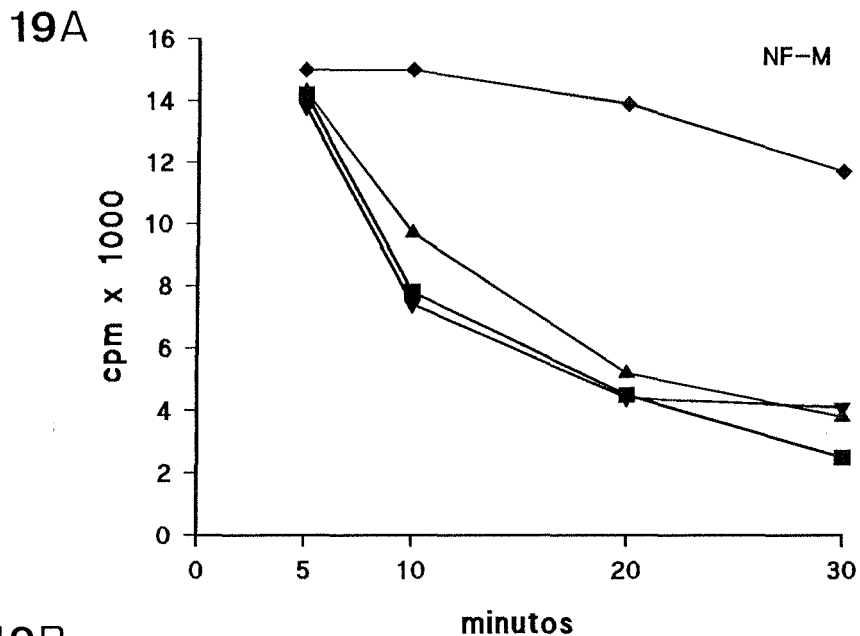


Figura 18 - Efeito do choque sobre a incorporação de ^{32}P *in vitro* nas proteínas da fração citoesquelética. Frações citoesqueléticas obtidas de hipocampo de ratos submetidos ao choque foram incubadas com ^{32}P -ATP e analisadas por SDS-PAGE. Os géis foram secos e expostos a filmes de autoradiografia. As bandas foram cortadas e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e foram analisados por teste T pareado.

citoesquelética, foi realizada uma curva de tempo de defosforilação (de 5 a 30 minutos) de frações citoesqueléticas obtidas do hipocampo de rats submetidos às tarefas de esQUIVA inibitória e habituação. Na figura 19 encontram-se representadas as curvas de tempo da defosforilação da NF-M (fig. 19A), sinapsina 1 (fig. 19B), NF-L (fig. 19C), alfa tubulina (fig. 19D) e GFAP (fig. 19E). Podemos observar que as curvas controle de todas as fosfoproteínas obedecem a um padrão de defosforilação semelhante, apresentando fosforilação máxima aos 5 minutos, caindo para aproximadamente 60 % da fosforilação máxima aos 10 minutos, chegando a 40 % da fosforilação máxima aos 20 minutos e 30% da fosforilação máxima aos 30 minutos de incubação.

As curvas de tempo de defosforilação das proteínas de frações citoesqueléticas obtidas de rats submetidos à esQUIVA inibitória obedecem ao mesmo padrão de defosforilação das curvas controle para NF-M (fig. 19A), NF-L (fig. 19C) e sinapsina 1 (fig. 19B). Embora a fosforilação aos 5 minutos, da alfa tubulina (fig. 19D) e da GFAP (fig. 19E) seja menor do que a fosforilação do controle, a queda no nível de fosforilação que ocorre nos tempos de 10, 20 e 30 minutos obedece a um perfil semelhante ao da curva controle para estas proteínas.

As curvas de tempo de defosforilação das proteínas de frações citoesqueléticas obtidas de animais submetidos à tarefa de habituação apresentaram um perfil de defosforilação semelhante ao das curvas controle para a sinapsina 1 (fig. 19B), alfa tubulina (fig. 19D) e GFAP (fig. 19E). Para a NF-M (fig. 19A) o nível de fosforilação aos 5 minutos é maior do que o nível de fosforilação do controle, mas a defosforilação aos 10, 20 e 30 minutos é proporcional à defosforilação da curva controle. Já para a NF-L (fig. 19C) o nível de fosforilação aos 5 minutos também foi maior do que o nível do controle, mas apresenta uma defosforilação mais acentuada entre os 5 e 10 minutos de incubação, quando atinge



■ controle ▲ habituação ▼ esquiva inib. ◆ ácido okadaico

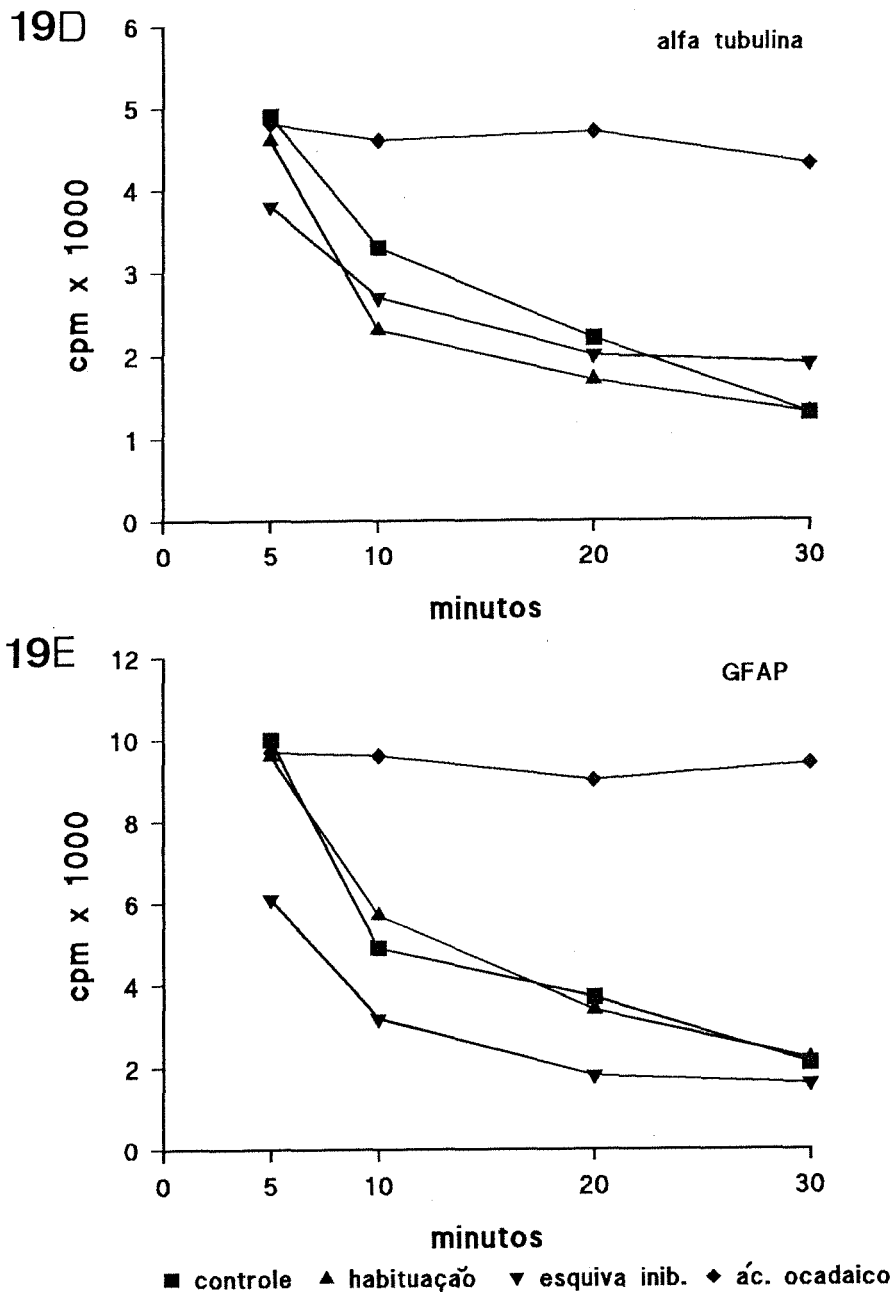


Figura 19 - Curvas de tempo de defosforilação da NF-M (A), sinapsina 1 (B), NF-L (C), α tubulina (D) e GFAP (E). Frações citoesqueléticas obtidas de hipocampus de ratos controles e de ratos submetidos as tarefas de esquiva inibitória e habituação foram incubadas com ^{32}P -ATP e as reações foram interrompidas por adição de tampão de amostra nos seguintes tempos de incubação : 5, 10, 20 e 30 minutos. Curvas nas quais a atividade fosfatásica está inibida foram obtidas através da incubação na presença de 5 μM de ácido ocadaico.

valores semelhantes aos do controle. Nos demais tempos de incubação (20 e 30 minutos) a curva obtida da fração citoesquelética do animal submetido à tarefa, praticamente se sobrepõe à curva controle.

Em sistemas incubados nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos, na presença de 5 μM de ácido ocadaico pode-se observar que praticamente não ocorre defosforilação, mantendo-se estáveis os níveis de fosforilação de todas as proteínas desde os 5 até os 30 minutos (figura 19A-E).

Estes resultados sugerem que as tarefas comportamentais levaram a uma alteração da atividade quinásica endógena da fração citoesquelética, sem no entanto, alterar a atividade fosfatásica.

V-DISSCUSSÃO

A extração da fração citoesquelética utilizada, baseou-se na propriedade das proteínas do citoesqueleto de serem insolúveis em Triton X-100. A fração extraída através deste método é extremamente útil para a realização de estudos de fosforilação, uma vez que o sistema fosforilante endógeno associado ao citoesqueleto é extraído conjuntamente com as proteínas citoesqueléticas (Sihag e Nixon, 1989). A utilização de inibidores de proteases no tampão de extração assegurou que não houvesse degradação das proteínas, tornando pouco provável existência de bandas correspondentes a produtos de degradação. Algumas das proteínas da fração citoesquelética representam bons substratos para o sistema de fosforilação endógeno. No sentido de identificar estas proteínas fosforiladas *in vitro* através de seu sistema fosforilante endógeno associado, foi utilizada a técnica de eletroforese bidimensional em condições de não equilíbrio. Nesta técnica a primeira separação baseia-se na carga elétrica da proteína, uma vez que o gel possui um gradiente de pH mantido por anfólinas. A segunda etapa da separação constitui-se de uma eletroforese em gel de poliacrilamida, no qual as proteínas são separadas pelo seu peso molecular. A eletroforese bidimensional em condições de não equilíbrio é de grande utilidade abrange uma ampla faixa de pH, permitindo obter a separação tanto de proteínas que apresentam ponto isoelétrico ácido, quanto de proteínas que apresentam seu ponto isoelétrico na faixa básica de pH.

Através da mobilidade eletroforética característica nos foi possível identificar as fosfoproteínas constituintes da fração citoesquelética, as quais são fosforiladas *in vitro* por seu sistema fosforilante endógeno, através da adição de ^{32}P -ATP. As principais fosfoproteínas identificadas foram : a subunidade de 150 kDa dos neurofilamentos (NF-M), a sinapsina1, a subunidade de 68 kDa dos neurofilamentos (NF-L), a alfa tubulina e a GFAP (figura 9). Também foi possível verificar o aparecimento de uma fosfoproteína de identidade desconhecida, com peso molecular de aproximadamente 63 kDa, localizada na região básica do gel, e

que por não ter sido identificada não foi utilizada nos estudos posteriores. Apesar disso, sabemos que o aparecimento desta banda não se deve a degradação de alguma proteína, já que, como foi mencionado anteriormente, fazíamos uso de inibidores de proteases durante as etapas de extração. Além disso, a eletroforese bidimensional foi de grande importância no sentido de garantir a ausência de sobreposição de bandas, permitindo a utilização da eletroforese monodimensional para a realização dos estudos posteriores.

A detecção imunológica através de anticorpos monoclonais foi de grande utilidade na confirmação da identidade das subunidades constituintes dos filamentos intermediários da fração citoesquelética. Esta técnica é largamente utilizada por apresentar grande sensibilidade e precisão em seus resultados. A figura 10 mostra que as três subunidades dos neurofilamentos (NF-H, NF-M e NF-L) e a GFAP reagiram com os anticorpos monoclonais utilizados. Apesar da comprovação da presença da subunidade NF-H na fração insolúvel em Triton X-100, aparentemente esta proteína não é fosforilada *in vitro* em nossas condições experimentais. Por esta razão a fosfoproteína correspondente ao NF-H não é detectada nas autoradiografias.

A identificação da alfa tubulina realizada através de sua mobilidade eletroforética característica (ponto isoelétrico e peso molecular) (Walsh e Kuruc, 1992), foi também confirmada através da migração concomitante com um padrão de tubulina. Na autoradiografia da fração citoesquelética fosforilada *in vitro* com ^{32}P -ATP podemos identificar a alfa tubulina através da comparação com a alfa tubulina padrão (figura 11).

Uma vez tendo sido identificadas as fosfoproteínas da fração citoesquelética, foi realizado um estudo no sentido de identificar as atividades quinásicas e fosfatásicas endógenas associadas.

Muitos trabalhos têm demonstrado que quinases copurificam em preparações citoesqueléticas e que as subunidades dos neurofilamentos podem ser

fosforiladas *in vitro* por numerosas quinases incluindo as dependentes de segundo mensageiro e as independentes de segundo mensageiro (Soussan et al, 1994).

As proteínas quinases dependentes de segundo mensageiro são as mais abundantes no cérebro e estão relacionadas com a regulação de muitos sistemas fisiológicos (O'Callaghan, 1994), portanto é de grande importância identificar estas atividades quinásicas em nossa fração citoesquelética.

Em nossas condições experimentais, os neurofilamentos foram fosforilados *in vitro* pela CaM quinase e pela proteína quinase A. O aumento da fosforilação encontrado na subunidade de 150 kDa (NF-M) e na subunidade de 68 kDa (NF-L) dos neurofilamentos quando da adição do ativador da quinase A (AMPC) foi superior ao aumento encontrado quando houve adição de cálcio e calmodulina (condições de ativação da CaM quinase). Isto sugere que embora haja participação da CaM quinase na fosforilação *in vitro* das subunidades dos neurofilamentos em nossas condições experimentais, estas subunidades são preferencialmente fosforiladas pela quinase A (figura 12). Além disso, os resultados indicaram que em nossas condições experimentais a alfa tubulina é fosforilada exclusivamente pela quinase A. Anteriormente já havia sido descrito que os neurofilamentos e a tubulina são fosforilados pela proteína quinase A e pela CaM quinase (O'Callaghan, 1994). É interessante observar que embora a proteína quinase C (dependente de cálcio e fosfolipídios) seja abundante no cérebro, não detectamos atividade desta enzima em nossa fração citoesquelética. No entanto, Sihag e colab. (1988) mostraram que a proteína quinase C purificada é capaz de fosforilar os neurofilamentos *in vitro*. Além disso, Georges e col. (1989) mostraram que houve estimulação da fosforilação dos neurofilamentos obtidos de culturas de células cromafínicas tratadas pelo ativador da proteína quinase C, o 13-acetato de 12-o-tetra-decanoil forbol (TPA).

Nossos resultados indicaram que a sinapsina 1 é fosforilada *in vitro* tanto pela quinase A, quanto pela CaM quinase. Estes dados estão de acordo com os resultados já estabelecidos para a fosforilação desta proteína *in vivo*. É sabido que

a sinapsina 1 possui um sítio fosforilado pela quinase A enquanto que, em outra região da molécula há dois sítios que são fosforilados pela CaM quinase. O influxo de cálcio no neurônio pré-sináptico resulta na fosforilação da sinapsina 1 pela CaM quinase (ativada por cálcio e calmodulina), resultando em um aumento da liberação de vesículas sinápticas. Por outro lado, a ativação da adenilato ciclase aumenta a sinalização através da quinase A, a qual resulta na fosforilação da sinapsina 1, sem no entanto aumentar a disponibilidade de vesículas sinápticas (Sihra et al, 1989).

Astrócitos em cultura possuem vários tipos de atividades quinásicas encontradas fosforilando a GFAP. Entre elas estão a PKA, a PKC e a CaM quinase. Além disso foi demonstrado que em preparações citoesqueléticas insolúveis em Triton X-100 obtidas de astrócitos, as mesmas quinases estão fosforilando a GFAP *in vitro* (Harrison e Mobley, 1992). Em nossas condições experimentais detectamos apenas a atividade da quinase dependente de cálcio e calmodulina fosforilando a GFAP *in vitro*.

Em conjunto, os resultados indicaram que há duas atividades quinásicas dependentes de segundo mensageiro associadas com a fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 obtida de hipocampo de ratos adultos. Estas são : quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaM quinase) e quinase dependente de AMP cíclico (quinase A). o fato destas quinases serem extraídas conjuntamente com a fração citoesquelética sugere que as mesmas estejam fisicamente associadas ao citoesqueleto *in vivo*, podendo ser de grande importância na regulação de seus processos fisiológicos.

Sabe-se que a regulação de sistemas fosforilantes é um processo dinâmico envolvendo um equilíbrio entre a atividade de quinases e fosfatases. Existem inúmeros estudos a respeito de atividades quinásicas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, no entanto, muito pouco é sabido a respeito de fosfatases envolvidas na defosforilação de proteínas do citoesqueleto. Existem quatro principais classes de fosfatases no cérebro, as quais defosforilam resíduos de serina e treonina. As quatro principais

fosfatases são : PP1, PP2A, PP2B e PP2C e são classificadas desta forma devido a sua dependência de íons e sua sensibilidade a inibidores específicos. A PP1 e a PP2A não necessitam de íons para exercerem suas atividades, enquanto que a PP2B necessita de cálcio e a PP2C é dependente de magnésio. Um importante instrumento para o estudo das fosfatases é o ácido ocadaico, uma toxina marinha que, em diferentes concentrações, é capaz de inibir seletivamente as fosfatases. A PP1 e a PP2A são inibidas em baixas concentrações de ácido ocadaico. Já a PP2B só é inibida em concentrações mais elevadas de ácido ocadaico (5 μ M) enquanto que a PP2C é insensível a este inibidor.

Através da utilização de concentrações crescentes (0,05; 0,5 e 5 μ M) de ácido ocadaico nos meios de incubação foi possível identificar a presença da atividade fosfatásica na fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100. Na concentração de 0,05 μ M (concentração na qual somente a PP2A é inibida) houve um aumento na incorporação de 32 P-ATP em todas as proteínas. Este aumento pode ser atribuído à inibição da PP2A na fração citoesquelética. Nas concentrações de 0,5 e 5 μ M também houve aumento na incorporação de 32 P-ATP em todas as proteínas. Contudo, este aumento não foi somatório ao encontrado na concentração de 0,05 μ M. Este fato sugere a inexistência de outras atividades fosfatásicas associadas. Caso houvessem outras fosfatases na fração citoesquelética, o aumento encontrado nas concentrações mais elevadas de ácido ocadaico (0,5 e 5 μ M) deveria ser maior do que o aumento ocorrido devido à inibição da PP2A.

Nossos resultados estão em acordo com os resultados encontrados por Sacher e col. (1994), onde foi mostrado que a PP2A é responsável pela defosforilação da porção amino terminal do NF-L enquanto que a PP1 não teve efeito sobre os níveis de 32 P tanto na subunidade NF-L quanto na subunidade NF-M *in vitro*. Além disso, Hisanaga e col. (1993) mostraram que a PP2A defosforila o NF-M, quando o mesmo é fosforilado *in vitro* pela quinase A.

Nossos resultados indicaram que a PP2A, além de defosforilar as subunidades dos neurofilamentos (NF-M e NF-L) também é responsável pela defosforilação *in vitro* da sinapsina 1, alfa tubulina e GFAP (figura 15). Isto provavelmente esteja ocorrendo devido à associação da PP2A com a fração citoesquelética em nossas condições experimentais.

A fosforilação proteica é um mecanismo que desempenha importante papel na regulação de numerosas funções neuronais incluindo vários processos celulares envolvidos no aprendizado e subsequentemente na formação de memória. Diversos trabalhos utilizando diferentes espécies animais em vários tipos de aprendizado, têm mostrado que proteínas quinases tais como a proteína quinase A, a CaM quinase e a proteína quinase C desempenham um papel fundamental na formação da memória (Zhao et al, 1995). Vários estudos utilizando inibidores específicos de proteínas quinases mostraram a importância das mesmas para o aprendizado e memória. A injeção intra-hipocampal de inibidores específicos da PKC (CGP 41231) (Jerusalinsky et al, 1994) e da CaM quinase (KN 62) (Wofman et al, 1994) apresentou efeito amnésico em ratos na tarefa de esquiva inibitória. Além disso, um estudo realizado por Serrano e col. (1994) mostrou que 13 diferentes inibidores de quinases (categorizados em dois grupos : aqueles que inibem quinases dependentes de cálcio e calmodulina e os que inibem proteína quinase C, proteína quinase A e proteína quinase G) tiveram efeito amnésico em galinhas na tarefa de esquiva inibitória.

Recente trabalho realizado por Zhao e col. (1995) demonstrou a importância das fosfatases na formação da memória. A injeção do inibidor de fosfatases, o ácido ocadaico em concentrações capazes de inibir a PP1 e a PP2A ocasionou déficit de retenção na tarefa de esquiva inibitória em galinhas, sendo que o déficit foi mais pronunciado quando a droga foi administrada imediatamente antes ou em curto período após o treino.

Apesar do grande número de trabalhos realizados mostrando a importância da fosforilação na memória, pouco se sabe a respeito dos substratos utilizados pelas proteínas quinases e/ou fosfatases na formação da memória. Lyn-Cook e Wilson (1983) mostraram que quatro fosfoproteínas não identificadas com pesos moleculares de 44, 24, 21 e 19 kDa obtidas da fração sinaptossomal particulada de ratos submetidos a tarefa de esquivar ativa tiveram sua fosforilação alterada. Além disso, foi demonstrado que o aprendizado em galinhas aumentou a fosforilação *in vitro* da MARCKS, uma fosfoproteína, substrato da proteína quinase C, a qual tem a propriedade de ligar-se à actina e encontra-se também associada a microtúbulos e membrana plasmática de axônios, terminais de axônios e cones de crescimento (Sheu et al, 1993).

Uma vez que a fosforilação é um mecanismo regulatório de vários processos cerebrais e as fosfoproteínas encontram-se amplamente distribuídas no cérebro, desempenhando diferentes funções é possível que a participação de proteínas quinases durante o processo de aprendizado e memória possa resultar na alteração do estado de fosforilação de uma variedade de proteínas, incluindo fosfoproteínas estruturais tais como as tubulinas e as subunidades dos filamentos intermediários (NF-M e NF-L e GFAP).

Nossos resultados mostraram que as preparações citoesqueléticas obtidas de hipocampus de ratos submetidos a tarefas comportamentais apresentaram alterações na incorporação *in vitro* de ^{32}P -ATP nas subunidades de 150 kDa (NF-M) e 68 kDa (NF-L) dos neurofilamentos, na alfa tubulina e na GFAP.

A tarefa de habituação a um novo ambiente ocasionou uma incorporação aumentada de ^{32}P -ATP nas duas subunidades dos neurofilamentos estudadas (NF-M e NF-L). Este aumento foi da ordem de 40% para as duas subunidades.

Sabe-se que a fosforilação dos neurofilamentos por quinases dependentes de segundo mensageiro (as quais foram identificadas em nossa fração citoesquelética) ocorre no domínio amino terminal (Soussan et al, 1994), e que a

fosforilação no domínio amino terminal é responsável pela regulação da polimerização das subunidades (Nixon et al, 1994). A fosforilação prolonga o tempo de permanência dos neurofilamentos no axônio, eliminando a necessidade de um contínuo fornecimento de novas subunidades por parte do corpo celular, mantendo a rede citoesquelética estável sem necessidade de aumento da expressão gênica das subunidades dos neurofilamentos (Nixon et al, 1994). Os neurofilamentos hiperfosforilados tornam-se mais resistentes a despolimerização (Nixon e Sihag, 1991), além disso, a extensiva fosforilação dos neurofilamentos no axônio aumenta sua resistência à digestão pela calpaína (protease ativada por cálcio, principal responsável pela degradação dos neurofilamentos), prevenindo sua prematura degradação (Pant, 1988).

Como foi visto, a fosforilação dos neurofilamentos regula o desempenho de suas funções fisiológicas, especialmente influenciando no tempo de permanência dos neurofilamentos no axônio. O aumento de fosforilação encontrado nas duas subunidades dos neurofilamentos (NF-L e NF-M) de hipocampo de ratos submetidos à tarefa de habituação poderia estar sendo mediado pela CaM quinase e quinase A as quais encontram-se associadas a fração citoesquelética. Estas quinases são reconhecidamente importantes para a formação e manutenção da memória respectivamente (Malenka, 1995; Serrano et al, 1994).

A tarefa de esquiva inibitória ocasionou uma diminuição na incorporação *in vitro* de ^{32}P -ATP em duas proteínas: alfa tubulina e GFAP, não tendo alterado a fosforilação das demais proteínas estudadas.

A alfa tubulina é uma proteína que se encontra tanto em células gliais como em neurônios. Nos neurônios a alfa tubulina é constituinte dos microtúbulos axonais, além de ser também encontrada em terminais sinápticos. O significado fisiológico da fosforilação dos microtúbulos está na plasticidade neuronal que ocorre através da regulação do estado de associação e estabilização dos microtúbulos em

diferentes domínios da célula nervosa (axônios, dendritos e corpo celular) (Diaz-Nido et al, 1990).

A GFAP é uma proteína exclusivamente expressa em astrócitos e possivelmente seu estado de fosforilação esteja relacionado com a atividade funcional astrocítica. Os astrócitos estão relacionados com o processamento de neurotransmissores, controle do balanço iônico e pH do meio extracelular e manutenção da barreira hemato-encefálica. Alguns astrócitos poderiam, devido a sua localização, estar diretamente envolvidos na atividade neuronal, mais do que simplesmente dando suporte a esta atividade. Possivelmente, mudanças reativas que ocorrem na glia estejam relacionadas com a reorganização sináptica que ocorre em resposta a atividade neuronal (Steward, 1991).

Foi visto que a fosforilação da GFAP é regulada por agonistas glutamatérgicos em fatias de hipocampo (Wofchuk e Rodnight, 1994) fato que sugere a possibilidade de que a fosforilação da GFAP participe na interação neurônio-gliial mediada por glutamato de maneira cálcio dependente. Além disso, a distribuição da GFAP predominantemente em hipocampo e outras estruturas do sistema límbico (Rodnight e Leal, 1990) sugere um possível envolvimento desta proteína na atividade plástica sináptica. Estes fatos sugerem a possibilidade de que a alteração encontrada na fosforilação da GFAP decorrente da tarefa de esQUIVA inibitória poderia estar refletindo um efeito ocorrido a nível sináptico. Além disso, este efeito pode estar relacionado com o fato da fosforilação da GFAP ser regulada por agonistas glutamatérgicos como foi citado acima, uma vez que a liberação de glutamato é essencial para a formação da memória (Izquierdo, 1993).

Nada é possível inferir a respeito do significado fisiológico desta diminuição de fosforilação causada pela tarefa de esQUIVA inibitória tanto na alfa tubulina quanto na GFAP. Seriam necessários estudos que relacionassem alterações de fosforilação e implicações funcionais para estas duas proteínas.

O fato das duas tarefas (esquiva inibitória e habituação) terem apresentado efeitos opostos sobre a fosforilação (aumento na esquiva inibitória e diminuição na habituação) de diferentes proteínas sugere que mecanismos diversos estejam envolvidos no aprendizado decorrente destas duas tarefas. Ou, ainda devido ao fato de que possivelmente o aprendizado pode induzir a um aumento na eficácia sináptica em um tipo de sinapse e uma diminuição da eficácia em outras, e que ambas as mudanças sejam mediadas por alterações na fosforilação de proteínas podendo ser essenciais para a formação da memória (Zhao et al, 1995).

O choque não foi capaz de alterar a fosforilação de nenhuma das proteínas estudadas, podendo ser utilizado como controle para a tarefa de esquiva inibitória, garantindo que o efeito encontrado na tarefa não foi devido ao choque, estando exclusivamente relacionado com o aprendizado sofrido pelo rato.

Surpreendentemente, nenhuma das tarefas comportamentais estudadas foi capaz de alterar o estado de fosforilação da sinapsina. Alterações eram esperadas, uma vez que a fosforilação desta proteína regula processos tão importantes como a disponibilidade de vesículas sinápticas para a liberação, através do ancoramento reversível à rede citoesquelética. No entanto, é preciso considerar a possibilidade da proteína em questão não se tratar da sinapsina, uma vez que o único critério para identificação da mesma foi sua mobilidade em eletroforese bidimensional, o que é insuficiente para identificá-la. Seria necessária a utilização da detecção imunológica para identificar esta proteína de maneira conclusiva.

É necessário considerar que alterações encontradas no nível de fosforilação protéica *in vitro* em preparações de animais treinados podem ser atribuídas a uma alteração na atividade endógena das enzimas, quinases e fosfatases, ou a mudanças conformacionais e também na distribuição intracelular dos substratos *in vivo* tornando-os mais susceptíveis a ação das enzimas. Outra possibilidade seria um aumento ou diminuição dos sítios aceptores de fosfato *in vivo* modificando a disponibilidade de sítios capazes de serem fosforilados *in vitro*.

Para verificar se as alterações no nível de fosforilação *in vitro* aos cinco minutos de incubação, das proteínas estudadas, decorrentes das tarefas comportamentais, eram devido a alterações nas atividades quinásica ou fosfatásica endógenas, foram realizadas curvas de defosforilação. Para tanto, as frações citoesqueléticas extraídas de animais submetidos as tarefas de esquiva inibitória e habituação foram incubadas com ^{32}P -ATP por diferentes tempos (5,10, 20 e 30 minutos). As curvas controles apresentaram perfil de defosforilação semelhante para todas as proteínas, com a fosforilação máxima ocorrendo aos cinco minutos de incubação, caindo para aproximadamente 60% aos 10 minutos, chegando a 40% aos 20 minutos e 30% aos 30 minutos de incubação. Perfil semelhante foi encontrado nas curvas de defosforilação das proteínas das frações citoesqueléticas obtidas de hipocampos de ratos submetidos as duas tarefas comportamentais. Aos 5 minutos de incubação estava aumentada a fosforilação da NF-M e NF-L de ratos submetidos a habituação, enquanto que a fosforilação da GFAP e alfa tubulina encontrou-se diminuída em frações citoesqueléticas obtidas de ratos submetidos a esquiva inibitória. Estes resultados confirmam os dados apresentados nas figuras 16 e 17. No entanto, o perfil de defosforilação destas proteínas obtidas de frações citoesqueléticas de ratos submetidos às tarefas, não apresentou qualquer alteração aos 10, 20 e 30 minutos de incubação, mostrando que a atividade fosfatásica associada à fração citoesquelética (PP2A) não se encontrava alterada. Um perfil em que a atividade fosfatásica encontra-se inibida pode ser visto nas curvas incubadas com ácido ocadaico (figuras 19A-19E). Com isto, podemos dizer que as tarefas de habituação e esquiva inibitória afetaram a atividade quinásica associada à fração citoesquelética *in vitro*, sem no entanto alterar a atividade fosfatásica.

A partir destes resultados podemos excluir a possibilidade do efeito das tarefas (habituação e esquiva inibitória) estar ocorrendo sobre a atividade fosfatásica.

Na continuidade deste trabalho, realizaremos estudos utilizando inibidores específicos de proteínas quinases (quinase A e CaM quinase) nos sistemas de incubação com ^{32}P - ATP *in vitro*, no sentido de investigar uma possível alteração na atividade destas enzimas, decorrente das tarefas comportamentais, as quais estariam ocasionando as alterações no estado de fosforilação de quatro das cinco proteínas estudadas (NF-M, NF-L, GFAP e α -tubulina).

VI-CONCLUSÕES

Foram identificadas as seguintes fosfoproteínas, as quais representam bons substratos para o sistema endógeno de fosforilação : a subunidade de 150 kDa dos neurofilamentos (NF-M), a sinapsina 1, a subunidade de 68 kDa dos neurofilamentos (NF-L), a α -tubulina e a GFAP, além de uma fosfoproteína de 63 kDa de identidade desconhecida.

Foram identificadas duas atividades quinásicas dependentes de 2º mensageiro associadas à fração citoesquelética : a quinase dependente de AMP cíclico (quinase A) e a quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaM quinase), as quais são responsáveis pela fosforilação *in vitro* das proteínas estudadas. Além disso, foi identificada uma atividade fosfatásica, a PP2A, associada à fração citoesquelética, responsável pela defosforilação das proteínas estudadas.

A tarefa de esquiva inibitória causou uma diminuição na incorporação de ^{32}P -ATP *in vitro* na α tubulina e na GFAP, enquanto que a tarefa de habituação ocasionou um aumento na incorporação de ^{32}P -ATP *in vitro* nas duas subunidades dos neurofilamentos (NF-M e NF-L). No entanto a incorporação de ^{32}P *in vitro* das proteínas não foi alterada com o choque. Através da curva de defosforilação das fosfoproteínas da fração citoesquelética obtida de hipocampos de ratos submetidos às tarefas de habituação e esquiva inibitória, concluímos que as alterações na atividade do sistema fosforilante endógeno estão provavelmente relacionadas à modificação das atividades quinásicas, não alterando a atividade fosfatásica.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. e Watson, J. D. (1994). **The Cytoskeleton**. In: *The Molecular Biology of the Cell*, 787-858 (3rd edition).

Baines, A. J. e Bennett, V. (1985). **Synapsin I is a spectrin-binding protein immunologically related to erythrocyte protein 4.1**. *Nature*, 315 : 410-413.

Bennett, G. S.; Laskowska, D. e DiLullo, C. (1991). **Lithium Chloride Inhibits the Phosphorylation of Newly Synthesized Neurofilament Protein, NF-H, in Cultured Chick Sensory Neurons**. *Journal of Neurochemistry*, 57 (1) : 120-129.

Bianchin, M.; Da Silva, R. C.; Schmitz, P. K.; Medina, J. H. e Izquierdo, I. (1994). **Memory of Inhibitory Avoidance in the Rat is Regulated by Glutamate Metabotropic Receptors in the Hippocampus**. *Behavioral Pharmacology*, 5: 536-539.

Bjerrum, O.J. e Shafer-Nielsen, C. (1986). **Buffer System and Transfer Parameters of Semidry Eletrobloting with an Horizontal Apparatus**. In : *Eletrophoresis*, 86. Dunn, M. J. Ed. VHC Publishers, Weinhein, 315.

Bliss, T. V. P. e Collingridge, G. L. (1993). **A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in The Hippocampus**. *Nature*, 361 : 31-39.

Bortolotto, Z. A. e Collingridge, G. L. (1993). **Characterization of LTP Induced by Activation of Glutamate Metabotropic Receptors in Area CA1 of the**

Hippocampus. Neurofarmacology, 32 : 1-9.

Bradford, M. M. (1977). **A Rapid and Sensitive Method for Quantitative of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Dinding.** Analytic Biochemistry, 72 : 248-254.

Brady, S. T. (1991) Molecular Motors in the Nervous System. Neuron, 7 : 521-533.

Bretscher, A.; Dress, B.; Harsay, E.; Schott, D. e Wang, T. (1994). **What are the Basic Functions of Microfilaments? Insights from Studies in Budding Yeast.** The Journal of Cell Biology, 126 (4) : 821-825.

Carden, M. J.; Trojanowski, J. Q.; Schlaepfer, W. W. e Lee, V. M. L. (1987). **Two-stage Expression of Neurofilament Polypeptides During Rat Neurogenesis with Early Establishment of Adult Phosphorylation Patterns.** Journal of Neuroscience, 7 : 3489-3504.

Colley, P. e Routtenberg, A (1993). **Long Term Potentiation as Synaptic Dialogue.** Brain Research Reviews, 18 : 115-122.

de Freitas, M. S.; de Mattos, A. G.; Camargo, M.M.; Wannmacher, C. M. D.e Pessoa-Pureur, R. (1995). **Cytoskeletal-associated Protein Kinase and Phosphatase Activities from Cerebral Cortex of Young Rats.** Neurochemical Research, 20 (8) : 951-956.

de Mattos, A. G.; de Freitas, M. S.; Camargo, M. M. e Pessoa-Pureur, R. (1994). **Developmentally Regulated *in Vitro* Phosphorylation of Cytoskeletal Proteins of Cerebral Cortex of Normal and Malnourished Rats.** *Developmental Neuroscience*, 16 : 38-43.

Desouits, F.; Cohen, D.; Nairn, A. C.; Greengard, P. e Girault, J. A. (1995). **Phosphorylation of DARP-32, a Dopamine and cAMP-regulated Phosphoprotein, by Casein Kinase I *in vitro* and *in vivo*.** *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (15) : 8772-8778.

Diaz-Nido, J.; Serrano, L.; Hernandez, M. A. e Avila, J. (1990). **Phosphorylation of Microtubule Proteins in Rat Brain at Different Developmental Stages: Comparison with that found in Neuronal Cultures.** *Journal of Neurochemistry*, 54 (1) : 211-222.

Garner, J. A. (1988). **Differential Turn-over of Tubulin and Neurofilament Proteins in the Central Nervous System Neuron Terminals.** *Brain Research*, 458: 309-318.

Georges, E.; Lindenbaum, M. H.; Sacher, M. G.; Trifaró, J. e Mushynski, W. E. (1989). **Neurofilament Phosphorylation in Cultured Bovine Adrenal Chromaffin Cells is Stimulated by Phorbol Ester.** *Journal of Neurochemistry*, 52 (4): 1156-1161.

Greenwood, J. A.; Troncoso, J. C.; Costello, A. C. e Johnson, G. V. W. (1993). **Phosphorylation Modulates Calpain-Mediated Proteolysis and Calmodulin Binding of the 200 KDa and 160 KDa Neurofilament Proteins.** Journal of Neurochemistry, 61 (1) : 191-199.

Haas, C. A. e DeGennaro, L. J. (1988). **Multiple Synapsin I Messenger RNAs Are Differentially Regulated During Neuronal Development.** The Journal of Cell Biology, 106 : 195-203.

Hammerschlag, R.; Cyr, J. L.; Brady, S. C. (1994). **Axonal Transport and the Neuronal Cytoskeleton.** In: Siegel, G.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Molinoff, P. B. (eds.) Basic Neurochemistry, 1994, 5th edition, pp 545-572.

Harrison, B. C. e Mobley, P. L. (1992). **Phosphorylation of Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin by Cytoskeletal- Associated Intermediate Filament Protein Kinase Activity in Astrocytes.** Journal of Neurochemistry, 58 (1) : 320-327.

Hawkes, R.; Niday, E. e Gordon, J. (1982). **A Dot Immunobinding Assay for Monoclonal and other Antibodies.** Analytical Biochemistry, 119 : 142-147.

Hebb, D. O. (1949). **The Organization of Behavior.** New York : Wiley.

Hisanaga, S. e Hirokawa, N. (1990). **Dephosphorylation-induced Interactions of Neurofilaments with Microtubules.** The Journal of Biological Chemistry, 265 (35) : 21852-21858.

Hisanaga, S.; Yasugawa, S.; Yamakawa, T.; Miyamoto, E.; Ikebe, M.; Uchiyama, M. e Kishimoto, T. (1993). *Journal of Biochemistry*, 113: 705-709.

Huang, Y.; Li, X. e Kandel, E. R. (1994). **cAMP Contributes to Mossy Fiber LTP by Initiating Both a Covalently Mediated Early Phase and Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase.** *Cell*, 79 : 69-79.

Ito, J.; Hidaka, H. e Sugiyama, H. (1991). **Effects of KN-62, a Specific Inhibitor of Calcium/Calmodulin Protein Kinase II, on a Long Term Potentiation in the Rat Hippocampus.** *Neuroscience Letters*, 121 : 119-121.

Izquierdo, I.; Da Cunha, C.; Rosat, R.; Jerusalinsky, D.; Ferreira, M. B. C. e Medina, J. H. (1992). **Neurotransmitter Receptors Involved in Memory Processing by the Amygdala, Medium Septal and Hippocampus of Rats.** *Behavioral and Neural Biology*, 58 : 16-26.

Izquierdo, I.; Medina, J. H.; Binchin, M.; Walz, R.; Zanatta, M. S.; Da Silva, R. C.; Bueno e Silva, M.; Ruschel, A. C. e Paczko, N. (1993). **Memory Processing by the Limbic System: Role of Specific Neurotransmitter Systems.** *Behavioral Brain Research*, 58 : 91-98.

Jerusalinsky, D.; Quillfeldt, J. A.; Walz, R.; da Silva, R. C.; Medina, J. H. e Izquierdo, I. (1994). **Post-Training Intrahippocampal Infusion of Protein Kinase C Inhibitors**

Causes Amnesia in Rats. Behavioral and Neural Biology, 61 : 107-109.

Johnson, G. V. W. e Jope, R. S. (1988). **Phosphorylation of Rat Brain Cytoskeletal Proteins is Increased after Orally Administered Aluminium.** Brain Research, 456 : 95-103.

Kurosawa, M. (1994). **Phosphorylation and Dephosphorylation of Protein in Regulating Cellular Function.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 31 : 135-139.

Laemmli, U.K. (1970). **Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature, 227 : 680-685.

Lanning, C. L.; Wilmarth, K. R. e Abou-Donia, M. B. (1994). **In Vitro Binding of [14 C] 2,5-Hexanedione to Rat Neuronal Cytoskeletal Proteins.** Neurochemistry Research, 19 (9): 1165-1173.

Lyn-Cook, B. D.; Ruder, F. J. e Wilson, J. E. (1985). **Regulation of Phosphate Incorporation into Four Brain Phosphoproteins that are Affected by Experience.** Journal of Neurochemistry, 44 (2) :552-559.

Lyn-Cook, B. D. e Wilson, J. E. (1983). **Effects of Experiences on Synaptic Protein Phosphorylation *in vitro*.** Pharmacol. Biochem. Behav., 18: 948-952.

Malenka, R. C. (1995). **LTP and LTD : Dynamic and Interactive Processes of Synaptic Plasticity.** *The Neuroscientist*, 1 : 35-42.

Maren, S. e Baudry, M. (1995). **Properties and Mechanisms of Long- Term Synaptic Plasticity in the Mammalian Brain: Relationships to Learning and Memory.** *Neurobiology of Learning and Memory*, 63 : 1-18.

Matus, A. (1988). **Neurotransmitter in the Regulation of Neuronal Cytoarchitecture.** *Brain Research Review*, 13 : 179-212.

Monaco, S.; Autilio-Gambetti, L.; Zabel, D. e Gambetti, P. (1985). **Giant Axonal Neuropathy: Acceleration of Neurofilament Transport in Optic Axons.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 920-924.

Morgan, J. I. e Curran, T. (1991). **Stimulus- Transcription Coupling in the Nervous System : Involvement of the inducible Proto-Oncogenes Fos and Jun.** *Annual Review of Neuroscience*, 14 : 421-451.

Nestler, E. J. e Greengard, P. (1989). **Protein Phosphorylation and the Regulation of Neuronal Function.** In: Hammerschlag et al, : *Molecular, Cellular, and Medical Aspects.* Siegel, G. J.; Agranoff, B.; Albers, R. W.; Molinoff, P., eds. New York, raven Press, pp373-398.

Nixon, R. A.; Paskevich, P. A.; Sihag, R. K. e Thayer, C. Y. (1994). **Phosphorylation**

on Carboxyl Terminus Domains of Neurofilament Proteins in Retinal Ganglion Cell Neurons in Vivo: Influences on Regional Neurofilament Accumulation, Interneurofilament Spacing, and Axonal Caliber. *The Journal of Cell Biology*, 126 (4) : 1031-1046.

Nixon, R. A. e Sihag, R. K. (1991). **Neurofilament Phosphorylation: a New Look at Regulation and Function.** *TINS*, 14 (11): 501-506

O'Dell, T. J.; Kandel, E. R. e Grant, S. G. N. (1991). **Long Term Potentiation in the Hippocampus is Blocked by Tyrosine Kinase Inhibitors.** *Nature*, 363 :558-560.

O'Callaghan, J. P. (1994). **A Potential Role for Altered Protein Phosphorylation in the Mediation of Developmental Neurotoxicity.** *Neurotoxicology*, 15 (1) : 29-40.

Pant, H. C. (1988). **Dephosphorylation of Neurofilament Proteins Enhances their Susceptibility to Degradation by Calpain.** *Biochem. Journal*, 256 : 665-668.

Petit, T. L. (1988). **The Neurobiology of Learning and Memory : Elucidation of the Mechanisms of Cognitive Dysfunction.** *Neurotoxicology*, 9 (3) : 413-428.

Rodnight, R. e Leal, R. (1990). **Regional Variation in Protein Phosphorylation Activity in Rat Brain Studied in Micro-slices Labeled with [³²P] Phosphate.** *Journal of Molecular Neuroscience*, 2: 115-122.

Sacher, M. G.; Athlan, E. S. e Mushynski, W. E. (1994). **Increased Phosphorylation of Amino-terminal Domain of the Low Molecular Weight Neurofilament Subunit in Okadaic Acid-treated Neurons.** The Journal of Biological Chemistry, 269 (28) : 18480-18484.

Schlaepfer, W. W. e Bruce, J. (1990). **Simultaneous Up-regulation of Neurofilament Proteins During the Postnatal Development of the Rat Nervous System.** Journal of Neuroscience Research, 25 : 39-49.

Serrano, P. A.; Beniston, D. S.; Oxonian, M. G.; Rodriguez, W. A.; Rosenzweig, M. R. e Bennett, E. L. (1994). **Differential Effects of Protein Kinase Inhibitors and Activators on Memory Formation in the 2-Day-Old Chick.** Behavioral and Neural Biology, 61: 60-72.

Shelansky, M. L.; Frappier, T.; Georgieff, I.; Troy, C.; Mellado, W. (1994). **Cytoskeleton of Central and Peripheral Neurons.** Journal of the Neurological Sciences, 124 : 33-37.

Shelansky, M. L.; Gaskin, F. e Cantor, C. R. (1973). **Microtubule Assembly in the Absence of Added Nucleotides.** Proceedings of National Academy of Science USA, 3 : 765-768.

Sheu, F.; McCabe, B. J.; Horn, G. e Routtenberg, A. (1993). **Learning Selectively Increases Protein Kinase C Substrate Phosphorylation in Specific Regions of**

the Chick Brain. *Neurobiology*, 90: 2705-2709.

Sihag, R. K. e Nixon, R. A. (1989). **In Vitro Phosphorylation of Distinct Domains of the 70 Kilodalton Neurofilament Subunit Involves Different Protein Kinases.** *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (1) : 457-464.

Sihag, R. K.; Jeng, A. Y. e Nixon, R. A. (1988). **Phosphorylation of Neurofilament Proteins by Protein Kinase C.** *FEBS Letters*, 233 : 181-185.

Sihra, T. S.; Wang, J. K. T.; Gorelick, F. S. e Greengard, P. (1989). **Translocation of Synapsin I in Response to Depolarization of Isolated Nerve Terminals.** *Neurobiology*, 86: 8108-8112.

Soussan, L.; Barzilai, A. e Michaelson, D. M. (1994). **Distinctly Phosphorylated Neurofilament in Different Classes of Neurons.** *Journal of Biochemistry*, 62(2) : 770-776.

Steward, O.; Torre, E. R.; Tomasulo, R. e Lothman, E. (1991). **Neuronal Activity Up-regulates Astroglial Gene Expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 6819-6823.

Svoboda, M.; Meuris, S.; Robin, C. e Christophe, J. (1985). **Rapid Electrotransfer of Proteins from Polyacrilamide to Nitrocelullose Membrane Using Surface-Conductive Glass as Anode.** *Analytical Biochemistry*, 151: 16-23.

Tokutake, S. (1990). **On the Assembly Mechanism of Neurofilaments.** Int. J. Biochem, 22 (1) : 1-6.

Walaas, S. I. e Greengard, P. (1991). **Protein Phosphorylation and Neuronal Function.** Pharmacological Reviews, 43 (3) : 299-349.

Walsh, M. J. e Kuruk, N. (1992). **The Postsynaptic Density : Constituent and Associated Proteins Characterized by Electrophoresis, Immunoblotting and Peptide Sequencing.** Journal of Biochemistry, 59 (2): 667-677.

Watson, D. F.; Fittro, K. P.; Hoffman, P. N. e Griffin, J. W. (1991). **Phosphorylation-related immunoreactivity and the rate of transport of neurofilaments in chronic 2,5-hexanedione intoxication.** Brain Research, 539: 103-109.

Wofchuk, S. T. e Rodnight, R. (1994). **Glutamate Stimulates the Phosphorylation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Slices of Immature Hippocampus Via a Metabotropic Receptor.** Neurochem. Intl., 24: 517-523.

Wolfman, C.; da Cunha, C.; Jerusalinsky, D.; de Stein, M. L.; Viola, H.; Izquierdo, I. e Medina, J.H. (1991). **Habituation and Inhibitory Avoidance Training Alter Brain Regional Levels of Benzodiazepine-like Molecules and are Affected by Flumazenil Microinjection.** Brain Research, 548 : 74-80.

Wolfman, C.; Fin, C.; Dias, M.; Bianchin, M.; da Silva, R. C.; Schmitz, P. K.; Medina, J.H. e Izquierdo, I. (1994). **Intrahippocampal or Intramygdala Infusion of KN-62, a Specific Inhibitor of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II, Causes retrograde Amnesia in the Rat.** Behavioral and Neural Biology, 61 : 203-205.

Yagamata, Y.; Obata, K.; Greengard, P. e Czernik, A. J. (1995). **Increase in Synapsin I Phosphorylation Implicates a Presynaptic Component in Septal Kindling.** Neuroscience 64 (1) : 1-4.

Yu, W. e Bass, P. W. (1994). **Changes in Microtubule Number and Length During Axon Differentiation.** The Journal of Neuroscience, 14 (5) : 2818-2829.

Zhao, W.; Bennet, P.; Sedman, G. L. e NG, K. T. (1995). **The Impairment of Long-term Memory Formation by the Phosphatase Inhibitor Okadaic Acid.** Brain Research Bulletin, 36 (6): 557-561.