

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO**

**Modelo computacional dos mecanismos pós-
sinápticos da potenciação sináptica de longa duração
inicial NMDA-dependente em células piramidais
hipocampais CA1**

Gabriela Antunes

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto para obtenção do título
de Doutor em Ciências na área de
concentração: Psicobiologia

**Ribeirão Preto – SP
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO**

**Modelo computacional dos mecanismos pós-
sinápticos da potenciação sináptica de longa duração
inicial NMDA-dependente em células piramidais
hipocampais CA1**

Gabriela Antunes

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto para obtenção do título
de Doutor em Ciências na área de
concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Roque da Silva Filho

Ribeirão Preto – SP

2007

Antunes, Gabriela

“Modelo computacional dos mecanismos pós-sinápticos da potenciação sináptica de longa duração inicial NMDA-dependente em células piramidais hipocampais CA1”

Ribeirão Preto, 2007

Tese (Doutorado) – Área de Psicobiologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto
2007, 322 páginas

Orientador: Prof. Antônio Carlos Roque da Silva Filho

1. LTP. 2. neurociência computacional. 3. AMPA. 4. NMDA. 5.vias de sinalização.

Agradeço

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, por ter financiado esse trabalho;

Ao meu orientador, Prof. Antônio Carlos Roque da Silva Filho;

À minha família;

Aos meus amigos.

E agradeço, especialmente,

Ao prof. Mark Dell'Acqua, por ter me recebido em seu laboratório no Departamento de Farmacologia da Universidade do Colorado, em Denver, por ter respondido, pacientemente, muitas das minhas dúvidas, e, acima de tudo, por ter me contagiado com seu entusiasmo pelo estudo dos mecanismos de plasticidade sináptica;

Ao prof. James E. Ferrel Jr. da Universidade de Stanford, que, gentilmente, me cedeu um de seus scripts, o que foi fundamental para a maneira com que esse trabalho foi conduzido.

E agradeço, mais do que especialmente,

Ao meu marido, Fábio, pelo apoio e paciência.....

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
I. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 A plasticidade sináptica de longa duração, o hipocampo e a memória	3
1.2 A LTP hipocampal inicial.....	9
1.3 O aumento do peso sináptico: os movimentos do AMPA.....	16
1.4 A Neurociência Computacional.....	26
II. MÉTODOS.....	31
III. O MODELO.....	39
3.1 O modelo do neurônio piramidal hipocampal CA1.....	39
3.2 Os receptores de L-glutamato ionotrópicos: AMPA e NMDA	43
3.3 A liberação intracelular de Cálcio e a via da PKC convencional	56
3.4 Dinâmica de Cálcio.....	65
3.5 O complexo Ca ²⁺ /Calmodulina.....	67
3.6 CaMKII.....	71
3.7 A via da PKA.....	75
3.8 A via da MAPK ERK1/2	80
3.9 Via da NOS: formação de NO	86
3.10 Fosfatases.....	92
IV. RESULTADOS	101
4.1 A Validação do Modelo.....	101
4.2 A LTP inicial e as propriedades intrínsecas de suas moléculas: a decodificação temporal	127
4.3 A LTP inicial e as propriedades de sua rede de sinalização: amplificação, coordenação e integração temporal.....	145
4.4 O NMDA, a compartimentalização bioquímica e a integração espaço-temporal da LTP	165
4.5 O aumento do peso sináptico e os movimentos do AMPA	179
V. DISCUSSÃO	191
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	207
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	211
VIII. ANEXOS I.....	293

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Localizações do AMPA nos neurônios piramidais da área CA1. Existem, basicamente, três localizações distintas do AMPA nos neurônios piramidais da área CA1: a zona sináptica, que fica imediatamente oposta aos sítios pré-sinápticos de liberação de vesículas de L-glutamato, a região extra-sináptica, localizada adjacente à zona sináptica, e o meio intracelular, que concentra cerca de 60% desses receptores armazenados em vesículas denominadas endossomas.....18
- Figura 2: AMPA e seus movimentos durante a atividade sináptica basal. O AMPA é formado por combinações das subunidades protéicas denominadas GluR1, GluR2 e GluR3 (A), que, estruturalmente, se distinguem pelo tamanho de sua cauda, entre outras propriedades. Assim, enquanto as subunidades GluR2 e GluR3 contém cauda curta, a subunidade GluR1 possui cauda longa (B). Essas subunidades se combinam formando os tetrâmeros GluR2/GluR3 e GluR1/GluR2 (B). A composição heteromérica do AMPA está diretamente implicada com os seus movimentos em condições de atividade celular basal. Nessas condições, enquanto os heterômeros GluR2/GluR3 possuem ciclos de entrada e saída na membrana citoplasmática (flechas pontilhadas), os AMPAs GluR1/GluR2 difundem-se, lateralmente, e alternam-se entre a zona sináptica e extra-sináptica (flechas contínuas) (C).....19
- Figura 3: AMPA e seus movimentos durante a ocorrência de LTD. Os heterômeros GluR2/GluR3, que são mantidos estabilizados na zona sináptica através de suas associações com as proteínas GRIPs/ABPs, durante a LTD, são fosforilados pela PKC, através da mediação das proteínas citoplasmáticas PICKs, que se associam aos receptores. Uma vez fosforilados, os AMPAs GluR2/GluR3, associados às PICKs, difundem-se até sítios de endocitose, localizados lateralmente em relação à zona sináptica, onde são, posteriormente, internalizados.....20
- Figura 4: AMPA e seus movimentos durante a ocorrência de LTP. Durante a LTP, apenas os heterômeros GluR1/GluR2 parecem sofrer uma alteração significativa em sua densidade de canais na zona sináptica. Dois movimentos desses heterômeros são observados: seu acúmulo na zona sináptica, através de sua difusão lateral, a partir de áreas extra-sinápticas, e posterior estabilização, em função de sua associação com proteínas específicas como as TARPs, e a inserção de novos receptores, provenientes de vesículas intracelulares, na membrana celular. Tanto o acúmulo de receptores na região sináptica quanto sua inserção na membrana requerem fosforilações catalisadas por diversas quinases.....21
- Figura 5: Esquematização geral do modelo da LTP inicial desenvolvido. O modelo foi construído contendo o neurônio piramidal da área CA1 (A) e, em uma de suas espinhas dendríticas, que são pequenas protusões encontradas ao longo dos dendritos (B), foram inseridas as vias bioquímicas da LTP inicial, representadas, em C, apenas por algumas enzimas (CaMKII, PKA, PKC e ERK1/2).....34
- Figura 6: Representação esquemática da construção do modelo compartimental. Para o desenvolvimento do modelo compartimental, o neurônio é representado através de pequenos segmentos, simulados a partir de circuitos equivalentes unidos entre si através de resistividades do meio intracelular (R_a).....39
- Figura 7: A espinha dendrítica e a representação de seu modelo computacional. A espinha dendrítica é uma pequena protusão encontrada ao longo dos dendritos dos neurônios, que atua na recepção da maior parte das entradas sinápticas excitatórias. Geralmente, essas

espinhas possuem uma cabeça e um pescoço (A), cujas dimensões foram consideradas no desenvolvimento de seu modelo. A simulação da espinha dendrítica foi feita com três compartimentos, sendo dois para representar a cabeça, separados por uma linha pontilhada, e um compartimento para o pescoço, que conecta a cabeça ao seu dendrito parental (B). Cada compartimento foi simulado através de seu circuito equivalente (C).42

Figura 8: Esquema geral dos receptores AMPA simulados. Os receptores AMPA foram simulados como duas populações, sendo uma composta pelos heterômeros GluR1/GluR2 e a outra pelos GluR2/GluR3. Os AMPAs GluR2/GluR3 foram simulados como uma população imóvel de receptores sinápticos, já os GluR1/GluR2s foi considerados em três localizações distintas: na zona sináptica, extra-sináptica e em vesículas intracelulares. Apenas os GluR2/GluR3s e os GluR1/GluR2s sinápticos mediam a transmissão glutamatérgica no modelo. E essa mediação pode ser alterada em função da presença de TARPs, proteínas transmembrânicas que podem se associar com ambos os heterômeros.47

Figura 9: A recepção de L-glutamato. O L-glutamato é liberado da zona ativa, localizado nos terminais axônicos pré-sinápticos. Nesses terminais, as vesículas de neurotransmissor são armazenadas até serem excitadas, liberando-o na fenda. Nessa região, em função do grande número de transportadores de L-glutamato existentes em células glias e nos próprios neurônios, esse neurotransmissor atua, apenas por um breve intervalo de tempo, ativando os receptores sinápticos. Os receptores extra-sinápticos, em função de sua localização desfavorável, não participam na recepção de L-glutamato.....48

Figura 10: Esquema cinético do receptor AMPA utilizado para a construção de seus modelos computacionais. Nesse esquema é considerada a associação do receptor desativado com o L-glutamato (●), sua passagem para os seus estados abertos (ativados) e estados dessensibilizados leves e profundos.....49

Figura 11: Modelo cinético do NMDA. O NMDA pode se associar ao L-glutamato (●) tanto em seu estado bloqueado por Mg^{2+} (quadrados) quanto em seu estado desbloqueado (círculos). Uma vez associado a duas moléculas de L-glutamato, o canal pode abrir ou entrar em um de seus dois estados dessensibilizados (representados por círculos e quadrados não preenchidos).....54

Figura 12: Ciclo de ativação da proteína G trimérica e da PLC β . A proteína G é um trímero formado pelas subunidades α , β e γ que, em seu estado inativo, permanece associado ao nucleotídeo GDP. Porém, a chegada de um estímulo na célula leva à dissociação do GDP e a associação do GTP em sua subunidade α que, nesse estado, ativa a PLC β . Por sua vez, a PLC β também age sobre a subunidade α , promovendo uma aceleração em sua atividade de GTPase, e ocasionando a sua volta ao seu estado inativo.59

Figura 13: A via de ativação da PKC convencional. Para se tornar ativa, a PKC requer sua associação ao Ca^{2+} , o que determina sua translocação até a membrana celular. Na membrana, essa enzima se associa ao DAG, produto da hidrólise de PIP $_2$ catalisada pela PLC β . Com base nesse seu requerimento, a ativação da PKC envolve a atuação de mGluRs.61

Figura 14: Esquema cinético de ativação do receptor de IP $_3$. O receptor de IP $_3$ é um tetrâmero que contém, em cada monômero, um sítio para a associação de IP $_3$ (círculos) e um para a associação de Ca^{2+} (quadrados). A ligação tanto de Ca^{2+} quanto de IP $_3$ (representada pelos sítios de associação em preto) pode ocorrer de maneira isolada, ou simultaneamente. Mas, no modelo do receptor de IP $_3$ simulado, é necessário que haja IP $_3$ associado ao receptor para o seu canal abrir. Ou seja, nesse modelo, o Ca^{2+} possui um caráter apenas modulador sobre a ativação desses receptores.64

Figura 15: Modelo de interação entre a neurogranina (Ng) e a CaM. A neurogranina se associa preferencialmente a CaM em ausência de Ca^{2+} , no entanto, ela também pode

interagir com o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, embora com afinidade menor. Dessa maneira, a elevação na concentração intracelular de Ca^{2+} não causa uma dissociação imediata entre a neurogranina e a CaM, e complexos contendo as duas proteínas e o Ca^{2+} podem existir.70

- Figura 16: Esquema do modelo de ativação da CaMKII. A CaMKII requer a associação de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ em sua estrutura para iniciar sua reação de autofosforilação, processo que ocorre através da ligação dessa enzima com o complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$, ou ainda com os $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$ e $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$. Uma vez autofosforilada (CaMKII*), a CaMKII pode se dissociar de Ca^{2+} e, em seguida, de CaM, o que ocorre com taxas lentas, permanecendo autônoma (CaMKII**). Em seu estado autônomo, a CaMKII** pode se autofosforilar novamente, o que impede, posteriormente, a sua reassociação com seus ativadores.73
- Figura 17: Via de ativação da PKA. A $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, formada a partir da ativação de receptores NMDA, determina a ativação tanto da AC quanto da PDE, enzimas que atuam na produção e degradação, respectivamente, do AMPc, segundo mensageiro que atua promovendo a ativação da PKA.76
- Figura 18: Esquema para a simulação da ativação da AC e da PDE. Nesse esquema, foi considerado a AC e a PDE, representadas, de maneira genérica, por E, podem interagir todas as espécies de CaM associadas ao Ca^{2+} ($(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$ e $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$). No entanto, apenas a associação dessas enzimas com o complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$ resulta em suas ativações.77
- Figura 19: A ativação da PKA. A PKA é um tetrâmero formado por duas subunidades R e duas subunidades C. A associação de quatro moléculas de AMPc, duas em cada subunidade R, determina uma mudança em sua estrutura que promove a liberação de suas subunidades catalíticas ativas no meio intracelular.79
- Figura 20: Via da MAPK ERK1/2. A ativação da ERK1/2 promovida pelos receptores NMDA inicia-se com a entrada de Ca^{2+} na célula e a ativação da enzima Ras-GRF. A Ras-GRF catalisa a ativação da Ras, proteína G monomérica que atua no recrutamento e ativação da MAPKKK denominada Raf-1, que age fosforilando e ativando a MEK1/2. Por fim, a MEK1/2 determina a ativação da ERK1/2.85
- Figura 21: Etapas para a formação de NO catalisada pela NOS. A enzima NOS, em seu estado ativo, converte a L-arginina em NO, através de dez reações de óxido-redução que ocorrem seqüencialmente.90
- Figura 22: Esquema de ativação da calcineurina. A calcineurina precisa estar associada a dois Ca^{2+} em sua subunidade CaNB para poder se ligar às espécies de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. E, embora a calcineurina seja capaz de se ligar a CaM com menos de quatro Ca^{2+} , a enzima só é ativada através de sua associação com a $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$95
- Figura 23: Resposta do modelo do neurônio piramidal CA1 para diferentes injeções de corrente aplicadas em seu soma. Para verificar se o modelo simulado nesse trabalho apresenta o mesmo comportamento que o desenvolvido por Traub et al. (1991), ele foi estimulado por diferentes valores de corrente, injetadas diretamente no soma, o que resultou nos padrões de disparos mostrados em A. Em B, é mostrado, em detalhe, a resposta do neurônio simulado nesse trabalho para uma corrente 0.25 nA e, logo abaixo, a resposta do modelo de Traub et al. (1991), evidenciando a concordância na resposta obtida nesse trabalho em comparação com o original.102
- Figura 24: Curva de frequência de disparos do modelo do neurônio piramidal da área CA1 em função da corrente injetada no seu soma. De acordo com os registros elétricos obtidos através da estimulação por injeção de corrente dos neurônios piramidais da área CA1 do hipocampo, sabe-se que eles apresentam um aumento na frequência de disparos, em

- função da magnitude da corrente utilizada como estímulo, resultado que foi obtido no modelo.....103
- Figura 25: Padrão de ativação e desativação dos heterômeros do AMPA simulados. De acordo com a literatura experimental, o AMPA atua na transmissão glutamatérgica rápida, e possui um padrão de ativação e desativação de poucos milissegundos. Com base nesse aspecto, para verificar se os dois modelos do AMPA simulados apresentam esse padrão, eles foram estimulados com um único pulso de L-glutamato (1 mmol.L^{-1}), com duração de 1 ms. Como é observado, a resposta obtida com os modelos está em concordância com os padrões temporais de ativação e desativação do AMPA, que apontam para um tempo de abertura total de 5 ms em análises similares (Swanson et al., 1997; Benke et al., 1998; Banke et al., 2003; Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005; Pei et al., 2007). .104
- Figura 26: A dessensibilização dos heterômeros GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 simulados. O AMPA apresenta uma dessensibilização profunda que é verificada, experimentalmente, através de sua exposição para pulsos longos de L-glutamato. Para verificar esse comportamento nos AMPAs simulados, seus modelos foram expostos a um pulso longo de L-glutamato, com duração total de 1 s, e intensidade de 1 mmol.L^{-1} . Os resultados obtidos mostram um tempo de abertura total de cerca de 10 ms, para os dois heterômeros simulados, o que está em acordo com os valores reportados na literatura (Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005; Mitchell e Fleck, 2007).105
- Figura 27: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do AMPA GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 simulados em função de sua estimulação por padrões oscilatórios de L-glutamato. Para verificar os padrões de ativação e desativação dos heterômeros AMPA simulados, os modelos foram expostos a diferentes freqüências de L-glutamato, constituídas por pulsos de duração de 0.1 ms (A e B) e 1 ms (C e D). Nessas situações, dez receptores de cada composição foram expostos a 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato. Em A e C, os heterômeros GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 são expostos para os mesmos padrões de freqüência de L-glutamato (10 Hz), mas com diferentes durações por pulso (0.1 ms para A e 1 ms para C). Já em B e D, os receptores simulados foram estimulados por pulsos de L-glutamato com freqüência de 5 Hz. Nesses gráficos, é possível notar que, enquanto para o pulso de duração menor (A e B), independente da freqüência considerada, há períodos de somação na corrente observada nos dois heterômeros, seguidos por períodos de dessensibilização. Já em C e D, que foram estimulados por freqüências de L-glutamato compostas por pulsos de duração maior, o padrão de corrente registrado mostra uma resposta composta por uma dessensibilização inicial, seguida por um período de estabilização. Cabe ressaltar que a estimulação com pulsos de 1 ms de duração aproxima-se mais do período de permanência de L-glutamato na fenda sináptica (Diamond e Jahr; 1997). Além disso, também vale notar que, para todas as situações mostradas, o heterômero GluR1/GluR2 apresenta uma ativação maior.107
- Figura 28: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do AMPA GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 para pulsos de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato com freqüência de 100 Hz. Quando os heterômeros simulados são estimulados com 100 Hz, com pulsos de 1 ms de duração, o que se nota é uma grande dessensibilização do GluR1/GluR2, determinando que sua ativação seja menor. Não há dados na literatura sobre o comportamento dos diferentes heterômeros do AMPA, mas, provavelmente, esse comportamento origina-se de uma taxa mais lenta de recuperação após a dessensibilização.109
- Figura 29: Curva dose-resposta para a ativação dos heterômeros simulados em função do L-glutamato. Não há registros sobre essas curvas para os AMPAs heteroméricos, no entanto, considerando os dados sobre os AMPAs homoméricos, os resultados obtidos com o modelo estão dentro da faixa de EC_{50} , ou seja, concentração de L-glutamato requerida para que o AMPA apresente metade de sua ativação máxima, que fica em

torno de 10-50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para o AMPA sem TARP, com pequenas variações em função das subunidades que compõem o receptor, e em torno de 1 mol.L^{-1} para o AMPA associado às TARPs (Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005; Kott et al., 2007).110

Figura 30: Diferenças na ativação e desativação dos AMPAs em função de sua associação com as TARPs. Para observar as diferenças entre o AMPA com e sem TARP, a mesma situação de estimulação foi simulada duas vezes. Em cada vez, 20 AMPAs, sendo 10 de cada composição heteromérica, foram expostos a um único pulso de L-glutamato de 1 mmol.L^{-1} . No AMPA nativo, a presença de TARPs causa um brutal aumento na corrente mediada pelo seu canal em função, principalmente, de uma diminuição na taxa de dissociação dos heterômeros com o L-glutamato. Esse padrão foi observado no modelo do AMPA com TARP, mostrado em B, que apresenta uma corrente duas vezes maior do que o modelo do AMPA sem TARP, mostrado em A, além de um maior tempo de abertura. Além disso, como é possível notar, independente da presença de TARP, as diferenças mencionadas anteriormente sobre a ativação dos heterômeros GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 são mantidas, ou seja, o GluR1/GluR2 apresenta uma ativação maior.111

Figura 31: A dessensibilização dos heterômeros do AMPA GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 com TARP. Para verificar a dessensibilização dos tipos de AMPA simulados, seus modelos foram expostos a um pulso longo de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato, com duração total de 1 s. Os resultados obtidos indicam a maior resistência à dessensibilização nos heterômeros simulados com TARP em comparação com os heterômeros sem TARP (Fig. 26), o que está de acordo com os dados reportados sobre o efeito dessa proteína (Tomita et al., 2003; Nicoll et al., 2006; Kott et al., 2007).112

Figura 32: Diferenças na ativação e desativação dos AMPAs em função de sua associação com as TARPs para 100 Hz de estimulação. Os GluR1/GluR2s e GluR2/GluR3s sem e com TARP foram estimulados por pulsos 100 Hz de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato, com pulsos de duração de 0.1 ms. Em A é mostrada a resposta dos dois heterômeros sem associação às TARPs e, em B, com as TARPs. Nesses gráficos, evidencia-se a grande diferença que a presença de TARP produz na magnitude da resposta e na dessensibilização dos dois heterômeros.113

Figura 33: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do NR1/NR2A e NR1/NR2B do NMDA simulados. Os dois heterômeros (10 receptores de cada tipo) foram expostos a pulsos de 0.1 ms e 1 ms de duração (A e B, respectivamente) de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato. Durante essas estimulações, a voltagem foi grampeada em -50 mV. Como é possível notar, há uma ativação superior em amplitude do heterômero NR1/NR2A, embora o NR1/NR2B responda por um período de tempo mais longo. Além disso, cabe notar que a corrente mediada pelo NMDA é muito superior a do AMPA, quando se considera o mesmo número de receptores, já que a condutância unitária do NMDA é maior em várias ordens de magnitude.115

Figura 34: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do NR1/NR2A e NR1/NR2B do NMDA. O comportamento dos heterômeros NR1/NR2A e NR1/NR2B foi analisado com estimulação composta por 10 Hz e 100 Hz, com pulsos de 0.1 ms e 1 ms de duração, e 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato. Durante essas estimulações, a voltagem foi grampeada em -50 mV. Como é possível notar, há uma ativação maior e amplitude do heterômero NR1/NR2A para todas as situações mostradas. Além disso, a estimulação composta por pulsos de 0.1 ms (A e C) produz uma resposta consideravelmente menor, em função da taxa mais lenta de associação ao L-glutamato do NMDA. Dessa maneira, a estimulação com pulsos mais longos, de 1 ms (B e D), produz uma corrente cerca de 2 vezes maior, independente da frequência considerada.116

Figura 35: A resposta de alguns componentes do neurônio simulado para a estimulação por L-glutamato. Nessa simulação, o modelo do neurônio piramidal foi estimulado por um

- pulso de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato, com duração de 1 ms, aplicado diretamente na zona sináptica da espinha dendrítica. A presença de L-glutamato, mesmo que por um breve intervalo de tempo como ocorre em uma sinapse (Diamond e Jahr, 1997) determinou, no modelo, o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, mostrado à direita, em função da abertura dos canais ligados aos receptores NMDA, à esquerda. Cabe ressaltar que a grande magnitude na concentração de Ca^{2+} observada se deve ao tamanho reduzido da espinha dendrítica e está em acordo com valores obtidos experimentalmente (Sabatini et al., 2002).117
- Figura 36: Curvas dose-resposta da CaM e da neurogranina. A curva para a formação do complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$ em função da concentração de Ca^{2+} livre indica um valor de EC_{50} da ordem de 10 mol.L^{-1} e acordo com os dados medidos experimentalmente (Olwin et al., 1985; Cox, 1988; Bayley et al., 1996; Persechini et al., 2000). Já a curva para os valores de CaM livre obtidos em função da concentração de neurogranina indicam a redução da concentração de CaM para 50% de seu valor inicial para concentrações de neurogranina em torno de 10 mol.L^{-1} (Baudier et al., 1989; Gerendasy et al., 1994). ...118
- Figura 37: Curvas dose-resposta da CaMKII, da calcineurina e da NOS. Para as enzimas que dependem de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, as curvas foram traçadas mantendo-se a concentração de CaM constante e variando-se apenas a concentração de Ca^{2+} . Em A é mostrada a curva a CaMKII indicando EC_{50} de cerca de $0.5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Hanson e Schulman, 1992; Gaertner et al., 2004b). Em B é mostrada a curva da fosfatase calcineurina, com EC_{50} de cerca de $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Kincaid e Vaughan, 1986; Stemmer e Klee, 1994; Feng e Stemmer, 2001). E em C é demonstrada a curva da NOS, que possui EC_{50} de aproximadamente $0.5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Bredt e Snyder, 1990).120
- Figura 38: Curvas dose-resposta da PDE, da AC e da PKA. Em A é mostrada a curva dose resposta da PDE, com EC_{50} de cerca de $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Cox et al., 1981; Huang et al., 1981). Em B é mostrada a curva bifásica da AC, que é inibida por concentrações de Ca^{2+} altas (Ferguson e Storm, 2004). E, em C, é vista a curva dose-resposta da PKA, ativada por AMPc, com EC_{50} de aproximadamente $0.1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Gibson e Taylor, 1997; Francis e Corbin, 1999).121
- Figura 39: Curvas dose-resposta para os componentes da via da PKC. Em A é mostrada a curva dose-resposta para a ativação do mGluR em função da concentração de L-glutamato, com EC_{50} de $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Martin et al., 1993; Jensen et al., 2003). Em B é mostrada a curva para a taxa de GTPase da proteína G, em função da concentração de GTP (Mukhopadhyay e Ross; 1999). Em C é mostrada a curva de probabilidade de abertura do canal do receptor de IP_3 em função da concentração de Ca^{2+} , evidenciando seu característico padrão bifásico (Bezprozvanny et al., 1991; Mak et al., 2003). Já em D é demonstrada a curva de ativação da PKC em função da concentração de Ca^{2+} livre e na presença de diferentes concentrações de DAG ($1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$), indicando o requerimento dos dois ativadores para a máxima ativação da enzima (Keranen e Newton, 1997; Kohout et al., 2001). A curva com atividade máxima se refere a presença de $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DAG, seguida pelas curvas de $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$123
- Figura 40: Curvas para caracterização da Ras e da Raf-1. Como não foram encontrados os valores de EC_{50} para a Ras, sua validação foi feita através da curva da concentração de Ras-GRF necessária para que a Ras apresente metade de sua concentração livre de GDP (A). Já para a validação da Raf-1 (B), não foram encontrados valores de EC_{50} . Em C é mostrado o padrão de ativação da via da MAPK ERK1/2, indicando a alta cooperatividade de ativação da ERK1/2.125
- Figura 41: As enzimas essenciais da LTP e seus mecanismos de ativação. A LTP inicial hipocampal NMDA-dependente requer, basicamente, a ativação de apenas quatro

- enzimas: a CaMKII, a PKA, a PKC e a MAPK ERK1/2, que, no modelo, foram simuladas a partir de seus mecanismos de ativação e regulação induzidos através, exclusivamente da estimulação celular com L-glutamato. 127
- Figura 42: A atividade oscilatória da PKC em função de sua estimulação por estímulos oscilatórios de Ca^{2+} . A PKC é altamente sensível às variações temporais na concentração de Ca^{2+} , característica que pode ser observadas nas curvas acima que mostram a ativação dessa enzima ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), em função de sua estimulação por pulsos de 10 ms de Ca^{2+} , sendo cada um de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ 130
- Figura 43: Ativação da CaMKII para diferentes frequências de Ca^{2+} . A CaMKII ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), nesses exemplos, foi estimulada por pulsos de 10 ms de Ca^{2+} , sendo cada um de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e em presença de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. Embora a CaMKII seja altamente sensível ao Ca^{2+} , essa sensibilidade é mais evidente para suas espécies que se associam diretamente ao Ca^{2+} , como pode ser visto em A, em que é mostrada a resposta da CaMKII autofosforilada ligada ao complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$. Em B é mostra sua espécie associada à ApoCaM (CaMKII *trapped*), que, em ausência de Ca^{2+} , representa grande parte de sua porcentagem ativa. 132
- Figura 44: Formação das espécies de CaM associadas ao Ca^{2+} em função de padrões oscilatórios de variação na concentração desse íon. A CaM pode apresentar quatro espécies ligadas ao Ca^{2+} , $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$ e $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$, que se alternam em magnitude, indicada por porcentagem de ativação, de acordo com a amplitude, duração e frequência dos pulsos de Ca^{2+} utilizados com estímulo. Para exemplificar esses comportamentos, em A é mostrada a resposta da CaM para pulsos de 5 Hz de Ca^{2+} , com concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e em B, a resposta para 100 Hz de Ca^{2+} , com concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por pulso. 134
- Figura 45: Estimulação da via da PKA para diferentes frequências de Ca^{2+} , compostas por pulsos de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com 10 ms de duração por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, em presença de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. Como é possível observar em A, enquanto a ativação da AC mostra um alto grau de variação oscilatória, acompanhando as frequências de Ca^{2+} , a PKA, mostrada em B, é ativada de maneira contínua, sem sofrer o efeito da variação temporal da AC. No entanto, esse padrão de ativação da AC pode permitir, durante a LTP, que a PKA seja ativada em função de uma variação breve na concentração intracelular de Ca^{2+} 135
- Figura 46: Ativação da Ras-GRF e da Ras para diferentes frequências de Ca^{2+} , compostas por pulsos de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com 10 ms de duração por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, em presença de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. No modelo de LTP inicial desenvolvido nesse trabalho, a ativação da ERK1/2 é mediada pelo Ca^{2+} através da ativação da Ras-GRF, mostrada em A, que requer $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ para se tornar ativa. Como é possível notar, enquanto a Ras-GRF é altamente sensível às oscilações de Ca^{2+} , acompanhando seu padrão pulsátil de variação, a Ras, em B, responde às oscilações da Ras-GRF apenas em magnitude de ativação, e transmite essa resposta para as demais enzimas da via. 136
- Figura 47: Ativação da PDE e da calcineurina por diferentes frequências de Ca^{2+} , compostas por pulsos de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com 10 ms de duração por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, em presença de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. Como é demonstrado, apesar de serem ativadas diretamente por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, nem a PDE (A) nem a calcineurina (B) apresentam atividade oscilatória. Além disso, há uma porcentagem de ativação bastante reduzida dessas enzimas em comparação com a ativação das demais moléculas mostradas, estimuladas pelos mesmos protocolos de estimulação. Vale atentar, no entanto, para ativação persistente da PDE, que retém a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ em sua estrutura. 137

- Figura 48: A sensibilidade intrínseca de algumas enzimas implicadas com a LTP às oscilações de Ca^{2+} . Para verificar como as moléculas simuladas respondem a diferentes padrões de estímulos de Ca^{2+} , elas foram expostas, individualmente ou em presença de CaM, para os casos das moléculas que não se ligam diretamente a esses íons, a nove protocolos distintos, que variaram em concentração de Ca^{2+} (1: 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 2: 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 3: 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), e em frequência de oscilação (1: 2 Hz, 2: 5 Hz, 3: 20 Hz, 4: 100 Hz). Com esses padrões de estimulação, utilizando sempre uma concentração de 0.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da molécula analisada, foi possível perceber que há uma grande diferença no comportamento dessas enzimas frente ao Ca^{2+} . Para quantificar essa diferença, a curva de concentração do estado ativo de cada molécula simulada, obtida em função de cada protocolo usado, foi integrada. O valor máximo obtido com essa integração foi considerado como 100% de ativação. E, os demais valores, foram transformados em porcentagem de ativação em função do valor definido como 100%. Com esse procedimento, foi possível observar que a ativação das enzimas mostradas é maior conforme se utiliza protocolos de estimulação compostos por pulsos com intensidade maior e apresentados em altas frequências, como ocorre durante a indução de LTP..... 138
- Figura 49: A sensibilidade da calcineurina às oscilações de Ca^{2+} . Para verificar como a calcineurina responde ao Ca^{2+} , foram utilizadas 3 concentrações diferentes de Ca^{2+} (1: 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 2: 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 3: 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), com frequências de oscilações distintas (1: 2 Hz, 2: 5 Hz, 3: 20 Hz, 4: 100 Hz). Com esses padrões de estimulação, e utilizando 0.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da calcineurina, foi possível observar que essa enzima requer uma grande variação na concentração de Ca^{2+} para se tornar ativa. Mas, vale ressaltar que, nesse gráfico, a porcentagem de ativação da enzima foi calculada a partir da integração da área de sua curva de ativação. Nesse sentido, a ativação mais alta obtida para um protocolo específico foi considerada como 100 %. Os demais valores de ativação foram colocados em porcentagens a partir desse valor máximo. Portanto, vale ressaltar que, nessas situações, embora não seja demonstrado, a ativação da calcineurina, em concentração, é, sempre, baixa. 139
- Figura 50: A inativação da CaMKII pela PP1. A CaMKII é uma das enzimas principais para a ocorrência de LTP e destaca-se das demais por possuir um complexo padrão de autofosforilação, que possibilita sua permanência em um estado ativo autônomo. No entanto, a presença de fosfatases rapidamente causa sua inativação, através de sua desfosforilação. Para ilustrar esse processo, o modelo da CaMKII (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi estimulado por 1 s por Ca^{2+} (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), em presença de CaM (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), o que promoveu a rápida autofosforilação da enzima. Em seguida, com o término do estímulo de Ca^{2+} , a CaMKII passa de seu estado autofosforilado para o *trapped*. Para verificar a ação da fosfatase PP1 nesse processo, no período de 3 a 4 s, uma concentração de PP1 (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), foi inserida no modelo e depois retirada. Rapidamente, as duas espécies de CaMKII foram inativadas. 140
- Figura 51: O padrão de aumento na concentração de Ca^{2+} em função da indução de LTP por um pulso de 100 Hz de L-glutamato durante 1s. A LTP é induzida por protocolos específicos de estimulação que determinam a rápida ativação dos receptores AMPA, seguida pela despolarização local da membrana celular, o que determina a ativação dos receptores NMDA, cuja corrente é mostrada à esquerda, e, em consequência, um intenso aumento na concentração local de Ca^{2+} , mostrado à direita. 142
- Figura 52: As enzimas que integram o modelo simulado. A LTP inicial hipocampal requer a ativação de quatro proteínas: a CaMKII, a PKC, a PKA e a ERK1/2. No entanto, no meio intracelular, existem diversas moléculas que atuam determinando a inativação dessas enzimas. Por essa razão, a compreensão da LTP envolve, necessariamente, a análise dos mecanismos que possibilitam que moléculas específicas sejam preferencialmente

ativadas. Entre essas moléculas destacam-se a CaMKII, que pode ser inativada pela PP1 e pela PP2A, a PKC, a PKA, cuja ativação é regulada, indiretamente, pela PDE1, representada por PDE, e pela PDE10, e a ERK1/2, que é inativada pela fosfatase MKP e, indiretamente, pela PP2A, além de ser regulada pela SynGAP, enzima que acelera a taxa de inativação da Ras. Cabe ainda ressaltar que a SynGAP pode atuar sobre a Ras tanto em seu estado desfosforilado, que é catalisado pela calcineurina (CaN), quanto após a sua fosforilação por CaMKII, fato que aumenta a sua atividade sobre a Ras.144

Figura 53: Ativação das enzimas essenciais da LTP, em função de 1 s de estimulação por pulsos de 1 mol.L^{-1} de L-glutamato simulados com 100Hz de frequência, considerando sua organização intracelular juntamente com a ação de fosfatases e demais moléculas. As proteínas requeridas para a indução de LTP inicial, ou seja, a ERK1/2, a PKA, a PKC e a CaMKII, indicada em dois estados de ativação (autofosforilada e *trapped*), apesar de serem altamente sensíveis ao aumento intracelular na concentração de Ca^{2+} , fato que determina que elas sejam capazes de se tornarem ativas mesmo em decorrência de variações breves na concentração desse íon, não permanecem persistentemente ativas quando se considera a coordenação entre a suas ativações e a ação das fosfatases, PDEs e da SynGAP. Nesse sentido, a compreensão da ocorrência de LTP requer, necessariamente, que a organização temporal e espacial entre seus componentes seja considerada.145

Figura 54: O efeito da neurogranina sobre a formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. A neurogranina é uma proteína de interação com a ApoCaM que mantém a CaM armazenada em concentrações basais de Ca^{2+} . Mas, além disso, ela dificulta a formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, por promover uma aceleração na taxa de dissociação do Ca^{2+} . Com isso, mesmo diante de uma forte estimulação (100 Hz de Ca^{2+} , com 10 ms de duração por pulso, para $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM), apenas a presença de neurogranina ($100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) é capaz de suprimir quase totalmente a formação da espécie $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$148

Figura 55: A neurogranina e o papel da PKC na amplificação de sinal da LTP inicial. Para verificar a ação da PKC no término da interação entre a neurogranina e a CaM, o modelo dessas proteínas foi isolado das demais e, inicialmente, a concentração de PKC foi mantida em zero. A neurogranina permaneceu, no início da simulação, em presença de CaM ($10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada uma) e Ca^{2+} ($20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, por um período de 2 s, o modelo foi exposto à PKC ativa ($1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). Como é possível observar, apenas a presença momentânea de PKC ativa já é suficiente para fosforilar a neurogranina e impedir a formação do complexo entre essa proteína e a ApoCaM.149

Figura 56: A neurogranina e o papel da PKC e da NOS na amplificação de sinal da LTP inicial. Para verificar a ação da PKC e da NOS no término da interação entre a neurogranina e a CaM, o modelo dessas proteínas foi isolado das demais e, inicialmente, a concentração de PKC e NOS foi mantida em zero. A concentração de neurogranina e de CaM simuladas foram equimolares ($10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada uma), além disso, foi, o modelo foi mantido em presença de Ca^{2+} ($20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). Por um período de 1s, o modelo foi exposto a NOS ($1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). Em uma segunda simulação, o modelo foi exposto por 1s a NOS e à PKC juntas e, como mostrado, determinou um rápido término na interação entre a neurogranina e a ApoCaM.151

Figura 57: Amplificação de sinal: a ação da PKC e da NOS. Tanto a PKC quanto a NOS são ativadas assim que há o aumento intracelular na concentração de Ca^{2+} . Uma vez ativas, essas enzimas atuam na amplificação de sinal da LTP através da fosforilação e oxidação, mediada por NO, da neurogranina, impedindo que ela se associe com a CaM. Dessa maneira, há um aumento na concentração de CaM disponível para ativar as demais moléculas que irão atuar na LTP.152

- Figura 58: Coordenação e integração da PKA e da CaMKII. A ativação da PKA e da CaMKII é altamente integrada. Assim, enquanto a PKA age inibindo, indiretamente, a PP1, que é uma das fosfatases que inativam a CaMKII, a CaMKII inibe a calcineurina, fosfatase que reverte esse processo, além de inibir também a PDE, enzima que termina a sinalização mediada por AMPc.153
- Figura 59: A inibição da PP1 mediada pela CaMKII. A CaMKII facilita a inibição da PP1 fosforilando a calcineurina e a PDE, enzimas que atuam na desfosforilação do In-1 e na hidrólise do AMPc, respectivamente. A inclusão dessas fosforilações no modelo contribuiu para a manutenção da atividade da CaMKII que, em seu estado ativo, gradualmente impede a desinibição da PP1. E, para ilustrar a simulação desse processo, as enzimas calcineurina, PKA, e PP1, em presença de In-1 fosforilado, foram mantidas em baixa concentração de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, o que possibilitou a ocorrência de uma ativação lenta das enzimas PKA e calcineurina. Com esse panorama, duas situações foram modeladas. Em uma delas, o modelo manteve a concentração de CaMKII como zero (curva em preto) e, em outro, em $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (curva em cinza). Como é possível observar, com a concentração $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ persistente no meio, logo a calcineurina iniciou sua ação desfosforilando o In-1. Porém, em presença de CaMKII, curva em cinza, esse processo gradualmente foi sendo revertido. Ou seja, a CaMKII presente no meio inibiu a atuação da calcineurina e determinou o aumento da concentração de In-1 fosforilado.....154
- Figura 60: A ação do GMPc sobre a manutenção da concentração de AMPc. O GMPc, no hipocampo, atua pós-sinapticamente na inibição da PDE10, enzima que gradativamente degrada o AMPc formado após a indução de LTP. Esse processo foi simulado, mas sua ação só é perceptível após um longo período de tempo. Para ilustrar esse processo, na situação mostrada acima, o AMPc, produzido pela AC, foi mantido sem ser consumido através de sua hidrólise por PDE1, assumindo-se, portanto, que apenas a PDE10 atua em sua degradação. Como é possível observar, sua concentração cai gradualmente, mas, a medida que GMPc é produzido, há o restabelecimento da concentração de AMPc.....155
- Figura 61: A ativação da via da ERK1/2 induzida pelo Ca^{2+} . Para ilustrar o papel do Ca^{2+} na ativação da via da ERK1/2, esse modelo foi isolado das demais moléculas simuladas, e mantido apenas em presença de suas enzimas (Ras, Raf-1 MEK1/2 e ERK1/2), além de Ras-GRF e ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e CaM ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A alta concentração dessas últimas duas moléculas é proposital, e tem o objetivo de evitar que elas sejam fatores limitantes. Com essa situação, a introdução no modelo, por apenas 1 s, de pulsos de Ca^{2+} com 100 Hz de frequência é capaz de induzir uma rápida ativação da Ras-GRF, seguida pela ativação das demais enzimas da via.157
- Figura 62: O efeito da SynGAP sobre a atividade da Ras. Para evidenciar o papel inibitório da SynGAP na ativação da Ras, ela foi simulada e, de maneira ilustrativa, o modelo da Ras foi isolado em presença de CaM, Ca^{2+} e Ras-GRF constante. Em uma situação, a SynGAP fosforilada foi mantida continuamente no modelo (curva em preto). Em outra, ela foi introduzida apenas por 5 segundos, ilustrando seu rápido efeito sobre a atividade da Ras.....158
- Figura 63: Vias das MAPKs ERK1/2 e p38. Tanto a ERK1/2 quanto a p38 têm sua ativação mediada por proteínas GRF específicas, que ativam as proteínas G monoméricas Ras e Rap. Mas, enquanto a Ras é relacionada com a ativação da ERK1/2, através da Raf-1 e da MEK1/2, a Rap relaciona-se com a ativação da p38, mediada pelas enzimas B-Raf e MKK3/6.160
- Figura 64: A simulação da ativação da p38 mediada pela Rap. A via da p38 possui, como principal forma de ativação, a ação da proteína G monomérica Rap. Uma vez ativa, as enzimas que integram a via da p38 tem a atividade altamente coordenada com as da via da ERK1/2. Por esse motivo, foi importante simular a via da p38 no modelo

desenvolvido nesse trabalho. Alguns resultados iniciais obtidos com a simulação dessa via são mostrados acima, onde é possível observar a ativação da p38 em decorrência da ativação prévia, mediada pela PKA, da Rap.....162

Figura 65: Modelo integrado das vias da ERK1/2 e da p38. A ativação das duas vias envolve o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} que determina a ativação da Ras mediada pelas proteínas Ras-GRF1 e Ras-GRF2 ativadas, por sua vez, através de sua associação de Ca^{2+}/CaM . Já a ativação da Rap ocorre por meio da PKA, que fosforila a proteína Src que determina, por sua vez, a ativação da C3G, enzima que catalisa a ativação da Rap. Uma vez ativas, a Ras e a Rap ativam a B-Raf. Além disso, a Rap ativa a Raf-1, que é inibida pela Rap. A B-Raf representa um importante ponto de cruzamento e é responsável, diretamente, pela ativação da ERK1/2, através da MEK1/2, e da p38, através da MKK3/6.....163

Figura 66: A ativação da ERK1/2 e da p38 para um trem de 100 Hz de Ca^{2+} . Após as vias da p38 e da ERK1/2 terem sido simuladas, elas foram unificadas através dos pontos de integração da atividade de alguns de seus componentes. Com essa integração, a estimulação do modelo com 1 trem de Ca^{2+} com 100 Hz de frequência, $10\mu\text{mol. L}^{-1}$ por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, resultou em uma ativação igual das duas enzimas finais das vias, ou seja, da ERK1/2 e da p38.164

Figura 67: Ativação das enzimas essenciais da LTP, considerando a presença dos mecanismos de amplificação de sinal, coordenação e integração entre a atividade de algumas de suas moléculas, em função de 1 s de estimulação por pulsos de 1 mol.L^{-1} de L-glutamato simulados com 100Hz de frequência. Como foi discutido, a LTP inicial hipocampal é caracterizada por apresentar uma ampla coordenação temporal na atividade de algumas de suas enzimas. Essa integração, embora esteja envolvida com a sua ocorrência, não é capaz de produzir a ativação, em grande porcentagem, da CaMKII e da ERK1/2, enzimas que atuam de maneira fundamental nesse processo. A CaMKII, porém, apresenta uma porcentagem de ativação maior nessa situação, em comparação com os dados obtidos para o mesmo protocolo de estimulação, mas sem considerar a ação coordenada entre as vias simuladas (Fig. 53).164

Figura 68: Contribuições específicas do NMDA NR1/NR2A e NR1/NR2B para o aumento de Ca^{2+} no meio intracelular. Para verificar as possíveis causas da seletividade da LTP no requerimento da ativação do NMDA NR1/NR2A, o modelo foi alterado para incorporar a contribuição exatada de cada subtipo de NMDA na indução da LTP. Na zona sináptica, os heterômeros NR1/NR2A correspondem a cerca de 65% do total de NMDAs, o que foi considerado no modelo. O restante de receptores foi simulado como heterômeros NR1/NR2B. Com essa composição, a indução de LTP gera um influxo de Ca^{2+} maior, em magnitude, mediado pelos NMDAs NR1/NR2A.....168

Figura 69: A ativação das enzimas CaMKII, PKA, PKC e ERK1/2 em função do Ca^{2+} que entra para o meio intracelular pelos diferentes heterômeros de NMDA simulados. Para a obtenção desses resultados, as vias simuladas foram incorporadas no modelo do neurônio piramidal desenvolvido, sem considerar, no entanto, a presença de fosfatases e demais proteínas que atuam na inibição de suas ativações. Metade da concentração de cada molécula incorporada nesse modelo recebeu Ca^{2+} provindo apenas de um dos heterômeros de NMDA simulados. Como pode ser observado, a CaMKII (A) responde com uma porcentagem de ativação maior para o Ca^{2+} provindo do NMDA NR1/NR2A, em comparação com sua ativação em função do Ca^{2+} do NR1/NR2B. O mesmo resultado foi obtido para a ativação da PKC (C), no entanto, a PKA exibiu ativação similar para o Ca^{2+} dos dois heterômeros de NMDA considerados (B). Já a ERK1/2, apresentou uma porcentagem de ativação em um intervalo de tempo menor em função do Ca^{2+} que fluiu através do NR1/NR2A, porém, sua ativação em estado-estável foi a mesma independente

- da origem do Ca^{2+} considerada. Vale ressaltar que, nesses gráficos, a porcentagem máxima de ativação se refere apenas a concentração total de proteínas acoplada com cada receptor NMDA, que é 50% de sua concentração total..... 169
- Figura 70: A ativação das enzimas CaMKII, PKA, PKC e ERK1/2 em função do Ca^{2+} que entra para o meio intracelular pelos diferentes heterômeros de NMDA simulados, considerando a presença das fosfatases e demais moléculas que contribuem para a inativação dessas quinases. Para a obtenção desses resultados, as vias simuladas foram inseridas no modelo do neurônio piramidal desenvolvido, e metade da concentração de cada molécula recebeu Ca^{2+} provindo apenas de um dos heterômeros de NMDA simulados. Como pode ser observado, o Ca^{2+} provindo do NMDA NR1/NR2A (A) promoveu uma ativação maior de todas as quinases essenciais para a ocorrência de LTP. Vale ressaltar que, nesses gráficos, a porcentagem máxima de ativação se refere apenas a concentração total de proteínas acoplada com cada receptor NMDA, que é 50% de sua concentração total. 170
- Figura 71: Ativação das enzimas essenciais da LTP quando se considera sua integração temporal e a distinção na fonte de Ca^{2+} que atua na ativação específica de cada molécula. A LTP é um processo que requer, além de coordenação temporal entre algumas proteínas, uma organização espacial precisa, que atua possibilitando a sua ocorrência através do favorecimento da ativação de algumas proteínas. E essa organização é especialmente relevante para a ERK1/2, que é ativada, nesse processo, através de seu posicionamento junto ao heterômero NR1/NR2A. Esse posicionamento favorece sua ativação pois a mantém isolada de enzimas que atuam em sua inativação. Dessa maneira, a incorporação desses processos no modelo de LTP inicial desenvolvido resultou na obtenção de uma grande porcentagem de ativação da ERK1/2..... 174
- Figura 72: A inibição da calcineurina através de sua interação com a AKAP79/150. No modelo construído, a principal função da AKAP79/150 foi inibir a calcineurina, reduzindo sua atividade catalítica para apenas 10% em comparação com sua forma livre. Dessa maneira, a calcineurina, mesmo que se encontre próxima à seus substratos, tem sua atuação bastante limitada..... 176
- Figura 73: A translocação da CaMKII no modelo de LTP desenvolvido. Após se autofosforilar, a CaMKII rapidamente migra do citoplasma (Cit) para a densidade pós-sináptica (PSD), onde ela é resistente à ação das fosfatases e permanece persistentemente ativa..... 178
- Figura 74: A ativação da CaMKII, da PKA, PKC e ERK1/2 durante a LTP inicial hipocampal. Através da combinação de uma organização espacial e temporal precisa, a indução de LTP determinou, no modelo, a ativação das enzimas que mediam o aumento do peso sináptico. 179
- Figura 75: A estabilização dos AMPAs na membrana sináptica mediada pela PKC e pela CaMKII após a indução de LTP. Enquanto a PKC atua na estabilização do AMPA apenas por um breve intervalo de tempo, em acordo com sua ativação transiente, a CaMKII contribui mais para o aumento do número de AMPAs, já que ela permanece persistentemente ativa. Dessa maneira, o principal fator limitante, durante esse processo, para a atuação da CaMKII será o número de receptores na membrana celular disponíveis para serem fosforilado..... 184
- Figura 76: A inserção dos AMPAs na membrana sináptica mediada pela PKC, PKA e ERK1/2 que, em função de padrões temporais de ativação distintos e concentrações diferentes, geram períodos de aumento de AMPAs na membrana diferenciados. 185
- Figura 77: O aumento no número de AMPAs como consequência à LTP. No modelo desenvolvido, a ação coordenada da CaMKII, PKA, ERK1/2 e PKC resultou na inserção

- de AMPAs na membrana e de sua estabilização na zona sináptica. Com esses processos, houve um grande aumento no número total de AMPAs.....186
- Figura 78: O aumento no número de AMPAs como consequência à LTP. Em cerca de meia hora após a indução de LTP, o número máximo de receptores AMPA possível no modelo já foi atingido e se mantém estável ao longo de duas horas, de acordo com a duração total da LTP inicial.....187
- Figura 79: As alteração da LTP podem ser observadas pelo aumento da corrente ou do potencial de membrana medido na célula pós-sináptica. Para ilustrar esse aumento, o comportamento do modelo foi comparado antes e depois da indução de LTP. Como é observado, para apenas um pulso de L-glutamato (1 mmol.L^{-1}), há a alteração da corrente mediada pelo AMPA (A) e, conseqüentemente, do potencial da membrana celular (C), medido na espinha dendrítica, que passa a apresentar uma componente resultante da ativação dos receptores AMPA maior. Em B está mostrada a corrente do canal do NMDA, que manteve-se inalterada.....188

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP	AMPA receptor binding protein
AC	Adenilato ciclase
AKAP79/150	A-kinase anchoring protein 79/150
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionic acid
AMPc	Adenosina monofosfato 3'-5'-cíclico
CaM	Calmodulina
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
EPAC	AMPc-regulated guanine nucleotide exchange factor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
GAP	GTPase-activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GRF	Guanine nucleotide releasing factor
GRIP	AMPA receptor-interacting protein
HFS	High frequency stimulation
In-1	Inibidor-1
LTP	Long-term potentiation
LTD	Long-term depression
MALD-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight
MAPK	Mitogenic-activated protein kinase
MEK1/2	Mitogenic-activated protein /extracellular signal-regulated 1/2 kinase
MKK3/6	Mitogenic-activated protein /extracellular signal-regulated 3/6 kinase
MKP	Mitogenic-activated protein kinase phosphatase

NMDA	N-metil-D-aspartato
PICK	Protein interacting with C-kinase
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	Postsynaptic density 95/disc large/Dlg/zonula occludens-1/ZO-1
PKC	Calcium and phospholipids-dependent protein kinase
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
PSD95	Postsynaptic density 95
Ras-GRF	Ras-guanine nucleotide-releasing factor
SAP97	Synapse associated protein 97
SynGAP	Synaptic GAP
TARP	Transmembranic AMPAR regulatory protein

Notas:

- 1. Adotou-se como convenção nesta tese o uso de abreviaturas e siglas em inglês, uma vez que muitos dos termos usados ainda não possuem tradução para o português ou, mesmo quando possuem, costumam ser referenciados pelas suas siglas em inglês.**
- 2. A escrita dos termos técnicos desta tese seguiu o padrão do livro “NELSON, DAVID L., COX, MICHAEL M. *Lehninger - Princípios de Bioquímica*. 3ª Edição. Tradução de Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo, Editora Savier, 2002”, cuja tradução para o português esteve a cargo da equipe coordenada pelos Profs. Dr. Arnaldo Antônio Simões e Dr. Wilson Roberto Navega Lodi.**

RESUMO

A potenciação sináptica de longa duração (LTP) inicial é um aprimoramento persistente na eficiência da transmissão sináptica, que ocorre em função da alteração no número de receptores AMPA na membrana celular. Esse processo é induzido por protocolos específicos, que causam a ativação dos receptores NMDA e determinam o influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) para o meio intracelular. O aumento na concentração de Ca^{2+} , durante a LTP, resulta na ativação preferencial de enzimas específicas em detrimento de outras. Uma vez ativas, essas proteínas mediam o aumento no peso sináptico promovendo a inserção de receptores AMPA na membrana celular e a sua estabilização na zona sináptica. No entanto, os eventos exatos e a organização dos componentes que mediam a ocorrência da LTP, desde a chegada de L-glutamato na célula pós-sináptica até o aumento do peso sináptico independente de síntese de novas proteínas, ainda são, em grande parte, desconhecidos. Com base nesses aspectos, foi construído um modelo computacional da LTP inicial hipocampal, com a intenção de estudar os mecanismos implicados com a sua ocorrência. O modelo desenvolvido baseou-se na simulação de um neurônio piramidal hipocampal da área CA1, no qual, em uma espinha dendrítica, foram inseridos os receptores glutamatérgicos e as moléculas que participam da LTP inicial. Com essa organização, foi possível analisar a integração espaço-temporal necessária entre os componentes do modelo para que a LTP, ao final do trabalho, surgisse como uma propriedade emergente. A partir da realização dessa análise, esse trabalho demonstrou que a LTP resulta da coordenação entre a atividade de moléculas específicas, somada à atuação dos receptores NMDA como integradores temporais e espaciais. E, esses mecanismos, que favorecem a ativação das enzimas essenciais para a LTP, aliados a processos de direcionamento da atividade catalítica, determinam o aumento do peso sináptico.

ABSTRACT

The early long-term potentiation (LTP) is a persistent improvement in the efficacy of the synaptic transmission that occurs as a result in the number of AMPA receptors in the cellular membrane. This process is induced by specific protocols that lead the activation of NMDA receptors and the following influx of calcium ions (Ca^{2+}) to the intracellular media. The increase in the Ca^{2+} concentration during LTP results in the preferential activation of some enzymes instead of others. Once activated, those enzymes mediate the augment of the synaptic weight by promoting the insertion and the stabilization of AMPA receptors in the synaptic zone of the cellular membrane. This process, referred as the augment in the synaptic efficiency, is widely investigated, but there is still a large gap of knowledge about the exact mechanisms and the organization of the components that compose the LTP. Based on these aspects, it was constructed a realistic computational model of the early LTP in hippocampus, to study the mechanisms that are responsible by the occurrence of this phenomena. The developed model was based in the simulation of a pyramidal neuron of the CA1 region of hippocampus, with glutamatergic receptors and the molecules that act on the LTP included in a dendritic spine. This system was used to analyze the spatiotemporal integration among the components of the model that is required for the occurrence of LTP as an emergent property. Based on this analysis, this work demonstrated that LTP is a result of the coordination of the activity of specific molecules, together with the actuation of the NMDA receptors working as temporal and spatial integrators. These mechanisms, which allow the activation of essential enzymes for the occurrence of LTP, allied to processes that drive their catalytic activity, will determinate the augment of the synaptic weight.



I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1 A plasticidade sináptica de longa duração, o hipocampo e a memória

Uma das mais importantes capacidades do cérebro é coletar informações do ambiente, armazená-las e promover uma mudança comportamental no organismo em consequência a essas novas informações (Kandel, 2001). Essa habilidade compreende os processos de aprendizagem, definido como a aquisição de novas informações, e memória, que se refere à retenção e evocação dos conteúdos aprendidos (Squire, 1992; Squire e Zola-Morgan, 1996). Ambos os processos, além de serem diretamente relacionados, são dependentes da atividade, isto é, partem da experiência do organismo, consciente ou não, como ponto inicial para a aquisição de novos comportamentos (Martin e Morris, 2002; Morris et al., 2003). Com base na importância da aprendizagem e da memória para a adaptação dos seres a novas situações e, conseqüentemente, para sua sobrevivência, seus estudos constituem um dos principais temas em neurociência, desde seus primórdios (Andersen, 2003).

Logo no início do uso das técnicas de coloração e de microscopia, o aumento na compreensão sobre a organização do cérebro determinou o surgimento das primeiras hipóteses fisiológicas para a aprendizagem e memória. Já nos primeiros trabalhos sobre a organização do sistema nervoso, verificou-se que os neurônios apresentam um complexo padrão de organização e comunicam-se através de junções especializadas, as sinapses (revisto em Eccles, 1964). A identificação da sinapse foi um ponto central para as teorias sobre memória que se seguiram, já que, por um longo período de tempo, as células nervosas foram consideradas incapazes de se regenerar. Assim, em função desse aspecto, as alterações sinápticas emergiram como as principais candidatas a atuarem promovendo, em um nível celular, a reorganização fisiológica necessária para a aquisição de novos comportamentos.

Com isso, desenvolveu-se a teoria sináptica da memória (Martin et al., 2000; Martin e Morris, 2002).

Muitos cientistas dedicaram-se à teoria sináptica da memória. Mas, sem dúvida, o principal nome é o do psicólogo canadense Donald Hebb que, em 1949, no livro *The Organization of Behaviour*, propôs um postulado que, em linhas gerais, afirma que quando o axônio de uma célula A está próximo o suficiente para excitar a célula B e levá-la a disparar repetida e consistentemente, algum processo de crescimento ou alteração metabólica ocorre em uma ou em ambas as células, ocasionando um aumento na eficiência da comunicação entre elas. Tal processo caracteriza-se pela presença de cooperatividade, associatividade e especificidade de entrada entre as células, e determina que elas atuem como um sistema fechado, capaz de se manter ativo mesmo após o término do estímulo inicial. Ainda segundo Hebb, esse mecanismo seria responsável pelo estágio inicial da percepção. Com o passar dos anos, o postulado de Hebb se difundiu, passou a ser aplicado para outros processos cognitivos, principalmente para a memória, e se tornou a base das regras de correlação para as modificações sinápticas (Bi e Poo, 2001).

A partir das idéias de Hebb e da noção crescente de que a memória deveria residir em alguma alteração sináptica, iniciou-se a busca pelos mecanismos celulares que seriam capazes de armazenar mudanças comportamentais induzidas pela atividade, de maneira eficiente e por longos períodos de tempo (Andersen, 2003; Bliss, 2003; Morris et al, 2003).

A primeira comunicação de uma alteração sináptica persistente e atividade-dependente foi feita por Terje Lomo, em 1966, na forma de um resumo apresentado em um congresso (revisto em Lomo, 2003). No entanto, em função de sua divulgação restrita, os resultados de Lomo passaram despercebidos. Apenas alguns anos depois, Lomo, em colaboração com Bliss, publicou um artigo sobre o mesmo fenômeno (Bliss e Lomo, 1973). Esse artigo contém resultados de um trabalho feito pelos dois autores em Oslo, no laboratório de Per Andersen, e

relata, assim como o resumo publicado em 1966, o aumento no potencial excitatório pós-sináptico, de maneira persistente, em células granulares do giro denteado de coelhos anestesiados, após a estimulação elétrica repetida nas fibras da via perfurante, que se estendem do córtex entorrinal até essas células (Amaral e Witter, 1989). Nesse experimento, quinze, dos dezoito animais utilizados, apresentaram registros elétricos com um aumento na magnitude do potencial excitatório pós-sináptico e na probabilidade de disparo da célula pós-sináptica, quando estimulada por uma entrada sináptica constante. Ou seja, houve uma intensificação persistente, com duração de várias horas, da comunicação sináptica entre as células da região após a sua estimulação. A alteração sináptica publicada por Bliss e Lomo foi então denominada potenciação sináptica de longa duração, ou apenas LTP, em função da abreviatura de seu nome em inglês: *long-term potentiation*.

No mesmo ano do trabalho de Bliss e Lomo, foi demonstrada a ocorrência de LTP em coelhos não anestesiados (Bliss e Gardner-Medwin, 1973). E, dois anos depois, foi feita a indução do mesmo fenômeno *in vitro* (Schwartzkroin e Wester, 1975). A partir daí, os estudos da LTP se propagaram para outros laboratórios e suas características, gradualmente, foram sendo descobertas.

A LTP é um evento persistente que segue exatamente as três propriedades propostas por Hebb (1949) para o aprimoramento da eficiência na comunicação sináptica, também referida como aumento do peso sináptico (Martin et al., 2000; McNaughton, 2003). Assim, a LTP apresenta cooperatividade entre fibras aferentes ativadas, ou seja, uma entrada fraca, ativada simultaneamente a uma entrada forte, é intensificada. Além disso, a LTP possui associatividade, isto é, há o requerimento da sincronia na ativação de certo número de fibras para que ocorra o aumento no peso sináptico. Por fim, a LTP tem especificidade de entrada: só as fibras que diretamente participam da sinapse apresentam o aprimoramento em sua comunicação. Por possuir essas características, a LTP é considerada a principal alteração

plástica *hebbiana*, o que a torna um importante processo vinculado com a ocorrência de fenômenos cognitivos persistentes, destacando-se a memória (Bi e Poo, 2001). No entanto, além de ser um processo em acordo com as idéias de Hebb, a LTP também é associada com a memória em função de sua ocorrência marcante em uma área específica do cérebro: o hipocampo (Sweatt, 2003).

O hipocampo é uma das estruturas da formação hipocampal, área localizada no lobo temporal e que atua na integração multimodal (Amaral, 1993). Em decorrência a essa localização, o hipocampo participa de diversas funções como o processamento de informações espaciais e temporais (O'Keefe e Dostrovsky, 1971; Morris et al., 1982; Eichenbaum et al., 1999). Porém, sua principal atuação é na formação de memória (Squire et al., 2004).

A vinculação do hipocampo com a memória tem como marco inicial o trabalho realizado por Scoville e Milner (1957), no qual os autores relatam prejuízos de memória em pacientes com lesão hipocampal e em estruturas do lobo temporal. Entre esses pacientes, os dados de H. M. foram os mais significativos e são considerados como a primeira evidência do requerimento hipocampal para a formação de memória.

H.M. teve a secção total do lobo temporal medial, bilateralmente, como forma de tratamento de crises epiléticas. Como consequência, houve um quadro grave de amnésia anterógrada, ou seja, H.M. apresentou a impossibilidade de memorizar novas informações, embora suas demais funções intelectuais tenham permanecido intactas (Scoville e Milner, 1957). A relevância desse quadro em decorrência à secção do lobo temporal medial foi fundamental para a compreensão das áreas anatômicas envolvidas com a consolidação da memória. Assim, a amnésia anterógrada de H.M. apontou, pela primeira vez, que a região do lobo temporal medial, destacando-se o hipocampo, participa da formação de novas memórias. No entanto, a preservação de conteúdos memorizados anteriormente à intervenção cirúrgica

indicou que, embora as regiões retiradas sejam fundamentais na aquisição de novas memórias, elas não atuam no armazenamento de informações (Squire et al., 2004; Squire e Bayley, 2006).

Os resultados de Scoville e Milner (1957) foram seguidos por outros, realizados por diferentes autores. Com isso, foi possível estabelecer alguns pontos centrais do papel do hipocampo para a memória. O primeiro desses pontos se refere à existência da dissociação entre a memória e as outras funções intelectuais (Mishkin, 1978; Mahut et al., 1981). Além disso, os efeitos da lesão hipocampal são seletivos a determinadas formas de memória (revisto em Milner et al., 1998). A explicação para a existência dessa seletividade está no fato da memória possuir subdivisões, processadas por áreas cerebrais distintas, e classificadas a partir da natureza da informação armazenada e do período de tempo pelo qual a informação é mantida (Squire, 1992; McClelland et al, 1995).

De acordo com o conteúdo armazenado, a memória pode ser dividida em duas grandes categorias: a memória implícita, ou não declarativa, que armazena as informações operacionais, adquiridas, muitas vezes, de forma inconsciente, e a memória explícita, ou declarativa, responsável pelo armazenamento de conteúdos que a pessoa pode trazer à mente ou declarar, isto é, informações como rostos, eventos e dados biográficos (Squire, 1992). Ambas as formas de memória apresentam diversas subdivisões e são processadas por áreas cerebrais distintas. Assim, a memória implícita requer, principalmente, a atuação do cerebelo, amígdala, neocórtex e estriado. Já a memória explícita possui como substrato fisiológico as estruturas do lobo temporal, destacando-se o hipocampo (Squire e Zola, 1996; Milner et al., 1998).

Independente da natureza da informação armazenada, a memória é dividida, temporalmente, em imediata, de curta duração e de longa duração. A memória imediata, ou memória de trabalho, é a manutenção de uma informação por intervalos de tempo que variam

de alguns segundos até minutos (Squire et al., 2004). Lesões nas estruturas do lobo temporal não causam nenhum dano a esse tipo de memória, que é processada, essencialmente, pelo córtex pré-frontal (Goldman-Rakic, 1996).

Conteúdos que são armazenados por um período de tempo maior, isto é, horas, dias, meses e anos, são mantidos pelas memórias de curta e de longa duração. A memória de curta duração permanece por cerca de algumas horas apenas, enquanto a memória de longa duração retém informações por meses ou anos (Cohen e Squire, 1980; Squire, 1992). Ambas são processadas pela região hipocampal e estruturas associadas do lobo temporal, mas envolvem processos celulares distintos (Izquierdo et al., 1999; Squire et al., 2004).

A LTP hipocampal é vinculada apenas com a formação de memória de longa duração explícita. Tal associação baseia-se na existência de uma grande concordância entre os mecanismos celulares necessários para a ocorrência de ambos os eventos (Izquierdo e Medina, 1995; Kandel, 2001; Lynch, 2004). Em função da existência dessa vinculação, os estudos da LTP avançaram motivados, inicialmente, pela intenção de se desvendar os mecanismos celulares da memória. Ao longo dos anos, porém, alguns dados começaram a levantar dúvidas em relação a associação entre LTP e memória (Stevens, 1998; Martin, 2000; Martin e Morris, 2002).

Atualmente, mais do que o substrato celular para a memória, a LTP hipocampal é o protótipo para o estudo de alteração sinápticas de longa duração. Nesse sentido, a investigação sobre suas propriedades serve como ponto de partida para a compreensão de inúmeros mecanismos de regulação celular (Lynch, 2004; Malenka e Bear, 2004).

1.2 A LTP hipocampal inicial

A partir da consolidação da LTP como um importante processo celular, seus estudos avançaram dando origem a uma área própria de pesquisa. Com isso, logo suas características começaram a ser desvendadas. A primeira dessas características se relaciona com a existência de fases distintas da LTP, denominadas inicial e final. Essas fases diferenciam-se temporalmente: a inicial começa com a chegada de neurotransmissor na célula pós-sináptica e dura cerca de uma a duas horas, já a fase final inicia-se aproximadamente duas horas após a estimulação celular e leva cerca de seis horas para ser concluída (Frey et al., 1988; Lynch, 2004; Blitzer et al., 2005). Embora essas fases ocorram, normalmente, em uma seqüência temporal, não há uma relação de dependência entre elas. Ou seja, as fases da LTP são processos celulares distintos e que contêm mecanismos próprios de indução, manutenção e expressão (Sweatt, 1999). Dessa maneira, cada fase da LTP requer a ativação de vias de sinalização específicas e, embora ambas determinem o aumento no peso sináptico, essa alteração resulta da atuação de mecanismos diferentes.

A fase inicial da LTP possui o aumento no peso sináptico ocasionado por uma alteração, independente de síntese protéica, no funcionamento de alguns receptores específicos de L-glutamato, principal neurotransmissor excitatório do cérebro (Malinow e Malenka, 2002; Brecht e Nicoll, 2003). Já a fase final depende de síntese de novas proteínas, da ativação de mecanismos de transcrição gênica e está implicada como uma reorganização estrutural da célula (Frey et al., 1988; Nguyen et al., 1994; Roberts et al., 1998; Engert e Bonhoeffer, 1999, Impey et al., 1999; Toni et al., 2001). No entanto, em função, principalmente, de dificuldades experimentais, a fase final da LTP é menos conhecida, já que, *in vitro*, ela requer a manutenção do tecido nervoso por um longo período de tempo (Sweatt, 2003). Por esse motivo, esse trabalho concentrou-se apenas na LTP inicial do hipocampo.

A LTP hipocampal ocorre em uma sinapse específica, que envolve os neurônios piramidais, principal tipo celular da região. Anatomicamente, o hipocampo é formado pelas áreas CA1, CA2 e CA3, que se conectam, sinapticamente, de maneira simples em comparação com outras estruturas cerebrais (Amaral e Witter, 1989; Ishizuka et al., 1990). A maior aferência que chega à região provém das células granulares do giro denteado, que mandam ramificações até as células da área CA3. Por sua vez, as células piramidais CA3 enviam aferências, denominadas colaterais de Schaffer, para as células da área CA1. Por fim, as células piramidais CA1 mandam projeções para o subículo e, em menor quantidade, para o córtex entorrinal (Amaral e Witter, 1989; Amaral, 1993).

Dentre todas essas conexões, apenas a sinapse formada entre os neurônios pré-sinápticos da área CA3 e os neurônios pós-sinápticos da área CA1 apresenta a característica LTP hipocampal. Essa LTP inicia-se com a liberação do neurotransmissor L-glutamato pelo neurônio piramidal da área CA3 (Collingridge et al., 1983b; Collingridge, 1985; Collingridge e Singer, 1990). Uma vez liberado, o L-glutamato se difunde pela fenda sináptica até atingir, pós-sinápticamente, os receptores glutamatérgicos, que são proteínas de membrana especializadas em sua captação. Existem diversas classes de receptores glutamatérgicos, que se distinguem em função de várias diferenças. Mas, para a LTP, é a chegada de L-glutamato nos receptores denominados N-metil-D-aspartato (NMDA), que desencadeia o aumento intracelular na concentração do íon cálcio (Ca^{2+}), fator determinante para a sua ocorrência (Collingridge, 1983a; Lynch et al., 1983; Nowak et al., 1984).

Os receptores NMDA são complexos protéicos que podem ser compostos pelas subunidades denominadas NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A e NR3B (Cull-Candy et al., 2001; Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004). Essas proteínas se combinam formando tetrâmeros com duas subunidades NR1, onde se localizam os sítios de ligação da L-glicina, que é um co-agonista essencial do NMDA, e duas subunidades NR2, que contêm os sítios de

interação do L-glutamato (Dingledine et al., 1999). No hipocampo, o NMDA é encontrado, principalmente, como heterômeros compostos pelas combinações NR1/NR2A e NR1/NR2B (Trovar e Westbrook, 1999; Köhr, 2006).

Os receptores NMDA são ionotrópicos, isto é, sua estrutura forma um poro que, em seu estado aberto, permite o fluxo seletivo de íons (Collingridge et al., 1983; Johnson e Ascher, 1987). Assim, o NMDA possibilita o fluxo de Ca^{2+} e sódio (Na^+) para o meio intracelular e potássio (K^+) para o meio extracelular (Blitzer, 2005). No entanto, para possibilitar esse fluxo iônico, o NMDA requer, além de sua associação com seus agonistas, a despolarização da membrana celular, o que se deve à presença de um íon magnésio (Mg^{2+}) que bloqueia seu canal iônico. Essa característica única faz com que, mesmo ligado a seus agonistas, o NMDA seja incapaz de mediar o fluxo iônico. Porém, a associação do Mg^{2+} no NMDA é dependente da voltagem e a despolarização da membrana determina a sua dissociação (Novack et al., 1984; Coan e Collingridge, 1985). Dessa maneira, a ativação do NMDA requer a ocorrência simultânea da despolarização da membrana sináptica e a presença de L-glutamato na fenda (Collingridge et al., 1983a; Malinow e Miller, 1986). Em função dessa propriedade, o NMDA atua tanto como um detector celular, quanto como um integrador temporal (Collingridge, 1985; Bliss e Collingridge, 1993).

Para a LTP hipocampal, a ação do NMDA é fundamental. Mas, como ele requer a despolarização da membrana para abrir seu canal, outro tipo de receptor glutamatérgico também é necessário para a indução desse processo. Esse receptor é o AMPA (Kauer et al., 1988; Muller e Lynch, 1988), assim chamado em função da abreviatura de seu nome em inglês *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionic acid*. O AMPA, de maneira análoga ao NMDA, é um receptor ionotrópico de L-glutamato, mas que atua, principalmente, na mediação da corrente excitatória rápida nas células (Dingledine et al., 1999).

Estruturalmente, os receptores AMPA são tetrâmeros formados por combinações de subunidades protéicas denominadas GluR1-4 (Gouaux, 2003; Mayer e Armstrong, 2004). Na região CA1 do hipocampo, os neurônios piramidais apresentam receptores AMPA compostos por associações das proteínas GluR1 e GluR2 (GluR1/GluR2) e das proteínas GluR2 e GluR3 (GluR2/GluR3) (Wenthold et al., 1996). Esses heterômeros se distinguem por diversas características, incluindo o tamanho de sua cauda citoplasmática, formadas por resíduos que contêm sítios para a interação com proteínas específicas (Swanson et al., 1997; Dingledine et al., 1999). Ou seja, os AMPAs GluR2/GluR3 contêm cauda curta, enquanto os heterômeros GluR1/GluR2 são formados por combinações de subunidades protéicas com cauda longa (Palmer et al., 2006). Além de sua cauda, os heterômeros do AMPA possuem outras diferenças biofísicas e bioquímicas. Mas, uma propriedade é comum a todos os AMPAs dos neurônios piramidais hipocâmpais: a impermeabilidade ao Ca^{2+} , em função da presença da isoforma GluR2 (Mayer e Armstrong, 2004). Essa propriedade é importante para a compreensão de que, nos neurônios piramidais da área CA1 do hipocampo, o AMPA causa a despolarização da membrana celular, mas não media, diretamente, o influxo de Ca^{2+} (Magge et al., 1998; Adesnick e Nicoll, 2007).

O influxo de Ca^{2+} induzido por L-glutamato nos neurônios piramidais ocorre, essencialmente, pelos canais dos receptores NMDA. No entanto, a ação do AMPA nesse processo é fundamental já que, por possuir um padrão de ativação e desativação rápido, é ele que causa a despolarização da membrana pós-sináptica necessária para a ativação do NMDA, assim que há neurotransmissores na fenda (Collingridge, 1985; Gouaux, 2003; Hansen et al., 2007). Por sua vez, o NMDA, por apresentar alta afinidade por L-glutamato, uma vez aberto, possibilita o influxo de Ca^{2+} por vários milissegundos, favorecendo um grande aumento em sua concentração intracelular (Dingledine et al., 1999; Klee e Means, 2002; Sabatini et al., 2002).

O aumento da concentração de Ca^{2+} no meio intracelular é fundamental para a LTP, pois determina a ativação de inúmeras vias de sinalização que irão atuar nesse processo. No entanto, o Ca^{2+} também media a ativação de vias que agem em outros eventos plásticos, como a depressão sináptica de longa duração (LTD, *long-term depression*) (Lynch et al., 1977). Assim como a LTP, a LTD é uma forma persistente de alteração sináptica, porém, que diminui o peso sináptico em resposta à entrada de Ca^{2+} através do NMDA. Dessa maneira, a diferença entre a LTP e a LTD reside nas vias bioquímicas específicas que compõem cada processo, ativadas por magnitudes e padrões distintos de variação na concentração intracelular de Ca^{2+} (Winder e Sweatt, 2001; Malenka e Bear, 2004; Sobczyk e Svodoba, 2007).

A LTP inicial envolve a participação de diversas moléculas, e, entre elas, duas proteínas se destacam: a CaMKII (*Calcium/Calmodulin protein kinase II*) e a PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) (Malinow et al., 1989; Sweatt, 1999; Blitzer et al., 2005). Tanto a CaMKII quanto a PKA, por serem proteínas quinases, catalisam reações de fosforilação, ou seja, de transferência do grupo γ -fosfato de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para moléculas aceptoras, que passam a apresentar uma alteração em sua atividade (Rubin e Rosen, 1975; Adams, 2001). O processo de fosforilação é a principal alteração covalente no meio intracelular. No entanto, as fosforilações podem ser revertidas por outra classe de enzimas, as fosfatases, cuja atividade é altamente coordenada com a atuação das quinases (Shenolikar, 1994; Hunter, 1995). Dessa maneira, em um evento como a LTP, que requer a ocorrência de fosforilações duradouras de inúmeros substratos, há a ativação de mecanismos que determinam a manutenção desse estado fosforilado (Dineley et al., 2001; Winder e Sweatt, 2001). E, entre esses mecanismos, destaca-se a ativação persistente da CaMKII (Lledo et al., 1995; Sanhueza et al., 2007).

Estruturalmente, a CaMKII é uma holoenzima composta por 12 subunidades (Brocke et al., 1999). Cada uma dessas subunidades contém um domínio catalítico, um domínio de associação às outras subunidades, e um domínio regulador onde se liga o complexo Ca^{2+} /Calmodulina (Ca^{2+} /CaM) (Hanson e Schulman 1992). Em ausência de Ca^{2+} /CaM, a CaMKII é mantida inativada por um resíduo autoinibitório que impede o acesso tanto de ATP quanto de substratos à enzima. A ligação de Ca^{2+} /CaM elimina esse resíduo e inicia um complexo processo de autofosforilação, no qual uma subunidade fosforila a subunidade vizinha (Mukherji e Soderling, 1994). Uma vez autofosforilada, mesmo após a dissociação de Ca^{2+} e CaM, a CaMKII permanece em um estado parcialmente ativo denominado autônomo (Miller et al., 1988). É esse estado autônomo que coloca a CaMKII como uma enzima central para a LTP inicial, pois possibilita que ela atue sobre seus substratos mesmo após o término do estímulo que desencadeou sua autofosforilação (Lisman, 1989; Lledo et al., 1995; Sanhueza et al., 2007).

Uma vez ativa, a CaMKII só retorna ao seu estado basal através de sua desfosforilação, reação catalisada pelas proteínas fosfatases 1 e 2A, conhecidas pela abreviatura de seus nomes em inglês como PP1 (*protein phosphatase 1*) e PP2A (*protein phosphatase 2A*) (Shields et al., 1985). Ambas as fosfatases são abundantes e rapidamente inativam a CaMKII (Lisman et al., 2002). Mas, durante a LTP, dois mecanismos principais impedem o acesso dessas fosfatases à CaMKII. Um desses mecanismos é a translocação da enzima, isto é, uma vez autofosforilada, a CaMKII rapidamente se desloca do citoplasma e se associa à densidade pós-sináptica (Strack et al, 1997b; Yoshimura e Yamauchi, 1997; Otmakhov et al., 2004), região localizada logo abaixo da membrana pós-sináptica e que concentra um grande número de receptores glutamatérgicos e complexos protéicos (Sheng e Kim 2002, Nourry et al., 2003; Sheng e Hoogenraad, 2007). Na densidade pós-sináptica, a CaMKII deixa de ser substrato da PP2A, e passa a ser desfosforilada apenas pela PP1 (Strack

et al., 1997a). Em adição a isso, nessa região, a CaMKII pode se associar ao receptor NMDA e permanecer em um estado de ativação resistente às fosfatases (Bayer et al., 2001; 2006). Ou ainda, a CaMKII pode ser mantida ativa em função de um processo de inibição da PP1 mediado pela PKA (Blitzer et al., 1995; 1998).

A PKA, assim como a CaMKII, tem sua ativação determinada pelo aumento na concentração de Ca^{2+} na célula, porém, ela não se associa diretamente a esse íon, nem ao complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. A PKA é um tetrâmero, formado por duas subunidades catalíticas (C) e duas reguladoras (R), que mantêm a enzima inibida em condições basais (Walsh et al., 1968; Francis e Corbin, 1999). A chegada de Ca^{2+} no meio intracelular determina a formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, que ativa a enzima adenilato ciclase (AC), responsável pela formação do segundo mensageiro adenosina monofosfato 3'-5'-cíclico (AMPC) (Choi et al., 1992; Calli et al., 1994; Ferguson e Storm, 2004). Cada subunidade R da PKA possui dois sítios de associação de AMPC, que, quando ocupados, ocasionam uma brusca mudança conformacional na sua estrutura protéica, liberando as duas subunidades C ativas e capazes de fosforilar diversos substratos, incluindo uma molécula reguladora de PP1, o inibidor 1 (In-1) (Blitzer et al., 1995; 1998).

A PP1 é uma proteína constitucionalmente ativa, mas que apresenta um grande número de reguladores (Shenolikar, 1994; Cohen, 2002). No hipocampo, um de seus principais reguladores é o In-1 que, fosforilado pela PKA, se associa e inibe a PP1 (Winder e Sweatt, 2002; Ceulemans e Bollen, 2003). Uma vez inibida, a PP1 não desfosforila a CaMKII, que permanece, então, persistentemente ativa.

A ativação da PKA e da CaMKII é fundamental para a LTP, pois essas duas enzimas determinam grande parte do aumento do peso sináptico. E, entre todos seus possíveis alvos de atuação nos neurônios piramidais hipocâmpais, um é essencial para esse aumento: o AMPA.

Desde a descoberta da LTP, sempre se especulou que o aumento do peso sináptico deveria ser mediado por reações de fosforilação, pois já se sabia que essas reações mediam grande parte dos eventos celulares. No entanto, naquela época, ainda não se conheciam quais eram as enzimas e os substratos fundamentais para esse processo (Browning et al., 1979). Com a descoberta do requerimento do AMPA para a LTP, seguida pela identificação da CaMKII e da PKA como enzimas essenciais para o aumento do peso sináptico, alguns grupos se dedicaram a buscar as possíveis relações entre esses pontos (Lisman, 1989; Malinow et al., 1989). Assim, logo foi demonstrado que o aumento do peso sináptico da LTP ocorre em função de uma alteração na condutância mediada pelo AMPA (Benke et al., 1998), que possui sítios próprios para fosforilações catalisadas por PKA e por CaMKII (Barria et al., 1997; Mammen et al., 1997; Lee et al., 1998; 2000). Com essas descobertas, surgiram as primeiras vinculações entre o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, a ativação de enzimas específicas e o aumento do peso sináptico.

1.3 O aumento do peso sináptico: os movimentos do AMPA

A identificação de sítios de fosforilação para a PKA e CaMKII no AMPA, somada ao descobrimento de que esses receptores mediam o aumento no peso sináptico, determinou que se desenvolvesse a hipótese de que, durante a LTP, há o aumento da condutância do AMPA em decorrência da fosforilação de alguns de seus resíduos. Essa idéia, rapidamente, foi comprovada por alguns autores (Barria et al., 1997; Benke et al., 1998; 2001). No entanto, por alguns anos, acreditou-se que a alteração na condutância do AMPA fosse um fenômeno microscópico, ou seja, que afeta apenas a condutância unitária do canal do receptor fosforilado. Atualmente, porém, essa hipótese já não tem mais sustentação.

O aumento característico do peso sináptico durante a LTP inicial reside, principalmente, em uma alteração na condutância de receptores AMPA, mas esse processo não envolve a mudança na condutância unitária do canal (Andrásfalvy e Magge, 2004; Lisman e Raghavachari, 2006). A alteração na condutância do AMPA é causada por um mecanismo extremamente dinâmico: a variação no número de receptores na zona sináptica (Malinow et al., 2000; Malinow e Malenka, 2002; Derkach et al., 2007).

A mudança no número de receptores AMPA é mediada por dois processos: difusão lateral e inserção de novos receptores na membrana celular (Borgdorff e Choquet, 2002; Brecht e Nicoll, 2003; Adesnik et al., 2005; Ashby et al., 2006; Cognet et al., 2006). Ambos os eventos são atividade-dependente, requerem a ativação dos receptores NMDA e envolvem mecanismos distintos, de acordo com as isoformas que compõem o AMPA (Shi et al., 1999; Braithwaite et al., 2000; Lu et al., 2001; Lee et al., 2004).

Na região CA1 do hipocampo, as subunidades protéicas que constituem o AMPA formam heterômeros que se distribuem na zona sináptica, nas regiões extra-sinápticas adjacentes e também em vesículas intracelulares (Hall e Soderling, 1997; Nusser et al., 1998; Park et al., 2004; Tanaka et al., 2005) (Fig. 1). Em condições de atividade sináptica basal, aproximadamente metade dos receptores AMPAs localizados na membrana celular difundem-se livremente, alternando-se entre a zona sináptica e extra-sináptica (Groc e Choquet, 2006). Esses receptores são formados, principalmente, pelas isoformas GluR1/GluR2 (Passafaro et al., 2001; Barry e Ziff, 2002). Os receptores compostos pelas proteínas GluR2/GluR3 têm uma taxa menor de difusão lateral (Osten et al., 2000; Perestenko e Henley, 2003). No entanto, os GluR2/GluR3s apresentam, durante a atividade celular basal, um movimento constante de internalização (endocitose) e inserção (exocitose) na membrana celular (Shi et al., 1999; Lin et al., 2000; Passafaro et al., 2001) (Fig. 2). Esses movimentos contínuos não contribuem para a alteração na densidade de canais do AMPA ao longo do tempo. Porém, a

atividade sináptica ocasiona uma rápida modificação nessa movimentação em função, principalmente, da existência de interações entre as subunidades do AMPA e proteínas específicas (Malinow e Malenka, 2002; Bredt e Nicoll, 2003).

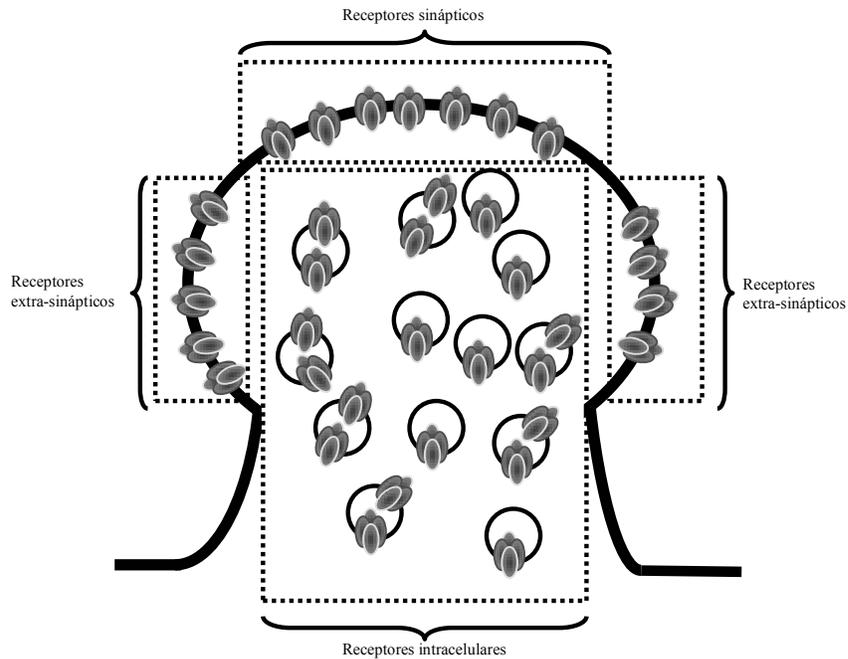


Figura 1: Localizações do AMPA nos neurônios piramidais da área CA1. Existem, basicamente, três localizações distintas do AMPA nos neurônios piramidais da área CA1: a zona sináptica, que fica imediatamente oposta aos sítios pré-sinápticos de liberação de vesículas de L-glutamato, a região extra-sináptica, localizada adjacente à zona sináptica, e o meio intracelular, que concentra cerca de 60% desses receptores armazenados em vesículas denominadas endossomas.

O AMPA GluR2/GluR3 se associa, na densidade pós-sináptica, com as proteínas conhecidas como GRIPs (*glutamate receptor-interacting proteins*) e ABPs (*AMPA receptor binding proteins*), que interagem, diretamente, com a subunidade GluR2 (Dong et al., 1997; 1999). As GRIPs/ABPs localizam-se da zona sináptica, onde permanecem associadas à densidade pós-sináptica através de palmitoilações (Fu et al., 2003), e estabilizam os GluR2/GluR3s (Wyszynski et al., 1999; Osten et al., 2000). Essa estabilização ocorre através da formação de complexos multiprotéicos (Hirbec et al., 2002). A GRIP e a ABP contém, cada uma, sete domínios de interação proteína-proteína do tipo PDZ (*postsynaptic density 95/disc*

large/Dlg/zonula occludens-1/ZO-1) (Garner et al., 2000; Sheng e Kim, 2002). Cada um desses domínios pode ser empregado na interação proteína-proteína e, dessa maneira, as GRIPs/ABPs podem, simultaneamente, se ligar ao AMPA e a outras proteínas, formando estruturas que impedem os receptores GluR2/GluR3s de difundirem-se o longo das zonas sináptica e extra-sináptica (Hung e Sheng, 2002; Perestenko e Henley, 2003).

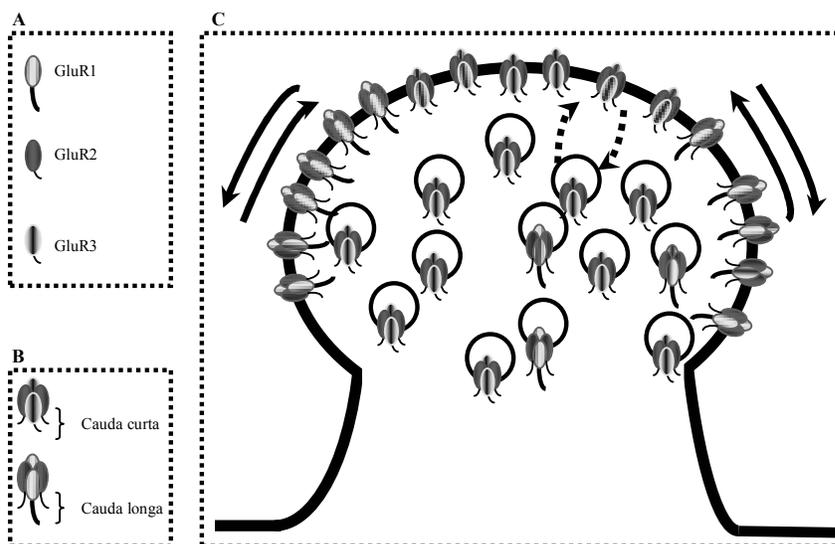


Figura 2: AMPA e seus movimentos durante a atividade sináptica basal. O AMPA é formado por combinações das subunidades protéicas denominadas GluR1, GluR2 e GluR3 (A), que, estruturalmente, se distinguem pelo tamanho de sua cauda, entre outras propriedades. Assim, enquanto as subunidades GluR2 e GluR3 contém cauda curta, a subunidade GluR1 possui cauda longa (B). Essas subunidades se combinam formando os tetrâmeros GluR2/GluR3 e GluR1/GluR2 (B). A composição heteromérica do AMPA está diretamente implicada com os seus movimentos em condições de atividade celular basal. Nessas condições, enquanto os heterômeros GluR2/GluR3 possuem ciclos de entrada e saída na membrana citoplasmática (flechas pontilhadas), os AMPAs GluR1/GluR2 difundem-se, lateralmente, e alternam-se entre a zona sináptica e extra-sináptica (flechas contínuas) (C).

No entanto, os GluR2/GluR3s também se associam com outra molécula, denominada PICK (*protein interacting with C-kinase*). Diferentemente da GRIP/ABP, a atuação da PICK sobre o AMPA ocorre através de sua interação com a PKC (Ca^{2+} and phospholipids-dependent protein kinase) (Dev et al., 1999). Com essa interação, a PICK media a fosforilação, catalisada pela PKC, do resíduo Serina 880 (Ser⁸⁸⁰) da subunidade GluR2

(Staudinger et al., 1997). A fosforilação da Ser⁸⁸⁰ pela PKC interrompe a associação do AMPA com as proteínas GRIPs/ABPs (Seidnman et al., 2003). Como consequência, o AMPA se desestabiliza da zona sináptica e difunde-se, associado à PICK, até sítios de endocitose, localizados lateralmente em relação à zona sináptica (Ashby et al., 2004; Rácz et al., 2004). Nesses locais, os AMPAs são endocitados em vesículas específicas, os endossomas (Man et al., 2000; Lee et al., 2004). Essa endocitose é atividade-dependente (Braithwaite et al., 2000), requer a ativação de receptores NMDA (Iwakura et al., 2001; Sossa et al., 2006), e tem sido implicada com a ocorrência de LTD (Nishimune et al., 1998; Lüscher et al., 1999; Lüthi et al., 1999; Noel et al., 1999; Braithwaite et al., 2000; Lee et al., 2002; Seidnman et al., 2003; Holman et al., 2007) (Fig. 3).

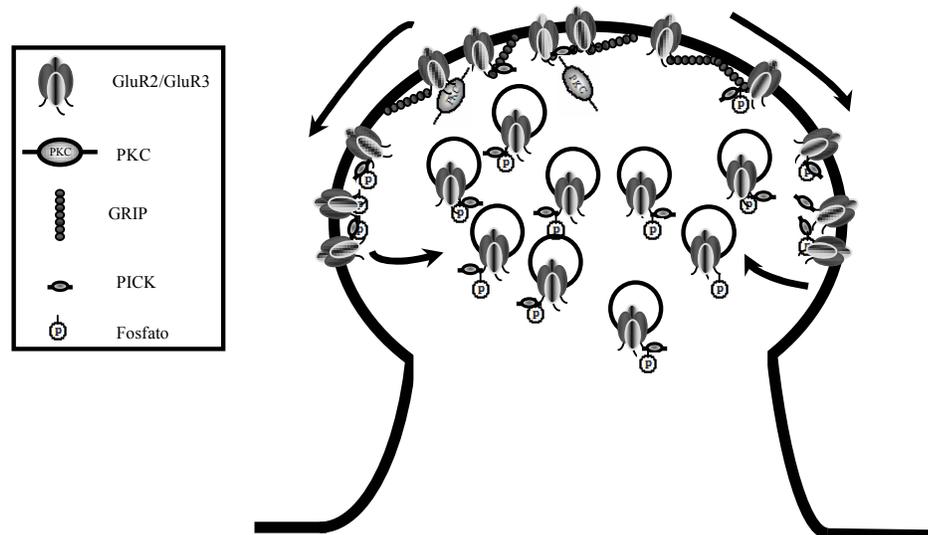


Figura 3: AMPA e seus movimentos durante a ocorrência de LTD. Os heterômeros GluR2/GluR3, que são mantidos estabilizados na zona sináptica através de suas associações com as proteínas GRIPs/ABPs, durante a LTD, são fosforilados pela PKC, através da mediação das proteínas citoplasmáticas PICKs, que se associam aos receptores. Uma vez fosforilados, os AMPAs GluR2/GluR3, associados às PICKs, difundem-se até sítios de endocitose, localizados lateralmente em relação à zona sináptica, onde são, posteriormente, internalizados.

Por sua vez, o AMPA formado pelas isoformas GluR1/GluR2 é relacionado, principalmente, com a ocorrência de LTP (Malinow e Malenka, 2002; Derkach et al., 2007).

Dois mecanismos contribuem para essa sua atuação (Fig. 4). O primeiro deles se refere ao acúmulo de receptores na zona sináptica. Já o segundo é a inserção de novos AMPAs na membrana. Ambos os processos dependem, basicamente, da interação da isoforma GluR1 com proteínas específicas (Hayashi et al., 2000; Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001). Vale ressaltar que há uma ordem de prioridade nas interações realizadas pelo AMPA de acordo com as isoformas que o compõem. Assim, as interações da GluR1 prevalecem no heterômero GluR1/GluR2, enquanto, no heterômero GluR2/GluR3, as interações da GluR2 predominam em relação às da GluR3 (Passafaro et al., 2001; Lee et al., 2002).

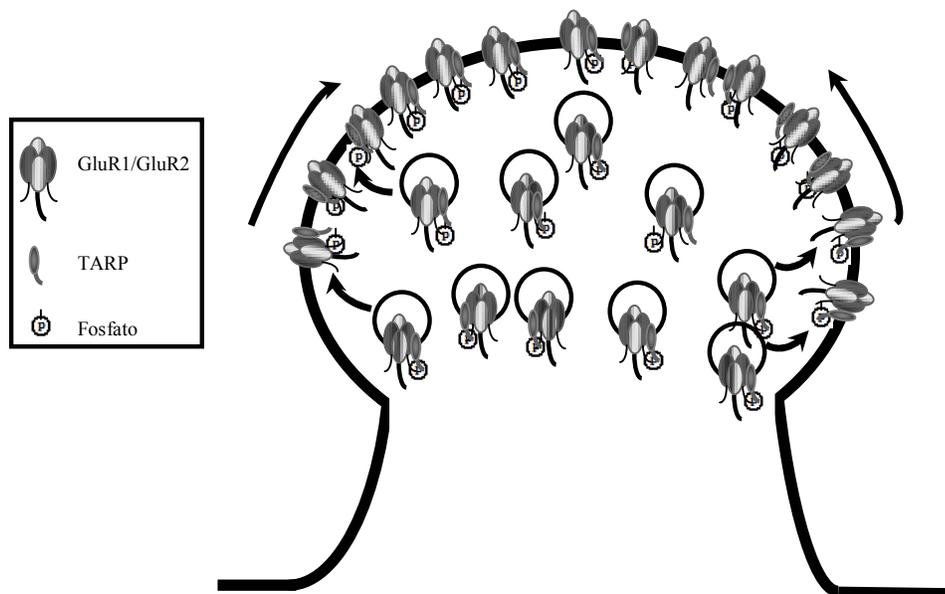


Figura 4: AMPA e seus movimentos durante a ocorrência de LTP. Durante a LTP, apenas os heterômeros GluR1/GluR2 parecem sofrer uma alteração significativa em sua densidade de canais na zona sináptica. Dois movimentos desses heterômeros são observados: seu acúmulo na zona sináptica, através de sua difusão lateral, a partir de áreas extra-sinápticas, e posterior estabilização, em função de sua associação com proteínas específicas como as TARPs, e a inserção de novos receptores, provenientes de vesículas intracelulares, na membrana celular. Tanto o acúmulo de receptores na região sináptica quanto sua inserção na membrana requerem fosforilações catalisadas por diversas quinases.

Uma das principais proteínas que interagem com a subunidade GluR1 é a SAP97 (*synapse-associated protein 97*), que se associa ao receptor através da ligação de seu domínio

PDZ com resíduos do terminal carboxílico do AMPA (Leonard et al., 1998). Além da SAP97, o AMPA também interage com uma classe bastante particular de proteínas transmembrânicas: as TARPs (*transmembranic AMPAR regulatory proteins*) (Letts et al., 1998).

As TARPs são pequenas proteínas que se associam aos AMPAs e ocasionam uma série de alterações em seu funcionamento, aumentando sua afinidade por L-glutamato, tempo de abertura, entre outras propriedades biofísicas (Nakagawa et al., 2005; Nicoll et al., 2006; Tomita et al., 2006; 2007; Ziff, 2007). Existem várias isoformas de TARPs, e a mais bem caracterizada, denominada estargazina, é encontrada em altas concentrações no cerebelo (Osten e Stern-Bach, 2006). No hipocampo, a isoforma de TARP mais abundante é a $\gamma 8$ (Tomita et al., 2003; 2005a). As TARPs podem se associar com todas as isoformas do AMPA, e, ao mesmo tempo, interagir, através de seus resíduos citoplasmáticos, com outras proteínas, formando complexos que mediam a estabilização e inserção do receptor na zona sináptica, durante a atividade celular basal (Rouach et al., 2005). Além disso, as TARPs contribuem para o acúmulo de receptores AMPA sinápticos durante a LTP, aumentando sua inserção na membrana e fixação na zona sináptica (Tomita et al., 2005b; Nicoll et al., 2006; Tsui e Malenka, 2006). E esse processo, somado ao fato de que a maioria dos AMPAs encontra-se associada às TARPs (Nakagawa et al., 2005), tem colocado essas proteínas em uma posição de destaque para a compreensão do mecanismo de aumento do peso sináptico da LTP, que depende também de reações de fosforilações (Boehm et al., 2006; Oh et al., 2006; Zhabotinsky et al., 2006). Ou seja, aparentemente, tanto a presença de TARPs quanto a fosforilação de resíduos específicos são eventos necessários para que haja um aumento do número de AMPAs sinápticos durante a LTP.

As fosforilações do AMPA implicadas com seu acúmulo e sua inserção na sinapse envolvem, principalmente, a isoforma GluR1 (Derkach et al., 2007; Ziff, 2007). Em função disso, é necessário considerar as três enzimas que a fosforilam diretamente, ou seja, a CaMKII

(resíduo Ser⁸³¹), a PKA (Ser⁸⁴⁵) e a PKC (Ser⁸¹⁸ e Ser⁸³¹). Todas essas reações de fosforilação são observadas durante a LTP (Mammen et al., 1997; Lee et al., 1998; 2000; Esteban et al., 2003; Boehm et al., 2006). Porém, embora ocorram, nem todas essas fosforilações são necessárias para a inserção e acúmulo de AMPAs na membrana sináptica (Groc e Choquet, 2006), mesmo que a ativação das três quinases seja fundamental para a LTP inicial (Sweatt, 2003; Blitzer et al., 2005). Esses aspectos apontam que é importante detalhar, especificamente, a ação de cada uma dessas proteínas sobre os movimentos do AMPA.

Estudos recentes indicam que, em resposta à elevação de AMPc na célula, existe o aumento no número de AMPAs na membrana citoplasmática, mas não na sinapse em si (Esteban et al., 2003; Sun et al., 2005; Oh et al., 2006). Ou seja, a PKA atua mediando a inserção de AMPAs na membrana, mas na região extra-sináptica.

Já a ativação da CaMKII não altera o número de receptores localizados extra-sinapticamente, embora sua ação determine que haja o acúmulo de AMPAs contendo a isoforma GluR1 na sinapse (Shi et al., 1999; 2001; Gao et al., 2006).

Por outro lado, a fosforilação do AMPA por PKC regula tanto a sua inserção em zonas extra-sinápticas quanto sua concentração na região sináptica (Boehm et al., 2006).

Com esses dados, observa-se que duas quinases são essenciais para o acúmulo de AMPAs na zona sináptica: a CaMKII e a PKC, e duas para a sua inserção na membrana celular: a PKA e a PKC. Mas, além delas, outra via atua, diretamente, nesse último processo: a da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), cuja ativação é mediada pela pequena proteína G monomérica Ras (Winder et al., 1999; Zhu et al., 2002; Kennedy et al., 2005; Li et al., 2006).

A Ras, por ser uma proteína G, apresenta seus ciclos de ativação e desativação regulados pela sua associação com os nucleotídeos guanosina trifosfato (GTP) e guanosina difosfato (GDP). Ou seja, a Ras permanece inativa quando está ligada ao GDP, e, para se

tornar ativa, sofre mudanças conformacionais que diminuem sua afinidade pelo GDP, que é substituído pelo GTP. Uma vez ativa, a Ras retorna ao seu estado basal através de sua atividade de GTPase, catalisando a hidrólise do GTP em GDP (Takai et al., 2001).

Em condições celulares basais, a ativação da Ras ocorre com uma taxa muito lenta. No entanto, esse processo pode ser controlado por diversos reguladores, destacando-se as proteínas que atuam acelerando sua ativação, denominadas fatores de troca do nucleotídeo guanina ou fatores de liberação do nucleotídeo guanina, mais conhecidas pelas abreviaturas GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) e GRF (*guanine nucleotide releasing factor*), e proteínas que aumentam sua atividade de GTPase, as GAPs (*GTPase-activating proteins*) (Mitin et al., 2005). Tanto as proteínas que atuam como GRFs quanto como GAPs são reguladas por inúmeros fatores e, algumas delas, são encontradas em altíssimas concentrações nos neurônios piramidais hipocâmpais da área CA1, concentrando-se, particularmente, na densidade pós-sináptica (Peng et al., 2004; Bos et al., 2007). Dessa maneira, cada vez mais tem sido demonstrado que essas proteínas desempenham um papel fundamental em eventos plásticos, sobretudo na LTP.

No hipocampo, as isoformas principais das proteínas GRF da Ras são a Ras-GRF1 e a Ras-GRF2, que se relacionam com a ocorrência de alterações plásticas de longa duração (Cook e Lockyer, 2006; Li et al., 2006). Para isso, a Ras-GRF1 e a Ras-GRF2 são ativadas por Ca^{2+}/CaM em decorrência do influxo de Ca^{2+} pelo NMDA, e determinam, conseqüentemente, a ativação da Ras.

Uma vez ativa, a Ras inicia a ativação da via da MAPK, que é formada por uma cascata bioquímica composta por três proteínas: uma MAPK quinase quinase (MAPKKK), uma MAPK quinase (MAPKK) e uma MAPK (Adams e Sweatt, 2002). Cada uma dessas quinases contém diversas isoformas, que agem em processos celulares distintos e são reguladas por mecanismos diferentes. Assim, a Ras está relacionada, principalmente, com a

ativação da MAPKKK denominada Raf-1, que, por sua vez, ativa a MAPKK denominada MEK1/2 (*MAP/extracellular signal-regulated 1/2 kinase*), que ativa a ERK1/2 (*extracellular signal-regulated 1/2 kinase*) (Pearson et al., 2001; Thomas e Huganir, 2005). Uma vez ativa, essa via atua tanto na LTP final, controlando mecanismos de transcrição gênica, quanto na LTP inicial, determinando a inserção de novos AMPAs na membrana celular (Zhu et al., 2002; Huang et al., 2004; Brown et al., 2005).

O aumento no número de receptores AMPA na zona sináptica, portanto, é controlado por quatro quinases, mas de maneiras distintas. A ERK1/2, a PKA e a PKC ocasionam a inserção extra-sináptica de AMPAs provenientes de vesículas intracelulares. Já a CaMKII media a estabilização do AMPA na zona sináptica, processo que também pode ser catalisado pela PKC. No entanto, um ponto chave para a compreensão desses eventos é a maneira como essas enzimas coordenam suas atividades até determinarem o aumento do peso sináptico, fato que ainda é pouco conhecido. Ou seja, embora essas quatro quinases estejam implicadas com o aumento do peso sináptico, suas ativações emergem de inúmeros pontos de cruzamentos entre vias e mecanismos de regulação, cujas análises só podem ser feitas através do uso de ferramentas específicas.

A CaMKII, por exemplo, é responsável pela ativação da SynGAP (*synaptic GAP*), enzima que acelera a atividade de GTPase da Ras, determinando sua volta ao estado inativo e inibindo, conseqüentemente, a ativação da ERK1/2 (Chen et al., 1998; Kim et al., 1998; Krapivinsky et al., 2004). Além disso, a CaMKII também atua favorecendo a ativação de outra via da MAPK, a da p38, cuja ação é implicada com a ocorrência de LTD (Takeda et al., 2004). Por sua vez, uma outra proteína G monomérica, a Rap que, em muitos aspectos, possui ação antagonista à Ras, é ativada através da mediação da PKA (Grewal et al., 2000; Schmitt e Stork, 2002a; 2002b). Além disso, todas essas enzimas competem, em algum ponto de suas vias, pelo mesmo ativador, o Ca^{2+} . Dessa maneira, o que se torna evidente é que a resposta

celular final frente à atividade sináptica e o influxo de Ca^{2+} é resultado de um processo cujo entendimento está longe de se basear em cascatas bioquímicas lineares.

Ao longo dos anos, as informações sobre as vias que compõem a LTP inicial, seus mecanismos de regulação e interações têm trazido, provavelmente, mais complexidade à área do que esclarecimento. Assim, cada vez mais, a necessidade de análises quantitativas, com a intenção de se avaliar exatamente o papel de cada molécula e suas interações na resposta celular final, se torna evidente. No entanto, poucas ferramentas possuem tal habilidade e, provavelmente, a neurociência computacional é uma das mais adequadas.

1.4 A Neurociência Computacional

A neurociência computacional é um campo de pesquisa que se baseia na construção de modelos através de descrição matemática de áreas, células e processos intracelulares do cérebro, para o estudo do funcionamento e regulação do sistema nervoso. Para isso, é necessário, inicialmente, identificar os componentes do sistema que se deseja simular e compreender as relações existentes entre eles. Em seguida, são desenvolvidas as equações que descrevem a evolução de cada componente considerado e suas interações ao longo do tempo e/ou espaço. Essas equações, para simular adequadamente o sistema biológico de interesse, são resolvidas com base em parâmetros reais, ou seja, concentrações das espécies bioquímicas, taxa de velocidade das reações, constantes que descrevem o funcionamento de canais iônicos, dimensões anatômicas dos compartimentos celulares, etc (Koch e Segev, 1998; Bower e Bolouri, 2001). Esses parâmetros são obtidos através de dados experimentais e, assim que o modelo é construído, é possível validá-lo através de comparações diretas com características que o sistema real apresenta. Depois de validado, o modelo pode ser usado para testar hipóteses e verificar as propriedades do sistema simulado.

É necessário esclarecer, no entanto, que a neurociência computacional baseia-se, especificamente, no uso de dados fisiológicos, anatômicos e bioquímicos sobre áreas, células e processos nervosos para a construção de modelos biologicamente plausíveis, isto é, que reproduzem a organização fisiológica do sistema que se deseja investigar, para que o seu comportamento surja como uma propriedade emergente. Nesse sentido, não se modelam, diretamente, processos, mas os componentes biofísicos e bioquímicos que atuam como substratos para os eventos de interesse (Bhalla e Iyengar, 1999; Weng et al., 1999; Bower e Bolouri, 2001).

A utilização da neurociência computacional para a pesquisa de eventos bioquímicos do sistema nervoso ainda é bastante restrita. Porém, o uso de modelos como ferramenta de estudo pode ser feito para qualquer processo que possua uma variação temporal e/ou espacial passível de ser representada matematicamente. Esse fato, somado aos grandes avanços tecnológicos dos últimos anos e que possibilitaram o acúmulo de um enorme volume de informações sobre o funcionamento, ação e regulação das vias de sinalização celular, tem determinado o interesse crescente pela aplicação de modelos para investigar processos intracelulares (Weng et al., 1999; Eungdamrong e Iyengar, 2004; Kennedy et al., 2005). Mas, é importante ressaltar que, apesar do desenvolvimento de modelos poder ser aplicado, teoricamente, para qualquer evento que apresente variação temporal e/ou espacial capaz de ser equacionada, sua construção, em neurociência computacional, parte de dados biofísicos e bioquímicos reais. Portanto, só é possível construir modelos de processos que já possuam características mínimas conhecidas, para que, a partir de seu desenvolvimento, algumas hipóteses sobre o sistema possam ser investigadas.

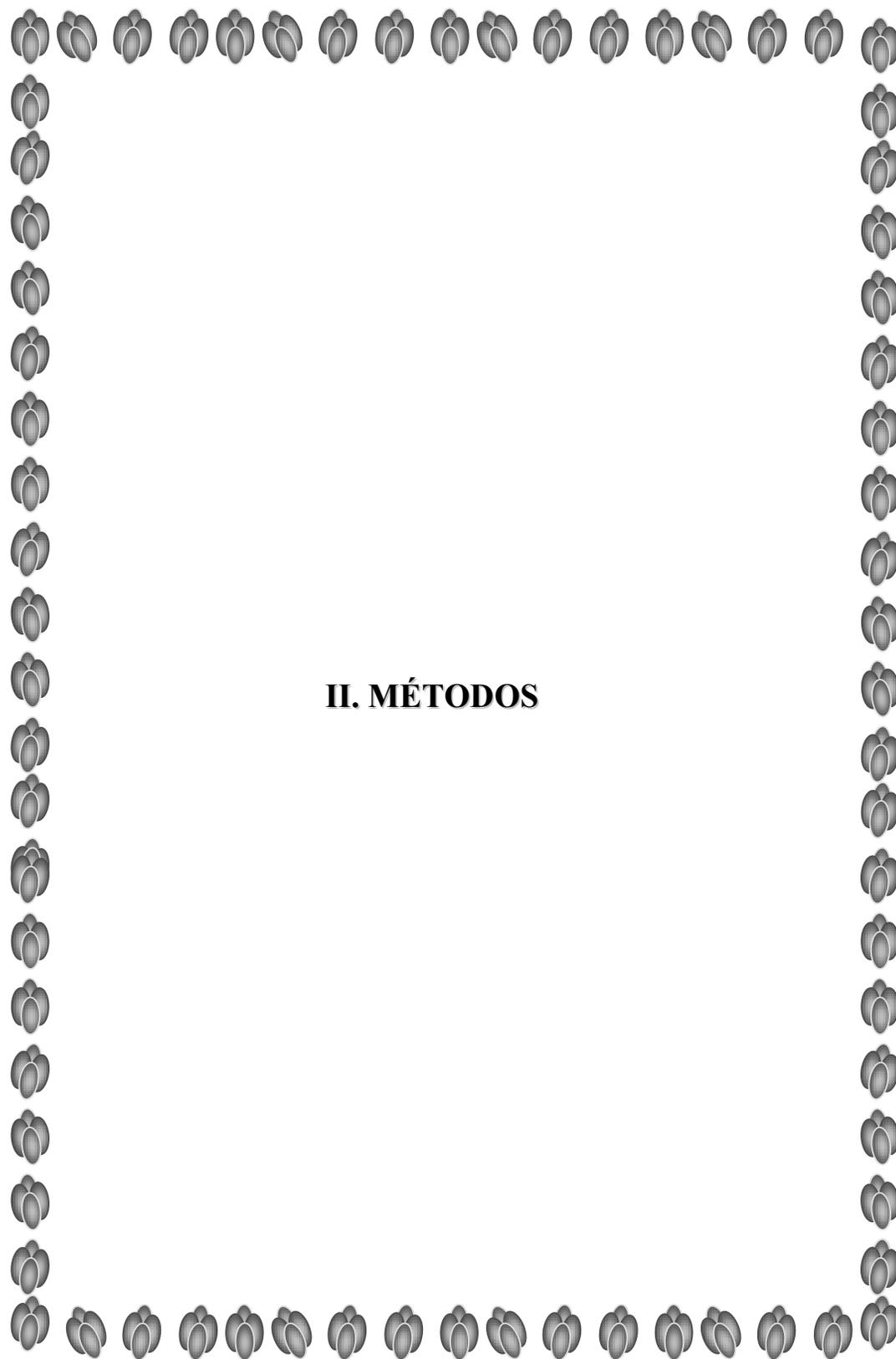
Poucos fenômenos celulares são tão estudados como a LTP inicial. Mas, até o presente momento não há, na literatura, nenhum relato sobre modelos de LTP, embora já existam trabalhos simulando alguns processos relacionados com a plasticidade sináptica (Lisman,

1989; Bhalla e Iyengar, 1999; d'Alcantara et al., 2003; Earnshaw e Bressloff, 2006; Zhabotinsky et al., 2006).

Com base nesse contexto, esse trabalho se dedicou ao desenvolvimento de um modelo da LTP inicial hipocampal. A construção desse modelo baseou-se, em um primeiro momento, na identificação das principais vias de sinalização envolvidas com a LTP hipocampal, seguida pela simulação de seus mecanismos de ativação e regulação. Essas vias, uma vez simuladas, foram validadas com base em dados retirados de artigos experimentais. Posteriormente, elas foram unificadas originando uma rede de sinalização. Essa rede de sinalização foi inserida no modelo do neurônio piramidal da área CA1 para o estudo da LTP hipocampal.

A LTP hipocampal foi investigada com base em dois aspectos centrais. O primeiro deles se refere aos eventos que culminam na ativação persistente de algumas enzimas em detrimento de outras. Para isso, o modelo foi utilizado para a identificação e análise das propriedades que emergem da organização temporal e espacial dos componentes simulados, e que determinam a ativação preferencial de moléculas específicas. Posteriormente, foram analisados os mecanismos presentes no modelo responsáveis pelo aumento do peso sináptico.

Com base nesses pontos, o objetivo central desse trabalho foi estudar a LTP inicial através da identificação e análise das propriedades que emergem da organização temporal e espacial de seus componentes bioquímicos e celulares e que são responsáveis por sua ocorrência.

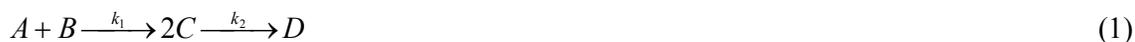


II. MÉTODOS

II. MÉTODOS

O modelo dos mecanismos pós-sinápticos da fase inicial da LTP foi desenvolvido a partir da simulação de um neurônio piramidal da área CA1 contendo, intracelularmente, sua rede de sinalização. Para a construção desses componentes, foram utilizadas equações diferenciais que permitem a simulação de fenômenos bioquímicos e biofísicos ao longo do tempo, com base em descrições cinéticas (Connors et al., 1990).

As simulações basearam-se na variação temporal das propriedades elétricas da célula e nas concentrações das espécies químicas simuladas. Para isso, as equações usadas para a simulação do neurônio seguiram o formalismo de modelagem compartimental (Koch e Segev, 1998), que será descrita posteriormente. Já as simulações das interações bioquímicas foram feitas de acordo com a lei de ação das massas, utilizando equações de taxas, através das quais cada espécie tem sua concentração calculada, ao longo do tempo, em função das taxas de velocidades das reações químicas em que participa como produto ou como reagente (Ferrel, 1999; 2002; Tyson et al., 2003; Eungdamrong e Iyengar, 2004; Sauro e Kholodenko, 2004). Assim, por exemplo, na reação abaixo:



cada espécie tem sua variação descrita, matematicamente, a partir das taxas de velocidade para seu consumo e/ou produção aplicadas à sua concentração inicial. Portanto, ainda de acordo com a reação (1), as equações que descrevem a concentração de cada espécie (A, B, C, D) ao longo do tempo são:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1 \cdot [A] \cdot [B] \quad (1)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_1 \cdot [A] \cdot [B] \quad (2)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_2 \cdot [C]^2 \quad (3)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_2 \cdot [C]^2 \quad (4)$$

Nessas equações, é possível notar que A e B tem apenas uma variação negativa ao longo do tempo, ou seja, essas espécies são consumidas na reação, com uma constante de velocidade k_1 , sem, no entanto, serem produzidas. Já a espécie C é produzida pela reação de A e B, com a constante de velocidade k_1 , e é consumida para gerar D. Porém, estequiometricamente, 2 mols de C são utilizados para produzir cada mol de D, o que é considerado nas equações (3) e (4). Todas as reações químicas simuladas nesse trabalho seguiram exatamente esse formalismo. Em todo o modelo, as constantes de velocidade e demais parâmetros utilizados foram retirados de artigos experimentais, com exceção de alguns componentes do modelo, cujos parâmetros não foram encontrados, fato que será indicado posteriormente.

As reações da LTP inicial ocorrem, essencialmente, nas espinhas dendríticas, que são pequenas protusões localizadas ao longo dos dendritos dos neurônios, e que atuam na recepção da maior parte das sinapses excitatórias que chegam à célula (Bloodgood e Sabatini, 2007; Sheng e Hoogenraad, 2007). As espinhas dendríticas são compostas, geralmente, por uma cabeça, onde se localizam, na superfície, os receptores sinápticos e, logo abaixo, a densidade pós-sináptica (Harris e Stevens, 1989; Alvarez e Sabatini, 2007). A cabeça da espinha dendrítica é unida ao seu dendrito parental por um pescoço, que, por apresentar um diâmetro reduzido, limita a difusão das proteínas para os demais compartimentos celulares (Nimchinsky et al., 2002; Bloodgood e Sabatini, 2005). Com isso, para a maior parte das

moléculas que participam da LTP inicial, sua difusão para outros compartimentos celulares pode ser desconsiderada. No entanto, algumas espécies simuladas, por possuírem tamanho reduzido e/ou alta reatividade, apresentam uma taxa de difusão rápida que limita suas reações (Sabatini et al., 2002; Eungdamrong e Iyengar, 2004). Para esses casos, foi necessário incorporar não apenas a variação temporal das concentrações simuladas, mas também a variação espacial. Para isso, no início desse trabalho, as simulações foram feitas a partir de equações diferenciais parciais, que permitem a simulação da variação temporal e espacial dos componentes de interesse. Porém, esse formalismo teve que ser substituído em função, principalmente, da limitação técnica para realizar essas simulações em larga escala e por longos períodos de tempo. Dessa maneira, optou-se por simular todas as reações a partir de equações diferenciais ordinárias e, para as espécies que possuem a difusão como um fator limitante de sua atuação, foram utilizados termos de decaimento derivados de seus coeficientes de difusão. Para algumas espécies, também foi utilizada a compartimentalização bioquímica, em que se considera que o mesmo componente pode se localizar ou se movimentar por diferentes compartimentos celulares (Eungdamrong e Iyengar, 2004). Para isso, foram utilizadas taxas para a mudança de um compartimento para o outro, obtidas através de artigos experimentais. Todos esses pontos, conforme o modelo for sendo descrito, serão apontados.

Todas as simulações foram feitas no programa *Mathematica* (Wolfram Research, Inc.), e resolvidas, de maneira determinística, com os métodos numéricos Runge-Kutta de 4ª ordem e de Adams.

A seguir, no próximo capítulo, serão descritos os detalhes do modelo, que contém um neurônio piramidal CA1 e as vias de sinalização da LTP inicial, simuladas no interior de uma espinhas dendríticas (Fig. 5), de acordo com as descrições da literatura que apontam que é

nessa estrutura que ocorrem as reações da LTP inicial (revisto em Sheng e Hoogenraad, 2007).

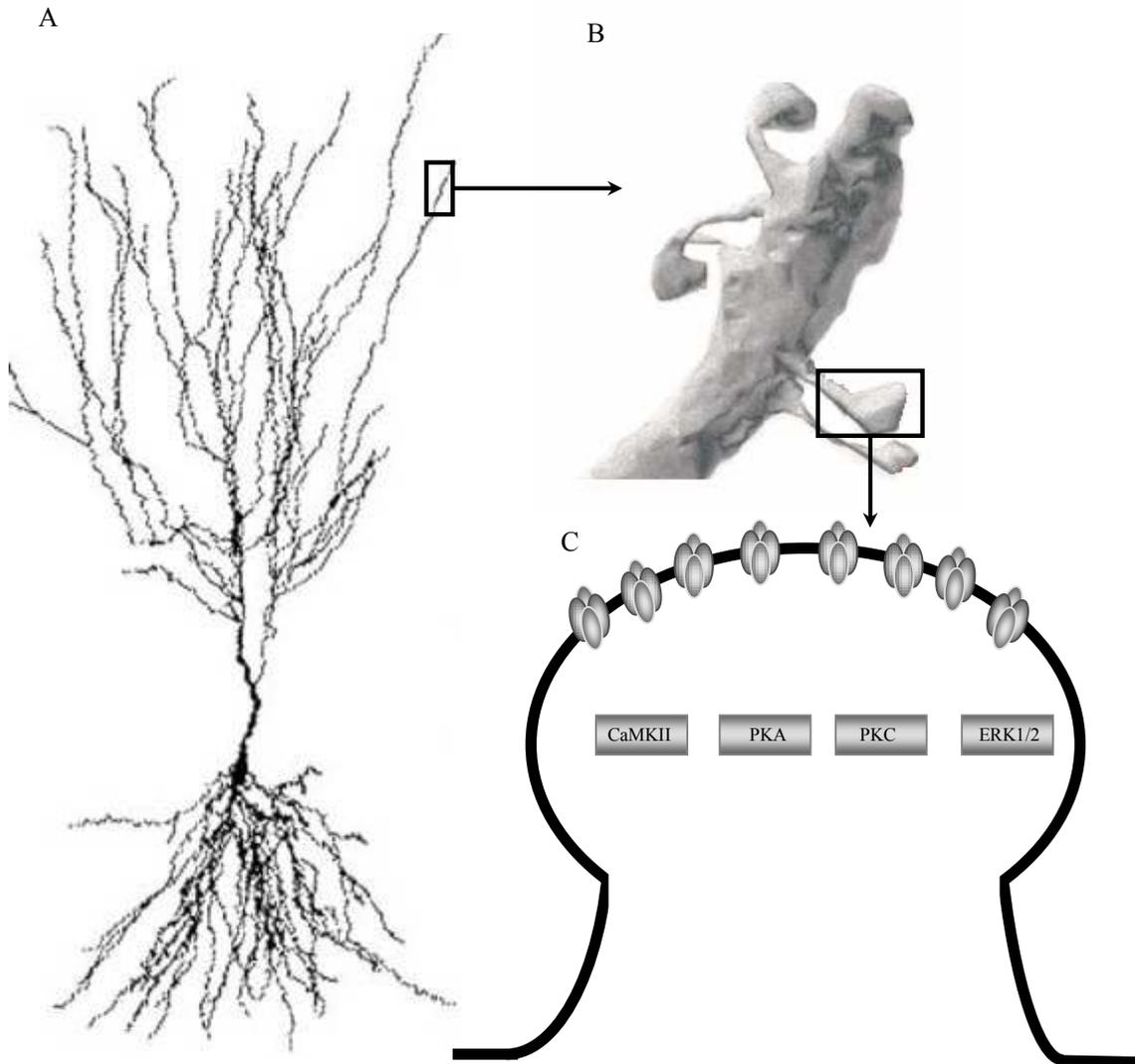


Figura 5: Esquematização geral do modelo da LTP inicial desenvolvido. O modelo foi construído contendo o neurônio piramidal da área CA1 (A) e, em uma de suas espinhas dendríticas, que são pequenas protusões encontradas ao longo dos dendritos (B), foram inseridas as vias bioquímicas da LTP inicial, representadas, em C, apenas por algumas enzimas (CaMKII, PKA, PKC e ERK1/2).

Entre as enzimas simuladas, destacam-se a CaMKII, a PKA, a PKC e a MAPK ERK1/2, que foram modeladas considerando-se seus mecanismos de ativação e regulação ativados através da estimulação celular por L-glutamato. Além delas, há ainda uma enzima

importante para a modulação da LTP e que também foi incluída no modelo: a óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO). Em adição a essas moléculas, foram simuladas algumas proteínas fosfatases, enzimas que atuam na terminação da sinalização mediada por quinases.

Cada molécula foi, em um primeiro momento, modelada isoladamente, a partir de seus mecanismos de ativação e regulação determinados pela estimulação glutamatérgica. Posteriormente, seus modelos foram unificados com base nos pontos de conexão existentes entre a atividade de algumas enzimas, o que foi feito em acordo com dados reportados na literatura. Após essa unificação, foi feita a organização espacial dos componentes simulados, desenvolvida considerando-se a localização específica de algumas moléculas no meio intracelular e as conseqüências desse posicionamento para sua atuação.

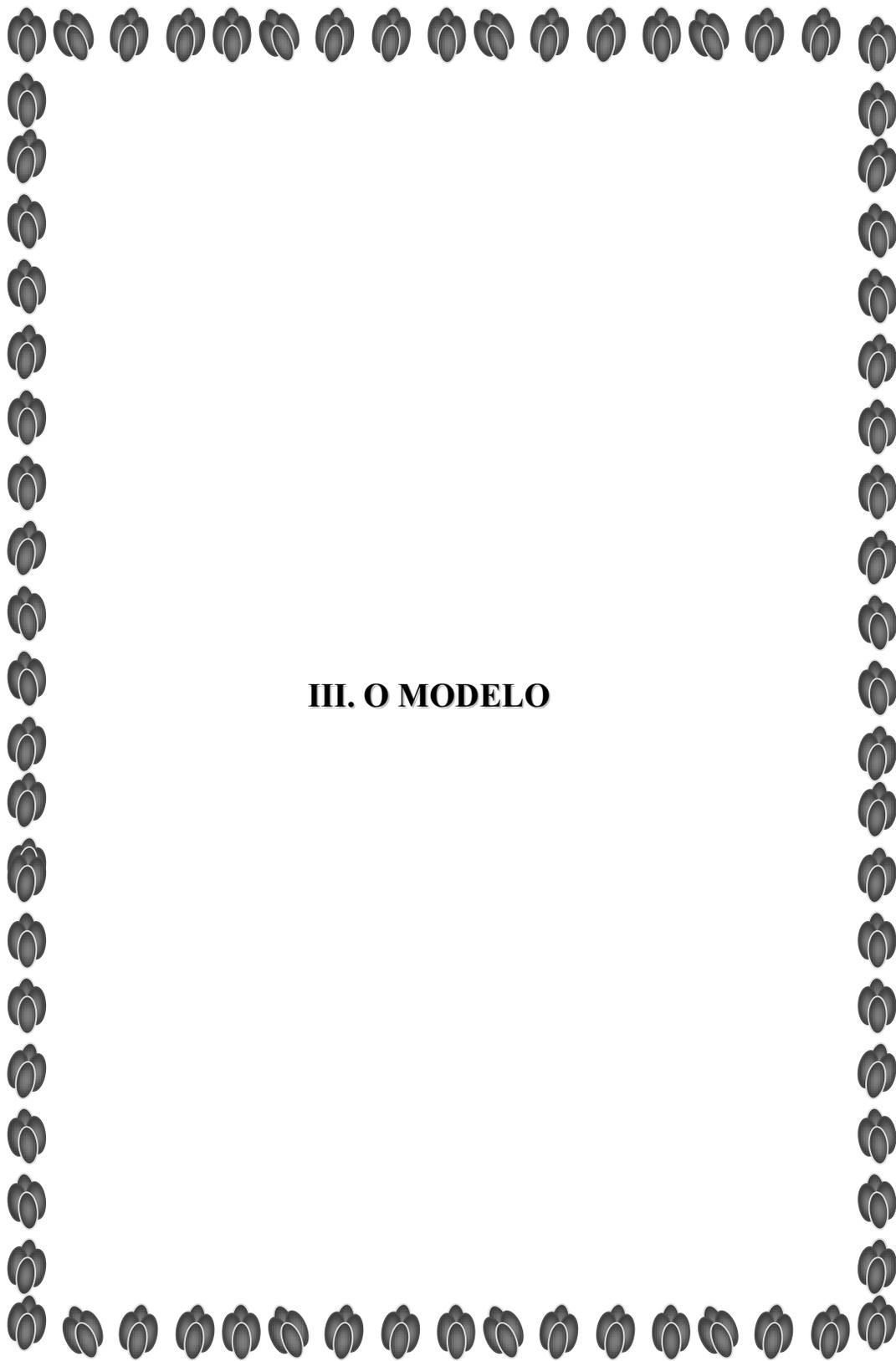
Após o desenvolvimento do modelo, ele foi validado com base na capacidade de seus componentes em apresentar comportamentos característicos observados, experimentalmente, no sistema biológico. Cabe ressaltar, no entanto, que essa validação foi feita considerando os componentes simulados de maneira isolada, já que a maior parte dos experimentos de caracterização dessas espécies utiliza situações experimentais nas quais elas são analisadas em sistemas artificiais, com a intenção de minimizar interferências nos resultados obtidos.

Após a validação do modelo, ele foi utilizado para o estudo da LTP inicial hipocampal. Esse estudo foi feito em quatro níveis principais. O primeiro considerou apenas algumas propriedades intrínsecas das proteínas simuladas e que podem explicar sua ativação durante a LTP. Em seguida, foram analisados os pontos de coordenação temporal entre a atividade dessas proteínas e como eles se relacionam com a ocorrência de LTP. No nível posterior, foi considerada a organização espacial dos componentes simulados no meio intracelular, considerando como essa organização favorece a ativação preferencial de algumas enzimas essenciais para a LTP e, em seguida, como ela determina a atuação dessas enzimas

na mediação do aumento do peso sináptico. Por último, foi proposto um mecanismo para explicar como deve ocorrer o aumento do peso sináptico na LTP.

Os resultados obtidos com o modelo desenvolvido são expressos, na maior parte das vezes, em termos de percentagem de ativação das enzimas simuladas, considerando-se que 100% de ativação se refere a concentração total de uma determinada enzima simulada em seu estado ativo. Alguns componentes, porém, são mostrados, diretamente, em concentração, dada em $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Além disso, a variação no número de receptores AMPA é apresentada, diretamente, em números de canais. E, em adição a essas formas de apresentação, há também dados mostrados em termos de corrente (canais sinápticos) e, para a célula elétrica, potencial da membrana.

As formas de análises dos resultados basearam-se, durante a fase de validação do modelo, na comparação direta dos resultados obtidos com os componentes do modelo com algumas características das espécies reais, como dependência de seus ativadores, para as enzimas simuladas, padrões de abertura e fechamento dos canais sinápticos, entre outras. Além dessa análise, os demais resultados obtidos foram avaliados com base em sua habilidade para apresentar comportamentos emergentes, ou seja, provenientes da organização entre os componentes do modelo, em acordo com dados existentes na literatura.



III. O MODELO

III. O MODELO

3.1 O modelo do neurônio piramidal hipocampal CA1

O primeiro componente do modelo de LTP inicial simulado foi o neurônio piramidal hipocampal. Para isso, utilizou-se a modelagem compartimental, técnica de simulação que se baseia na representação dos neurônios através de circuitos equivalentes. Ou seja, nesse tipo de simulação, o neurônio é dividido em pequenos compartimentos. Cada um desses compartimentos é representado por um circuito equivalente que é simulado através de equações diferenciais ordinárias (Koch e Segev, 1998; Kath, 2005) (Fig. 6).

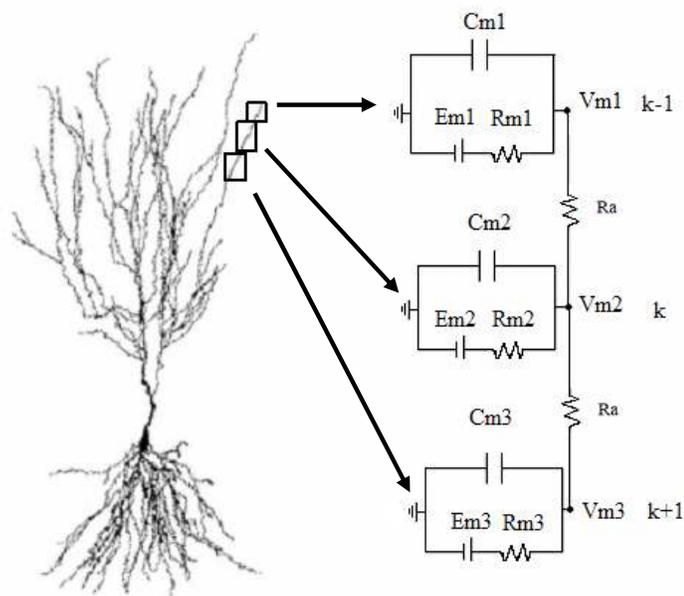


Figura 6: Representação esquemática da construção do modelo compartimental. Para o desenvolvimento do modelo compartimental, o neurônio é representado através de pequenos segmentos, simulados a partir de circuitos equivalentes unidos entre si através de resistividades do meio intracelular (R_a).

A simulação da célula da área CA1 foi feita com base em um modelo compartimental já existente, desenvolvido por Traub et al. (1991). Essa escolha se deve, principalmente, ao fato desse modelo apresentar, de maneira eficiente, o comportamento de um neurônio

piramidal CA1 através de poucos compartimentos, o que é vantajoso do ponto de vista técnico, pois possibilita que as simulações da célula sejam feitas sem um alto custo computacional.

O neurônio piramidal da área CA1 do hipocampo é composto por um soma, axônio, dendritos basais e apicais que se ramificam formando arborizações dendríticas (Ishizuka et al., 1990; 1995). Essas características morfológicas são simuladas, no modelo de Traub et al. (1991), através de dezenove compartimentos: nove representando dendritos basais, um para o soma, e nove para os dendritos apicais. A mesma organização foi incorporada no modelo do neurônio piramidal utilizado nesse trabalho. Cada compartimento elétrico foi simulado de acordo com a equação:

$$C_k \frac{dV_k}{dt} = \gamma_{k-1,k} (V_{k-1} - V_k) + \gamma_{k+1,k} (V_{k+1} - V_k) - I_{iônica,k} \quad (5)$$

em que k é o compartimento considerado, C_k é a capacitância no compartimento k , $\gamma_{k,k+1}$ é a condutância entre os compartimentos k e $k+1$, V_k é o potencial no compartimento k , V_{k-1} e V_{k+1} são as voltagens nos compartimentos vizinhos ao compartimento k considerado, e $I_{iônica,k}$ representa as correntes iônicas existentes no compartimento k . Os parâmetros utilizados no modelo do neurônio foram: resistividade do meio intracelular (R_a) = 100 Ωcm , resistência específica da membrana (R_m) = 10000 Ωcm^2 , capacitância específica da membrana (C_m) = 3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, resistência de entrada nos dendritos apicais = 60 $\text{M}\Omega$, resistência de entrada nos dendritos basais = 90 $\text{M}\Omega$, e resistência de entrada em toda a célula = 32 $\text{M}\Omega$ (Traub et al., 1991; Mainen et al., 1996).

O modelo do neurônio piramidal foi simulado com seis correntes iônicas, sendo uma de Ca^{2+} , uma de Na^+ e as demais de K^+ (Traub et al., 1991). Cada uma dessas correntes é

responsável por uma característica elétrica específica. A corrente transiente de sódio (I_{Na} , *sodium current*) gera potenciais de ação. As correntes de potássio retificadora com atraso (I_{K_DR} , *delayed rectifier potassium current*) e transiente do tipo A (I_{K_A} , *A-type transient potassium current*) são responsáveis por repolarizar os potenciais de ação. A corrente de potássio ativada por cálcio (I_{K_AHP} , *Ca²⁺-dependent afterhyperpolarization potassium current*) e a corrente de potássio de curta duração sensível à voltagem e ativada por cálcio (I_{K_C} , *short duration voltage- and -Ca²⁺-dependent potassium current*) atuam na adaptação lenta da frequência de disparos de potenciais de ação. A corrente de cálcio de baixo limiar (I_{Ca}) é responsável por disparos em rajada (*burst*). Além disso, o modelo também possui uma corrente de vazamento que simula o fluxo passivo de íons através da membrana e contribui para o potencial de repouso. As equações utilizadas para a construção dessas correntes foram retiradas de Traub et al. (1991).

Após a construção desse modelo de acordo com sua descrição original (Traub et al., 1991), foi necessário alterá-lo. O trabalho de Traub et al. (1991) não simula, explicitamente, as espinhas dendríticas, o que é um fato comum em diversos modelos de neurônios, que representam essas estruturas apenas como um prolongamento da área da membrana dendrítica (Mainen et al., 1996). No entanto, é na espinha dendrítica que se localiza a densidade pós-sináptica, concentrando as proteínas e receptores que agem na LTP, além dos sítios para endocitose e exocitose (Spacek e Harris, 1997; Nimchinsky et al., 2002; Bloodgood et al., 2005; Sheng e Hoogenraad, 2007). Assim, foi necessário incluir uma espinha dendrítica explicitamente, onde foi, posteriormente, inserida a rede de sinalização simulada.

A simulação da espinha dendrítica foi feita a partir de sua estrutura morfológica, que é formada por uma cabeça, aonde chegam as entradas sinápticas, e um pescoço que conecta a cabeça ao dendrito parental (Volfovisky et al., 1999; Tsay e Yuste, 2002; 2004). O modelo

desenvolvido baseou-se na espinha dendrítica do tipo cogumelo, que é comum em células piramidais hipocampais (Nimchinsky et al., 2002; Bloodgood e Sabatini., 2007).

A espinha dendrítica foi simulada com 3 compartimentos cilíndricos, com uma altura total de $1.5 \mu\text{m}$ (Fig. 7). O primeiro e o segundo compartimentos representam a cabeça, e são simulados como cilindros com diâmetro da base de $0.71 \mu\text{m}$ (Mainen et al., 1996; Volfovsky et al., 1999). A densidade pós-sináptica ocupa apenas o primeiro compartimento da cabeça e tem altura de $0.3 \mu\text{m}$ (Sorra e Harris, 2000; Ebihara et al., 2003). O pescoço foi simulado como um cilindro de altura igual a $0.43 \mu\text{m}$ e diâmetro da base de $0.20 \mu\text{m}$ (Mainen et al., 1996; Volfovsky et al., 1999).

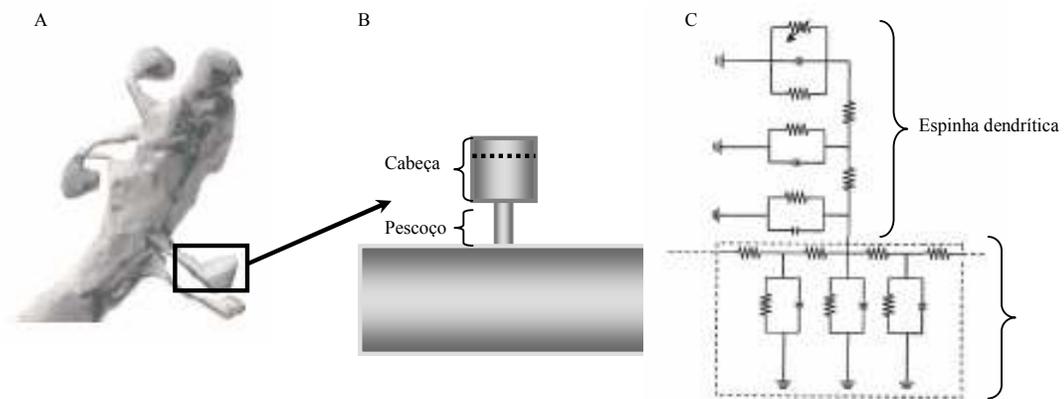


Figura 7: A espinha dendrítica e a representação de seu modelo computacional. A espinha dendrítica é uma pequena protusão encontrada ao longo dos dendritos dos neurônios, que atua na recepção da maior parte das entradas sinápticas excitatórias. Geralmente, essas espinhas possuem uma cabeça e um pescoço (A), cujas dimensões foram consideradas no desenvolvimento de seu modelo. A simulação da espinha dendrítica foi feita com três compartimentos, sendo dois para representar a cabeça, separados por uma linha pontilhada, e um compartimento para o pescoço, que conecta a cabeça ao seu dendrito parental (B). Cada compartimento foi simulado através de seu circuito equivalente (C).

Todos os compartimentos da espinha dendrítica foram modelados de acordo com a equação (5), exceto o primeiro compartimento da cabeça, onde se localiza a zona sináptica, que foi simulado considerando a presença dos receptores AMPA e NMDA de acordo com a equação:

$$\frac{dV_k}{dt} = \left[I_{NMDA} + I_{AMPA} - \left(\frac{V_k(t) - E_{rep}}{R_m} \right) - \left(\frac{V_k(t) - V_{k+1}(t)}{R_a} \right) \right] \cdot \frac{1}{C_m} \quad (6)$$

onde V_k é a voltagem no primeiro compartimento da cabeça, E_{rep} (-70mV) é o seu potencial de repouso, R_m (10000 Ωcm^2) é a resistência específica da membrana, C_m (1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$) é a capacitância específica da membrana no compartimento, e R_a (200 Ωcm) é a resistividade do meio intracelular (Holmes e Levy, 1990; Mainen et al., 1996). I_{NMDA} e I_{AMPA} são as correntes do NMDA e AMPA, respectivamente e foram construídas considerando a condutância unitária para cada canal, multiplicada pelo número de canais abertos ao longo das simulações, para a obtenção da condutância macroscópica na região. Essa condutância multiplicada pelo potencial da membrana fornece o valor da corrente para cada tipo de canal simulado. Portanto, a condutância e a corrente variam de acordo com o número de canais AMPAs e NMDAs abertos em cada instante das simulações.

3.2 Os receptores de L-glutamato ionotrópicos: AMPA e NMDA

De acordo com os dados da literatura, nos neurônios piramidais hipocampais da região CA1 são encontrados, principalmente, dois tipos de receptores ionotrópicos de L-glutamato, o AMPA e o NMDA, que se colocizam nas sinapses (Spruston et al., 1995; Nusser, 2000). Além do AMPA e do NMDA, há ainda um terceiro tipo de receptor ionotrópico de L-glutamato, o kainato. Porém, os receptores kainato não são abundantes nos neurônios da área CA1, o que determina que eles tenham um papel apenas modulatório na LTP dessa região, embora sejam fundamentais para a LTP em outras áreas do cérebro (Colquhoun et al., 1992; Bortolotto et al., 1999; Lerma, 2003). Em função desse ponto, os receptores kainato não foram simulados.

Geralmente, há apenas uma sinapse em cada espinha dendrítica dos neurônios da área CA1, composta, pré-sinápticamente, pela zona ativa de liberação de vesículas e, pós-sinápticamente, pelos receptores sinápticos e pela densidade pós-sináptica (Harris e Stevens, 1989; Sorra e Harris, 2000). Todas as sinapses excitatórias dos neurônios hipocâmpais CA1 contêm receptores NMDA (Nusser, 2000; Racca et al., 2000). Já os receptores AMPA são encontrados em 85% delas (Liao et al., 1995; Takumi et al., 1999; Tanaka et al., 2005). Além disso, nas sinapses que contêm AMPA, seu número varia consideravelmente (3-140 receptores por sinapse) (Nusser et al., 1998; Matsuzaki et al., 2001). E esse número se altera ao longo do tempo, em função da atividade sináptica (Morales e Goda, 1999; Shi et al., 1999).

Para incorporar a variação no número de AMPAs ao longo das simulações, foi necessário considerar a existência de duas populações de receptores, diferenciadas em função de suas subunidades. Ou seja, no modelo, foi simulada a existência de uma população de AMPAs GluR2/GluR3 e uma de AMPAs GluR1/GluR2. Além dessas duas populações, 80% do total de AMPAs simulados, independente de sua composição, foi considerado associado às TARPs (Nakagawa et al., 2005).

Os GluR2/GluR3 foram simulados como uma população fixa de receptores sináptico, pois, durante a atividade celular basal, eles apresentam um movimento contínuo de exocitose e endocitose na membrana que não altera sua densidade de canais (Lüscher et al., 1999; Passafaro et al., 2001). Da mesma forma, a difusão lateral do GluR2/GluR3 é menor do que a dos GluR1/GluR2, e não é capaz de gerar qualquer modificação no peso sináptico durante a LTP (Shi et al., 1999; 2001). Ou seja, os GluR2/GluR3 não apresentam uma variação, em número, significativa para a ocorrência de LTP e, portanto, seus movimentos não foram incorporados no modelo desenvolvido.

Em contrapartida ao comportamento dos GluR2/GluR3, os receptores GluR1/GluR2 estão amplamente implicados com a ocorrência de LTP (Malinow e Malenka, 2002; Palmer et

al., 2006). Durante as condições celulares basais, esses receptores difundem-se na membrana celular alternando-se entre a zona sináptica e extra-sináptica, sem, porém, causar qualquer mudança na densidade de canais na zona sináptica (Tardin et al., 2003; Adesnik et al., 2005). No entanto, durante a LTP, os receptores da membrana citoplasmática param de se difundir livremente e são recrutados para a zona sináptica, através de processos mediados por reações de fosforilação (Ashby et al., 2006; Bats et al., 2007). A LTP também causa a entrada de mais receptores GluR1/GluR2 na membrana, provenientes de vesículas intracelulares específicas, os endossomas de reciclagem (Park et al., 2004). Esses receptores novos são inseridos, necessariamente, na zona extra-sináptica podendo, posteriormente, se moverem até a região sináptica através de difusão lateral (Ashby, 2004; 2006; Groc e Choquet, 2006). Todos esses pontos foram considerados no modelo de LTP inicial desenvolvido. Para isso, foi necessário simular três espécies de AMPAs GluR1/GluR2 distintas espacialmente: GluR1/GluR2 em vesículas intracelulares, GluR1/GluR2 na zona extra-sináptica e GluR1/GluR2 na região sináptica (Hall e Soderling, 1997; Park et al., 2004; Ashby et al., 2006).

Os receptores intracelulares foram modelados a partir de suas interações com proteínas específicas e sua movimentação entre a membrana e as vesículas intracelulares. Não foi considerada a inserção de AMPAs na membrana durante a atividade celular basal. Ou seja, só a ocorrência de LTP foi associada com a entrada desses receptores na membrana. E, para serem inseridos, os AMPAs GluR1/GluR2 do modelo devem estar associados às TARPs e serem fosforilados. Uma vez inseridos na membrana celular, o que necessariamente ocorre na zona extra-sináptica, os GuR1/GluR2 podem difundir ao longo da cabeça da espinha dendrítica. Para simular esse processo, foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{d[AMPA_{extra}]}{dt} = \frac{vol}{A_{extra}} \cdot k \cdot [AMPA_{intra_fosforil}] - \frac{A_{extra}}{A_{intra}} \cdot d_1 \cdot [AMPA_{extra}] + \frac{A_{intra}}{A_{extra}} \cdot d_2 \cdot [AMPA_{sin}] \quad (7)$$

onde $AMPA_{extra}$ se refere aos receptores extra-sinápticos, cuja população varia em função da entrada de receptores intracelulares fosforilados na membrana, representados por $AMPA_{intra_fosforil}$, em função de sua difusão para a zona sináptica e em função da difusão de receptores sinápticos, representados por $AMPA_{sin}$, para a região extra-sináptica. Nessa equação, k é a taxa de inserção desses receptores, d_l é a taxa de difusão dos receptores extra-sinápticos para a zona sináptica e d_e é a taxa dos receptores sinápticos para a zona extra-sináptica (Tardin et al., 2003; Bats et al., 2007). Como essas três localizações possuem dimensões geométricas diferentes, é necessário multiplicar cada um desses termos por fatores de conversão que calculam o número de receptores em função das dimensões da região considerada. Assim, vol é o volume do meio intracelular da espinha dendrítica, A_{extra} é a área da membrana extra-sináptica e A_{intra} , da membrana sináptica.

Como foi mencionado anteriormente, no modelo, os GluR1/GluR2 se difundem livremente até serem estabilizados na zona sináptica durante a LTP. Para haver a sua estabilização, o AMPA deve atender a dois critérios: estar associado com TARP e ser fosforilado, em concordância com dados experimentais (Tomita et al., 2005b; Tsui e Malenka, 2006). Com base nesses pontos, é importante ressaltar que foram simuladas quatro espécies de AMPA GluR1/GluR2 em cada localização espacial considerada: com e sem proteína de associação (TARP), fosforilado com e sem proteína de associação (Fig. 8). Vale notar que uma fosforilação específica é requerida para a entrada do AMPA na membrana, catalisada pela ERK1/2, pela PKA, ou pela PKC, e outra é necessária para a fixação do receptor na zona sináptica, sendo catalisada pela CaMKII ou pela PKC.

Na zona sináptica, tanto os receptores GluR1/GluR2 quanto os GluR2/GluR3 foram considerados capazes de se ligarem ao L-glutamato e mediarem a despolarização celular. É importante ressaltar, no entanto, que os GluR1/GluR2 extra-sinápticos não foram simulados como capazes de participarem da transmissão sináptica. Essa simplificação foi adotada por

que os receptores extra-sinápticos contribuem muito pouco para a despolarização celular, em função de sua localização desfavorecida para a recepção do neurotransmissor (Raghavachari e Lisman, 2004) (Fig. 9).

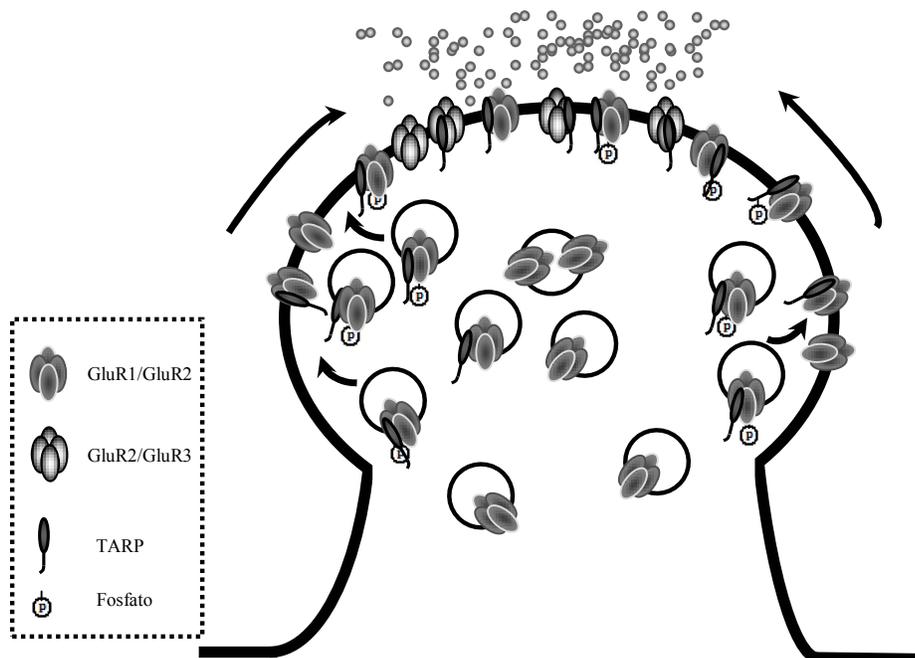


Figura 8: Esquema geral dos receptores AMPA simulados. Os receptores AMPA foram simulados como duas populações, sendo uma composta pelos heterômeros GluR1/GluR2 e a outra pelos GluR2/GluR3. Os AMPAs GluR2/GluR3 foram simulados como uma população imóvel de receptores sinápticos, já os GluR1/GluR2s foi considerados em três localizações distintas: na zona sináptica, extra-sináptica e em vesículas intracelulares. Apenas os GluR2/GluR3s e os GluR1/GluR2s sinápticos mediam a transmissão glutamatérgica no modelo. E essa mediação pode ser alterada em função da presença de TARPs, proteínas transmembrânicas que podem se associar com ambos os heterômeros.

Para simular a atuação do AMPA na transmissão sináptica, foi necessário considerar seu padrão de abertura, fechamento e dessensibilização em presença de L-glutamato, que é independente de sua composição protéica (Dingledine et al., 1999). Ou seja, tanto o GluR1/GluR2 quanto o GluR2/GluR3 podem ser representados pelo mesmo esquema cinético, que descreve as transições entre os estados de seus canais.

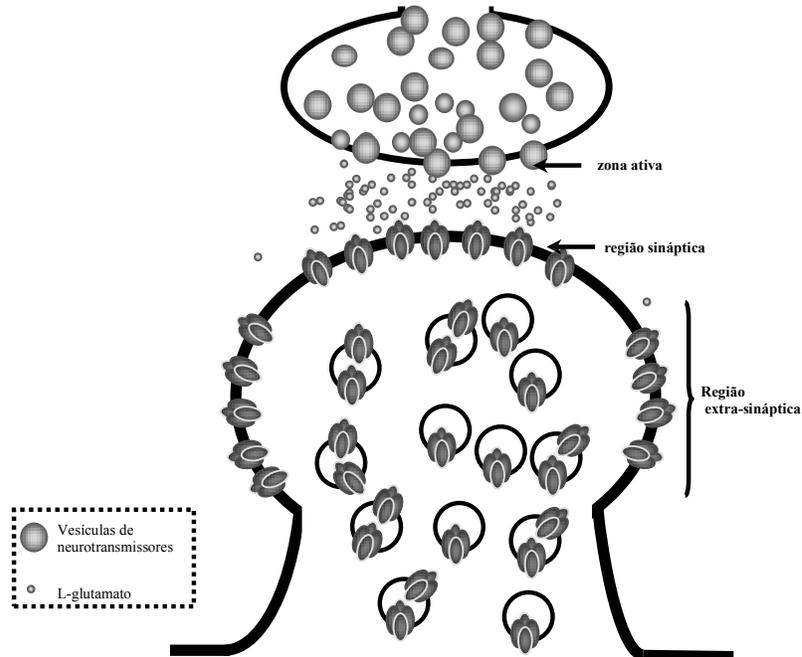


Figura 9: A recepção de L-glutamato. O L-glutamato é liberado da zona ativa, localizado nos terminais axônicos pré-sinápticos. Nesses terminais, as vesículas de neurotransmissor são armazenadas até serem excitadas, liberando-o na fenda. Nessa região, em função do grande número de transportadores de L-glutamato existentes em células glia e nos próprios neurônios, esse neurotransmissor atua apenas por um breve intervalo de tempo, ativando os receptores sinápticos. Os receptores extra-sinápticos, em função de sua localização desfavorável, não participam na recepção de L-glutamato.

Estruturalmente, o AMPA é formado a partir de combinações diméricas de suas isoformas, ou seja, primeiro duas subunidades se associam, formando um dímero e, através da junção de dois dímeros, forma-se o arranjo tetramérico do receptor (Madden, 2002; Gouaux, 2003; Hansen et al., 2007). É essa organização dimérica inicial que permite que o canal iônico do AMPA apresente, pelo menos, três estados abertos, ou seja, associado a duas, três ou quatro moléculas de agonista (Swanson et al., 1997; Pei et al., 2007). Cada um desses estados abertos é vinculado a uma condutância unitária específica (Raghavachari e Lisman, 2004). Além dos estados abertos e fechados do canal, o AMPA também apresenta uma rápida e profunda dessensibilização (Colquhoun et al., 1992; Sun et al., 2002). Assim, a breve corrente mediada pelo AMPA é controlada, em grande parte, por suas taxas de desativação, ou seja, a taxa de decaimento da corrente iônica após a retirada do agonista, e de dessensibilização,

definida como o decaimento na corrente que flui pelo canal em presença contínua do agonista (Hansen et al., 2007; Mitchell e Fleck, 2007). Para incorporar essas características, o modelo do AMPA foi construído de acordo com o esquema cinético mostrado na Fig. 10.

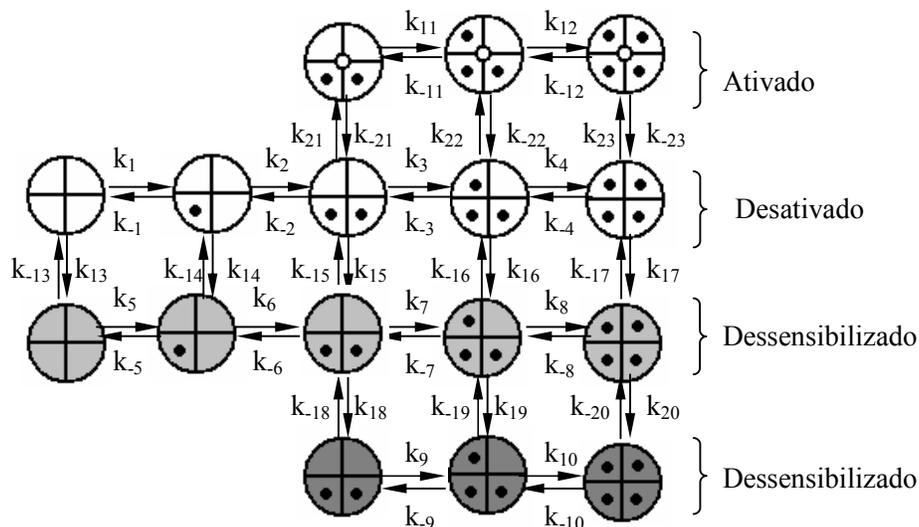


Figura 10: Esquema cinético do receptor AMPA utilizado para a construção de seus modelos computacionais. Nesse esquema é considerada a associação do receptor desativado com o L-glutamato (●), sua passagem para os seus estados abertos (ativados) e estados dessensibilizados leves e profundos.

O esquema cinético do AMPA foi utilizado como base para simulá-lo, através das equações diferenciais mostradas abaixo, em que R representa o receptor, L o L-glutamato, D o estado dessensibilizado leve, D' o estado dessensibilizado profundo (2ª dessensibilização), k_1 - k_{23} são as constantes de taxa para a passagem de um estado para o outro do receptor (Tabela I, Anexo I), e o número subscrito após o L indica a quantidade de moléculas de L-glutamato associadas ao AMPA:

$$\frac{d[R]}{dt} = -(k_1 \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL]) - (k_{13} \cdot [R] - k_{-13} \cdot [D]) \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RL]}{dt} &= (k_1 \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL]) - (k_{14} \cdot [RL] - k_{-14} \cdot [DL]) \\ &- (k_2 \cdot [RL] \cdot [L] - k_{-2} \cdot [RL_2]) \end{aligned} \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RL_2]}{dt} &= (k_2 \cdot [RL] \cdot [L] - k_{-2} \cdot [RL_2]) - (k_3 \cdot [RL_2] \cdot [L] - k_{-3} \cdot [RL_3]) \\ &- (k_{15} \cdot [RL_2] - k_{-15} \cdot [DL_2]) - (k_{21} \cdot [RL_2] - k_{-21} \cdot [OL_2]) \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RL_3]}{dt} &= (k_3 \cdot [RL_2] \cdot [L] - k_{-3} \cdot [RL_3]) - (k_4 \cdot [RL_3] \cdot [L] - k_{-4} \cdot [RL_4]) \\ &- (k_{16} \cdot [RL_3] - k_{-16} \cdot [DL_3]) - (k_{22} \cdot [RL_3] - k_{-22} \cdot [OL_3]) \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RL_4]}{dt} &= (k_4 \cdot [RL_3] \cdot [L] - k_{-4} \cdot [RL_4]) - (k_{17} \cdot [RL_4] - k_{-17} \cdot [DL_4]) \\ &- (k_{23} \cdot [RL_4] - k_{-23} \cdot [OL_4]) \end{aligned} \quad (12)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = (k_{13} \cdot [R] - k_{-13} \cdot [D]) - (k_5 \cdot [D] \cdot [L] - k_{-5} \cdot [DL]) \quad (13)$$

$$\frac{d[DL]}{dt} = (k_5 [D][L] - k_{-5} [DL]) - (k_6 [DL][L] - k_{-6} [DL_2]) \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DL_2]}{dt} &= (k_6 \cdot [DL] \cdot [L] - k_{-6} \cdot [DL_2]) - (k_7 \cdot [DL_2] \cdot [L] - k_{-7} \cdot [DL_3]) \\ &- (k_{18} \cdot [DL_2] - k_{-18} \cdot [D'L_2]) \end{aligned} \quad (15)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DL_3]}{dt} &= (k_7 \cdot [DL_2] \cdot [L] - k_{-7} \cdot [DL_3]) - (k_8 \cdot [DL_3] \cdot [L] - k_{-8} \cdot [DL_4]) \\ &- (k_{19} \cdot [DL_3] - k_{-19} \cdot [D'L_3]) \end{aligned} \quad (16)$$

$$\frac{d[DL_4]}{dt} = (k_8 \cdot [DL_3] \cdot [L] - k_{-8} \cdot [DL_4]) - (k_{20} \cdot [DL_4] - k_{-20} \cdot [D'L_4]) \quad (17)$$

$$\frac{d[D'L_2]}{dt} = (k_{18} \cdot [DL_2] - k_{-18} \cdot [D'L_2]) - (k_9 \cdot [D'L_2] \cdot [L] - k_{-9} \cdot [D'L_3]) \quad (18)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[D'L_3]}{dt} &= (k_{19} \cdot [DL_3] - k_{-19} \cdot [D'L_3]) - (k_9 \cdot [D'L_2] \cdot [L] - k_{-9} \cdot [D'L_3]) \\ &- (k_{10} \cdot [D'L_3] \cdot [L] - k_{-10} \cdot [D'L_4]) \end{aligned} \quad (19)$$

$$\frac{d[D'L_4]}{dt} = (k_{20} \cdot [DL_4] - k_{-20} \cdot [D'L_4]) + (k_{10} \cdot [D'L_3] \cdot [L] - k_{-10} \cdot [D'L_4]) \quad (20)$$

$$\frac{d[OL_2]}{dt} = (k_{21} \cdot [RL_2] - k_{-21} \cdot [OL_2]) - (k_{11} \cdot [OL_2] \cdot [L] - k_{-11} \cdot [OL_2]) \quad (21)$$

$$\frac{d[OL_3]}{dt} = (k_{22} \cdot [RL_3] - k_{-22} \cdot [OL_3]) - (k_{12} \cdot [OL_3] \cdot [L] - k_{-12} \cdot [OL_4]) \quad (22)$$

$$\frac{d[OL_4]}{dt} = (k_{23} \cdot [RL_4] - k_{-23} \cdot [OL_4]) + (k_{12} \cdot [OL_3] \cdot [L] - k_{-12} \cdot [OL_4]) \quad (23)$$

A cinética do receptor AMPA, além de ser dependente das isoformas que o compõem, também é profundamente alterada em função da presença de TARP (Kristensen e Traynelis, 2005). Como já foi mencionado, as TARPs são pequenas proteínas transmembrânicas que se associam aos AMPAs nos retículos endoplasmáticos, local em que os receptores são glicosilados antes de serem inseridos na membrana (Tomita et al., 2003; Nicoll et al., 2006). Ao que se sabe, a associação das TARPs nesses receptores aumenta sua taxa de inserção na membrana celular e na zona sináptica, através de sua interação com as proteínas da densidade pós-sináptica (Rouach et al., 2005; Tomita et al., 2005b; Ziff, 2007). Além disso, as TARPs também modificam a ativação do AMPA, aumentando sua afinidade por agonista, diminuindo sua taxa de desativação e aumentando o tempo necessário para o AMPA entrar em seu estado dessensibilizado (Tomita et al., 2003; 2005a; 2006; 2007).

Em função desses pontos, foi necessário incluir a interação entre as TARPs e o AMPA no modelo, já que os parâmetros utilizados, retirados de trabalhos em que o receptor é expresso sem TARP, provavelmente estão divergentes em relação ao comportamento do AMPA nativo (Hansen et al., 2007). No entanto, é necessário ressaltar que, como a descoberta das TARPs é recente (Letts et al., 1998), ainda existem inúmeros pontos desconhecidos e, para a construção do modelo, alguns aspectos foram considerados, embora ainda sejam pouco conhecidos.

O primeiro desses aspectos se refere à estequiometria de interação entre as TARPs e o AMPA que foi considerada como fixa e 1:1. Cerca de 80% dos AMPAs são colocalizados com as TARPs, independentemente da composição do receptor (Tomita et al., 2003; Nakagawa et al., 2005), o que foi incorporado nas simulações. Esses receptores associados às TARPs foram simulados com uma taxa de dissociação de L-glutamato 50% mais lenta (Tomita et al., 2005; Kott et al., 2007). Também foi necessário alterar os parâmetros para a dessensibilização do AMPA, que, com TARP, ocorre após um intervalo de tempo 50% maior (Priel et al., 2005; Turetsky et al., 2005). Assim, embora o modelo cinético utilizado para simular o AMPA tenha sido o mesmo para o GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 com e sem TARP (Fig. 9), a composição do receptor e a presença de TARP foi considerada através do uso de taxas de velocidade distintas, retiradas de dados experimentais (Robert e Howe, 2003; Nakagawa et al., 2005; Priel et al., 2005; Robert et al., 2005; Tomita et al., 2005; Turetsky et al., 2005) (Tabela 1, Anexo I).

Uma vez na zona sináptica, o AMPA media grande parte da despolarização da membrana celular. E, de acordo com a despolarização da membrana celular, pode ocorrer a abertura dos canais dos receptores NMDA, que também foi simulado.

Em comparação com o AMPA, o NMDA apresenta movimentos muito lentos na membrana celular, o que se deve, em grande parte, a sua interação direta com a actina (Wyszynski et al., 1997). Esses movimentos aparentemente não possuem vinculação com a ocorrência de LTP ou LTD (Groc et al., 2004), embora esse fato seja controverso (Tovar e Westbrook, 2002). Além disso, os receptores NMDA concentram-se, principalmente, na membrana celular, e não em vesículas intracelulares, e apresentam densidade de canais relativamente constante do ponto de vista temporal (Nusser, 2000; Racca et al., 2000). Portanto, o modelo do NMDA não considerou a variação em sua densidade de canais ao longo das simulações.

O NMDA é um tetrâmero formado, geralmente, a partir da combinação de duas subunidades NR1 e duas NR2 (Cull-Candy et al., 2001; Köhr, 2006). A maior parte dos receptores NMDA nos neurônios piramidais CA1 é formada por duas subunidades NR1 e duas NR2B, ou duas NR1 e duas NR2A (Tovar e Westbrook, 1999). Há uma sensível diferença na distribuição desses receptores ao longo das espinhas dendríticas. O NMDA NR1/NR2B, que predomina na região sináptica durante o desenvolvimento, na fase adulta migra para a zona extra-sináptica (Cull-Candy et al., 2001; Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004). Já o NR1/NR2A, na fase adulta, é encontrado principalmente na zona sináptica, onde é estabilizado através de associações com proteínas da densidade pós-sináptica (Watanabe et al., 1998; Janssen et al., 2005).

Embora a composição do NMDA interfira, consideravelmente, em suas propriedades biofísicas e bioquímicas, os padrões cinéticos de abertura, fechamento e dessensibilização dos dois heterômeros, ao que se sabe, são iguais (Vicini et al., 1998; Erreger et al., 2005). Assim, para o NMDA abrir, é preciso ocorrer a sua ligação com duas moléculas de L-glicina nas isoformas NR1, e duas moléculas de L-glutamato nas subunidades NR2 (Collingridge et al., 1983; Johnson e Ascher, 1987). No entanto, diferentemente do AMPA, os dados sobre a cinética do receptor NMDA apontam para a existência de apenas um estado aberto, que ocorre com o receptor completamente associado aos seus agonistas (Banke e Traynelis, 2003), porém, evidências recentes têm sugerido a existência de, possivelmente, três estados abertos do canal (Popescu e Auerbach, 2003), mas esses estados não foram incluídos no modelo.

Além dos estados abertos e fechados, o NMDA apresenta dois estados dessensibilizados, um rápido e um lento (Kampa et al., 2004; Erreger et al., 2005). E, em adição a essas características, o NMDA contém um Mg^{2+} que bloqueia o seu canal e é liberado de maneira voltagem-dependente. Assim, para o NMDA abrir, além de sua ligação aos seus agonistas, deve ocorrer a despolarização da membrana.

Todos esses pontos mencionados anteriormente foram considerados para desenvolver o modelo cinético do NMDA (Fig. 11). Porém, não foi simulada, explicitamente, a associação do NMDA com a L-glicina, ou seja, a ativação do NMDA teve, como etapas limitantes, apenas a ligação de L-glutamato e a liberação do Mg^{2+} do poro do canal. Uma vez associado ao L-glutamato, o NMDA apresenta dois estados dessensibilizados, um rápido e um lento. Além disso, de acordo com dados recentes, todos esses estados podem ocorrer associados ou não com o Mg^{2+} . Ou seja, o NMDA está em equilíbrio constante com o Mg^{2+} . E esse equilíbrio é importante, pois a presença de Mg^{2+} altera algumas das taxas de transição dos estados do NMDA (Kampa et al., 2004; Vargas-Caballero e Robinson, 2004; Clarke e Johnson, 2006).

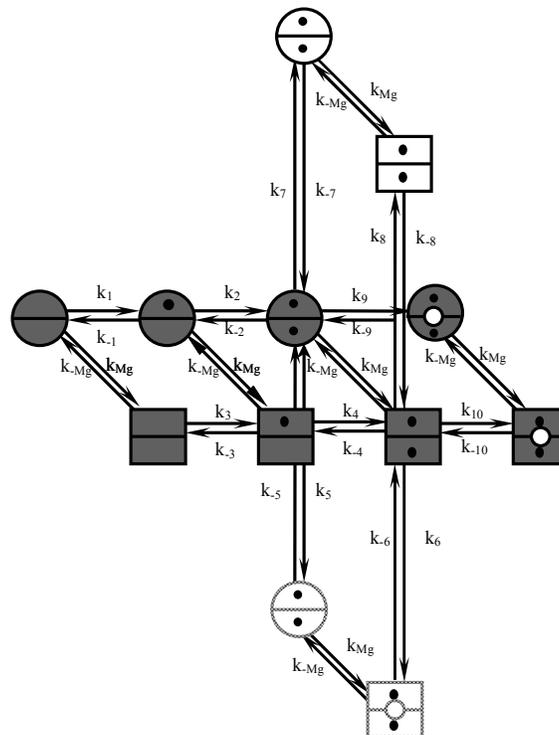


Figura 11: Modelo cinético do NMDA. O NMDA pode se associar ao L-glutamato (●) tanto em seu estado bloqueado por Mg^{2+} (quadrados) quanto em seu estado desbloqueado (círculos). Uma vez associado a duas moléculas de L-glutamato, o canal pode abrir ou entrar em um de seus dois estados dessensibilizados (representados por círculos e quadrados não preenchidos).

De maneira análoga ao AMPA, o modelo cinético do NMDA foi utilizado para simular seus dois heterômeros, a partir da utilização de constantes cinéticas diferentes (Tabela II, Anexo I). Os parâmetros foram retirados de artigos experimentais (Banke e Traynelis, 2003; Kampa et al., 2004; Vargas-Caballero e Robinson, 2004; Erreger et al., 2005).

O NMDA foi simulado de acordo com as equações a seguir, onde R é receptor, L é o L-glutamato, D e D' são os estados dessensibilizados do receptor, O é seu estado aberto e k_x e k_{-x} são as constantes de velocidade cujos valores estão na Tabela 2 (Anexo I):

$$\frac{d[R]}{dt} = -(k_1 \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL]) - (k_{Mg} \cdot [R] - k_{-Mg} \cdot [RMg^{2+}]) \quad (24)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RL]}{dt} &= (k_1 \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL]) - (k_2 \cdot [RL] \cdot [L] - k_{-2} \cdot [RL_2]) \\ &- (k_{Mg} \cdot [RL] - k_{-Mg} \cdot [RMg^{2+}L]) \end{aligned} \quad (25)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RL_2]}{dt} &= (k_2 \cdot [RL] \cdot [L] - k_{-2} \cdot [RL_2]) - (k_5 \cdot [RL_2] - k_{-5} \cdot [DL_2]) \\ &- (k_7 \cdot [RL_2] - k_{-7} \cdot [D'L_2]) - (k_9 \cdot [RL_2] - k_{-9} \cdot [OL_2]) \\ &- (k_{Mg} \cdot [RL_2] - k_{-Mg} \cdot [RMg^{2+}L_2]) \end{aligned} \quad (26)$$

$$\frac{d[DL_2]}{dt} = (k_5 \cdot [RL_2] - k_{-5} \cdot [DL_2]) - (k_{Mg} \cdot [DL_2] - k_{-Mg} \cdot [DMg^{2+}L_2]) \quad (27)$$

$$\frac{d[D'L_2]}{dt} = (k_7 \cdot [RL_2] - k_{-7} \cdot [D'L_2]) - (k_{Mg} \cdot [D'L_2] - k_{-Mg} \cdot [D'Mg^{2+}L_2]) \quad (28)$$

$$\frac{d[OL_2]}{dt} = (k_9 \cdot [RL_2] - k_{-9} \cdot [OL_2]) - (k_{Mg} \cdot [OL_2] - k_{-Mg} \cdot [OMg^{2+}L_2]) \quad (29)$$

$$\frac{d[RMg^{2+}]}{dt} = -(k_3 \cdot [RMg^{2+}] \cdot [L] - k_{-3} \cdot [RMg^{2+}L]) + (k_{Mg} \cdot [R] - k_{-Mg} \cdot [RMg^{2+}]) \quad (30)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RMg^{2+}L]}{dt} &= (k_3 \cdot [RMg^{2+}] \cdot [L] - k_{-3} \cdot [RMg^{2+}L]) \\ &- (k_4 \cdot [RMg^{2+}L] \cdot [L] - k_{-4} \cdot [RMg^{2+}L_2]) + (k_{Mg} \cdot [RL] - k_{-Mg} \cdot [RMg^{2+}L]) \end{aligned} \quad (31)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RMg^{2+}L_2]}{dt} &= (k_4 \cdot [RMg^{2+}L] \cdot [L] - k_{-4} \cdot [RMg^{2+}L_2]) \\ &- (k_6 \cdot [RMg^{2+}L_2] - k_{-6} \cdot [DMg^{2+}L_2]) - (k_8 \cdot [RMg^{2+}L_2] - k_{-8} \cdot [D'Mg^{2+}L_2]) \\ &- (k_{10} \cdot [RMg^{2+}L_2] - k_{-10} \cdot [OMg^{2+}L_2]) + (k_{Mg} \cdot [RL_2] - k_{-Mg} \cdot [RMg^{2+}L_2]) \end{aligned} \quad (32)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DMg^{2+}L_2]}{dt} &= (k_6 \cdot [RMg^{2+}L_2] - k_{-6} \cdot [DMg^{2+}L_2]) \\ &+ (k_{Mg} \cdot [DL_2] - k_{-Mg} \cdot [DMg^{2+}L_2]) \end{aligned} \quad (33)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[D'Mg^{2+}L_2]}{dt} &= (k_8 \cdot [RMg^{2+}L_2] - k_{-8} \cdot [D'Mg^{2+}L_2]) \\ &+ (k_{Mg} \cdot [D'L_2] - k_{-Mg} \cdot [D'Mg^{2+}L_2]) \end{aligned} \quad (34)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[OMg^{2+}L_2]}{dt} &= (k_{10} \cdot [RMg^{2+}L_2] - k_{-10} \cdot [OMg^{2+}L_2]) \\ &+ (k_{Mg} \cdot [OL_2] - k_{-Mg} \cdot [OMg^{2+}L_2]) \end{aligned} \quad (35)$$

Uma vez aberto, o NMDA media o influxo de Ca^{2+} na célula e inicia a ativação das vias Ca^{2+} -dependente. Porém, no modelo, além da entrada de Ca^{2+} através do NMDA, há a sua liberação a partir de vesículas intracelulares, que é mediada por outro tipo de receptor glutamatérgico, os metabotrópicos (mGluRs).

3.3 A liberação intracelular de Cálcio e a via da PKC convencional

Os mGluRs compreendem três grupos de receptores (I, II e III), cuja ação intracelular é mediada pela proteína G trimérica (revisto em Pin et al., 2004; Conn et al., 2005). O grupo I é formado pelos receptores mGluR1 e mGluR5 e está relacionado com a hidrólise de fosfoinositóis (PI). Já os grupos II e III são compostos, respectivamente, pelos receptores mGluR2-3 e mGluR4-8, e são acoplados, intracelularmente, com a proteína G_i , responsável pela inativação da enzima AC. No hipocampo, os mGluRs encontrados em maior abundância pertencem apenas à classe I (Romano et al., 1995; Luján et al., 1996).

Nos neurônios piramidais da área CA1, tanto os mGluR1 quanto os mGluR5 são encontrados na zona peri-sináptica, ou seja, ao redor da zona sináptica (Luján et al., 1996), o que determina que sua ativação seja menor do que a dos receptores ionotrópicos de L-glutamato posicionados sinápticamente. Uma vez ativos, os mGluRs ocasionam, intracelularmente, a ativação da proteína G.

A proteína G é uma família de enzimas triméricas, cujas isoformas são compostas por subunidades denominadas α , β e γ (revisado em Sprang, 1997). Existem diversos tipos de proteínas G, classificados de acordo com os efeitos da subunidade α . Os mGluR1 e mGluR5 nos neurônios piramidais hipocâmpais são acoplados, especificamente, com a proteína $G_{\alpha_{11}}$ (Tanaka et al., 2000), que é responsável pela ativação da enzima fosfolipase $C\beta$ (PLC β) (Rhee e Choi, 1992; Exton, 1996; Rebecchi e Pentylala, 2000).

Para simular esses eventos, ou seja, a ativação da proteína G e da PLC β , foi considerado que, em seu estado inativo, a proteína G encontra-se associada ao nucleotídeo GDP através da subunidade α . A ativação do receptor metabotrópico determina uma mudança conformacional na G, que rapidamente se dissocia do GDP e se liga ao GTP, ocasionando a ativação da enzima. Para algumas classes da proteína G, essa ativação ocasiona a dissociação da subunidade α do receptor e das subunidades $\beta\gamma$, porém, para a G_{11} , aparentemente esse processo não ocorre, ou seja, a ligação de GTP ocasiona apenas uma reorganização estrutural do trímero e o recrutamento da enzima PLC β para a membrana (Jenco et al., 1997; Mukhopadhyay e Ross, 1999; Wang et al., 1999). Dessa maneira, o processo de ativação da proteína G foi simulado considerando, inicialmente, o mGluR ligado à G, e sua associação ao L-glutamato, originando o mGluR*:

$$\frac{d[mGluR^*]}{dt} = (k_{a1} \cdot [mGluR] \cdot [glu] - k_{d1} \cdot [mGluR^*]) \quad (36)$$

A proteína G, associada ao mGluR com L-glutamato, libera o GDP, formando a espécie representada como mGluR α^* . Em seguida, há a associação da enzima ao GTP (mGluR α_{GTP}^*). Uma vez ligada ao GTP, a subunidade α ativa a PLC β :

$$\frac{d[mGluR\alpha^*]}{dt} = (k_{d2} \cdot [mGluR^*] - k_{a2} \cdot [GDP] \cdot [mGluR\alpha^*]) - (k_{a3} \cdot [GTP] \cdot [mGluR\alpha^*] - k_{d3} \cdot [mGluR\alpha_{GTP}^*]) \quad (37)$$

$$\frac{d[mGluR\alpha_{GTP}^*]}{dt} = (k_{a3} \cdot [GTP] \cdot [mGluR\alpha^*] - k_{d3} \cdot [mGluR\alpha_{GTP}^*]) - k_{cat} \cdot [mGluR\alpha_{GTP}^*] \quad (38)$$

As constantes de velocidade para essas equações, representadas por k_{fx} e k_{bx} , foram retiradas de artigos experimentais e estão mostradas na Tabela 3 (Anexo I) (Biddlecome et al., 1996; Chidiac et al., 1999; Mukhopadhyay e Ross, 1999; Zhong et al., 2003; Thomas et al., 2004).

Em seu estado ativo, a subunidade α se associa e ativa a PLC β (Blank et al., 1991; Lee et al., 1992; revisto em Preininger e Hamm, 2004). No entanto, a ativação da PLC β também contribui para a inativação da própria proteína G, já que a PLC β causa um aumento na atividade de GTPase da subunidade α (Biddlecome et al., 1996; Chidiac et al., 1999; Mukhopadhyay e Ross, 1999; Ross e Wilkie, 2000) (Fig. 12).

Para a simulação desse processo, cujos parâmetros são dados na Tabela 3 (Anexo I) e foram retirados de artigos experimentais (Biddlecome et al., 1996; Chidiac et al., 1999; Mukhopadhyay e Ross, 1999), a ativação da PLC β foi considerada dependente apenas de sua associação à subunidade α ativa, formando a espécie PLC β^* . Uma vez ativa, a PLC β retorna ao seu estado inativo pela dissociação da subunidade α ativa, ou após a enzima hidrolisar o

GTP, o que ocorre com uma taxa maior do que a observada para a proteína G livre. Com base nesses pontos, apenas uma equação foi utilizada para simular a ativação da PLC β :

$$\frac{d[PCL\beta^*]}{dt} = (k_{a4} \cdot [mGluR\alpha_{GTP}^*] \cdot [PCL\beta^*] - k_{d4} \cdot [PCL\beta^*]) - k_{GTPase'} \cdot [PCL\beta^*] \quad (39)$$

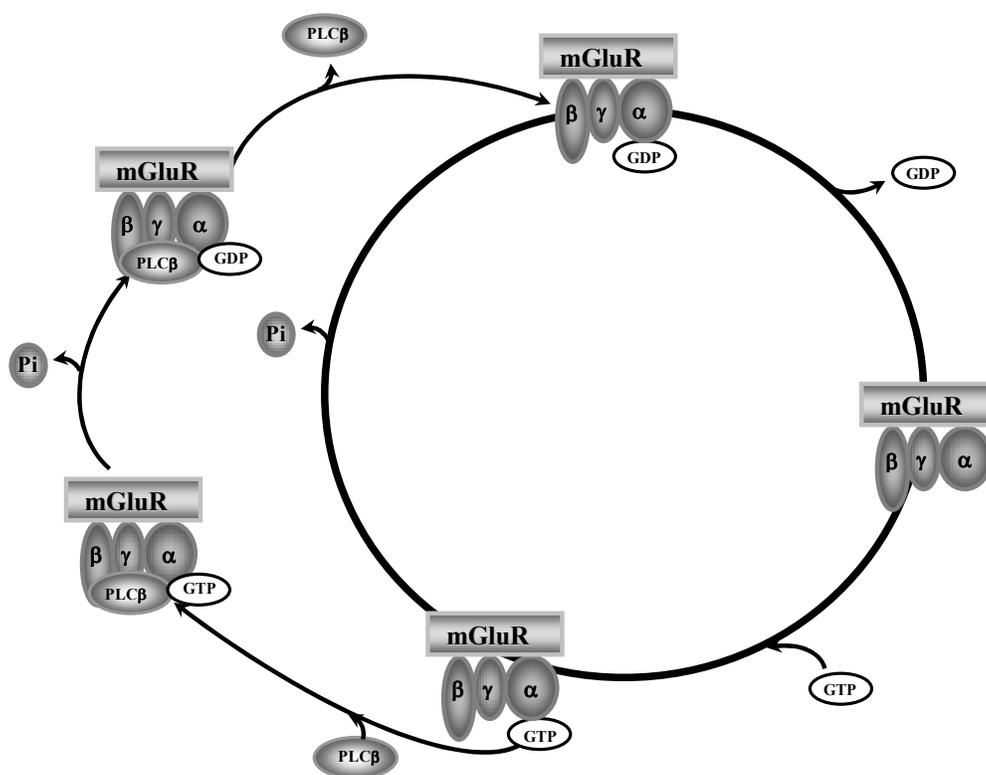


Figura 12: Ciclo de ativação da proteína G trimérica e da PLC β . A proteína G é um trímero formado pelas subunidades α , β e γ que, em seu estado inativo, permanece associado ao nucleotídeo GDP. Porém, a chegada de um estímulo na célula leva à dissociação do GDP e a associação do GTP em sua subunidade α que, nesse estado, ativa a PLC β . Por sua vez, a PLC β também age sobre a subunidade α , promovendo uma aceleração em sua atividade de GTPase, e ocasionando a sua volta ao seu estado inativo.

Antes de retornar ao seu estado inativo, a PLC β catalisa a quebra do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP $_2$), formando os segundos mensageiros DAG e

inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Berridge e Irvine, 1984; Hokin, 1985; Majerus et al., 1986). Assim que são produzidos, os dois segundos mensageiros atuam em processos distintos.

O DAG age na ativação da PKC convencional, classe de enzimas composta pelas isoformas PKC α , PKC β I, PKC β II e PKC γ , e amplamente implicadas com alterações plásticas (Colley et al., 1990; Boehm et al., 2006).

As PKCs convencionais são compostas por dois domínios principais (C1 e C2) que regulam sua ação. O domínio C2 interage com o Ca²⁺ diretamente, e o domínio C1 se associa ao DAG. Por apresentar esses dois domínios, a ativação das isoformas convencionais de PKC requer o aumento na concentração intracelular de Ca²⁺, que se associa com a PKC e determina que a enzima se mova do citosol até a membrana (Newton, 2001; Gallegos et al., 2006). Na membrana, a PKC ligada ao Ca²⁺ se associa fracamente a fosfolipídios ácidos, como a fosfoserina, e se difunde até encontrar o DAG (Newton e Koshland, 1989; Edwards e Newton, 1997; Mosior e Newton 1998; Giorgione et al., 2003). Assim que a PKC encontra o DAG, ela interage com ele através de seu domínio C1 (Slater et al., 2001; 2002). A interação da enzima com o Ca²⁺ e DAG promove então a remoção de um pseudo-substrato de sua estrutura, através de uma mudança conformacional, o que a torna ativa (Bittova et al., 2001; Kohout et al., 2002). Esse processo foi simulado considerando a associação da PKC com o Ca²⁺ formando a PKC*, seguida por sua translocação até a membrana, originando a espécie representada por PKC**, e a sua associação com DAG, formando a PKC***:

$$\frac{d[PKC]}{dt} = -(k_{a5} \cdot [PKC] \cdot [Ca^{2+}]^2 - k_{d5} \cdot [PKC*]) \quad (40)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[PKC*]}{dt} = & (k_{a5} \cdot [PKC] \cdot [Ca^{2+}]^2 - k_{d5} \cdot [PKC*]) \\ & - (k_{a6} \cdot [PKC*] - k_{d6} \cdot [PKC**]) \end{aligned} \quad (41)$$

$$\frac{d[PKC^{**}]}{dt} = (k_{a6} \cdot [PKC^*] - k_{d6} \cdot [PKC^{**}]) - (k_{a7} \cdot [PKC^{**}] \cdot [DAG] - k_{d7} \cdot [PKC^{***}]) \quad (42)$$

Os parâmetros para a construção da via da PKC (Fig. 13), da mesma maneira que foi feito para as demais moléculas simuladas, foram retirados de artigos experimentais (Kohout et al., 2001; Nalefski e Newton, 2001; Ananthanarayanan et al., 2003; Stahelin et al., 2005; Gallegos et al., 2006; Giorgione et al., 2006; Driers et al., 2007) e são mostrados na Tabela 3 (Anexo I).

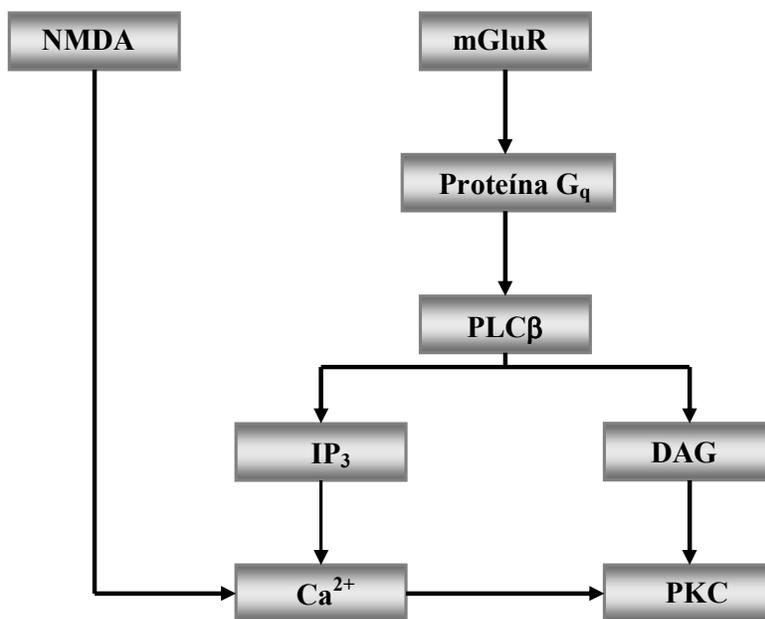


Figura 13: A via de ativação da PKC convencional. Para se tornar ativa, a PKC requer sua associação ao Ca^{2+} , o que determina sua translocação até a membrana celular. Na membrana, essa enzima se associa ao DAG, produto da hidrólise de PIP_2 catalisada pela $PLC\beta$. Com base nesse seu requerimento, a ativação da PKC envolve a atuação de mGluRs.

A ativação da PKC, conseqüente à ação da proteína G e da $PLC\beta$, ocorre simultaneamente a outro evento celular: o aumento na concentração de Ca^{2+} mediada por IP_3 , segundo produto da hidrólise de PIP_2 . Assim que é produzido, o IP_3 media a liberação de Ca^{2+}

armazenado nos retículos endoplasmáticos, organelas intracelulares encontradas em diversos compartimentos celulares, incluindo as espinhas dendríticas (Harris e Stevens, 1989). Ou seja, na membrana dos retículos endoplasmáticos, há canais de Ca^{2+} ativados por IP_3 , que, uma vez associados ao ligante, permitem o fluxo de Ca^{2+} do interior reticular (*lúmen*) para o citoplasma (Berridge e Irvine, 1984; Berridge, 1998).

Com base nesses aspectos, para simular a liberação intracelular de Ca^{2+} mediada pelo IP_3 , foi necessário considerar, primeiro, sua produção pela $PLC\beta$, seguida pela sua associação aos seus receptores e sua degradação. Com isso, a equação que descreve a variação na concentração de IP_3 é dada abaixo:

$$\frac{d[IP_3]}{dt} = \frac{k_{cat_PLC} \cdot [PLC\beta^*] \cdot [PIP_2]}{K_S + [PIP_2]} - k_{deg} \cdot [IP_3] - (k_{a8} \cdot [(IP_3)_{x-1}(Ca^{2+})_y IP_3 R] \cdot [IP_3] - k_{d8} \cdot [(IP_3)_x(Ca^{2+})_y IP_3 R]) \quad (43)$$

O receptor de IP_3 foi simulado como um complexo tetramérico que contém um sítio para IP_3 em cada monômero. Além dos sítios de ligação de IP_3 , cada monômero possui, pelo menos, um sítio de associação de Ca^{2+} , que, quando preenchido, também contribui para a abertura dos canais de Ca^{2+} ativados por IP_3 (Worley et al., 1987; Migneri e al., 1990). Dessa maneira, o receptor de IP_3 foi simulado contendo quatro sítios para IP_3 e quatro para Ca^{2+} (Fig. 14), e a equação que descreve seu estado ligado aos seus agonistas é dada por:

$$\frac{d[(IP_3)_x(Ca^{2+})_y IP_3 R]}{dt} = (k_{a8} \cdot [(IP_3)_{x-1}(Ca^{2+})_y IP_3 R] \cdot [IP_3] - k_{d8} \cdot [(IP_3)_x(Ca^{2+})_y IP_3 R]) + (k_{a9} \cdot [(IP_3)_x(Ca^{2+})_{y-1} IP_3 R] \cdot [Ca^{2+}] - k_{d9} \cdot [(IP_3)_x(Ca^{2+})_y IP_3 R]) \quad (44)$$

Nessas equações (43) e (44), o receptor de IP_3 , representado por IP_3R , pode se ligar a x moléculas de IP_3 e y de Ca^{2+} , formando a espécie $(IP_3)_x(Ca^{2+})_yIP_3R$, e $x \leq 4$ e $y \leq 4$. Assim, enquanto todos os sítios de associação de agonistas não estão preenchidos, o receptor pode se associar a mais moléculas de IP_3 ou a mais Ca^{2+} . As constantes de velocidade e demais parâmetros são mostrados na Tabela 3 (Anexo I) e foram obtidas a partir de artigos experimentais (Meyer et al., 1990; James et al., 1995; LeBeau et al., 1999; Moraru et al. 1999; Höfer et al., 2002; Baran, 2003). A ligação de 2-4 moléculas de IP_3 em presença ou não de Ca^{2+} determina a transição do canal para o estado aberto.

A partir da associação de duas moléculas de IP_3 , com ou sem Ca^{2+} estimulando a liberação de Ca^{2+} , o canal de Ca^{2+} ativado por IP_3 pode abrir e permitir o fluxo iônico, representado por J_{RE} :

$$J_{RE} = f \cdot N \cdot P_o \cdot [Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_{RE} \quad (45)$$

onde f é a taxa máxima de fluxo por cada canal, N é o número de canais abertos, $[Ca^{2+}]$ é a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma, $[Ca^{2+}]_{RE}$ é a concentração do íon no interior do retículo endoplasmático, e P_o é a probabilidade de abertura dos canais dependente da concentração de Ca^{2+} . Esse último termo é fundamental, já que, quando a concentração de Ca^{2+} no meio intracelular se eleva acima de determinados valores, o Ca^{2+} passa a inibir a abertura dos canais de Ca^{2+} ativados por IP_3 (Bezprozvanny et al., 1991). Existem evidências de que a inibição da abertura dos canais ligados aos receptores de IP_3 é mediada pela CaM (Patterson et al., 2004; Rossi e Taylor, 2004), mas esse fato não é consensual (Foskett et al., 2007). Assim, para incorporar essa inibição, foi considerado que P_o é dada pela seguinte equação (Mak et al., 2003; Foskett et al., 2007):

$$P_o = 0.81 \cdot \left\{ 1 + \left(\frac{[Ca^{2+}]}{K_i} \right)^{H_i} \right\}^{-1} \quad (46)$$

onde K_i e H_i são parâmetros determinados para a inativação de Ca^{2+} sobre a abertura do canal de IP_3 .

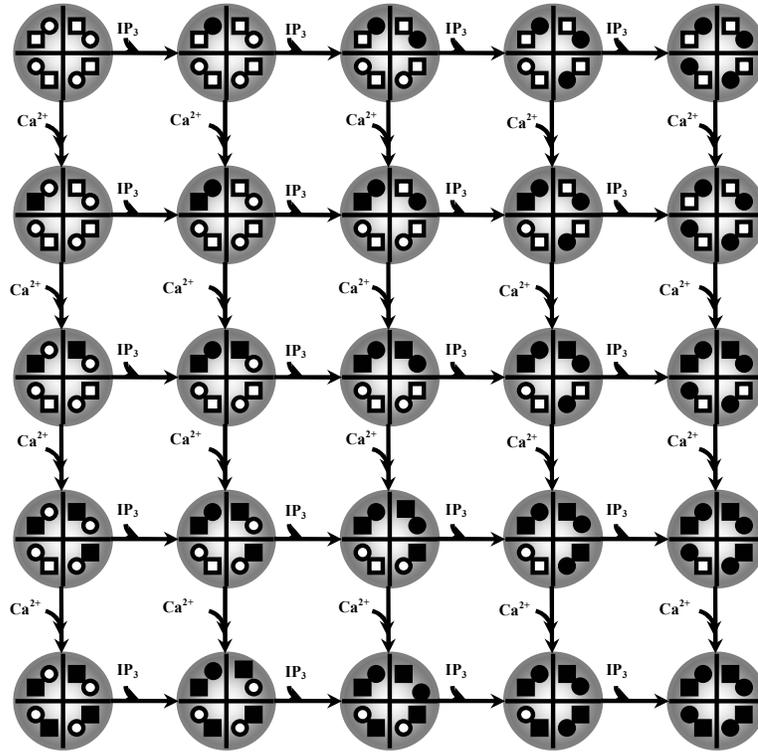


Figura 14: Esquema cinético de ativação do receptor de IP_3 . O receptor de IP_3 é um tetrâmero que contém, em cada monômero, um sítio para a associação de IP_3 (círculos) e um para a associação de Ca^{2+} (quadrados). A ligação tanto de Ca^{2+} quanto de IP_3 (representada pelos sítios de associação em preto) pode ocorrer de maneira isolada, ou simultaneamente. Mas, no modelo do receptor de IP_3 simulado, é necessário que haja IP_3 associado ao receptor para o seu canal abrir. Ou seja, nesse modelo, o Ca^{2+} possui um caráter apenas modulador sobre a ativação desses receptores.

Uma vez abertos, tanto os canais ligados aos receptores de IP_3 quanto aos receptores de NMDA, ocasionam o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , evento que é fundamental para a ativação das vias de sinalização da LTP. Porém, assim que há o aumento na concentração de Ca^{2+} , há também a ativação de inúmeros mecanismos responsáveis pelo rápido restabelecimento de seu nível basal. Com isso, a variação de Ca^{2+} no meio intracelular

é rápida, fato que determina que sua atuação seja apenas transiente. Para simular essa variação, denominada dinâmica de Ca^{2+} , foi necessário, portanto, considerar as origens do aumento na concentração do íon e os mecanismos de restabelecimento dessa concentração ao seu nível basal.

3.4 Dinâmica de Cálcio

A sinalização de Ca^{2+} é um mecanismo importante de integração e transmissão de informação em vários processos. E, para atuar como um sinal no meio intracelular, o Ca^{2+} apresenta variações em sua concentração que são altamente reguladas (Berridge, 1998; Berridge et al., 2003). Durante a LTP, a variação na concentração de Ca^{2+} é um evento breve, mas que ocorre com uma grande magnitude e determina a ativação, direta o indiretamente, de todas as moléculas que atuam nesse processo. Para incorporar essas características da dinâmica de Ca^{2+} no modelo, quatro processos de controle da concentração intracelular desse íon foram simulados: o influxo para o meio intracelular, a associação com quelantes endógenos, a difusão ao longo da célula e a extrusão.

No modelo de LTP inicial desenvolvido nesse trabalho, há duas formas de influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. Uma delas é a partir da abertura de canais de Ca^{2+} ativados por IP_3 , como descrito anteriormente, e a outra é através dos canais ligados aos receptores NMDA, cujo fluxo foi incorporado nas simulações de acordo com a equação:

$$J_{NMDA} = -1 \cdot \frac{N \cdot (\gamma \cdot V_m)}{2 \cdot F \cdot Vol} \quad (47)$$

onde Vol é o volume da espinha dendrítica, F é a constante de Faraday, N é o número de canais ligados aos receptores NMDA abertos, V_m é o potencial da membrana celular e γ é a

condutância unitária do NMDA, que depende das subunidades que o compõem (NR1/NR2A: 68pS e NR1/NR2B: 62.3pS) (Erreger et al., 2005).

Uma vez que há o aumento na concentração de Ca^{2+} no meio intracelular, dois mecanismos de extrusão contribuem para sua rápida volta ao estado basal. Essas extrusões são catalisadas pelas enzimas Ca^{2+} -ATPases da membrana celular e do retículo endoplasmático. A ação das duas Ca^{2+} -ATPases foi simulada da mesma maneira:

$$V_{ext} = \frac{k_{\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{K_{\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}} + [\text{Ca}^{2+}]} \quad (48)$$

em que V_{ext} é a velocidade de extrusão do Ca^{2+} , $k_{\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}}$ é a constante de velocidade das Ca^{2+} -ATPase (dois valores foram utilizados: 140 s^{-1} e 15 s^{-1}), $[\text{Ca}^{2+}]$ é a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma, e $K_{\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}}$ é a constante de dissociação de Ca^{2+} da Ca^{2+} -ATPase (dois valores foram utilizados: $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Gill et al., 1984; Jencks, 1989).

Além da entrada de Ca^{2+} através dos canais e de sua saída mediada pela ação das Ca^{2+} -ATPases, a concentração de Ca^{2+} ainda varia em função da difusão do íon para os outros compartimentos celulares, simulada de acordo com uma taxa de decaimento (0.0025s^{-1}) calculada a partir do coeficiente de difusão do Ca^{2+} .

Ainda é necessário considerar que uma grande quantidade de moléculas atua como quelante no meio intracelular e se associa ao Ca^{2+} . Essas moléculas são responsáveis por grande parte da sinalização de Ca^{2+} no meio intracelular, o que é uma propriedade essencial já que muitas proteínas, embora dependam de Ca^{2+} , não se associam a ele diretamente. Nesse sentido, apesar do aumento na concentração celular de Ca^{2+} ser o sinal inicial para desencadear a ativação da maior parte das vias que atuam na LTP inicial, poucas moléculas implicadas nesse evento possuem a habilidade de se associar a esses íons (Persechini e

Stemmer, 2002; Tran et al., 2003; Kennedy et al., 2005). Dessa maneira, a maior parte da sinalização de Ca^{2+} , nos neurônios, é mediada por proteínas específicas, destacando-se, para a LTP, a CaM (Chin e Means, 2000; Xia e Storm, 2005).

3.5 O complexo Ca^{2+} /Calmodulina

A CaM é uma pequena proteína globular encontrada em todas as células eucariontes, onde representa cerca 0.1 % ($\sim 1 - 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) da concentração protéica total das células em que é encontrada (Stoclet et al., 1987; Persechini e Stemmer, 2002). Porém, particularmente no cérebro, sua concentração é maior e varia entre 10 a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, de acordo com a área considerada (Xia e Storm, 2005).

A CaM não possui atividade enzimática e sua principal função nas células é mediar a sinalização de Ca^{2+} . E, para desempenhar tal papel, a CaM precisa se ligar aos íons rápida e reversivelmente (Chin e Means, 2000). Para isso, a CaM contém quatro sítios de associação ao Ca^{2+} , com constantes de dissociação (K_D) na ordem de $10^{-7} - 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$ (Crouch e Klee, 1980; Sabatini et al., 2002). A ligação dos íons nesses sítios não é seqüencial e ordenada, o que resulta na formação de quatro espécies de CaM associada ao Ca^{2+} : $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$ (Haiech et al., 1981; Cox, 1988).

Para incorporar a formação dessas espécies no modelo, a simulação da interação entre a CaM e o Ca^{2+} foi feita através de equações diferenciais ordinárias utilizando as constantes de velocidade para a associação e dissociação, k_{f1-4} e k_{b1-4} , respectivamente, do Ca^{2+} com a CaM específicas para cada sítio (Tabela 4, Anexo I), retiradas de artigos experimentais (Haiech et al., 1981; Cox, 1988; Linse et al., 1991; Martin et al., 1985; 1992; Bayley et al., 1996):

$$\begin{aligned}
\frac{d[Ca^{2+}]}{dt} = & -(k_{f1} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [CaM] + k_{b1} \cdot [(Ca^{2+})CaM]) \\
& - (k_{f2} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})CaM] + k_{b2} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM]) \\
& - (k_{f3} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_2CaM] + k_{b3} \cdot [(Ca^{2+})_3CaM]) \\
& - (k_{f4} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_3CaM] + k_{b4} \cdot [(Ca^{2+})_4CaM])
\end{aligned} \tag{49}$$

$$\frac{d[CaM]}{dt} = -k_{f1} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [CaM] + k_{b1} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM] \tag{50}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[(Ca^{2+})CaM]}{dt} = & (k_{f1} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [CaM] + k_{b1} \cdot [(Ca^{2+})CaM]) \\
& - (k_{f2} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})CaM] + k_{b2} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM])
\end{aligned} \tag{51}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[(Ca^{2+})_2CaM]}{dt} = & (k_{f2} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})CaM] + k_{b2} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM]) \\
& - (k_{f3} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_2CaM] + k_{b3} \cdot [(Ca^{2+})_3CaM])
\end{aligned} \tag{52}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[(Ca^{2+})_3CaM]}{dt} = & (k_{f3} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_2CaM] + k_{b3} \cdot [(Ca^{2+})_3CaM]) \\
& - (k_{f4} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_3CaM] + k_{b4} \cdot [(Ca^{2+})_4CaM])
\end{aligned} \tag{53}$$

$$\frac{d[(Ca^{2+})_4CaM]}{dt} = (k_{f4} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_3CaM] + k_{b4} \cdot [(Ca^{2+})_4CaM]) \tag{54}$$

Uma vez associada ao Ca^{2+} , a CaM interage com seus alvos. Porém, como a maior parte das moléculas ativadas por Ca^{2+} requer a mediação de CaM, essa proteína acaba se tornando um importante fator limitante na célula (Persechini e Stemmer, 2002; Tran et al., 2003; Kim et al., 2004). Esse fato é extremamente relevante para um estudo sobre a LTP, pois, para entender como esse processo acontece, é necessário considerar quais são os eventos que podem atuar como seus fatores limitantes. Assim, considerando-se que entre todas as enzimas essenciais para a LTP, apenas uma, a PKC, não requer Ca^{2+}/CaM para se tornar ativa, é preciso compreender como a disputa por esse ativador ocorre na célula. Para isso, é fundamental levar em conta que, durante a atividade celular basal, a CaM não se encontra livre no citoplasma, mas associada a proteínas específicas (Alexander et al., 1987). Essas

proteínas interagem preferencialmente com a CaM em sua forma livre de Ca^{2+} , denominada Apocalmodulina (ApoCaM), e possuem um papel importante nos neurônios piramidais: armazenar a CaM em locais estratégicos, como as espinhas dendríticas, liberando-a assim que há um aumento na concentração de Ca^{2+} (Gerendasy et al., 1994; 1995).

Nos neurônios piramidais hipocampais, duas proteínas de associação à ApoCaM têm ganhado notoriedade, pois, aparentemente, sua atuação para diversos processos plásticos é fundamental (Liu e Storm, 1990; Gamby et al., 1996). Essas proteínas, denominadas neuromodulina e neurogranina, localizam-se em compartimentos celulares distintos (Alexander et al., 1987; Baudier et al., 1989). Assim, enquanto a neuromodulina é essencialmente pré-sináptica, a neurogranina é altamente concentrada nas espinhas dendríticas (Repressa et al., 1990). Com base nessa localização, no modelo de LTP inicial construído, apenas a neurogranina foi simulada.

A simulação da interação entre a neurogranina e a CaM foi feita considerando sua associação com a ApoCaM, e também com as espécies de CaM associadas ao Ca^{2+} , ou seja, $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$ (Gaertner et al., 2004a). A presença de Ca^{2+} associado à CaM causa uma diminuição na afinidade da neurogranina por CaM, o que favorece a dissociação entre as duas, principalmente se, no sistema considerado, existirem outras moléculas que competem por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Jurado et al., 1999; Huang et al., 2000). Dessa maneira, tem sido demonstrado que, além de atuar na localização celular de CaM, a neurogranina também determina um retardo na ativação das enzimas dependentes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, por competir com elas.

Cinco espécies de neurogranina associada à CaM foram simuladas: neurogranina associada à ApoCaM (CaMNg), neurogranina associada à $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$ ($[(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}]\text{Ng}$), neurogranina associada à $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$ ($[(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}]\text{Ng}$), neurogranina associada à $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$ ($[(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}]\text{Ng}$) e, por fim, neurogranina associada à $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$

$[(Ca^{2+})_4CaM]Ng$). E, para as espécies em que a CaM está associada a menos de quatro Ca^{2+} , foi simulada também a possibilidade de associação com mais íons, até a formação do complexo entre a neurogranina e a $(Ca^{2+})_4CaM$, representado por $[(Ca^{2+})_4CaM]Ng$ (Fig. 15).

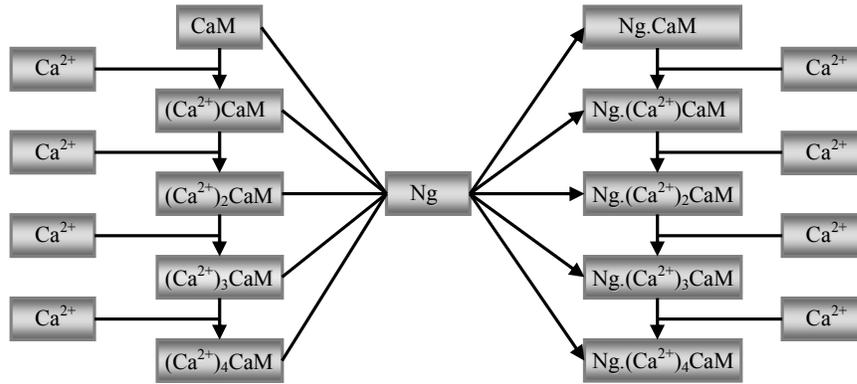


Figura 15: Modelo de interação entre a neurogranina (Ng) e a CaM. A neurogranina se associa preferencialmente a CaM em ausência de Ca^{2+} , no entanto, ela também pode interagir com o complexo Ca^{2+}/CaM , embora com afinidade menor. Dessa maneira, a elevação na concentração intracelular de Ca^{2+} não causa uma dissociação imediata entre a neurogranina e a CaM, e complexos contendo as duas proteínas e o Ca^{2+} podem existir.

As equações utilizadas para a simulação da interação entre a neurogranina e a CaM são mostradas abaixo, os parâmetros estão na Tabela 4 (Anexo I):

$$\frac{d[CaMNg]}{dt} = -k_{f5} \cdot [Ng] \cdot [CaM] + k_{b5} \cdot [CaMNg] - k_{f6} \cdot [CaMNg] \cdot [Ca^{2+}] + k_{b6} \cdot \{[(Ca^{2+})CaM]Ng\} \quad (55)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\{[(Ca^{2+})CaM]Ng\}}{dt} &= k_{f6} \cdot [CaMNg] \cdot [Ca^{2+}] - k_{b6} \cdot \{[(Ca^{2+})CaM]Ng\} + \\ &+ k_{f7} \cdot [CaM(Ca^{2+})] \cdot [Ng] - k_{b7} \cdot \{[(Ca^{2+})CaM]Ng\} \\ &- k_{f8} \cdot \{[(Ca^{2+})CaM]Ng\} \cdot [Ca^{2+}] - k_{b8} \cdot \{[(Ca^{2+})_2CaM]Ng\} \end{aligned} \quad (56)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\{[(Ca^{2+})_2CaM]Ng\}}{dt} &= k_{f8} \cdot \{[(Ca^{2+})CaM]Ng\} \cdot [Ca^{2+}] - k_{b8} \cdot \{[(Ca^{2+})_2CaM]Ng\} \\ &+ k_{f9} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM] \cdot [Ng] - k_{b9} \cdot \{[(Ca^{2+})_2CaM]Ng\} \\ &- k_{f10} \cdot \{[(Ca^{2+})_2CaM]Ng\} \cdot [Ca^{2+}] + k_{b10} \cdot \{[(Ca^{2+})_3CaM]Ng\} \end{aligned} \quad (57)$$

$$\begin{aligned}
\frac{d\{[(Ca^{2+})_3CaM]Ng\}}{dt} &= k_{f10} \cdot \{[(Ca^{2+})_2CaM]Ng\} \cdot [Ca^{2+}] - k_{b10} \cdot \{[(Ca^{2+})_3CaM]Ng\} \\
&+ k_{f11} \cdot [(Ca^{2+})_3CaM] \cdot [Ng] - k_{b11} \cdot \{[(Ca^{2+})_3CaM]Ng\} \\
&- k_{f12} \cdot \{[(Ca^{2+})_3CaM]Ng\} \cdot [Ca^{2+}] - k_{b12} \cdot \{[(Ca^{2+})_4CaM]Ng\}
\end{aligned} \tag{58}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d\{[(Ca^{2+})_4CaM]Ng\}}{dt} &= k_{f12} \cdot \{[(Ca^{2+})_3CaM]Ng\} \cdot [Ca^{2+}] - k_{b12} \cdot \{[(Ca^{2+})_4CaM]Ng\} \\
&+ k_{f13} \cdot [(Ca^{2+})_4CaM] \cdot [Ng] - k_{b13} \cdot \{[(Ca^{2+})_4CaM]Ng\}
\end{aligned} \tag{59}$$

Em seguida à construção do modelo da CaM e do modelo de sua interação com a neurogranina, foram simuladas as proteínas dependentes de Ca^{2+}/CaM . Nos neurônios piramidais hipocampais, a Ca^{2+}/CaM é responsável pela ativação de diversas enzimas, destacando-se, para a LTP, a CaMKII.

3.6 CaMKII

A CaMKII é uma enzima multifuncional extremamente abundante (Hanson e Schulman, 1992; Griffith et al., 2003), mas, embora possua inúmeras isoenzimas, no hipocampo, apenas duas espécies, a CaMKII α e a CaMKII β , são encontradas em grande concentração, com predominância da ordem de 3:1 da α em relação à β (Erondu e Kennedy, 1985).

A CaMKII é uma enzima multimérica composta por 6-12 subunidades que se organizam radialmente (Hanson e Schulman, 1992; Brocke et al., 1999; Hook e Means, 2001; Soderling et al., 2001). Cada uma dessas subunidades contém um domínio de interação com o complexo Ca^{2+}/CaM , um resíduo auto-inibitório, um domínio catalítico e um domínio de interação com as subunidades vizinhas. A associação de Ca^{2+}/CaM determina uma mudança conformacional na subunidade considerada, que libera seu resíduo auto-inibitório e possibilita

o início de sua autofosforilação no resíduo treonina 286 (Thr²⁸⁶). Vale ressaltar, porém, que durante muitos anos acreditou-se que somente a interação da CaMKII com a (Ca²⁺)₄CaM seria capaz de iniciar sua autofosforilação. Mas, recentemente foi demonstrado que essa enzima se associa e inicia sua autofosforilação, com taxas catalíticas menores, com outras espécies de CaM associada ao Ca²⁺, ou seja, com a (Ca²⁺)CaM, a (Ca²⁺)₂CaM e a (Ca²⁺)₃CaM (Shifman et al., 2006), o que foi considerado na construção desse modelo.

A autofosforilação da CaMKII é uma reação intra-holoenzima, mas inter-subunidade: uma subunidade fosforila a subunidade vizinha da mesma holoenzima (Mukherji e Soderling, 1994). Para isso, ambas as subunidades devem estar ligadas ao complexo Ca²⁺/CaM (Rich e Schulman, 1998).

Uma vez autofosforilada, a CaMKII apresenta um grande aumento em sua afinidade por CaM, mesmo em ausência de Ca²⁺, o que possibilita que ela mantenha a CaM presa (*trapped*) em sua estrutura após a dissociação de Ca²⁺ (Meyer et al., 1992; Singla et al., 2001). E, mesmo depois da lenta dissociação da CaM, a CaMKII autofosforilada mantém um estado ativo parcial, denominado autônomo (Lisman et al., 2002). A CaMKII autônoma possui taxas catalíticas menores, mas ela pode restabelecer suas taxas se associando, de novo, à CaM e ao Ca²⁺. Porém, a CaMKII autônoma também pode se autofosforilar novamente, em outro resíduo, o resíduo Thr³⁰⁵ para a isoforma α e Thr³⁰⁶ para a isoforma β . Essa nova autofosforilação impede a reassociação da CaMKII com a CaM, mantendo a enzima apenas com sua atividade parcial (Colbran e Soderling, 1990; Patton et al., 1990).

Com base nesses pontos, o modelo da CaMKII foi feito de acordo com o esquema mostrado na Fig. 16, no qual se considera que essa enzima é capaz de se associar com todas as espécies de Ca²⁺/CaM, ou seja, (Ca²⁺)CaM, (Ca²⁺)₂CaM, (Ca²⁺)₃CaM e (Ca²⁺)₄CaM, em seguida, se autofosforilar (CaMKII*) e depois, a partir da dissociação de seus ativadores, se manter em seu estado autônomo (CaMKII**). Nesse estado, a CaMKII pode se autofosforilar

novamente (CaMKII***), o que impede sua reassociação com o Ca^{2+} e a CaM. Cabe ainda ressaltar que, para todos os estados em que a enzima está associada à CaM, o Ca^{2+} pode se ligar e se desligar do complexo, propriedade que confere à CaMKII uma alta sensibilidade às variações na concentração desse íon (De Koninck e Schulman, 1998).

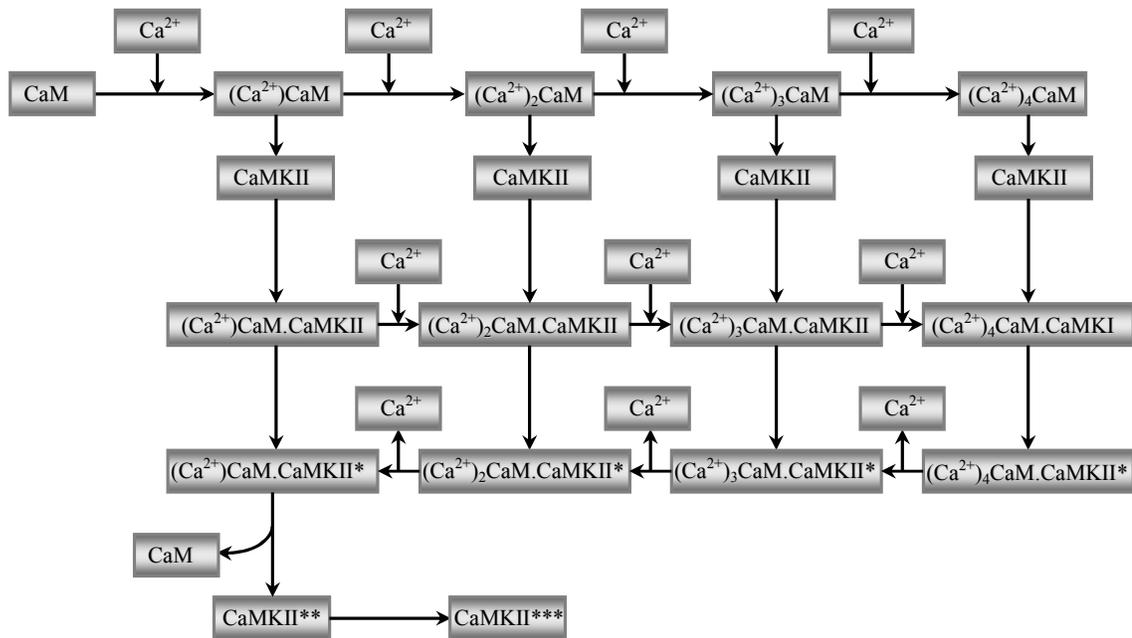


Figura 16: Esquema do modelo de ativação da CaMKII. A CaMKII requer a associação de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ em sua estrutura para iniciar sua reação de autofosforilação, processo que ocorre através da ligação dessa enzima com o complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$, ou ainda com os $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$ e $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$. Uma vez autofosforilada (CaMKII*), a CaMKII pode se dissociar de Ca^{2+} e, em seguida, de CaM, o que ocorre com taxas lentas, permanecendo autônoma (CaMKII**). Em seu estado autônomo, a CaMKII** pode se autofosforilar novamente, o que impede, posteriormente, a sua reassociação com seus ativadores.

As equações utilizadas para a simulação da atividade da CaMKII são dadas por:

$$\begin{aligned} \frac{d\{[(\text{Ca}^{2+})_x \text{CaM}]_2 \text{CaMKII}\}}{dt} &= k_{f14} \cdot [(\text{Ca}^{2+})_x \text{CaM}]^2 \cdot [\text{CaMKII}] \\ &- k_{b14} \cdot \{[(\text{Ca}^{2+})_x \text{CaM}]_2 \text{CaMKII}\} - k_{f15} \cdot \{[(\text{Ca}^{2+})_x \text{CaM}]_2 \text{CaMKII}\} \cdot [\text{Ca}^{2+}]^2 \\ &- k_{b15} \cdot \{[(\text{Ca}^{2+})_{x+1} \text{CaM}]_2 \text{CaMKII}\} - k_{cat} \cdot \{[(\text{Ca}^{2+})_x \text{CaM}]_2 \text{CaMKII}\} \end{aligned} \quad (60)$$

$$\frac{d\{[(Ca^{2+})_x CaM]_2 CaMKII^*\}}{dt} = k_{cat} \cdot \{[(Ca^{2+})_x CaM]_2 CaMKII\} - k_{b16} \cdot \{[(Ca^{2+})_x CaM]_2 CaMKII^*\} + k_{f16} \cdot [(CaM)_2 CaMKII^*] \cdot [Ca^{2+}]^2 \quad (61)$$

$$\frac{d[(CaM)_2 CaMKII^*]}{dt} = -k_{b17} \cdot [(CaM)_2 CaMKII^*] + k_{f17} \cdot [CaMKII^{**}] \cdot [CaM]^2 \quad (62)$$

$$\frac{d[CaMKII^{**}]}{dt} = k_{b17} \cdot [(CaM)_2 CaMKII^*] - k_{f17} \cdot [CaMKII^{**}] \cdot [CaM]^2 - k_{cat2} \cdot [CaMKII^{**}] \quad (63)$$

$$\frac{d[CaMKII^{***}]}{dt} = k_{cat2} \cdot [CaMKII^{**}] \quad (64)$$

onde o termo $[(Ca^{2+})_x CaM]_2 CaMKII$ representa a CaMKII associada à CaM com $x Ca^{2+}$, e $x \leq 4$, $CaMKII^*$ é a enzima autofosforilada, $CaMKII^{**}$ é ela em seu estado autônomo e $CaMKII^{***}$ representa a espécie da CaMKII em seu estado fosforilado no resíduo Thr^{305/306}. As constantes de taxa utilizadas, representadas por k_x , foram retiradas de artigos experimentais (Colbran e Soderling, 1990; Patton et al., 1990; Meyer et al., 1992; Singla et al., 2001; Gaertner et al., 2004b) e são mostradas na Tabela 5 (Anexo I).

A incorporação da CaMKII a partir dessas equações originou um modelo composto por múltiplos estados da enzima. E, entre esses estados, sete são considerados ativos: o estado da CaMKII autofosforilada ligada com a CaM e com o Ca^{2+} (1, 2, 3 ou 4 íons), da CaMKII com a CaM *trapped*, da enzima autônoma e da CaMKII autofosforilada no resíduo Thr^{305/306}. Cabe ressaltar, portanto, que todas essas espécies ativas podem fosforilar os mesmos substratos, mas com uma taxa que varia em função do número de Ca^{2+} presentes. Ou seja, segundo Hanson e Schulman (1992), há um aumento de cerca de 25% na atividade da CaMKII para cada Ca^{2+} que é associado à sua estrutura, o que foi considerado nas simulações de sua atividade catalítica.

Em seguida a construção do modelo da CaMKII, outras moléculas que dependem de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ foram modelados, iniciando-se pelas enzimas que integram a via da PKA.

3.7 A via da PKA

Além da CaMKII, a PKA também é fundamental para a ocorrência de LTP. No entanto, grande parte dos estudos sobre a sua ação na LTP utiliza protocolos baseados na ativação de receptores β -adrenérgicos, que, por serem ligados intracelularmente à proteína $G\alpha_s$, atuam na ativação das enzimas ACs, responsável pela produção de AMPc a partir do ATP (Levistki, 1986; Taussig e Gilman, 1995; Sunahara et al., 1996). Mas, diferentemente de outras regiões, no hipocampo, as isoformas predominantes de AC, a AC1 e a AC8, são ativadas, principalmente, através de sua associação com o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Brostrom et al., 1976; Salter et al., 1981; Choi et al., 1992; Nielsen et al., 1996; Guillou et al., 1999b; Wang et al., 2003; Ferguson e Storm, 2004). Portanto, durante a LTP NMDA-dependente, a entrada de Ca^{2+} na célula, determinando a formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, é suficiente para ativar as enzimas AC1 e AC8 e iniciar a produção de AMPc (Ferguson e Storm, 2004; Wang et al., 2004). Dessa maneira, a via da PKA (Fig. 17) pode ser ativada exclusivamente por estimulação glutamatérgica, embora a presença de agonistas de receptores β -adrenérgicos tenha um papel facilitador na indução de LTP (Dineley et al., 2001; Morozov et al., 2003).

Uma vez produzido, o AMPc é rapidamente degradado por outra classe de enzimas denominadas fosfodiesterases, também conhecidas pela abreviatura PDE (*phosphodiesterase*). As PDEs compõem uma família com 11 membros, agrupados em subfamílias (Goraya e Cooper, 2005). No hipocampo, a classe de PDE presente em abundância é a PDE1.

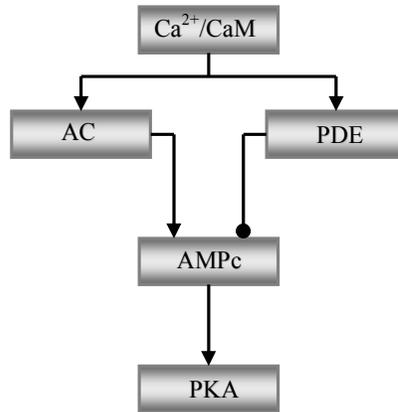


Figura 17: Via de ativação da PKA. A $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, formada a partir da ativação de receptores NMDA, determina a ativação tanto da AC quanto da PDE, enzimas que atuam na produção e degradação, respectivamente, do AMPc, segundo mensageiro que atua promovendo a ativação da PKA.

A PDE1 possui diversas isoformas, e, entre elas, apenas duas, a PDE1A2 e a PDE1B1, são encontradas em alta concentração no hipocampo (Grab et al., 1981; Sharma e Wang, 1985; 1986; Kincaid et al, 1987). Ambas as isoformas são ativadas, *in vitro* e *in vivo*, por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Sharma et al., 1980; Cheung et al., 1981; Kincaid et al., 1981; 1984). E, em função desse requerimento, é possível notar que a atividade da PDE1 é altamente coordenada com a da AC. A incorporação dessa coordenação no modelo de LTP inicial é importante, pois é a partir dela que é possível investigar os padrões de estímulo que irão determinar a produção de níveis elevados de AMPc.

A simulação do modelo da ativação da AC e da PDE foi feito considerando o mesmo esquema para a associação dessas enzimas com o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Fig. 18). De maneira similar ao que tem sido notificado para a CaMKII, essas duas proteínas também são capazes de se associar com a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ com menos de quatro íons Ca^{2+} , embora essa interação com essas espécie ocorra com afinidade menor (Cox et al., 1981; Cox, 1988; Yuan et al., 1999; Simpson et al., 2006). Mas cabe ressaltar que, embora essas enzimas possam interagir com a CaM ligada a menos que quatro Ca^{2+} , sua ativação requer a presença dos quatro íons.

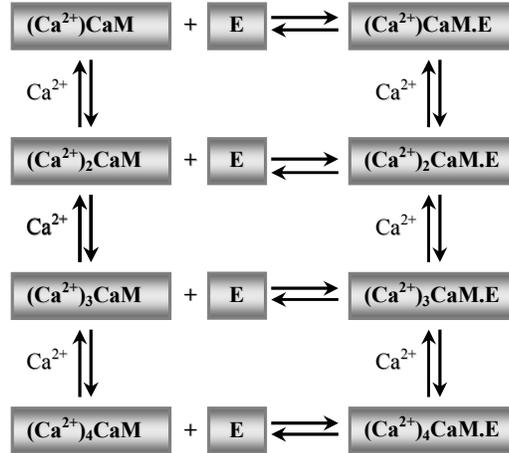


Figura 18: Esquema para a simulação da ativação da AC e da PDE. Nesse esquema, foi considerado a AC e a PDE, representadas, de maneira genérica, por E, podem interagir todas as espécies de CaM associadas ao Ca^{2+} ($(Ca^{2+})CaM$, $(Ca^{2+})_2CaM$, $(Ca^{2+})_3CaM$ e $(Ca^{2+})_4CaM$). No entanto, apenas a associação dessas enzimas com o complexo $(Ca^{2+})_4CaM$ resulta em suas ativações.

Com base nesses pontos, a ativação da AC e da PDE foi simulada considerando a existência de quatro complexos formados entre a enzima (E), que pode ser a AC ou a PDE, a CaM e o Ca^{2+} : $(Ca^{2+})CaM.E$, $(Ca^{2+})_2CaM.E$, $(Ca^{2+})_3CaM.E$ e $(Ca^{2+})_4CaM.E$. Todas as espécies em que a CaM, ligada a E, está associada a menos do que quatro Ca^{2+} , mais íons podem se associar, até formar a única espécie de cada enzima considerada ativa, ou seja, a $(Ca^{2+})_4CaM.AC$, para a AC, e $(Ca^{2+})_4CaM.PDE$, para a PDE. Esse processo foi simulado de acordo com as equações:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[(Ca^{2+})CaM.E]}{dt} &= (k_{f18} \cdot [(Ca^{2+})CaM] \cdot [E] - k_{b18} \cdot [(Ca^{2+})CaM.E]) \\
 &- (k_{f19} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})CaM.E] - k_{b19} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM.E])
 \end{aligned} \tag{65}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d[(Ca^{2+})_2CaM.E]}{dt} &= (k_{f20} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM] \cdot [E] - k_{b20} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM.E]) \\
 &+ (k_{f19} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})CaM.E] - k_{b19} \cdot [(Ca^{2+})_2CaM.E]) \\
 &- (k_{f21} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_2CaM.E] - k_{b21} \cdot [(Ca^{2+})_3CaM.E])
 \end{aligned} \tag{66}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[(Ca^{2+})_3 CaM.E]}{dt} &= (k_{f22} \cdot [(Ca^{2+})_3 CaM] \cdot [E] - k_{b22} \cdot [(Ca^{2+})_3 CaM.E]) \\ &+ (k_{f21} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_2 CaM.E] - k_{b21} \cdot [(Ca^{2+})_3 CaM.E]) \\ &- (k_{f23} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_3 CaM.E] - k_{b23} \cdot [(Ca^{2+})_4 CaM.E]) \end{aligned} \quad (67)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[(Ca^{2+})_4 CaM.E]}{dt} &= (k_{f24} \cdot [(Ca^{2+})_4 CaM] \cdot [E] - k_{b24} \cdot [(Ca^{2+})_4 CaM.E]) \\ &+ (k_{f23} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})_3 CaM.E] - k_{b23} \cdot [(Ca^{2+})_4 CaM.E]) \end{aligned} \quad (68)$$

Uma vez ativas, a ação catalítica de ambas as enzimas foi simulada de acordo com reações de equilíbrio rápido. Porém, diferentemente da PDE, a atividade da AC apresenta um padrão bifásico característico em função da variação na concentração de Ca^{2+} , ou seja, essa enzima é inibida por concentrações elevadas do íon (Cooper, 2003a). Para considerar essa característica na produção de AMPc, a equação que descreve sua concentração, em função da atividade da AC e da PDE, é dada por:

$$\begin{aligned} \frac{d[AMPc]}{dt} &= [AC^*] \cdot k_{cat_AC} \cdot \frac{[ATP]}{K_M} \\ &\quad \left(1 + \frac{[ATP]}{K_{M_AC}} + \frac{[Ca^{2+}]_{livre}}{K_i} \right) \\ &- [PDE^*] \cdot k_{cat_PDE} \cdot \frac{[AMPc]}{K_{M_PDE} + [AMPc]} \end{aligned} \quad (69)$$

em que k_{cat_AC} , k_{cat_PDE} , K_{M_AC} , K_{M_PDE} , são as constantes catalíticas para a AC e PDE, $[ATP]$ é a concentração do ATP, que é o substrato da AC, $[AC^*]$ e $[PDE^*]$ são as concentrações de AC e PDE ativas, respectivamente, e K_i é a constante de inibição da AC por Ca^{2+} . Da mesma maneira que foi feito para as demais moléculas modeladas, a simulação da ativação da AC e da PDE se baseou em parâmetros experimentais mostrados na Tabela 6 (Anexo I) (Cheung et

al., 1981; Cox et al., 1981; Huang et al., 1981; Sharma e Wang, 1985; 1986; Cox, 1988; Wang et al., 2003; 2004; Simpson et al., 2006).

Uma vez que a ação catalítica da AC, no modelo, supera a da PDE, há um excesso de AMPc no meio intracelular suficiente para ativar a PKA.

Como já foi mencionado, a PKA é um tetrâmero formado por duas subunidades catalíticas (C) e duas reguladoras (R). Para se tornar ativa a enzima se liga a quatro moléculas de AMPc, em sítios localizados nas subunidades R, o que promove a liberação das duas subunidades C ativas (Corbin et al., 1978; OGREIG e DOSKELAND; 1980; 1981a; 1981b) (Fig. 19). Dessa maneira, o fator limitante para a ativação da PKA é a existência de AMPc no meio intracelular. Cada par de AMPc se liga a uma subunidade R da PKA, em sítios distintos denominados A e B (OGREIG e DOSKELAND, 1980; OGREIG e DOSKELAND, 1981a; OGREIG e DOSKELAND, 1981b).



Figura 19: A ativação da PKA. A PKA é um tetrâmero formado por duas subunidades R e duas subunidades C. A associação de quatro moléculas de AMPc, duas em cada subunidade R, determina uma mudança em sua estrutura que promove a liberação de suas subunidades catalíticas ativas no meio intracelular.

Para simular essa associação, foi considerada a formação de duas espécies da PKA: com dois AMPc, representada por $(AMPc)_2PKA$, e com quatro AMPc, representada por $(AMPc)_4PKA$. E, em seu estado associado a quatro moléculas de AMPc, a PKA sofre uma mudança conformacional que resulta na perda da afinidade entre as subunidades R e C, que se dissociam. Com base nesses aspectos, o modelo de ativação da PKA foi feito de acordo com as seguintes equações:

$$\begin{aligned} \frac{d[(AMPc)_2 PKA]}{dt} = & (k_{f25}[AMPc]^2 \cdot [PKA] - k_{f25}[(AMPc)_2 PKA]) \\ & - (k_{f26}[AMPc]^2 \cdot [(AMPc)_2 PKA] - k_{f26}[(AMPc)_4 PKA]) \end{aligned} \quad (70)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[(AMPc)_4 PKA]}{dt} = & (k_{f26}[AMPc]^2 \cdot [(AMPc)_2 PKA] - k_{b26} \cdot [(AMPc)_4 PKA]) \\ & - (k_{b27} \cdot [(AMPc)_4 PKA] - k_{f27} \cdot [(AMPc)_4 R] \cdot [C]^2) \end{aligned} \quad (71)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = (k_{b27} \cdot [(AMPc)_4 PKA] - k_{f27} \cdot [(AMPc)_4 R] \cdot [C]^2) \quad (72)$$

onde $[C]$ e $[R]$ representam a concentração de subunidade catalítica e reguladora livres, respectivamente, $[(AMPc)_2 PKA]$ e $[(AMPc)_4 PKA]$ são as concentrações da PKA associada com dois e quatro moléculas de AMPc, e k_{fx} e k_{bx} são as constantes de velocidade, cujos valores estão descritos na Tabela 6 (Anexo I) e foram retirados de artigos experimentais (Ogreig e Doskeland, 1980; Rannels e Corbin, 1980; Ogreig e Doskeland, 1981a; Ogreig e Doskeland, 1981b; Zawadzki e Taylor, 2004):

Em seguida à via da PKA, foi simulada a quarta via fundamental para a LTP inicial, a da MAPK ERK1/2.

3.8 A via da MAPK ERK1/2

As enzimas MAPKs são implicadas, principalmente, com processos de proliferação celular e mecanismos de transcrição gênica (Adans et al., 2000; Weeber e Sweatt, 2002). Porém, algumas dessas enzimas, destacando-se, para a LTP, a ERK1/2, estão envolvidas também no controle da inserção dos receptores AMPA na membrana (Zhu et al., 2002; Krapivinsky et al., 2003; 2004; Kim et al., 2005; Qin et al., 2005; Ivanov et al., 2006; Li et al., 2006).

As proteínas MAPKs podem ser ativadas através da chegada de inúmeros estímulos à célula, no entanto, a forma mais conhecida para essa ativação é através da estimulação de receptores tirosina quinase (Ray e Sturgill, 1988; Hubbard e Till, 2000; Kovalchuk et al., 2002). Mas as MAPKs também podem ser ativadas através da estimulação celular apenas com L-glutamato (Rosen e al., 1994; Wang et al., 2007). E, independente do mecanismo de estimulação utilizado, geralmente, a ativação das enzimas MAPKs é mediada pelas proteínas G monoméricas.

As proteínas G monoméricas são pequenas enzimas que formam uma superfamília dividida, por sua vez, em cinco subfamílias denominadas Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf e Ran (Takai et al., 2001). Para a LTP inicial, apenas as enzimas da família da Ras tem sido apontadas como importantes.

As enzimas da família da Ras são classificadas, em mamíferos, como Ras (Ki-Ras, Ha-Ras, N-Ras, R-Ras e M-Ras), Ral (RalA e RalB), Rap (Rap1A, Rap1B, Rap2A e Rap2B), Rin Tc21, Rit, Rad e Kir/Gem. Para a LTP inicial, especialmente as enzimas agrupadas como Ras, ou seja a Ki-Ras, Ha-Ras, N-Ras, R-Ras e M-Ras, têm sido implicadas, embora existam poucos dados sobre a atuação específica de cada uma dessas proteínas. Nesse sentido, ao longo das simulações, não foram feitas considerações em função de possíveis diferenças das isoformas da Ras.

Para simular a Ras, foi necessário considerar seus mecanismos de ativação e desativação. De maneira análoga às proteínas G triméricas, as proteínas G monoméricas possuem seu ciclo de ativação/desativação regulado pela presença de GTP/GDP, respectivamente. No entanto, a ativação e desativação das G monoméricas é um evento que envolve inúmeros reguladores, agrupados em duas grandes classes, sendo uma dessas classes compostas por moléculas que atuam no aumento da velocidade de liberação de GDP, denominadas GEF ou GRF, enquanto a outra é formada por moléculas que agem promovendo

o aumento em sua atividade de GTPase, e são chamadas GAPs (Takai et al., 2001; Mitin et al., 2005; Yarwood et al., 2006; Bos et al., 2007).

Nos neurônios piramidais hipocâmpais, existem diversos tipos de GEFs que atuam especificamente sobre a Ras. Mas, entre as proteínas que catalisam a ativação da Ras em decorrência da estimulação glutamatérgica, destacam-se a Ras-GRF1 e a Ras-GRF2. Ambas as enzimas estão presentes na região sináptica e requerem a associação com $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ para se tornarem ativas (Farnsworth et al., 1995; Buchsbaum et al., 1996; Fam et al., 1997; Freshney et al., 1997; Sturani et al., 1997). No entanto, embora se saiba que a Ras-GRF1 e a Ras-GRF2 são ativadas através de sua associação com a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, existem poucos dados sobre esse processo. Sabe-se, porém, que a interação da Ras-GRF1 e da Ras-GRF2 com a CaM é similar a de outra enzima, a IQGAP. Com base nesse ponto, o modelo de ativação das duas RGFs foi construído considerando sua associação com a ApoCaM e com as espécies de CaM associada ao Ca^{2+} . Esse tipo de interação, similar ao processo observado na associação entre a CaM e a neurogranina, caracteriza-se por envolver um motivo protéico específico, o IQ. Proteínas que possuem motivos IQ se associam com a CaM preferencialmente em ausência de Ca^{2+} (Jurado et al., 1999). Algumas moléculas, no entanto, possuem o motivo IQ incompleto, como a IQGAP e as Ras-GRFs 1 e 2, e se ligam a CaM em presença e em ausência de Ca^{2+} , embora em presença do íon sua afinidade pela CaM seja cerca de duas ordens de magnitude maior (Houdusse e Cohen, 1995; Li e Sacks, 2003). Dessa maneira, a simulação da interação entre as proteínas Ras-GRF1 e Ras-GRF2 se baseou nas equações utilizadas para a simulação das interações entre o Ca^{2+} , a CaM e a neurogranina. Em seguida, foi simulada sua interação com a Ras.

Em seu estado ativo, que foi considerado como o estado associado à CaM com quatro Ca^{2+} , a Ras-GRF1 e a Ras-GRF2 catalisam a liberação de GDP da Ras, através da formação de um complexo ternário entre a Ras, o GDP e a Ras-GRF, representado por *Ras-*

$GRF \cdot RasGDP$. Em seguida, o GDP é liberado, formando o complexo binário $Ras-GRF \cdot Ras$, que se associa ao GTP, resultando no complexo ternário $Ras-GRF \cdot RasGTP$, que, pode se dissociar mantendo a Ras ativa (Lenzen et al., 1998; Zhang et al., 2005; Bos et al., 2003).

Esse processo foi simulado de acordo com as equações:

$$\frac{d[RasGDP]}{dt} = -(k_{f34} \cdot [Ras - GRF^*] \cdot [RasGDP] - k_{b34} \cdot [Ras - GRF^* \cdot RasGDP]) \quad (73)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Ras - GRF^* \cdot RasGDP]}{dt} &= (k_{f34} \cdot [Ras - GRF^*] \cdot [RasGDP] \\ &- k_{b34} \cdot [Ras - GRF^* \cdot RasGDP]) \\ &- (k_{b35} \cdot [Ras - GRF^* \cdot RasGDP] - k_{f35} \cdot [Ras - GRF^* \cdot Ras] \cdot [GDP]) \end{aligned} \quad (74)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Ras - GRF^* \cdot Ras]}{dt} &= (k_{b35} \cdot [Ras - GRF^* \cdot RasGDP] \\ &- k_{f35} \cdot [Ras - GRF^* \cdot Ras] \cdot [GDP]) \\ &- (k_{f36} \cdot [Ras - GRF^* \cdot Ras] \cdot [GTP] - k_{b36} \cdot [Ras - GRF^* \cdot RasGTP]) \end{aligned} \quad (75)$$

$$\frac{d[Ras^*]}{dt} = k_{b37} \cdot [Ras - GRF^* \cdot RasGTP] - k_{a37} \cdot [Ras^*] \cdot [Ras - GRF^*] \quad (76)$$

em que $[RasGDP]$, e $[Ras^*]$ representam as concentrações de Ras inativa através de sua associação com o GDP e Ras ativa ligada ao GTP, respectivamente, e $[GDP]$ e $[GTP]$ são as concentrações de GDP e GTP e $[Ras-GRF^*]$ é a concentração de Ras-GRF em seu estado ativo. As constantes k_{fx} e k_{bx} são mostradas na Tabela 7 (Anexo I) e foram retiradas de artigos experimentais (Lenzen et al., 1998; Zhang et al., 2005).

O retorno da Ras ao seu estado ligado ao GDP também é catalisado por proteínas específicas, as GAPs. Nos neurônios piramidais hipocampais, uma GAP destaca-se por ser extremamente abundante da densidade pós-sináptica, a SynGAP (Chen et al., 1998; Kim et al., 1998). Com base nesse fato, foi simulada a interação entre a SynGAP e a Ras em seu

estado ligado ao GTP, seguida pela hidrólise do nucleotídeo, o que resulta no retorno da Ras ou da Rap ao seu estado inativo:

$$\frac{d[RasGDP]}{dt} = k_{c38} \cdot [Ras * SynGAP] \quad (77)$$

Uma vez ativa, a Ras inicia a ativação da via da MAPK.

As enzimas MAPKs não compõem apenas uma via, mas várias vias que se caracterizam por possuir, pelo menos, três quinases acopladas em série, e que são responsáveis uma pela ativação da outra. Assim, a primeira enzima da via é uma MAPKKK, que ativa, através de duas fosforilações, uma MAPKK, que ativa a MAPK. Cada uma dessas quinases compreende uma classe de enzimas que possuem mecanismos de ativação distintos e regulam processos específicos (Pearson et al., 2001).

A Ras age preferencialmente na ativação da MAPKKK denominada Raf-1 (Hallberg et al., 1994). Essa ativação envolve o recrutamento da Raf-1 para a membrana, onde a Raf-1 se torna ativa através de sua associação com a Ras, seguida por mecanismos adicionais como sua interação com fosfolipídios, fosforilações e, possivelmente, dimerização (Kyriakis, 2007). Mas, cabe ressaltar, que a interação entre a Ras e Raf-1 é a etapa limitante dessa reação e foi o único evento simulado.

Uma vez ativa, a Raf-1 catalisa a ativação das MAPKKs denominadas MEK1 e MEK2, que podem ser agrupadas, em função de suas semelhanças, como MEK1/2. A MEK1/2, por sua vez, catalisa a ativação da ERK1/2 (Fig. 20), através de um processo bastante particular. As MEK1/2, assim com as demais enzimas MAPKKs, são proteínas quinases duais, ou seja, que catalisam fosforilações em resíduos treonina e tirosina de seus alvos, as enzimas MAPKs (Cobb e Goldsmith, 1995; Roux e Blenis, 2004).



Figura 20: Via da MAPK ERK1/2. A ativação da ERK1/2 promovida pelos receptores NMDA inicia-se com a entrada de Ca^{2+} na célula e a ativação da enzima Ras-GRF. A Ras-GRF catalisa a ativação da Ras, proteína G monomérica que atua no recrutamento e ativação da MAPKKK denominada Raf-1, que age fosforilando e ativando a MEK1/2. Por fim, a MEK1/2 determina a ativação da ERK1/2.

Todo esse processo de ativação das três enzimas da via da MAPK foi simulado de acordo com as seguintes equações:

$$\frac{d[Raf-1]}{dt} = -(k_{f39} \cdot [Ras] \cdot [Raf-1] - k_{b39} \cdot [Raf-1*]) \quad (78)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Raf-1*]}{dt} &= (k_{f39} \cdot [Ras] \cdot [Raf-1] - k_{b39} \cdot [Raf-1*]) \\ &- (k_{f40} \cdot [Raf-1*] \cdot [MEK1/2] - k_{b40} \cdot [Raf-1* MEK1/2]) \\ &+ k_{c40} \cdot [Raf-1* MEK1/2] \\ &- (k_{f40} \cdot [Raf-1*] \cdot [MEK1/2*] - k_{b40} \cdot [Raf-1* MEK1/2*]) \\ &+ k_{c40} \cdot [Raf-1* MEK1/2*] \end{aligned} \quad (79)$$

$$\frac{d[MEK1/2]}{dt} = -(k_{f40} \cdot [Raf-1*] \cdot [MEK1/2] - k_{b40} \cdot [Raf-1* MEK1/2]) \quad (80)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Raf-1* MEK1/2]}{dt} &= (k_{f40} \cdot [Raf-1*] \cdot [MEK1/2] - k_{b40} \cdot [Raf-1* MEK1/2]) \\ &- k_{c40} \cdot [Raf-1* MEK1/2] \end{aligned} \quad (81)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MEK1/2*]}{dt} &= k_{c40} \cdot [Raf-1* MEK1/2] \\ &- (k_{f40} \cdot [Raf-1*] \cdot [MEK1/2*] - k_{b40} \cdot [Raf-1* MEK1/2*]) \end{aligned} \quad (82)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Raf-1* MEK1/2*]}{dt} &= (k_{f40} \cdot [Raf-1*] \cdot [MEK1/2*] - k_{b40} \cdot [Raf-1* MEK1/2*]) \\ &- k_{c40} \cdot [Raf-1* MEK1/2*] \end{aligned} \quad (83)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MEK1/2^*]}{dt} &= k_{c40} \cdot [Raf - 1^*MEK1/2^*] - (k_{f41} \cdot [MEK1/2^{**}] \cdot [ERK1/2] \\ &- k_{c41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2]) + k_{c41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2] \\ &- (k_{f41} \cdot [MEK1/2^{**}] \cdot [ERK1/2^*] - k_{b41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2^*]) \\ &+ k_{c41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2^*] \end{aligned} \quad (84)$$

$$\frac{d[ERK1/2]}{dt} = -(k_{f41} \cdot [MEK1/2^{**}] \cdot [ERK1/2] - k_{b41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2]) \quad (85)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MEK1/2^{**}ERK1/2]}{dt} &= (k_{f41} \cdot [MEK1/2^{**}] \cdot [ERK1/2] - k_{b41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2]) \\ &- k_{c41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2] \end{aligned} \quad (86)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[ERK1/2^*]}{dt} &= k_{c41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2] \\ &- (k_{f41} \cdot [MEK1/2^{**}] \cdot [ERK1/2^*] - k_{b41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2^*]) \end{aligned} \quad (87)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MEK1/2^{**}ERK1/2^*]}{dt} &= (k_{f41} \cdot [MEK1/2^{**}] \cdot [ERK1/2^*] - k_{b41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2^*]) \\ &- k_{c41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2^*] \end{aligned} \quad (88)$$

$$\frac{d[ERK1/2^{**}]}{dt} = k_{c41} \cdot [MEK1/2^{**}ERK1/2^*] \quad (89)$$

onde k_{fx} e k_{bx} são constantes de velocidade para a associação e dissociação dos complexos protéicos indicados, e k_{cx} são constantes de velocidade para as reações de fosforilação. Esses parâmetros utilizados são mostrados na Tabela 7 (Anexo I) e foram retirados de artigos experimentais (Catling et al., 1994; Gorman et al., 1996; Kiel et al., 2004).

Com a construção do modelo da via da MAPK ERK1/2, finalizou-se a parte das simulações consideradas essenciais para a LTP. No entanto, inúmeras outras enzimas desempenham um papel modulador importante para a LTP e, entre elas, destaca-se a NOS, responsável pela produção do segundo mensageiro NO.

3.9 Via da NOS: formação de NO

O NO foi identificado, pela primeira vez, no sistema nervoso central em 1988 (revisto em Garthwaite e Boulton, 1995). Sua ação, nessa região, é bem diversificada em função de seu caráter altamente reativo, o que possibilita sua atuação não apenas em alvos próximos ao seu local de síntese, mas também em compartimentos celulares distantes e até mesmo em outras células (Garthwaite, 1991; Girard e Potier, 1993).

A ação do NO mais estudada é na estimulação da produção de guanosina monofosfato 5',3'-cíclico (GMPc), através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) (Denninger e Marletta, 1999; Bon e Garthwaite, 2003; Toda e Okamura, 2003). Porém, além dessa atuação, o NO também age, diretamente, sobre inúmeros alvos oxidando resíduos cisteína (Radi et al., 1991; Stamler et al., 1992; Girard e Potier, 1993; Lipton et al., 1993).

Independente do alvo de ação do NO, sua produção ocorre em decorrência da ativação da NOS que, por sua vez, é mediada pelo influxo de Ca^{2+} .

Nos neurônios, a principal isoforma de NOS encontrada, denominada NOS neuronal (nNOS), se localiza próxima às subunidades NR1 dos receptores NMDA (Griffith e Stuehr, 1995; Weiss et al., 1998), e é ativada assim que há o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, já que essa proteína, assim como diversas outras enzimas simuladas, é dependente de Ca^{2+}/CaM (Bredt e Snyder, 1990). E, assim como a AC, a CaMKII e outras enzimas de interação com a Ca^{2+}/CaM , a NOS também é capaz de se associar com a CaM em sua forma com menos de quatro Ca^{2+} (Persechini et al., 1996; Censarek et al., 2002). Dessa maneira, a interação entre a CaM, o Ca^{2+} e a NOS origina quatro espécies distintas: $(Ca^{2+})CaM.NOS$, $(Ca^{2+})_2CaM.NOS$, $(Ca^{2+})_3CaM.NOS$ e $(Ca^{2+})_4CaM.NOS$, simuladas de acordo com as equações (65)-(68). Cabe ressaltar, no entanto, que apenas a espécie da NOS ligada na $(Ca^{2+})_4CaM$, representada por $(Ca^{2+})_4CaM.NOS$, foi considerada capaz de se associar ao seu substrato, a L-arginina, representada por *Arg*, formando o complexo enzima/substrato, $(Ca^{2+})_4CaM.NOS.Arg$. Mas, cabe ressaltar que a atividade catalítica da NOS é dependente,

além de $(Ca^{2+})_4CaM$, dos co-substratos o NADPH e O_2 , e resulta na produção da L-citrulina em adição ao NO, a partir da oxidação da L-arginina (Marletta, 1993; Masters, 1994; Stuehr, 1997; 2001).

Além de sua interação com o complexo Ca^{2+}/CaM , a simulação da atividade da NOS também teve que considerar outros aspectos. Estruturalmente, a NOS é uma enzima dimérica que possui, em cada monômero, um domínio oxidase e um redutase, acoplados a diversos grupos prostéticos, incluindo, no domínio oxigenase, um grupo ferro-protoporfirina IX (heme) (McMillan et al., 1992; Schimidt et al., 1992; Stuehr e Ikeda-Saito, 1992; Sheta et al., 1994; Werner et al., 2003; Stuehr et al., 2004; Wei et al., 2005). A reação catalítica total para a formação de NO ocorre em dois passos, nos quais há a oxidação do NADPH, no terminal redutase, a migração de seus elétrons através dos grupos prostéticos até o grupo heme, onde há a redução de seu átomo de ferro ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) (revisto em Marletta, 1993; Masters, 1994; Griffiths e Stuehr, 1995; Stuehr, 1997; Santolini et al., 2001; Stuehr et al., 2001). Após a redução do átomo de ferro do grupo heme, há a associação de O_2 . O O_2 é reduzido e reage com a água. Com isso, há a hidroxilação da L-arginina, que resulta na formação do intermediário N^{ω} -hidroxi-L-arginina (NOHA). Uma vez formado, o NOHA é então, no segundo passo da reação, consumido para formar L-citrulina e NO. A catálise do NOHA envolve as mesmas etapas requeridas para a sua produção. Porém, ao invés de sofrer uma reação de hidroxilação, há uma reação de oxidação do NOHA, que resulta na formação dos produtos finais da reação, destacando-se, para o modelo, o NO. Depois de formado no terminal oxidase, o NO se dissocia lentamente da enzima, e a maior parte dessa dissociação é mediada pela oxidação do Fe^{3+} por O_2 (revisto em Marletta, 1993; Masters, 1994; Griffiths e Stuehr, 1995; Stuehr, 1997). Todo esse processo foi utilizado como base para a construção da produção de NO e baseou-se em um modelo já existente (Santolini et al., 2001) (Fig. 21).

As equações utilizadas para a construção do modelo de produção de NO seguem abaixo:

$$\frac{d[Fe^{3+}]}{dt} = -k_1 \cdot [Fe^{3+}] + k_7 \cdot [Fe_{NO}^{3+}] + k_{10} \cdot [Fe_{NO}^{2+}] \quad (90)$$

$$\frac{d[Fe^{2+}]}{dt} = k_1 \cdot [Fe^{3+}] + k_8 \cdot [Fe_{NO}^{2+}] - k_2 \cdot [Fe^{2+}] \quad (91)$$

$$\frac{d[Fe^{2+}_{-O_2}]}{dt} = -k_3 \cdot [Fe^{2+}_{-O_2}] + k_2 \cdot [Fe^{2+}] \quad (92)$$

$$\frac{d[Fe_{NOHA}^{3+}]}{dt} = -k_4 \cdot [Fe_{NOHA}^{3+}] + k_2 \cdot [Fe^{2+}_{-O_2}] \quad (93)$$

$$\frac{d[Fe_{NOHA}^{2+}]}{dt} = k_4 \cdot [Fe_{NOHA}^{3+}] - k_5 \cdot [Fe_{NOHA}^{2+}] \quad (94)$$

$$\frac{d[Fe_{NO}^{3+}]}{dt} = k_5 \cdot [Fe_{NOHA}^{2+}] - k_7 \cdot [Fe_{NO}^{3+}] - k_8 \cdot [Fe_{NO}^{3+}] \quad (95)$$

$$\frac{d[Fe_{NO}^{2+}]}{dt} = -k_{10} \cdot [Fe_{NO}^{2+}] + k_5 \cdot [Fe_{NO}^{3+}] - k_9 \cdot [Fe_{NO}^{2+}] \quad (96)$$

$$\frac{d[NO]}{dt} = k_8 \cdot [Fe_{NO}^{3+}] + k_9 \cdot [Fe_{NO}^{2+}] \quad (97)$$

onde os termos subscritos *NOHA* e *NO* se referem a NOS ligada ao intermediário NOHA ou NO, respectivamente. Já as constantes catalíticas, k_n , foram retiradas de artigos experimentais e estão demonstradas na Tabela 8 (Anexo I) (Su et al., 1995; Santolini et al., 2001; Stuhler, 2001; Ost e Daff, 2005). Como essas equações descrevem o processo catalítico de oxidação da L-arginina, elas foram simuladas foram simuladas como processos irreversíveis.

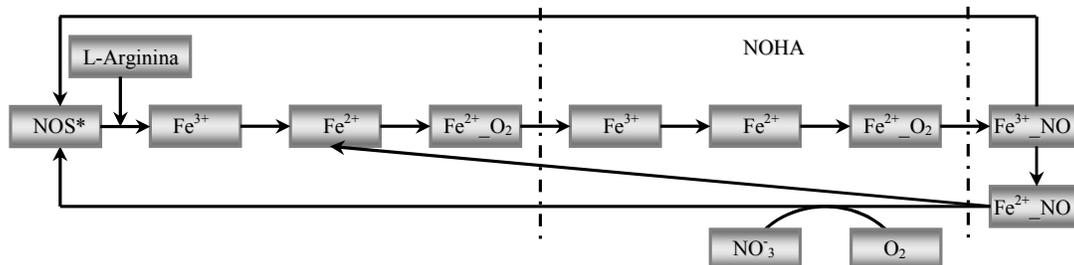


Figura 21: Etapas para a formação de NO catalisada pela NOS. A enzima NOS, em seu estado ativo, converte a L-arginina em NO, através de dez reações de óxido-redução que ocorrem seqüencialmente.

Uma vez produzido, o NO é rapidamente consumido para a formação de compostos nitrogenados, que atuam nas reações de oxidação no meio intracelular. Essa oxidação ocorre, principalmente, através de trocas de grupos tióis (R-SH) por nitrotióis (R-SNO), processo chamado de nitrosação (Radi et al., 1991; Stamler et al., 1992; Girard e Potier, 1993; Lipton et al., 1993). A formação de nitrotióis é bastante susceptível à liberação posterior do grupo NO, levando a formação de pontes de dissulfeto, o que é uma forma comum de indução de rearranjo na estrutura protéica (Meister e Anderson, 1983; Stamler et al., 1992; Girard e Potier, 1993). Esse processo foi simulado, pois está implicado com a regulação do nível de CaM livre, o que será descrito em detalhes posteriormente, e segue as seguintes reações (Kharitonov et al., 1995; Miao et al., 2000):



Em seguida, há a reação dos tióis das cisteínas com o N_2O_3 , formando nitrotióis, RSNO. Por fim, os nitrotióis reagem entre si para formar ponte de dissulfeto (RSSR), regenerando o NO utilizado na reação inicial (Wink et al., 1997; Miao et al., 2000):



O produto da reação, um nitrotiol, RSNO, reage com outro RSNO para formar as pontes de dissulfeto:



Esse processo foi simulado com base nas seguintes equações:

$$\frac{d[NO_2]}{dt} = k_{ox1}[NO][O_2] - k_{ox2}[NO_2][NO] \quad (98)$$

$$\frac{d[N_2O_3]}{dt} = k_{ox2}[NO_2][NO] - k_{ox3}[N_2O_3][RSH] \quad (99)$$

$$\frac{d[RSNO]}{dt} = k_{ox3}[N_2O_3][RSH] - k_{ox4}[RSNO]^2 \quad (100)$$

Os parâmetros para essas equações estão na Tabela 8 (Anexo I) (Radi et al., 1991; Kharitonov et al., 1995; Singh et al., 1996; Wink et al., 1997; Miao et al., 2000).

Além da oxidação de resíduos cisteína localizados em algumas proteínas específicas, o NO ativa a enzima sGC. Existem diversas divergências na literatura sobre os mecanismos exatos para a reação entre o NO e a sGC (Stone e Marletta, 1996; Cary et al., 2006). Porém, para a construção do modelo de ativação a sGC, optou-se pela simulação de um mecanismo de associação rápida entre o NO e essa enzima. Essa ligação ocorre através da associação do NO com o grupo heme da sGC, que contém um átomo de ferro (Fe^{2+}) penta-coordenado ligado em um resíduo histidina (His¹⁰⁵). Quando há NO no meio, o Fe^{2+} se associa rapidamente a ele, com taxa de velocidade próxima a velocidade de difusão do NO, e forma o

complexo intermediário hexa-coordenado Fe^{2+} -nitrosil. Em seguida, há o rompimento da ligação entre o Fe^{2+} e o resíduo His^{105} , mantendo apenas o complexo penta-coordenado Fe^{2+} -nitrosil, e promovendo a ativação da enzima (Bellamy e Garthwaite, 2002; Roy e Garthwaite, 2006).

A partir desses dados, a ligação do NO com a sGC foi modelada em uma reação com duas etapas, nas quais ocorre a ligação do NO com o grupo heme, formando o complexo hexa-coordenado, representado por sGC^* , e, em seguida, a quebra da ligação entre o íon Fe^{2+} e resíduo His^{105} , o que determina a ativação da sGC, indicada por sGC^{**} :

$$\frac{d[sGC^*]}{dt} = -k_{11}[NO][sGC] + k_{-11}[sGC^*] - k_{12}[sGC^*] + k_{-12}[sGC^{**}] \quad (101)$$

$$\frac{d[sGC^{**}]}{dt} = k_{12}[sGC^*] - k_{-12}[sGC^{**}] \quad (102)$$

A inativação do complexo NO.sGC não depende apenas da degradação do NO, mas também de sua taxa de difusão, que é rápida ($t_{1/2} \sim 5\text{s}$) (Hall e Garthwaite, 2006). Porém, antes de retornar ao seu estado inativo, a sGC catalisa a produção do nucleotídeo GMPC a partir do GTP, o que foi simulado através de uma equação de Michaelis-Menten. Uma vez produzido, o GMPC atua em inúmeros processos.

3.10 Fosfatases

Como foi mencionado até esse momento, a LTP é um evento que envolve a ativação persistente, principalmente, de proteínas quinases e reações de fosforilação. Porém, toda fosforilação pode ser revertida pela ação das proteínas fosfatases (Sweatt, 2001).

Em contraste com as proteínas quinase, que apresentam complexos padrões de ativação, as fosfatases são, muitas vezes, enzimas constitucionalmente ativas, embora sua ação catalítica possa ser regulada por inúmeros moduladores. Além disso, ainda em comparação com as quinases que possuem um grau elevado de especificidade de atuação, as fosfatases são menos específicas (Winder e Sweatt, 2001). Ou seja, as mesmas enzimas catalisam uma grande gama de reações e, geralmente, com altas taxas catalíticas. Nesse sentido, a LTP não é apenas um processo que requer a ativação das quinases, mas que, necessariamente, envolve a inibição das fosfatase, ou ainda, a proteção dos resíduos fosforilados. Com base nisso, foi necessário simular a atuação das fosfatases, que foram incluídas no modelo a partir de suas reações com seus substratos e de seus principais mecanismos de regulação.

Assim como ocorre com as quinases, que são classificadas como serina/treonina ou tirosina quinases em função dos resíduos que fosforilam, há duas grandes classes de proteínas fosfatases, divididas de acordo com sua especificidade de atuação. A primeira dessas classes é composta pelas fosfatases específicas para a desfosforilação de resíduos serina/treonina, destacando-se, para a LTP, a PP1, a PP2A e a calcineurina (também chamada de PP2B) (Shenolikar, 1994; Cohen, 2002; Winder e Sweatt, 2001). As três enzimas possuem uma ampla atuação e desfosforilam todos os resíduos serina/treonina fosforilados pela CaMKII, pela PKA, pela PKC e pelas enzimas da via das MAPKs (Millward et al., 1999; Winder e Sweatt, 2001; Ceulemans e Bollen, 2003). No entanto, existem poucas informações sobre as isoformas e taxas catalíticas específicas para cada uma dessas fosfatases. A PP2A, por exemplo, é um trímero formado por uma subunidade catalítica, uma subunidade reguladora e uma ancoradoura, que posiciona a enzima em locais específicos da célula. Cada uma dessas subunidades possui diversas isoformas, cujas especificidades são pouco conhecidas (Millward et al., 1999; Janssens e Goris, 2001).

A PP1, na LTP, é mais estudada do que a PP2A. E isso ocorre por que a PP1 é uma das principais fosfatases encontradas no hipocampo (Strack et al., 1999), e que recebe considerável atenção por ser a única enzima capaz de catalisar a inativação da CaMKII na densidade pós-sináptica (Shields et al., 1985; Strack et al., 1997b). Além desses aspectos, a PP1 possui uma grande variedade de reguladores e, no hipocampo, um deles se destaca: o In-1 (Cohen, 2002; Ceulemans e Bollen, 2003).

Em condições celulares basais, o In-1 é capaz de se associar apenas fracamente com a PP1, mas, durante a LTP, ele passa a ser fosforilado pela PKA. Uma vez fosforilado, o In-1 rapidamente se associa e inibe a PP1. Dessa maneira, a ativação da PKA favorece a manutenção da atividade da CaMKII (Blitzer et al., 1995; 1998). Esse processo porém, pode ser revertido por outra fosfatase, a calcineurina, que age na desfosforilação do In-1 (Mulkey et al., 1994).

A calcineurina, juntamente com a CaMKII, é uma das enzimas mais abundantes do sistema nervoso central (revisto em Klee et al., 1998; Rusnak e Mertz, 2000). Seu papel em eventos plásticos é fundamental, especialmente em processos que determinam a diminuição do peso sináptico, como a LTD (Mulkey et al., 1994). Mas, em comparação com a PP2A e com a PP1, a calcineurina não se encontra ativa em condições celulares basais e, assim como muitas quinases, ela requer a presença de ativadores para iniciar sua atuação. Assim, para incorporar esse requerimento no modelo, foi necessário considerar alguns aspectos sobre a regulação dessa enzima.

Estruturalmente, a calcineurina é um dímero, composto pelas subunidades CaNA e CaNB (Klee et al., 1998). A CaNB é uma subunidade reguladora que se assemelha a CaM (Gallagher et al., 2001), e possui quatro sítios de associação ao Ca^{2+} , que modulam sua atividade (Klee et al., 1979; Stemmer e Klee, 1994; Kakalis et al., 1995). Porém, dois desses

sítios possuem afinidade tão alta por Ca^{2+} que estão sempre preenchidos e são considerados sítios estruturais (Feng e Stemmer, 1999).

A ligação de Ca^{2+} na CaNB é um pré-requisito para que a CaNA, que contém o sítio ativo da enzima, se associe à $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ e inicie sua atividade catalítica (Yang e Klee, 2000; Feng e Stemmer, 2001). E, assim como outras moléculas, a calcineurina se liga à $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ não apenas com quatro mas também com três, dois e um Ca^{2+} , embora ela necessite estar associada com a CaM com quatro Ca^{2+} para iniciar sua atividade catalítica (Kincaid e Vaughan, 1986).

Com base nesses pontos, o modelo da calcineurina foi feito considerando, primeiro, sua associação com dois Ca^{2+} e, em seguida, às espécies de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Fig. 22).

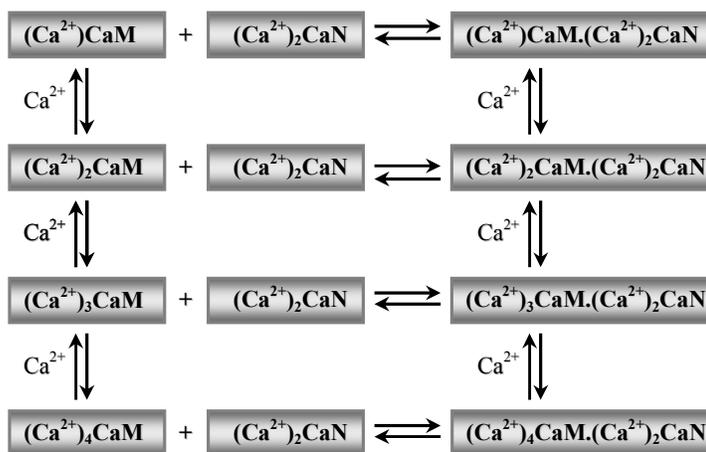


Figura 22: Esquema de ativação da calcineurina. A calcineurina precisa estar associada a dois Ca^{2+} em sua subunidade CaNB para poder se ligar às espécies de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. E, embora a calcineurina seja capaz de se ligar a CaM com menos de quatro Ca^{2+} , a enzima só é ativada através de sua associação com a $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$.

As equações para a associação da calcineurina, representada por CaN, com os dois Ca^{2+} são dadas abaixo:

$$\frac{d[CaN]}{dt} = -(k_{f1} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [CaN] - k_{b1} \cdot [(Ca^{2+})CaN]) \quad (103)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[(Ca^{2+})CaN]}{dt} &= (k_{f1} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [CaN] - k_{b1} \cdot [(Ca^{2+})CaN]) \\ &- (k_{f2} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})CaN] - k_{b2} \cdot [(Ca^{2+})_2CaN]) \end{aligned} \quad (104)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[(Ca^{2+})_2CaN]}{dt} &= (k_{f2} \cdot [Ca^{2+}] \cdot [(Ca^{2+})CaN] - k_{b2} \cdot [(Ca^{2+})_2CaN]) \\ &- (k_{f3} \cdot [(Ca^{2+})_4CaM] \cdot [(Ca^{2+})CaN] - k_{b3} \cdot [CaN^*]) \end{aligned} \quad (105)$$

em que $(Ca^{2+})CaN$ e $(Ca^{2+})_2CaN$ são suas espécies com um e dois Ca^{2+} associados na CaNB, respectivamente. Já a espécie CaN^* representa a calcineurina ativa, ou seja, associada tanto ao Ca^{2+} , na CaNB, quanto à $(Ca^{2+})_4CaM$, na CaNA. As constantes de velocidade estão representadas por k_{fx} e k_{bx} e tiveram seus valores, mostrados na Tabela 9 (Anexo I), retirados de dados experimentais (Hubbard e Klee, 1987; Stemmer e Klee, 1994; Perrino et al., 1995; Feng e Stemmer, 2001; Perrino et al., 2002; Quintana et al., 2005). As constantes k_{f31} e k_{b31} até k_{f33} e k_{b33} se referem a associação da calcinerina na CaM com menos de quatro íons Ca^{2+} e suas equações seguem o mesmo formalismo das equações (65)-(68).

Uma vez ativa, a calcineurina e as fosfatases PP1 e PP2A desfosforilam inúmeros substratos, através, inicialmente, da formação de um complexo ($fosfatase.Sub_{PO_4}$) entre a enzima ($fosfatase$) e seu alvo (Sub_{PO_4}), seguida pela remoção do grupo fosfato e liberação da fosfatase e do substrato desfosforilado:

$$\frac{d[Sub_{PO_4}]}{dt} = -k_f \cdot [fosfatase] \cdot [Sub_{PO_4}] + k_b \cdot [fosfatase.Sub_{PO_4}] \quad (106)$$

$$\frac{d[fosfatase.Sub_{PO_4}]}{dt} = k_f \cdot [fosfatase] \cdot [Sub_{PO_4}] - (k_b + k_{cat}) \cdot [fosfatase.Sub_{PO_4}] \quad (107)$$

em que k_f , k_b e k_{cat} são constantes catalíticas específicas para cada enzima e substrato considerado, e serão apontadas posteriormente.

Vale ressaltar ainda que, além das serina/treonina fosfatases, há ainda uma segunda classe de fosfatases que agem na desfosforilação de resíduos tirosina. Essas enzimas são pouco conhecidas na LTP, embora se saiba que elas atuam em uma grande variedade de substratos (Stoker, 2005). No entanto, no modelo de LTP inicial desenvolvido, apenas a ERK1/2 requer a desfosforilação em resíduos tirosina para retornar ao seu estado basal. Porém, geralmente, essas desfosforilações são catalisadas por enzimas específicas, as MKPs (*mitogenic-activated protein kinase phosphatase*) (Zheng e Guan, 1993; Farroq e Zhou, 2004; Martín et al., 2005).

Diferentemente das demais proteínas fosfatases, as MKPs possuem atividade dual e desfosforilam dois resíduos, um treonina e um tirosina, da ERK1/2 ativa. A maioria dessas fosfatases, porém, localizam-se apenas no núcleo celular, não agindo, portanto, na LTP inicial (revisto em Dickinson e Keyse, 2006). Mas, algumas delas são encontradas no citoplasma e regulam, localmente, o nível de ativação das enzimas das MAPKs (Husi et al., 2000). Por essa razão, essas enzimas foram simuladas.

As reações utilizadas para a simulação da atividade das MKPs envolvem exatamente o mesmo mecanismo descrito pelas equações (106) e (107), porém, esse mecanismo é realizado duas vezes, uma para a desfosforilação de cada resíduo fosforilado da ERK1/2 (Dickinson e Keyse, 2006).

Dessa maneira, é importante ressaltar que o modelo contou com a ação coordenada de quinases e fosfatases. Por serem menos seletivas, as mesmas fosfatases desfosforilam diferentes substratos regulando, portanto, o nível de ativação das enzimas do modelo.



IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 A Validação do Modelo

Os primeiros resultados obtidos nesse trabalho foram utilizados para a validação do modelo do neurônio piramidal, dos receptores AMPA e NMDA e das proteínas simuladas. Para isso, cada componente citado foi analisado com base em algumas de suas características observadas experimentalmente. Ou seja, a validação do modelo foi feita, na maior parte das vezes, através da comparação direta de algumas propriedades dos componentes simulados com dados experimentais retirados da literatura.

O primeiro componente do modelo analisado foi o neurônio piramidal da área CA1. Nessa etapa de validação, como o modelo da célula foi feito baseado no artigo de Traub et al. (1991), optou-se por analisá-lo apenas a partir de sua capacidade para apresentar os mesmos resultados do trabalho original. No artigo em questão, os autores estudaram, entre outros aspectos, os padrões de disparo do neurônio piramidal para diferentes valores de injeções de corrente. E esse foi um dos aspectos verificados no modelo desenvolvido nesse trabalho. Para isso, ele foi estimulado por diferentes valores de corrente, injetadas diretamente no soma, o que resultou na obtenção dos padrões de disparo iguais aos obtidos no artigo original (Fig. 23), cuja frequência aumenta, gradualmente, à medida que a corrente injetada é maior (Fig. 24).

Após a verificação de que o modelo do neurônio piramidal desenvolvido apresenta o mesmo comportamento do modelo original, iniciou-se a análise dos demais componentes simulados.

Para o desenvolvimento do modelo da LTP inicial, foi necessário simular, em detalhes, os receptores sinápticos AMPA e NMDA, que foram validados separadamente.

Experimentalmente, tanto o AMPA quanto o NMDA são analisados, na maior parte das vezes, através de sua expressão em células específicas como oócitos. Nessas situações, apenas um tipo de receptor é expresso e seu comportamento é analisado através de sua exposição a diversos protocolos de estimulação. Dessa forma, é possível verificar as taxas de abertura e fechamento do canal do receptor, entre outras características (esse tipo de análise foi feita, por exemplo, no artigo de Banke e Traynelis, (2003)). Com base nesse procedimento experimental, a validação do modelo do AMPA e do NMDA foi feita, isoladamente, através da simulação da exposição de cada um dos receptores simulados para padrões distintos de estimulação de L-glutamato.

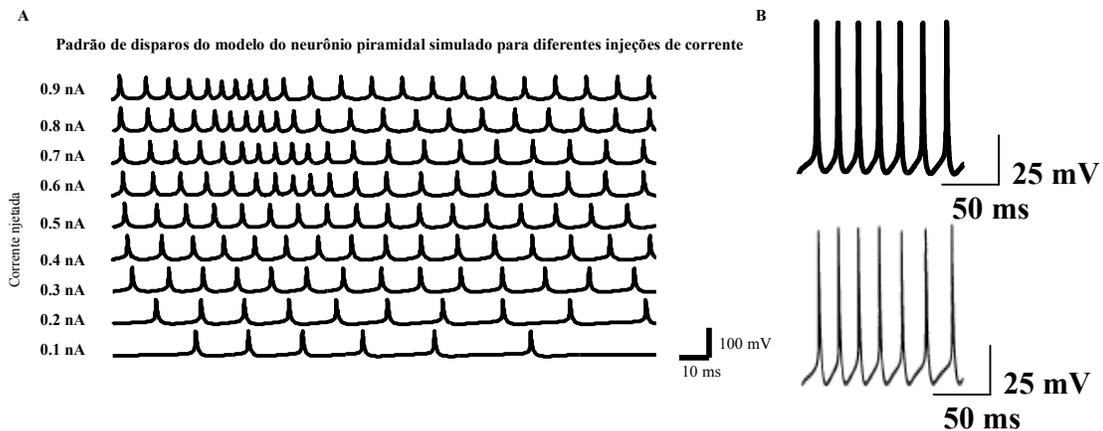


Figura 23: Resposta do modelo do neurônio piramidal CA1 para diferentes injeções de corrente aplicadas em seu soma. Para verificar se o modelo simulado nesse trabalho apresenta o mesmo comportamento que o desenvolvido por Traub et al. (1991), ele foi estimulado por diferentes valores de corrente, injetadas diretamente no soma, o que resultou nos padrões de disparos mostrados em A. Em B, é mostrado, em detalhe, a resposta do neurônio simulado nesse trabalho para uma corrente 0.25 nA e, logo abaixo, a resposta do modelo de Traub et al. (1991), evidenciando a concordância na resposta obtida nesse trabalho em comparação com o original.

O primeiro receptor analisado foi o AMPA. A principal característica do AMPA é mediar a neurotransmissão glutamatérgica rápida, o que se deve à sua baixa afinidade por L-glutamato, associada a rápidas taxas de ativação e desativação (Swanson et al., 1997; Hansen

et al., 2007; Mitchell e Fleck, 2007). Essa característica, ou seja, sua ação como mediador da corrente sináptica rápida, foi um dos pontos analisados no modelo dos AMPAs desenvolvidos. Para isso, os heterômeros simulados foram expostos a um breve pulso de L-glutamato, reproduzindo um procedimento de análise bastante utilizado experimentalmente.

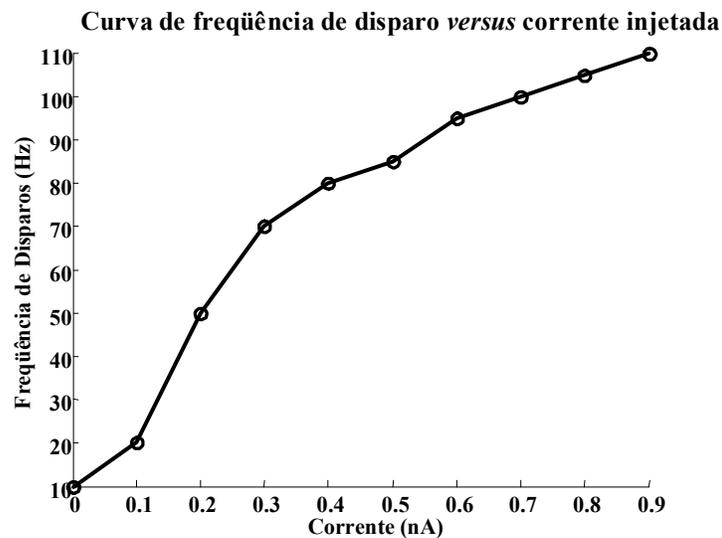


Figura 24: Curva de freqüência de disparos do modelo do neurônio piramidal da área CA1 em função da corrente injetada no seu soma. De acordo com os registros elétricos obtidos através da estimulação por injeção de corrente dos neurônios piramidais da área CA1 do hipocampo, sabe-se que eles apresentam um aumento na freqüência de disparos, em função da magnitude da corrente utilizada como estímulo, resultado que foi obtido no modelo.

Como pode ser observado na Fig. 25, os dois heterômeros simulados (10 de cada), estimulados por um pulso de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato por um período de 1 ms, apresentaram, como resposta, uma corrente rápida. Experimentalmente, análises similares indicam que, nessa situação, o AMPA possui um tempo total de abertura de cerca de 5 ms (Swanson et al., 1997; Benke et al., 1998; Banke et al., 2003; Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005; Pei et al., 2007), o que está em pleno acordo com os resultados do modelo. Da mesma maneira, a magnitude da resposta obtida na simulação, que fica abaixo de 5 pS, está em concordância com a pequena condutância unitária do AMPA, que varia entre 5-12 pS em

função do número de L-glutamato associados ao receptor (Raghavachari e Lisman, 2004; Nicoll et al., 2006). Porém, é importante ressaltar que, embora a magnitude e o padrão temporal obtidos com os heterômeros simulados estejam em acordo com a faixa de valores apresentada nos artigos consultados, nas situações experimentais, os AMPAs analisados são sempre homoméricos. Nesse sentido, apesar de haver uma grande concordância entre os dados existentes na literatura e os resultados do modelo, não é possível fazer uma validação mais aprofundada, que possibilite uma análise quantitativa precisa.

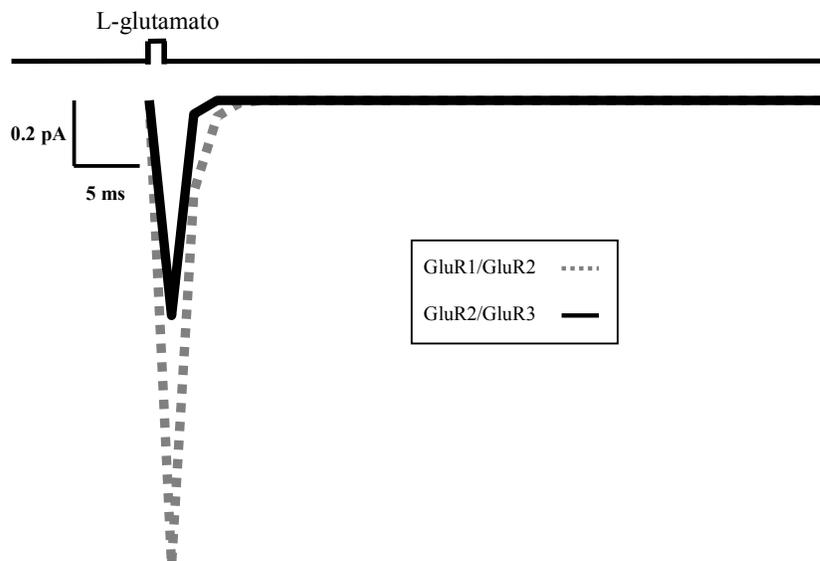


Figura 25: Padrão de ativação e desativação dos heterômeros do AMPA simulados. De acordo com a literatura experimental, o AMPA atua na transmissão glutamatérgica rápida, e possui um padrão de ativação e desativação de poucos milissegundos. Com base nesse aspecto, para verificar se os dois modelos do AMPA simulados apresentam esse padrão, eles foram estimulados com um único pulso de L-glutamato (1 mmol.L^{-1}), com duração de 1 ms. Como é observado, a resposta obtida com os modelos está em concordância com os padrões temporais de ativação e desativação do AMPA, que apontam para um tempo de abertura total de 5 ms em análises similares (Swanson et al., 1997; Benke et al., 1998; Banke et al., 2003; Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005; Pei et al., 2007).

Além de sua rápida ativação e desativação, o AMPA apresenta uma profunda dessensibilização, que é sensível à duração do pulso de L-glutamato, número de pulsos e sua intensidade, ou seja, concentração de L-glutamato (Hansen et al., 2007). Esses padrões de comportamento puderam ser observados nos modelos dos heterômeros GluR1/GluR2 e

GluR2/GluR3 através de sua estimulação por um pulso de L-glutamato (1 mmol.L^{-1}) de longa duração (1 s) (Fig. 26). A resposta obtida está em acordo com dados recentes reportados por Mitchell e Fleck (2007), e também com dados de outros autores (Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005), que demonstram a profunda dessensibilização do AMPA para pulsos de L-glutamato longos. A dessensibilização do AMPA ocorre com uma constante de tempo de decaimento um pouco mais lenta do que sua desativação, e é reportada, na literatura, variando entre 1-10 ms, de acordo com a composição do AMPA considerada e com a concentração de L-glutamato utilizada. Assim, para concentrações de L-glutamato de mmol.L^{-1} , a duração total da abertura do AMPA diante de um pulso prolongado de seu agonista é de, aproximadamente, 10 ms, como foi obtido com o modelo.

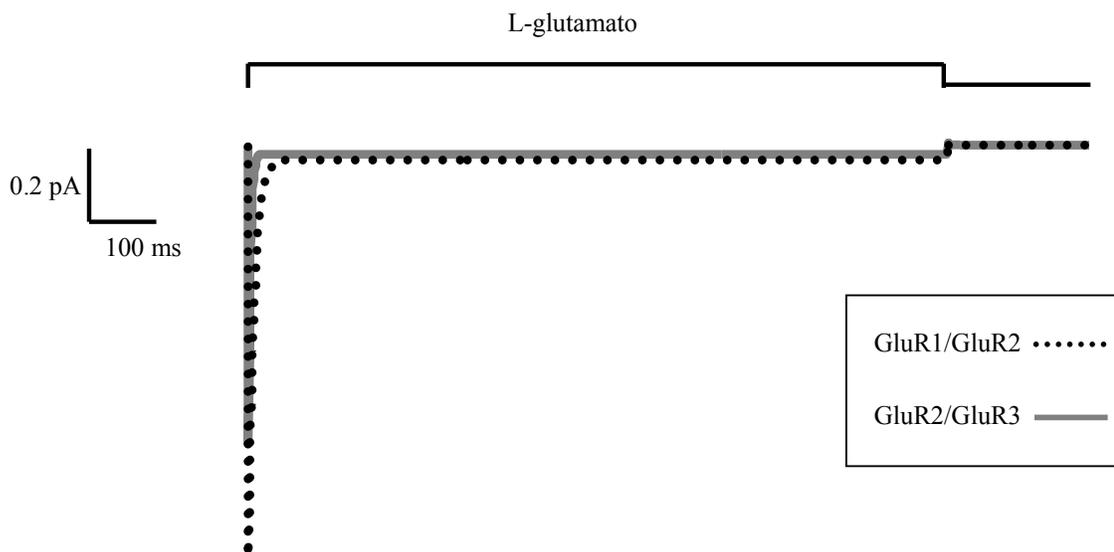


Figura 26: A dessensibilização dos heterômeros GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 simulados. O AMPA apresenta uma dessensibilização profunda que é verificada, experimentalmente, através de sua exposição para pulsos longos de L-glutamato. Para verificar esse comportamento nos AMPAs simulados, seus modelos foram expostos a um pulso longo de L-glutamato, com duração total de 1 s, e intensidade de 1 mmol.L^{-1} . Os resultados obtidos mostram um tempo de abertura total de cerca de 10 ms, para os dois heterômeros simulados, o que está em acordo com os valores reportados na literatura (Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005; Mitchell e Fleck, 2007).

Além desse padrão de estimulação, as propriedades macroscópicas dos AMPAs simulados puderam ser verificadas através do uso de estimulação pulsátil, composta por de pulsos de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato com durações diferentes (0.1 ms e 1 ms), e frequências de 5 e 10 Hz (Fig. 27). Nessas situações, é possível notar que, para pulsos breves (0.1 ms), os AMPAs simulados apresentaram uma somação gradual em sua resposta, seguida por uma brusca dessensibilização (Fig. 27A e 27B), em acordo com dados apresentados por outros autores (Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005). Já para pulsos de L-glutamato com duração maior (1 ms), há a ocorrência de uma dessensibilização inicial, percebida logo nos primeiros pulsos de estimulação, seguida por um período de atividade regular (Fig. 27C e 27D). E, para os dois valores de duração de pulso utilizados, o padrão de resposta observado variou pouco em função da frequência utilizada. Ou seja, aparentemente, a duração do pulso é um fator que influencia mais a ativação do AMPA do que o intervalo entre um pulso e outro. Cabe ressaltar, no entanto, que não há dados na literatura para esses padrões exatos de estimulação, mas, considerando que a LTP é induzida por estímulos oscilatórios, foi importante verificar as respostas dos AMPAs simulados para essas situações. Para essas mesmas formas de estimulação, foi possível notar também as diferenças mais significativas dos modelos dos AMPA simulados em função de suas composições.

Na literatura, praticamente não há dados para o comportamento do AMPA heteromérico. A maior parte das informações existentes sobre esse receptor provém de estudos que utilizam sua expressão homomérica. Em função desse fato, a análise do comportamento dos heterômeros simulados foi feita de maneira simplificada, baseando-se, exclusivamente, em algumas características específicas de suas subunidades descritas em artigos que as expressaram formando AMPAs homoméricos.

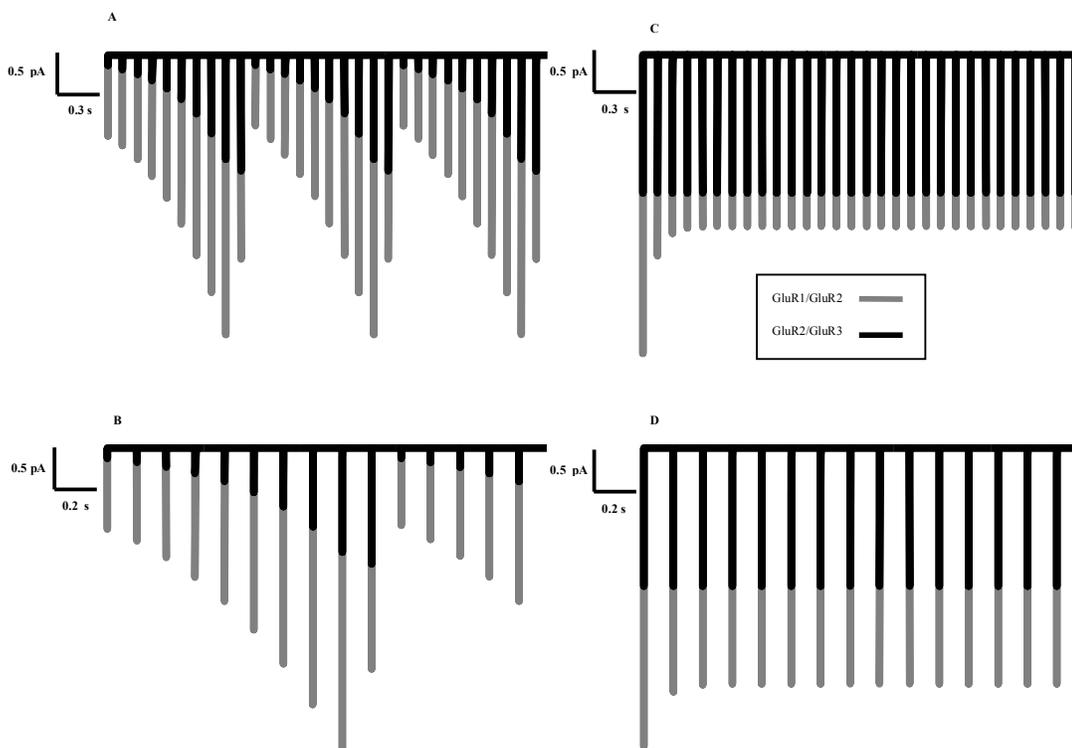


Figura 27: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do AMPA GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 simulados em função de sua estimulação por padrões oscilatórios de L-glutamato. Para verificar os padrões de ativação e desativação dos heterômeros AMPA simulados, os modelos foram expostos a diferentes frequências de L-glutamato, constituídas por pulsos de duração de 0.1 ms (A e B) e 1 ms (C e D). Nessas situações, dez receptores de cada composição foram expostos a 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato. Em A e C, os heterômeros GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 são expostos para os mesmos padrões de frequência de L-glutamato (10 Hz), mas com diferentes durações por pulso (0.1 ms para A e 1 ms para C). Já em B e D, os receptores simulados foram estimulados por pulsos de L-glutamato com frequência de 5 Hz. Nesses gráficos, é possível notar que, enquanto para o pulso de duração menor (A e B), independente da frequência considerada, há períodos de somação na corrente observada nos dois heterômeros, seguidos por períodos de dessensibilização. Já em C e D, que foram estimulados por frequências de L-glutamato compostas por pulsos de duração maior, o padrão de corrente registrado mostra uma resposta composta por uma dessensibilização inicial, seguida por um período de estabilização. Cabe ressaltar que a estimulação com pulsos de 1 ms de duração aproxima-se mais do período de permanência de L-glutamato na fenda sináptica (Diamond e Jahr; 1997). Além disso, também vale notar que, para todas as situações mostradas, o heterômero GluR1/GluR2 apresenta uma ativação maior.

A principal diferença entre os receptores GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 está na presença da subunidade GluR1, que apresenta taxas cinéticas mais lentas, especialmente para sua desativação, enquanto as subunidades GluR2 e GluR3 possuem comportamento de abertura, fechamento e dessensibilização com constantes de tempo similares (Swanson et al.,

1997; Robert e Howe, 2003; Pei et al., 2007). Provavelmente em função dessas taxas diferentes, a presença da subunidade GluR1 no heterômero GluR1/GluR2 ocasiona, em diversas situações analisadas, uma ativação maior, como foi observado na Fig. 27. No entanto, esse padrão de resposta não é constante. Assim, por exemplo, para a estimulação dos dois heterômeros por pulsos de 1 mmol.L⁻¹ de L-glutamato com frequência de 100 Hz, o heterômero GluR1/GluR2 passou a apresentar uma ativação menor, o que se explica, provavelmente, por sua lenta taxa de restabelecimento após a dessensibilização (Sun et al., 2002; Robert e Howe; 2003; Robert et al., 2005; Pei et al., 2007) (Fig. 28). Seria interessante verificar o comportamento dos dois heterômeros *in vivo*, já que essas diferenças certamente tem alguma razão fisiológica e devem contribuir em processos patológicos. Mas, cabe enfatizar que não foram encontrados dados sobre o padrão do AMPA heteromérico e, portanto, os resultados obtidos com o modelo devem ser analisados com cautela. Além disso, o comportamento do AMPA nativo é mais complexo, já que 80% desses receptores apresentam-se associados às TARPs.

As TARPs, como já foi mencionado, são proteínas transmembrânicas que atuam como subunidade auxiliares dos receptores AMPAs nas células. Essas proteínas foram descobertas recentemente no camundongo mutante *Stargazer* (Letts et al., 1998), que apresenta crises epilêpticas de ausência. A primeira TARP identificada, denominada estargazina em referência ao *Stargazer*, logo foi classificada como sendo apenas uma isoforma de uma família de proteínas transmembrânicas que, funcionalmente, se assemelham às subunidades auxiliares γ_1 presentes em canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem (Osten e Stern-Bach, 2006).

Nos neurônios, as isoformas das TARPs encontram-se associadas com a maior parte dos receptores AMPA (Tomita et al., 2003; Nakagawa et al., 2005). E, uma vez associado a essas proteínas, o AMPA apresenta uma grande alteração em seu padrão de ativação e desativação, o que é decorrente de um aumento em sua afinidade por L-glutamato (Fig. 29).

Ou seja, o AMPA associado às TARPs possui uma taxa de desativação mais lenta, embora mantenha sua taxa de ativação inalterada (Tomita et al., 2003; Kott et al., 2007). Além disso, o período de tempo de exposição ao L-glutamato necessário para esse receptor entrar em dessensibilização é maior quando ele está associado às TARPs (Priel et al., 2005; Turetsky et al., 2005). Com isso, há um favorecimento da abertura do canal do AMPA em estados de condutância altos (Nicoll et al., 2006; Osten e Stern-Bach, 2006).

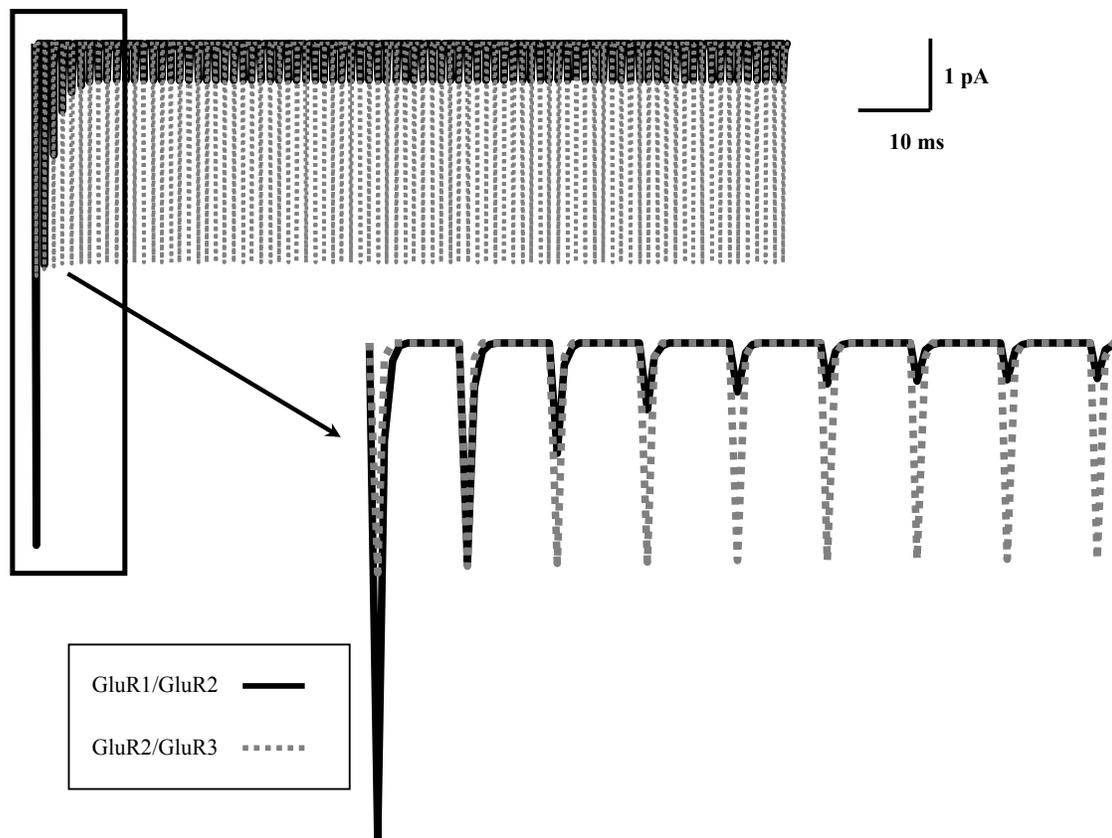


Figura 28: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do AMPA GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 para pulsos de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato com frequência de 100 Hz. Quando os heterômeros simulados são estimulados com 100 Hz, com pulsos de 1 ms de duração, o que se nota é uma grande dessensibilização do GluR1/GluR2, determinando que sua ativação seja menor. Não há dados na literatura sobre o comportamento dos diferentes heterômeros do AMPA, mas, provavelmente, esse comportamento origina-se de uma taxa mais lenta de recuperação após a dessensibilização.

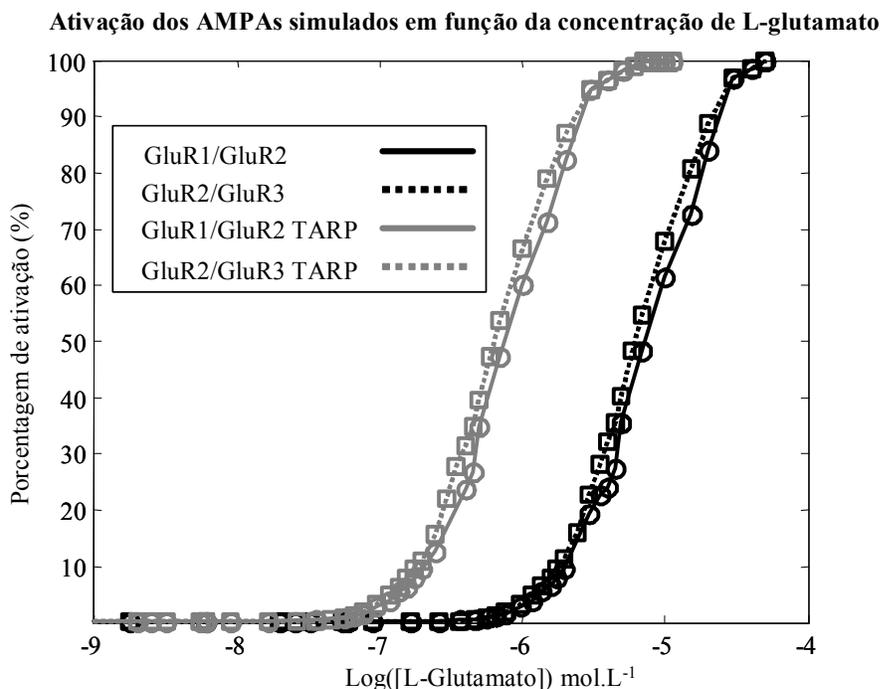


Figura 29: Curva dose-resposta para a ativação dos heterômeros simulados em função do L-glutamato. Não há registros sobre essas curvas para os AMPAs heteroméricos, no entanto, considerando os dados sobre os AMPAs homoméricos, os resultados obtidos com o modelo estão dentro da faixa de EC_{50} , ou seja, concentração de L-glutamato requerida para que o AMPA apresente metade de sua ativação máxima, que fica em torno de $10\text{-}50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o AMPA sem TARP, com pequenas variações em função das subunidades que compõem o receptor, e em torno de 1 mol.L^{-1} para o AMPA associado às TARPs (Robert e Howe, 2003; Robert et al., 2005; Kott et al., 2007).

Não há, na literatura, nenhum registro de modelos de AMPA com TARPs, e ainda não foram feitas caracterizações biofísicas precisas da extensão da presença dessas proteínas para o funcionamento desses receptores. No entanto, de acordo com os dados existentes sobre as TARPs, é possível observar, nos resultados dos heterômeros simulados com TARP, um grande aumento no tempo total em que os canais permanecem abertos em função de uma estimulação composta por um breve pulso de L-glutamato, o que se deve à diminuição na taxa de desativação do canal, associada a um aumento na afinidade por L-glutamato (Fig. 30). E, para gerar esses resultados, os receptores AMPA simulados com TARP foram expostos a um único pulso de L-glutamato de 1 mmol.L^{-1} , com duração de apenas 0.1 ms . Com essa simulação, como pode ser observado (Fig. 30), o período de tempo de abertura total do

AMPA com TARP é de cerca de duas vezes e meia maior do que período de tempo de abertura total do AMPA sem TARP. Esse aumento no tempo de abertura ocorre, simultaneamente, a um grande aumento na condutância do canal, que, nos heterômeros com TARP, é duas ordens de magnitude maior, em função, principalmente, do aumento na afinidade do AMPA por L-glutamato, que determina a abertura de seu canal em estados de condutância mais elevados (Nicoll et al., 2006).

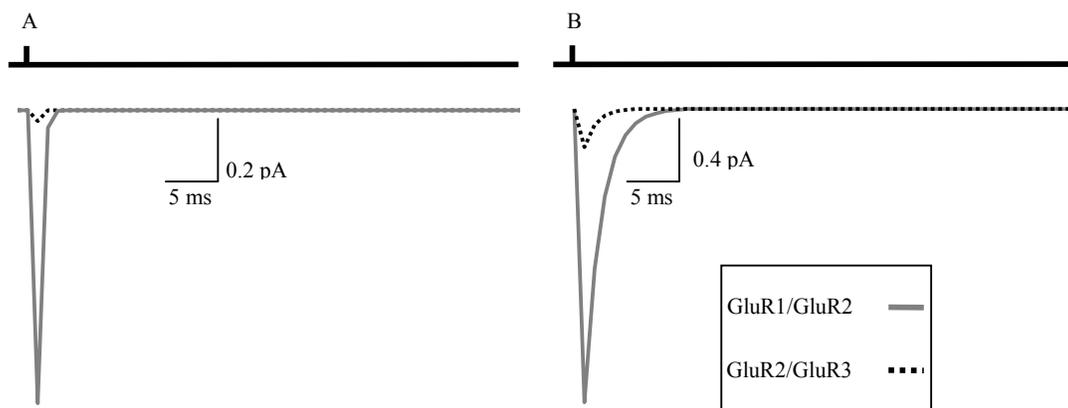


Figura 30: Diferenças na ativação e desativação dos AMPAs em função de sua associação com as TARPs. Para observar as diferenças entre o AMPA com e sem TARP, a mesma situação de estimulação foi simulada duas vezes. Em cada vez, 20 AMPAs, sendo 10 de cada composição heteromérica, foram expostos a um único pulso de L-glutamato de 1 mmol.L^{-1} . No AMPA nativo, a presença de TARPs causa um brutal aumento na corrente mediada pelo seu canal em função, principalmente, de uma diminuição na taxa de dissociação dos heterômeros com o L-glutamato. Esse padrão foi observado no modelo do AMPA com TARP, mostrado em B, que apresenta uma corrente duas vezes maior do que o modelo do AMPA sem TARP, mostrado em A, além de um maior tempo de abertura. Além disso, como é possível notar, independente da presença de TARP, as diferenças mencionadas anteriormente sobre a ativação dos heterômeros GluR1/GluR2 e GIR2/GluR3 são mantidas, ou seja, o GluR1/GluR2 apresenta uma ativação maior.

A presença de TARPs associada nos heterômeros GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 simulados também ocasiona a ocorrência de uma resistência à dessensibilização em presença de L-glutamato (1 mmol.L^{-1}) por um longo período de tempo (1 s). Assim, como é mostrado na Fig. 31, os AMPAs simulados com TARP dessensibilizam com uma constante de tempo que é cerca de duas vezes mais lenta. Cabe ainda notar que, ambos os heterômeros simulados com TARP apresentaram, nessa situação, uma corrente residual durante todo o período de

duração do estímulo, o que também foi observado para os AMPAs sem TARPs simulados, mas com menor intensidade, comportamento que tem sido notificado na literatura (Tomita et al., 2006; Mitchell e Fleck; 2007).

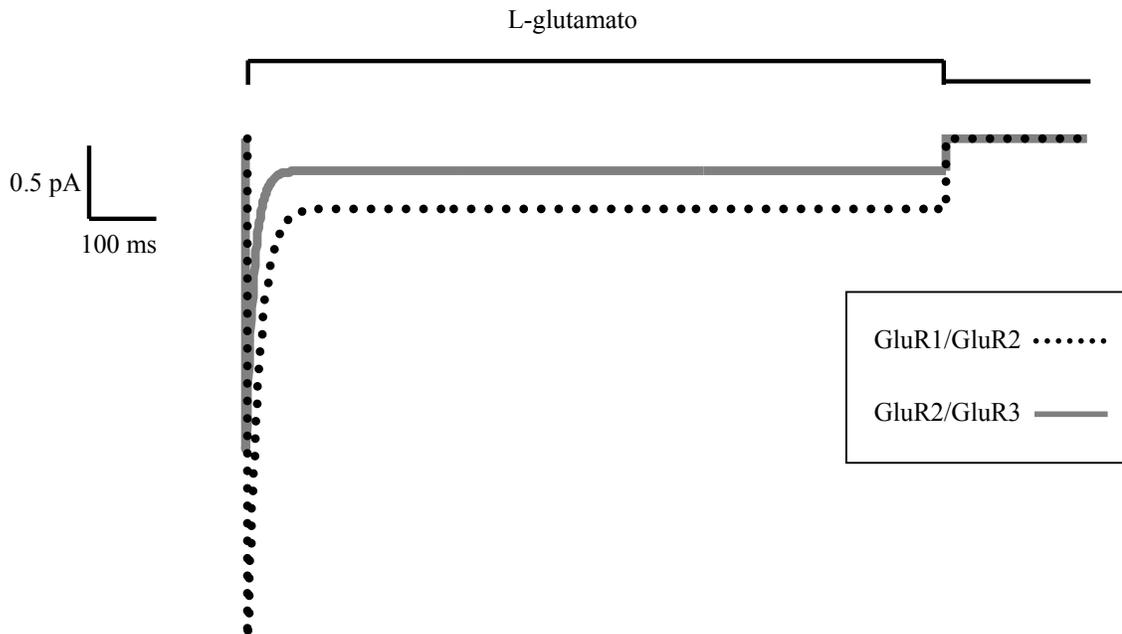


Figura 31: A dessensibilização dos heterômeros do AMPA GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 com TARP. Para verificar a dessensibilização dos tipos de AMPA simulados, seus modelos foram expostos a um pulso longo de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato, com duração total de 1 s. Os resultados obtidos indicam a maior resistência à dessensibilização nos heterômeros simulados com TARP em comparação com os heterômeros sem TARP (Fig. 26), o que está de acordo com os dados reportados sobre o efeito dessa proteína (Tomita et al., 2003; Nicoll et al., 2006; Kott et al., 2007).

Os modelos dos AMPAs associados às TARPs também apresentam menor dessensibilização em resposta à sua estimulação pulsátil, como pode ser observado, por exemplo, na situação mostrada na Fig. 32, utilizando um padrão de estímulo composto por pulsos de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato, como frequência de 100 Hz. Com esses resultados, é possível afirmar que esses modelos de AMPA estão plenamente em acordo com o que tem sido reportado sobre os efeitos das TARPs no funcionamento dos AMPAs (Tomita et al., 2003; 2005a; 2006; Kott et al., 2007).

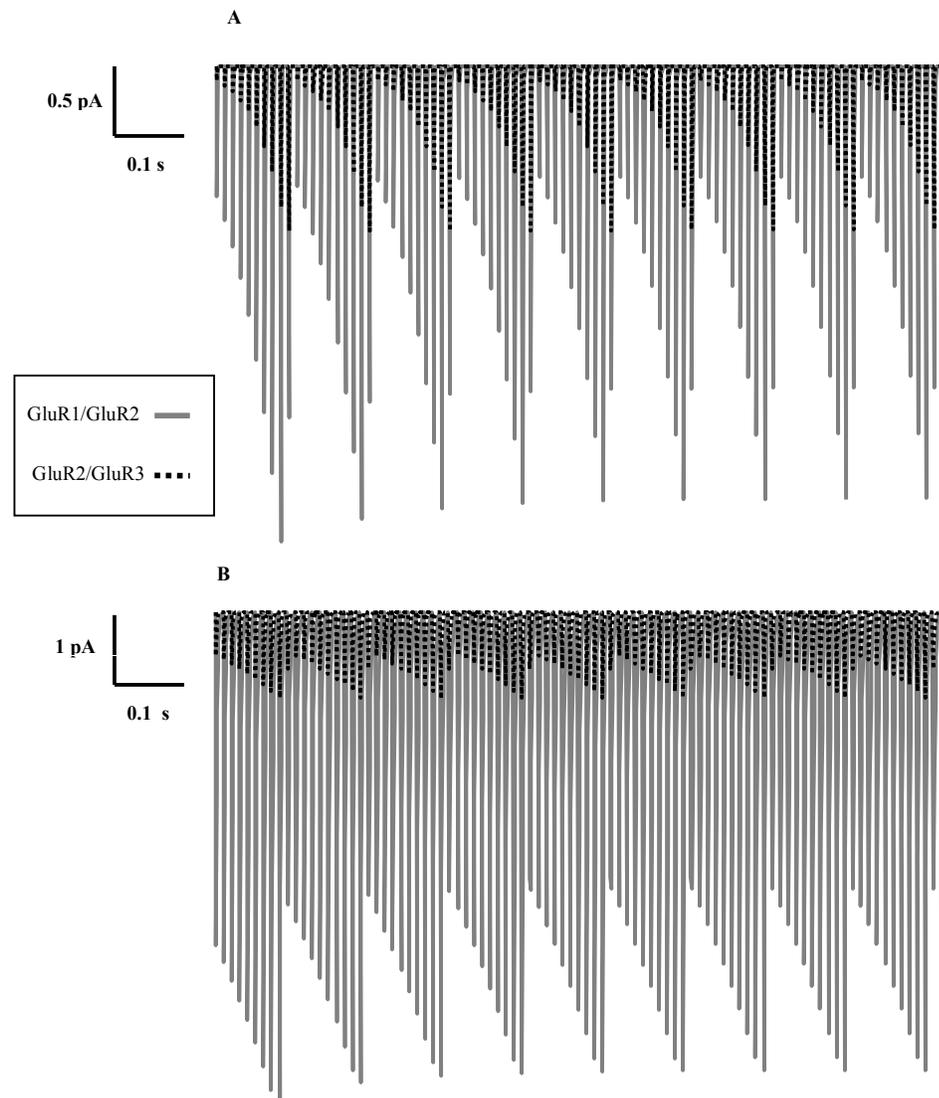


Figura 32: Diferenças na ativação e desativação dos AMPAs em função de sua associação com as TARPs para 100 Hz de estimulação. Os GluR1/GluR2s e GluR2/GluR3s sem e com TARP foram estimulados por pulsos 100 Hz de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato, com pulsos de duração de 0.1 ms. Em A é mostrada a resposta dos dois heterômeros sem associação às TARPs e, em B, com as TARPs. Nesses gráficos, evidencia-se a grande diferença que a presença de TARP produz na magnitude da resposta e na dessensibilização dos dois heterômeros.

Diferentemente dos receptores AMPA, os NMDAs são responsáveis pela condutância sináptica lenta, em função de sua alta afinidade por L-glutamato (Dingledine et al., 1999). No entanto, os dois heterômeros simulados, o NR1/NR2A e o NR1/NR2B, possuem inúmeras diferenças em seu padrão de resposta quando são expostos a seu agonista.

Para verificar as diferenças dos tipos de NMDAs simulados, os dois heterômeros foram expostos a estímulos distintos de L-glutamato, como mostrado na Fig. 33. Como é possível observar, há uma diferença brutal na corrente mediada por cada heterômero do NMDA, assim, enquanto o NMDA NR1/NR2A apresenta um padrão de ativação e desativação rápido, o NR1/NR2B é mais lento, porém, é mais resistente à dessensibilização. De acordo com o tamanho do pulso de L-glutamato utilizado, a diferença entre o tempo total de abertura entre esses dois heterômeros do NMDA varia. Assim, para pulsos de 1 ms, o NR1/NR2A apresenta uma desativação com taxa cerca de 6 vezes mais rápida, como observado na Fig. 33, permanecendo aberto por, aproximadamente, 50 ms, enquanto o NR1/NR2B fica por cerca de 300 ms (Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004; Liu et al., 2004; Erreger et al., 2005; Köhr, 2006). E, geralmente, para o mesmo valor de L-glutamato, o NR1/NR2A apresenta um pico de corrente que é, em magnitude, o dobro da apresentada pelo NR1/NR2B (Erreger et al., 2005). Os modelos dos NMDAs construídos apresentam, portanto, a mesma faixa de magnitude e padrão temporal de resposta reportada na literatura. Cabe ressaltar, no entanto, que não é possível fazer uma análise quantitativa mais precisa entre os dados da literatura e os resultados obtidos com modelo, já que, experimentalmente, esses estudos são feitos em células específicas e com densidade de canais não estimada.

O receptor NMDA NR1/NR2A, em comparação com o NR1/NR2B, apresenta um padrão de ativação e desativação rápido (Vicini et al., 1998; Banke e Traynelis, 2003). Dessa maneira, para poucos pulsos de L-glutamato, a resposta do NR1/NR2A é maior em intensidade, embora o heterômero NR1/NR2B permaneça aberto por um período de tempo mais longo. Além disso, o NR1/NR2A apresenta uma dessensibilização acentuada, o que determina que sua corrente seja mais sensível às variações na duração do pulso de L-glutamato e no intervalo entre esses pulsos (Banke e Traynelis, 2003; Erreger et al., 2005). Todos esses comportamentos podem ser observados no modelo dos dois heterômeros. Assim,

o NR1/NR2A possui uma resposta muito mais intensa, em magnitude, para pulsos breves, como é mostrado na Fig. 34. Porém, o NR1/NR2A apresenta uma dessensibilização maior, o que fica muito evidente na Fig. 34A, embora ambos os heterômeros dessensibilizem gradualmente, em função da exposição prolongada ao L-glutamato, o que está em acordo com padrões de respostas obtidos por outros autores (Vicini et al., 1998; Banke e Traynelis, 2003; Erreger et al., 2005) (Fig. 34).

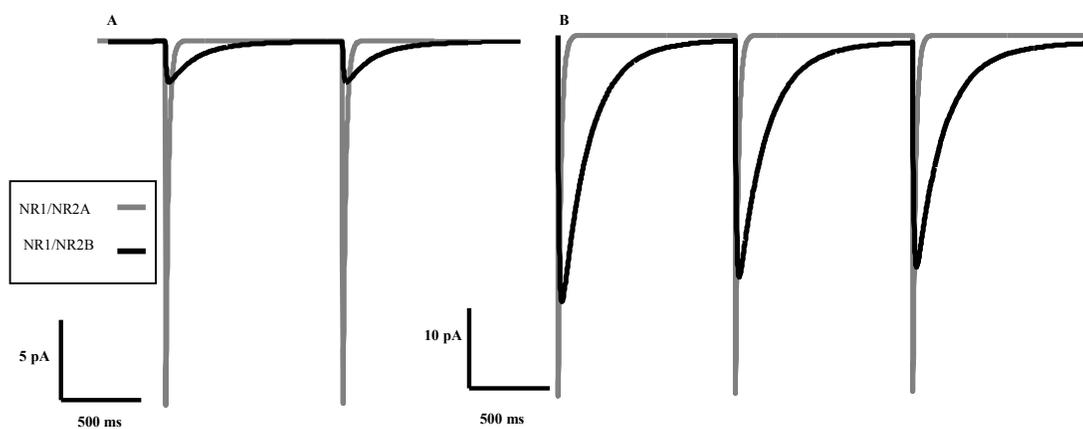


Figura 33: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do NR1/NR2A e NR1/NR2B do NMDA simulados. Os dois heterômeros (10 receptores de cada tipo) foram expostos a pulsos de 0.1 ms e 1 ms de duração (A e B, respectivamente) de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato. Durante essas estimulações, a voltagem foi grampeada em -50 mV . Como é possível notar, há uma ativação superior em amplitude do heterômero NR1/NR2A, embora o NR1/NR2B responda por um período de tempo mais longo. Além disso, cabe notar que a corrente mediada pelo NMDA é muito superior a do AMPA, quando se considera o mesmo número de receptores, já que a condutância unitária do NMDA é maior em várias ordens de magnitude.

Após a verificação de que os modelos dos AMPAs e dos NMDAs demonstram comportamentos em concordância com os dados experimentais existentes na literatura, eles foram inseridos na espinha dendrítica simulada, já acoplado ao modelo do neurônio piramidal, para verificar como esses componentes integrados respondem à estimulação. Para isso, foi simulada a ocorrência de apenas uma sinapse, através da exposição do modelo para um pulso de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato com 1 ms de duração (Diamond e Jahr, 1997) (Fig. 35). Como pode ser observado, a magnitude da variação na concentração de Ca^{2+} obtida é alta, em

perfeita concordância com dados de Sabatini et al. (2002), que determinaram que, para uma única sinapse, a elevação na concentração de Ca^{2+} fica, aproximadamente, em $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$. E esse fato é fundamental que seja seguido pelo modelo, já que, durante a LTP, a maior parte das enzimas responsáveis por esse processo dependem de Ca^{2+} .

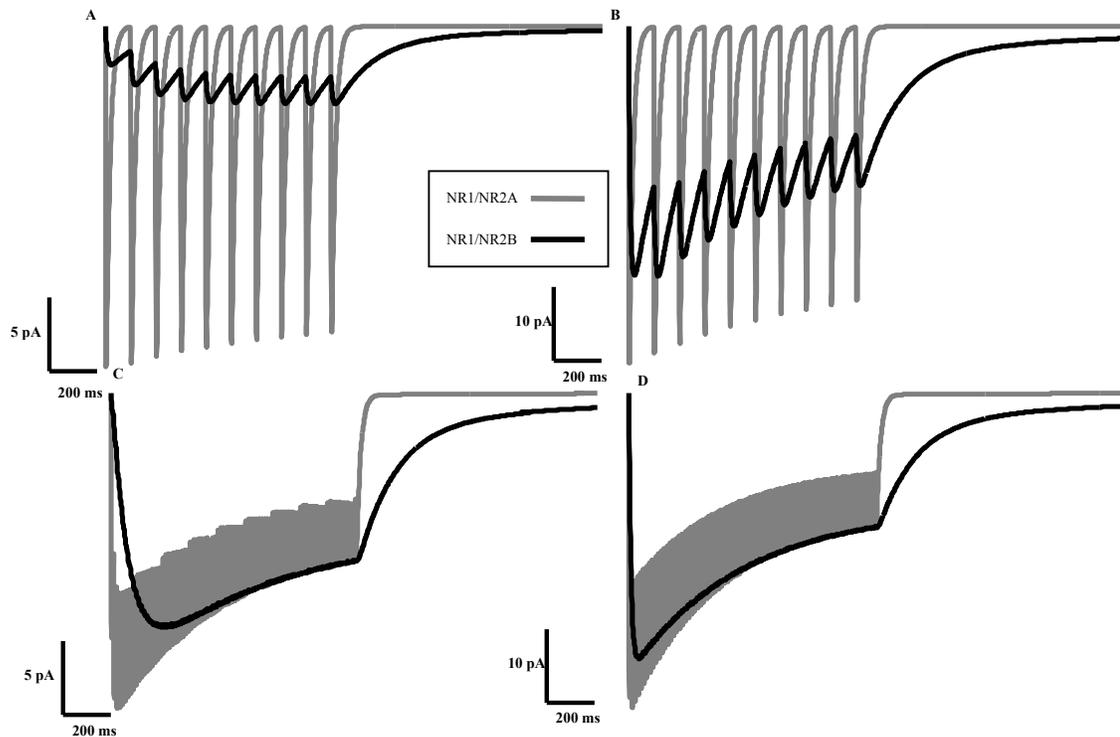


Figura 34: Propriedades macroscópicas dos heterômeros do NR1/NR2A e NR1/NR2B do NMDA. O comportamento dos heterômeros NR1/NR2A e NR1/NR2B foi analisado com estimulação composta por 10 Hz e 100 Hz, com pulsos de 0.1 ms e 1 ms de duração, e 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato. Durante essas estimulações, a voltagem foi grampeada em -50 mV . Como é possível notar, há uma ativação maior e amplitude do heterômero NR1/NR2A para todas as situações mostradas. Além disso, a estimulação composta por pulsos de 0.1 ms (A e C) produz uma resposta consideravelmente menor, em função da taxa mais lenta de associação ao L-glutamato do NMDA. Dessa maneira, a estimulação com pulsos mais longos, de 1 ms (B e D), produz uma corrente cerca de 2 vezes maior, independente da frequência considerada.

Após essa etapa de análise dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos, iniciou-se a validação do modelo das proteínas simuladas. Essa validação foi feita com base nas curvas dose-resposta características de cada enzima, o que permite verificar seus valores de EC_{50} , ou

seja, a concentração de ativador necessária para que a enzima atinja metade de sua atividade máxima. Essa validação foi adotada por ser de fácil comparação com resultados experimentais, além de ser um dado amplamente utilizado.

Corrente do NMDA e influxo de Ca^{2+} para a ocorrência de uma única sinase

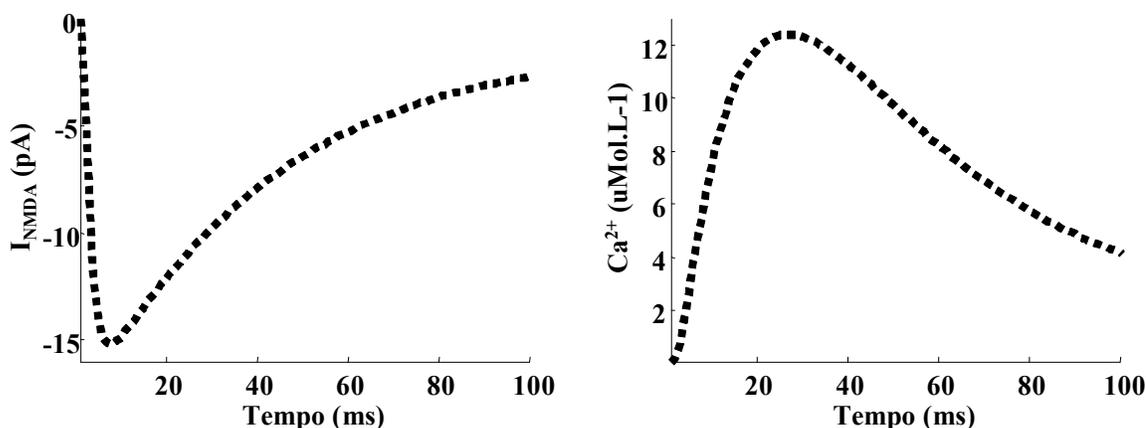


Figura 35: A resposta de alguns componentes do neurônio simulado para a estimulação por L-glutamato. Nessa simulação, o modelo do neurônio piramidal foi estimulado por um pulso de 1mmol.L^{-1} de L-glutamato, com duração de 1 ms, aplicado diretamente na zona sináptica da espinha dendrítica. A presença de L-glutamato, mesmo que por um breve intervalo de tempo como ocorre em uma sinapse (Diamond e Jahr, 1997) determinou, no modelo, o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, mostrado à direita, em função da abertura dos canais ligados aos receptores NMDA, à esquerda. Cabe ressaltar que a grande magnitude na concentração de Ca^{2+} observada se deve ao tamanho reduzido da espinha dendrítica e está em acordo com valores obtidos experimentalmente (Sabatini et al., 2002).

Para o desenvolvimento das curvas dose-resposta, foi simulada a exposição de cada enzima para diferentes concentrações de seu ativador, reproduzindo um típico experimento de caracterização enzimática *in vitro*. Para cada concentração de ativador simulada, foi anotada a concentração de enzima ativa em estado estável e, em seguida, esses dados foram organizados na forma de gráficos. Com isso, cada ponto nas curvas se refere ao estado estável da enzima ativa obtido em uma simulação. Cabe ressaltar que nem todas as moléculas simuladas possuem atividade enzimática. Com isso, a CaM, por exemplo, que não é uma enzima, foi validada através de seu requerimento por Ca^{2+} para formar o complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$. E o valor

obtido para a concentração de Ca^{2+} necessária para a formação de metade da concentração de $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$ ($\sim 10 \text{ mol.L}^{-1}$) está de acordo com os dados experimentais (Olwin et al., 1985; Cox, 1988; Bayley et al., 1996; Persechini et al., 2000) (Fig. 36A).

Além da CaM, outra molécula simulada que não possui atividade catalítica é a neurogranina. Diferentemente da CaM, a neurogranina não apresenta nenhum tipo de ativador. Considerando, no entanto, a habilidade da neurogranina em se associar à ApoCaM, sua validação foi feita com base em sua concentração necessária para reduzir a concentração de CaM livre através da formação do complexo CaMNg. Os resultados obtidos também estão em acordo com observações experimentais (Baudier et al., 1989; Gerendasy et al., 1994) (Fig.36B).

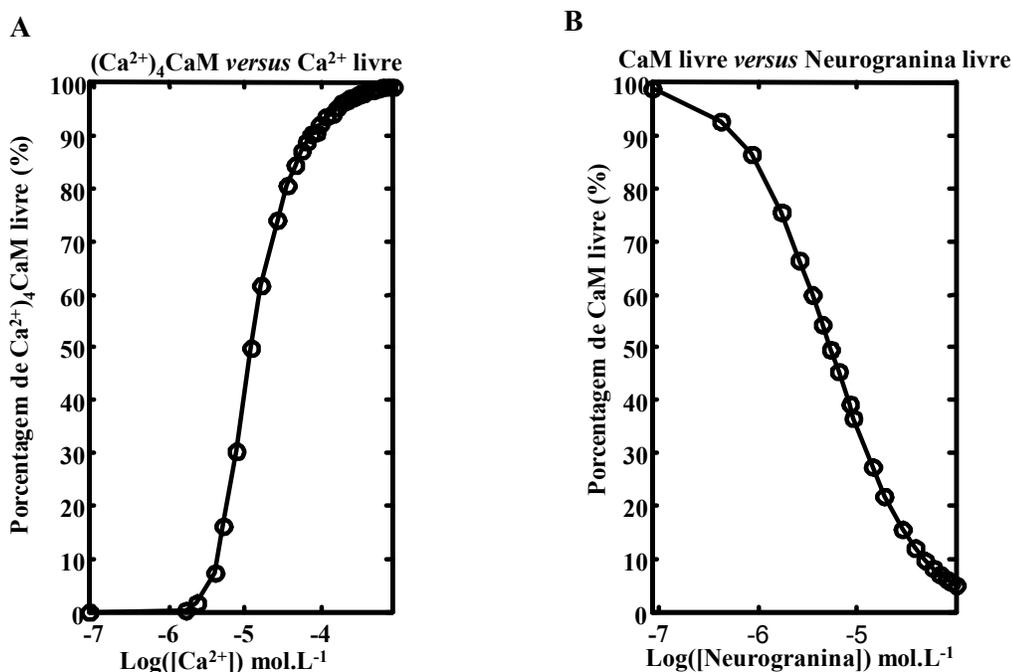


Figura 36: Curvas dose-resposta da CaM e da neurogranina. A curva para a formação do complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$ em função da concentração de Ca^{2+} livre indica um valor de EC_{50} da ordem de 10 mol.L^{-1} e acordo com os dados medidos experimentalmente (Olwin et al., 1985; Cox, 1988; Bayley et al., 1996; Persechini et al., 2000). Já a curva para os valores de CaM livre obtidos em função da concentração de neurogranina indicam a redução da concentração de CaM para 50% de seu valor inicial para concentrações de neurogranina em torno de 10 mol.L^{-1} (Baudier et al., 1989; Gerendasy et al., 1994).

Em relação às moléculas simuladas que possuem atividade enzimática, sua validação foi feita com base na verificação de seus valores de EC_{50} . As enzimas que dependem de Ca^{2+}/CaM foram caracterizadas segundo o mesmo padrão, ou seja, cada molécula foi analisada isoladamente e, em presença de concentração de CaM saturante ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM para $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de enzima), a concentração de Ca^{2+} foi variada. A Fig. 37 e 38 mostram os resultados obtidos para a CaMKII, a calcineurina, a PDE e a AC, NOS e para a PKA, todos em acordo com dados experimentais sobre a ativação de cada enzima (as espécies ativas são representadas com um asterisco). No modelo, portanto, a CaMKII exibe metade da ativação máxima para concentrações de Ca^{2+} da ordem de $0.2-0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Hanson e Schulman, 1992; Gaertner et al., 2004b) (Fig. 37A), valor similar ao requerido pela fosfatase calcineurina ($EC_{50} \sim 0.5-1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Kincaid e Vaughan, 1986; Stemmer e Klee, 1994; Feng e Stemmer, 2001) (Fig. 37B), e também pela NOS ($EC_{50} \sim 0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Bredt e Snyder, 1990) (Fig. 37C). A PDE, embora possua uma afinidade alta por Ca^{2+}/CaM , apresenta valor de EC_{50} consideravelmente maior ($\sim 1 - 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Cox et al., 1981; Huang et al., 1981) (Fig. 38A). Já a AC, como foi mencionado anteriormente, possui resposta bifásica ao Ca^{2+} , sendo estimulada por concentrações iônicas dentro da faixa de variação fisiológica, mas inibida por valores de Ca^{2+} (IC_{50}) maiores ($EC_{50} \sim 0.8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $IC_{50} \sim 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), o que seu modelo reproduziu adequadamente (Fig. 38B) (Ferguson e Storm, 2004). A PKA, cuja curva dose-resposta é mostrada na Fig. 38C, não depende de Ca^{2+}/CaM , mas de AMPc. Portanto, essa curva foi traçada através da exposição da enzima para diferentes concentrações de AMPc. Em concordância com os dados experimentais, a PKA simulada demonstrou metade de sua ativação máxima para valores de AMPc da ordem de $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Gibson e Taylor, 1997; Francis e Corbin, 1999).

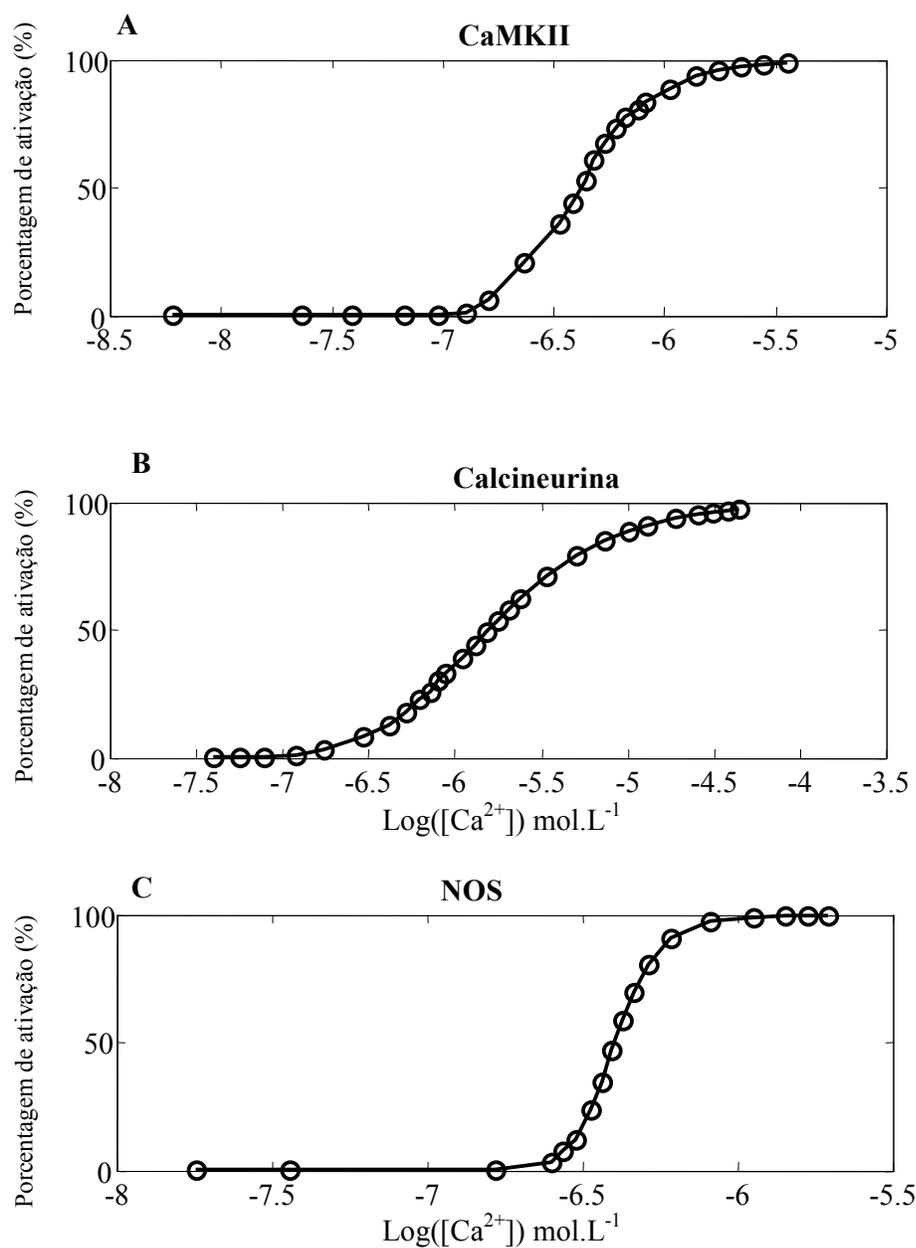


Figura 37: Curvas dose-resposta da CaMKII, da calcineurina e da NOS. Para as enzimas que dependem de Ca²⁺/CaM, as curvas foram traçadas mantendo-se a concentração de CaM constante e variando-se apenas a concentração de Ca²⁺. Em A é mostrada a curva a CaMKII indicando EC₅₀ de cerca de 0.5 μmol.L⁻¹ (Hanson e Schulman, 1992; Gaertner et al., 2004b). Em B é mostrada a curva da fosfatase calcineurina, com EC₅₀ de cerca de 5 μmol.L⁻¹ (Kincaid e Vaughan, 1986; Stemmer e Klee, 1994; Feng e Stemmer, 2001). E em C é demonstrada a curva da NOS, que possui EC₅₀ de aproximadamente 0.5 μmol.L⁻¹ (Bredt e Snyder, 1990).

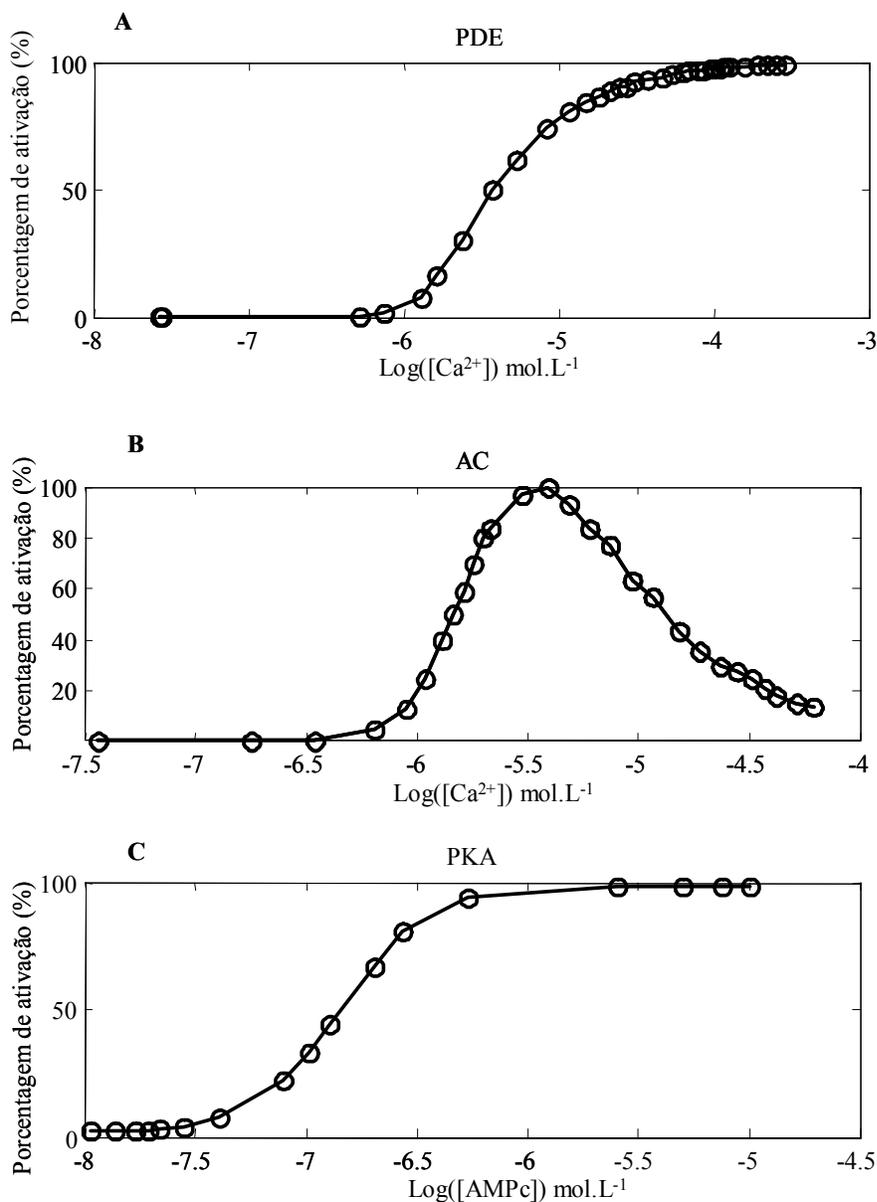


Figura 38: Curvas dose-resposta da PDE, da AC e da PKA. Em A é mostrada a curva dose resposta da PDE, com EC_{50} de cerca de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Cox et al., 1981; Huang et al., 1981). Em B é mostrada a curva bifásica da AC, que é inibida por concentrações de Ca^{2+} altas (Ferguson e Storm, 2004). E, em C, é vista a curva dose-resposta da PKA, ativada por AMPc, com EC_{50} de aproximadamente $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Gibson e Taylor, 1997; Francis e Corbin, 1999).

Em seguida, foram feitas as validações das moléculas que integram a via da PKC convencional. Essas análises foram feitas a partir dos ativadores específicos para cada molécula simulada. O início da ativação dessa via ocorre através da associação de L-

glutamato com o mGluR, com EC_{50} de aproximadamente $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Martin et al., 1993; Jensen et al., 2003) (Fig. 39A).

Posteriormente, há a ativação da proteína $G\alpha_{11}$, que, por sua vez, determina a ativação da PLC β . A validação desse ponto da via foi feita em função da atividade de GTPase da $G\alpha_{11}$, cuja a curva é mostrada na Fig. 39B.

Uma vez ativa, a PLC β produz DAG e IP $_3$. Assim que é produzido, o IP $_3$ media a liberação intracelular de Ca^{2+} . A principal característica desse processo é seu caráter bifásico, em função de sensibilidade do receptor de IP $_3$ as concentrações intracelulares de Ca^{2+} (Bezprozvanny et al., 1991). Assim, para concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} de $10^{-9} \text{mol.L}^{-1}$ até cerca de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o próprio Ca^{2+} se associa aos receptores de IP $_3$ e estimula sua liberação, aumentando a probabilidade de abertura dos canais ligados aos receptores. Porém, para concentrações do íon acima desse valor, ele passa a atuar inibindo a sua liberação intracelular, através da diminuição da probabilidade de abertura dos canais ligados aos receptores de IP $_3$ (revisto em Foskett et al., 2007). Esse comportamento é muito característico e foi utilizado para validar o modelo do receptor de IP $_3$ através da simulação da exposição do receptor a diferentes concentrações de Ca^{2+} e verificando a variação em sua probabilidade de abertura. O resultado obtido, mostrado na Fig. 39C, está plenamente em acordo com dados experimentais (Bezprozvanny et al., 1991; Mak et al., 2003).

O último ponto dessa via caracterizado foi a PKC, que foi analisada em função de seu requerimento por Ca^{2+} , cujo valor de EC_{50} fica em torno de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Keranen e Newton, 1997; Kohout et al., 2001). Para isso, sua atividade foi analisada em presença de diferentes concentrações de DAG ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$), demonstrando o requerimento dos dois ativadores, ou seja, Ca^{2+} e DAG, para que a enzima atinja sua atividade máxima (Fig. 39D).

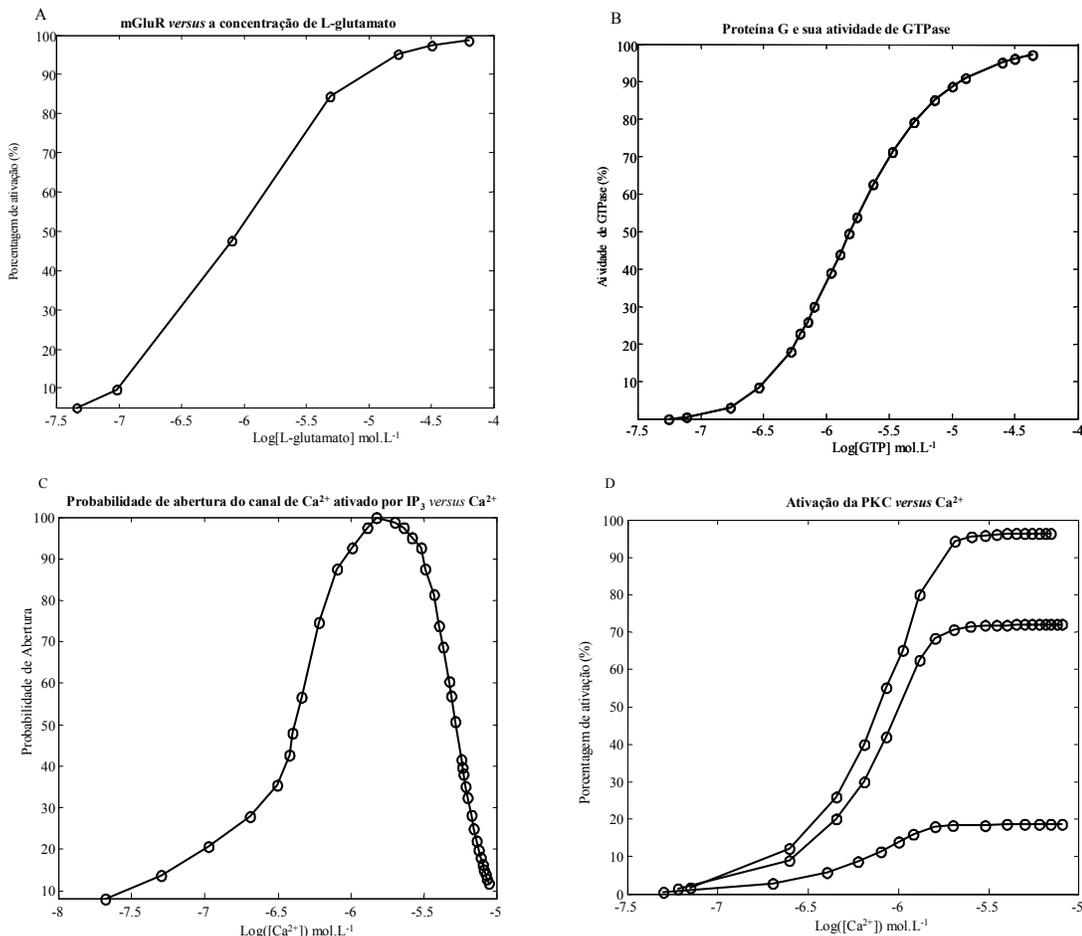


Figura 39: Curvas dose-resposta para os componentes da via da PKC. Em A é mostrada a curva dose-resposta para a ativação do mGluR em função da concentração de L-glutamato, com EC_{50} de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Martin et al., 1993; Jensen et al., 2003). Em B é mostrada a curva para a taxa de GTPase da proteína G, em função da concentração de GTP (Mukhopadhyay e Ross; 1999). Em C é mostrada a curva de probabilidade de abertura do canal do receptor de IP₃ em função da concentração de Ca²⁺, evidenciando seu característico padrão bifásico (Bezprozvanny et al., 1991; Mak et al., 2003). Já em D é demonstrada a curva de ativação da PKC em função da concentração de Ca²⁺ livre e na presença de diferentes concentrações de DAG ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$), indicando o requerimento dos dois ativadores para a máxima ativação da enzima (Keranen e Newton, 1997; Kohout et al., 2001). A curva com atividade máxima se refere a presença de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DAG, seguida pelas curvas de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Por fim, foram analisadas as enzimas da via da MAPK ERK1/2. A primeira molécula analisada foi a Ras, a partir de sua ativação em função da presença de Ras-GRF1. Existem poucos artigos de caracterização da Ras em função de seus reguladores. Por isso, não foi possível traçar sua curva dose-resposta no mesmo padrão utilizado para as demais enzimas

simuladas, já que não foram encontrados dados que pudessem ser usados para comparação. Assim, seu modelo foi caracterizado apenas com base na porcentagem de liberação de GDP em função da concentração de Ras-GRF1, reproduzindo o experimento reportado por Gotoh et al., (1997) (Fig. 40A).

Em seguida, foi feita a curva dose-resposta para a Raf-1 em função da concentração de Ras ativa. Como é possível observar na Fig. 40B, o modelo da Raf-1 apresenta um valor de EC_{50} baixo, de acordo com a alta afinidade entre as duas enzimas, com valor de K_D em torno de 10^{-6} mol.L⁻¹ (Gorman et al., 1996; Kiel et al., 2004). No modelo simulado, o valor de EC_{50} obtido ficou em torno de 0.1 μ mol.L⁻¹ (Fig. 40B). No entanto, não foram encontrados valores na literatura que pudessem ser utilizados para comparação. O mesmo fato ocorreu para todas as demais moléculas dessa via, que não puderam ser validadas, pois não foram encontrados dados sobre seus valores de EC_{50} ou outros parâmetros que pudessem ser usados para comparação. Na Fig. 40C é mostrada apenas a resposta da via em estado-estável, indicando seu característico comportamento biestável, no qual a ERK1/2, em função da alta cooperatividade presente em todos os níveis de sua via de ativação, apresenta uma ativação com um caráter denominado ultra-sensível (Huang e Ferrel, 1996).

Com essas análises, todo o modelo foi validado com base em sua comparação com os dados disponíveis na literatura. Certamente, essa validação é limitada, especialmente para os heterômeros dos receptores AMPA simulados com TARP e para a via da MAPK ERK1/2. Porém, não existem dados suficientes que possibilitem uma análise mais aprofundada desses componentes, o que impossibilitou a realização de verificações mais precisas e aprofundadas.

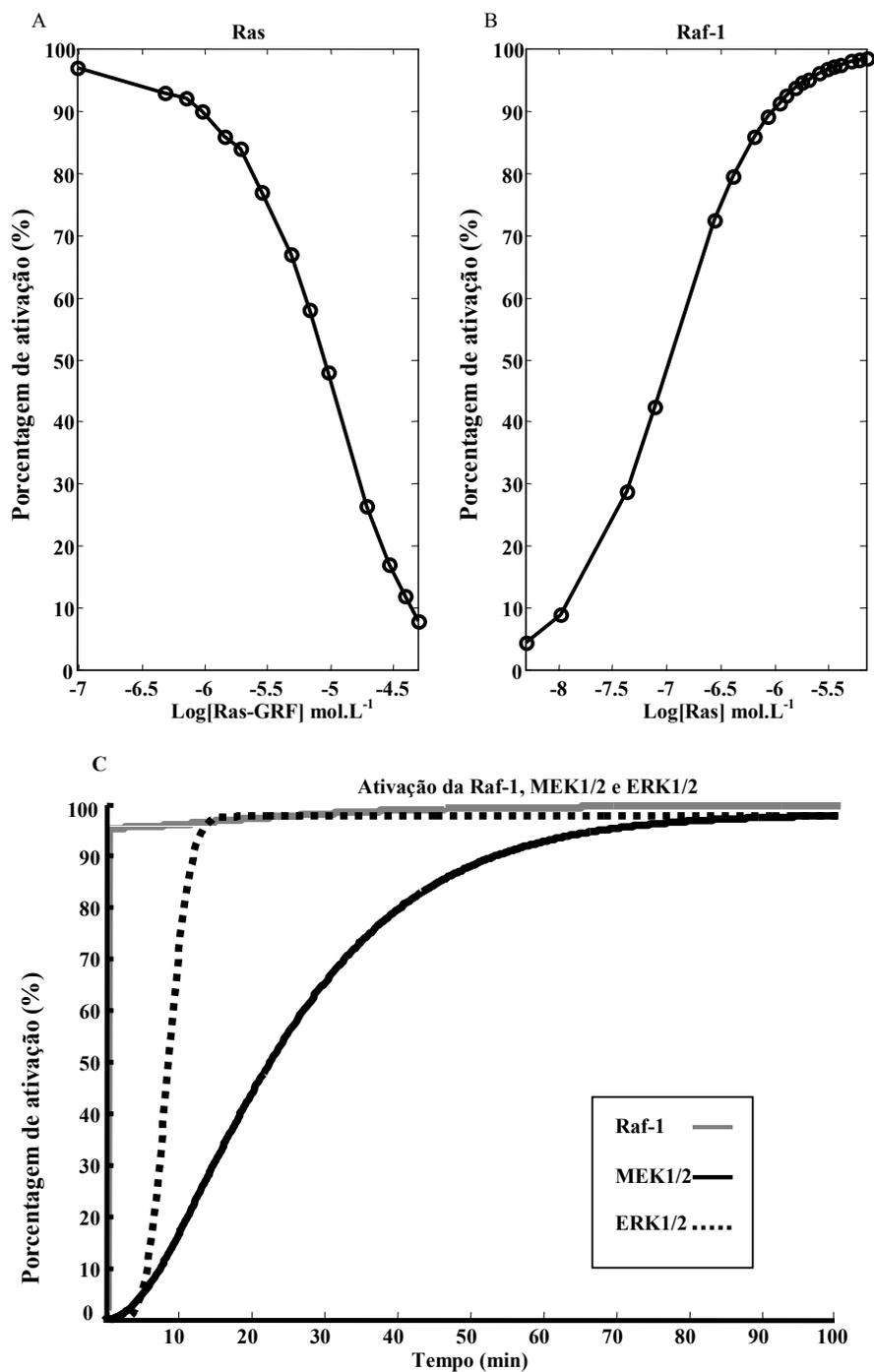


Figura 40: Curvas para caracterização da Ras e da Raf-1. Como não foram encontrados os valores de EC_{50} para a Ras, sua validação foi feita através da curva da concentração de Ras-GRF necessária para que a Ras apresente metade de sua concentração livre de GDP (A). Já para a validação da Raf-1 (B), não foram encontrados valores de EC_{50} . Em C é mostrado o padrão de ativação da via da MAPK ERK1/2, indicando a alta cooperatividade de ativação da ERK1/2.

Mas, apesar dessas limitações, vale a pena ressaltar que o modelo foi todo construído utilizando parâmetros experimentais, e desta maneira, as suas propriedades emergentes, provavelmente, devem refletir características do sistema biológico que ainda não foram mostradas experimentalmente devido a limitações inerentes a algumas técnicas.

Uma vez validado, o modelo foi utilizado para o estudo da LTP inicial hipocampal. Para isso, é necessário esclarecer exatamente as questões principais que foram consideradas.

Quando o projeto para a realização desse trabalho foi proposto, seu objeto era simular o neurônio piramidal contendo as vias de sinalização da LTP, e, com esse modelo, estudar os mecanismos necessários para induzir o aumento do peso sináptico. Para isso, foi necessário simular os componentes que integram a LTP, ou seja, o neurônio, alguns de seus receptores sinápticos e determinadas vias de sinalização. Porém, a LTP não é um evento que resulta simplesmente da ativação de algumas enzimas, mas é um processo no qual a ativação de algumas moléculas supera a de outras. Essa ativação maior é a etapa inicial para a compreensão da LTP e envolve a seguinte questão: que características as enzimas essenciais da LTP possuem que favorecem a sua ativação mediante protocolos específicos? Nesse sentido, é necessário considerar que a LTP inicial é um fenômeno persistente, gerado por um estímulo transiente. Com essa pergunta em mente, uma parte considerável desse trabalho se dedicou, exclusivamente, a identificar quais são os mecanismos da rede de sinalização da LTP que a tornam possível. Em adição a esses pontos, foi necessário considerar outro aspecto: uma vez que essas enzimas estão ativas, como elas mediam o aumento do peso sináptico? Nesse sentido, foi necessário fazer um amplo levantamento bibliográfico, buscando responder a essas questões com base nas hipóteses mais recentes propondo mecanismos que explicam, exatamente, como a LTP ocorre.

4.2 A LTP inicial e as propriedades intrínsecas de suas moléculas: a decodificação temporal

A LTP inicial hipocampal requer, basicamente, a ativação de apenas quatro proteínas: a CaMKII, a PKA, a PKC e a MAPK ERK1/2 (Fig. 41). Portanto, a compreensão de sua ocorrência passa, necessariamente, pelo entendimento de quais mecanismos possibilitam a ativação preferencial dessas enzimas, em consequência à breves estimulações, em detrimento de outras proteínas, cuja ação está implicada com eventos celulares diferentes, incluindo outras formas de plasticidade sináptica.

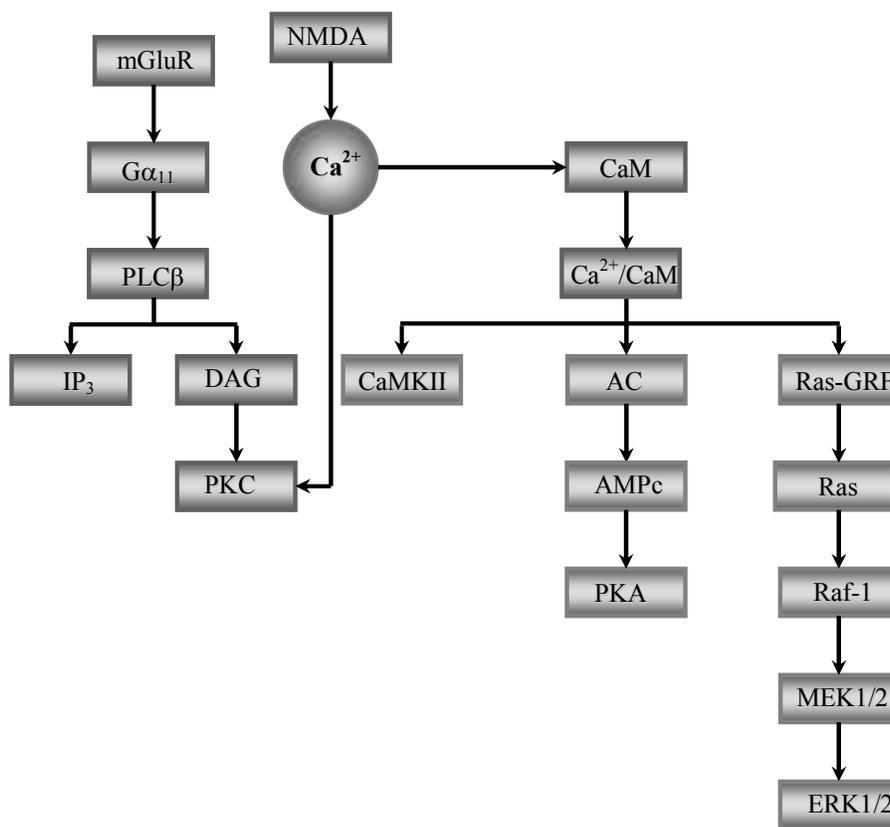


Figura 41: As enzimas essenciais da LTP e seus mecanismos de ativação. A LTP inicial hipocampal NMDA-dependente requer, basicamente, a ativação de apenas quatro enzimas: a CaMKII, a PKA, a PKC e a MAPK ERK1/2, que, no modelo, foram simuladas a partir de seus mecanismos de ativação e regulação induzidos através, exclusivamente da estimulação celular com L-glutamato.

A LTP é induzida por protocolos muito particulares, compostos, na maioria das vezes, por uma estimulação breve e intensa (Bliss e Collingridge, 1993; Taube e Schwartzkroin, 1988; Daoudal et al., 2002). Esses protocolos de indução são constituídos por descargas elétricas aplicadas diretamente nas fibras que compõem o colateral de Schaffer, o que induz uma liberação rítmica de L-glutamato na fenda sináptica (Sabatini e Regehr, 1999; Sweatt, 2003). O principal protocolo de indução da LTP, denominado estimulação de alta frequência (*HFS, high frequency stimulation*), é composto apenas por 1 trem de pulsos com frequência de 100 Hz, aplicado no colateral de Schaffer por 1 segundo (Taube e Schwartzkroin, 1988). Outros exemplos de protocolos são formados por três pulsos de 100 Hz separados por alguns minutos, ou ainda, por 3 trens de 5 Hz, separados por 20 segundos, sendo que cada trem é formado por 10 estímulos compostos, individualmente, por 4 pulsos de 100Hz. Além desses protocolos, há outros que utilizam variações nos padrões de frequência e números de trens (Malinow e Tsien ; 1990; Bi e Poo, 2001). Mas, o que é importante notar é que todos os protocolos de indução de LTP são constituídos por estímulos rápidos e intensos.

Com base no requerimento da LTP por protocolos de indução compostos por padrões de estímulos breves e em alta frequência, uma questão analisada com o modelo desenvolvido nesse trabalho foi quais são os possíveis mecanismos celulares que determinam tal requerimento.

Como já foi mencionado, a LTP depende da ativação, principalmente, de quatro enzimas. Nesse sentido, para se compreender como a LTP ocorre, é importante considerar como essas enzimas podem ser ativadas através de estímulos breves. Na literatura, uma hipótese comum que vincula a estimulação breve com a indução de LTP é a grande sensibilidade que algumas moléculas apresentam para os padrões de variação na concentração intracelular de Ca^{2+} . Em função dessa propriedade, a ocorrência da LTP seria explicada, essencialmente, pela sua dependência de enzimas capazes de se tornarem ativas mesmo

quando são estimuladas por sinais muito breves (Lisman, 1989; Zhabotinsky, 2000). Ou seja, segundo essa hipótese, o ponto central para a ocorrência de LTP está na alta sensibilidade de algumas moléculas às variações da concentração de Ca^{2+} , propriedade intrínseca que determinaria a ativação preferencial de algumas enzimas em detrimento de outras, de acordo apenas com o padrão de estimulação considerado.

Com base nessa hipótese, o primeiro ponto analisado com o modelo foi a sensibilidade das vias simuladas às variações de Ca^{2+} . O Ca^{2+} é o estímulo que inicia, intracelularmente, a LTP. Porém, o aumento em sua concentração é breve, o que ocasiona a ativação preferencial das moléculas com alta afinidade e altas taxas de associação a esse íon. E, uma forma de verificar tal característica, é expor, isoladamente, as vias simuladas à padrões distintos de sinais de Ca^{2+} . Dessa maneira, é possível verificar, exatamente, a magnitude de ativação apresentada por cada molécula simulada para estímulos oscilatórios de Ca^{2+} e, através desse procedimento, estabelecer uma relação entre sua sensibilidade ao Ca^{2+} e sua ativação em função do protocolo de indução de LTP.

Duas enzimas da LTP, a PKC e a CaMKII, são exemplos bastante conhecidos de moléculas sensíveis às oscilações de Ca^{2+} (De Koninck e Schulman, 1998; Oancea e Meyer, 1998; Mogami et al., 2003; Violin et al., 2003). Tal característica possibilita que a PKC apresente atividade catalítica oscilatória, ou seja, tão logo há um aumento de Ca^{2+} no meio intracelular, ela se torna ativa e fosforila, de forma pulsátil, inúmeros substratos. De maneira análoga, esse padrão de estimulação possibilita que a CaMKII se autofosforile entre uma oscilação e outra, fato que determina que ela atinja um alto grau de ativação, mesmo quando estimulada por sinais compostos por breves pulsos de Ca^{2+} (De Koninck e Schulman, 1998). Com base nesses aspectos, o modelo das vias de ativação dessas duas enzimas foi exposto, isoladamente, a estímulos artificiais de Ca^{2+} compostos por pulsos de frequência, duração e amplitude diferentes. A intenção com esse procedimento foi verificar apenas a magnitude de

ativação apresentada por cada uma dessas moléculas em função de sua estimulação por sinais oscilatórios.

Na Fig. 42 e 43 são mostradas as respostas do modelo da PKC e da CaMKII para diferentes freqüências de Ca^{2+} , com pulsos de duração de 10 ms, e amplitude de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Como é possível observar, quando estimuladas por sinais formados por breves pulsos de Ca^{2+} , ambas as enzimas atingem uma alta porcentagem de ativação, fato que indica que, em situações de variação rápida na concentração intracelular de Ca^{2+} , certamente, essas moléculas deverão ser ativadas facilmente.

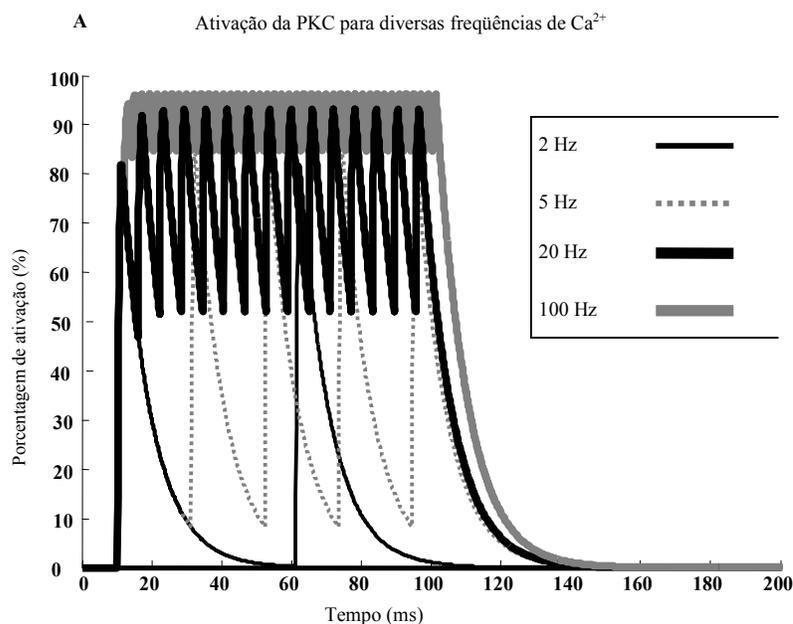


Figura 42: A atividade oscilatória da PKC em função de sua estimulação por estímulos oscilatórios de Ca^{2+} . A PKC é altamente sensível às variações temporais na concentração de Ca^{2+} , característica que pode ser observadas nas curvas acima que mostram a ativação dessa enzima ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), em função de sua estimulação por pulsos de 10 ms de Ca^{2+} , sendo cada um de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Ainda vale ressaltar que, nessa situação de estimulação simulada, a PKC apresentou uma atividade altamente oscilatória, comportamento que está em concordância com dados experimentais (Oancea e Meyer, 1998; Mogami et al., 2003; Violin et al., 2003). E esse fato aponta que, apesar de ser facilmente ativada por estímulos breves de Ca^{2+} , essa enzima

também é desativada rapidamente. Essa característica sugere que, provavelmente, durante a LTP, a PKC é ativada apenas por um breve período e, após o término da estimulação inicial, ela rapidamente retorne a seu estado basal. Tal propriedade apresentada pelo modelo nunca foi observada experimentalmente, mas está em acordo com o requerimento da PKC para a indução da LTP inicial, e não para a sua expressão (Malinow et al., 1988; Sweatt, 1999; Dineley et al., 2001). Cabe ressaltar, porém, que alguns autores defendem o requerimento da ativação persistente da PKC durante toda a fase inicial da LTP (Klann et al., 1991; 1993), mas esse ponto não é consensual (Blitzer et al., 2005; Zhabotinsky et al., 2006).

A PKC convencional, espécie que foi simulada nesse modelo, apresenta, experimentalmente, uma rápida desativação em função do decréscimo na concentração intracelular de Ca^{2+} (Keränen e Newton, 1997). No entanto, a PKC também pode permanecer persistentemente ativa através de sua proteólise (Takai et al., 1977), processo que é mais estudado com uma isoforma da PKC atípica, a PKC ζ , e está vinculado com a manutenção da ativação dessa enzima durante a fase final da LTP (Sacktor et al., 1993; Serrano et al., 2005). A proteólise das isoformas convencionais da PKC também pode ocorrer sustentando, por exemplo, suas atuações durante a LTP. No entanto, não há, até o momento, nenhuma comprovação de que um mecanismo desse tipo na LTP inicial.

Diferentemente da PKC, a CaMKII tem a habilidade de se manter persistentemente ativa, mesmo após sua estimulação apenas por sinais transientes de Ca^{2+} . Mas essa persistência só é observada para algumas espécies da CaMKII ativa. Ou seja, no modelo da CaMKII, há diversos estados ativos dessa enzima. Assim, ela inicia sua ativação com sua autofosforilação e, gradativamente, se dissocia do Ca^{2+} , mantendo-se ativa, até chegar à espécie denominada *trapped*, na qual essa enzima encontra-se associada apenas com a ApoCaM. Esse estado é duradouro e, no modelo, é observado em alta porcentagem. Mas, além desses estados, a CaMKII ainda continua ativa depois de liberar a CaM, estado

conhecido como autônomo, e pode se autofosforilar novamente, nos resíduos Thr^{305/306}. De todos esses estados, apenas os que se ligam diretamente ao Ca²⁺ possuem atividade altamente sensível ao Ca²⁺, sendo capazes de variarem, rapidamente, em concentração, assim que há o aumento na concentração desse íon. E, essa sensibilidade é transferida para os demais níveis de atividade da enzima como um aumento persistente em sua ativação global. Por possuir tal característica, a CaMKII permanece ativa durante toda a LTP e é fundamental para sua ocorrência (Lisman et al., 2002).

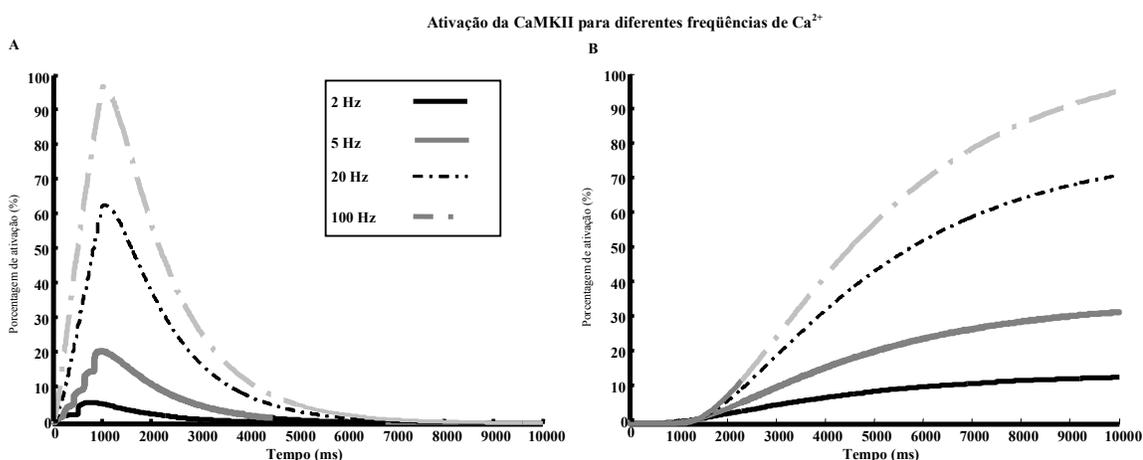


Figura 43: Ativação da CaMKII para diferentes frequências de Ca²⁺. A CaMKII (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), nesses exemplos, foi estimulada por pulsos de 10 ms de Ca²⁺, sendo cada um de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e em presença de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. Embora a CaMKII seja altamente sensível ao Ca²⁺, essa sensibilidade é mais evidente para suas espécies que se associam diretamente ao Ca²⁺, como pode ser visto em A, em que é mostrada a resposta da CaMKII autofosforilada ligada ao complexo (Ca²⁺)₄CaM. Em B é mostrada sua espécie associada à ApoCaM (CaMKII *trapped*), que, em ausência de Ca²⁺, representa grande parte de sua porcentagem ativa.

Além da CaMKII e da PKC, a LTP ainda requer a ativação da PKA e da MAPK ERK1/2. Essas duas enzimas não são ativadas, diretamente, por Ca²⁺, porém, as moléculas que atuam em suas ativações são dependentes do complexo Ca²⁺/CaM. Nesse sentido, antes de considerar as vias da ERK1/2 e da PKA, é importante analisar outro aspecto: a resposta da CaM ao Ca²⁺, já que é ela que irá mediar a ativação de todas as demais proteínas.

Como já foi mencionado, entre todas as moléculas que atuam na LTP, poucas se ligam diretamente ao Ca^{2+} . Porém, muitas requerem $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Assim, a CaM não apenas é um fator limitante para a ocorrência de LTP, mas principalmente, é o ponto inicial da sinalização de Ca^{2+} para inúmeras vias (Persechini e Stemmer, 2002; Tran et al., 2003; Xia e Storm, 2005).

Para atuar como mediador da sinalização de Ca^{2+} , a CaM deve se ligar a ele, rápida e reversivelmente, e mediar a sua atuação através de uma mudança conformacional brusca e imediata, fato que possibilita o seu reconhecimento e a sua associação com seus alvos (Chin e Means, 2000). No entanto, a sensibilidade da CaM ao Ca^{2+} é um evento pouco explorado na literatura. Para verificar esse aspecto no modelo, da mesma maneira como foi feito com a CaMKII e com a PKC, a CaM foi exposta ao Ca^{2+} de maneira isolada, ou seja, sem a presença de outras moléculas no meio, para evitar que a competição por Ca^{2+} entre diferentes enzimas mascarasse o padrão de resposta observado. Essa exposição foi feita utilizando padrões de estímulos de Ca^{2+} artificiais, e que foram variados em amplitude, duração e número exatos de pulsos. Os resultados obtidos, mostrados parcialmente na Fig. 44, demonstram que as espécies de CaM ligadas ao Ca^{2+} , ou seja, $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$ e $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$, se alternam em intensidade, isto é, em porcentagem de ocorrência, de acordo com o padrão de estimulação utilizado. Assim, quando a amplitude de Ca^{2+} é alta (Fig. 44A), mesmo para baixa frequência (5 Hz), há uma grande porcentagem de proteína complexada na forma $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$, que é a espécie que determina a ativação, indiretamente, da ERK1/2 e da PKA. Se a amplitude de variação de Ca^{2+} é menor, só há uma prevalência das espécies de CaM com três e quatro Ca^{2+} para frequências maiores (Fig. 44B). Nesse sentido, um fato importante para ser ressaltado é que, numa situação em que não há a prevalência do complexo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$, as enzimas que possuem a habilidade de se associarem com a CaM com menos de quatro Ca^{2+} tem sua ativação favorecida através de sua ligação com a CaM com menos de

quatro íons. Assim, essas moléculas armazenam a CaM em sua estrutura e, quando há um novo aumento na concentração de Ca^{2+} , esses íons preenchem os sítios da CaM que estavam vazios, possibilitando sua ativação rápida.

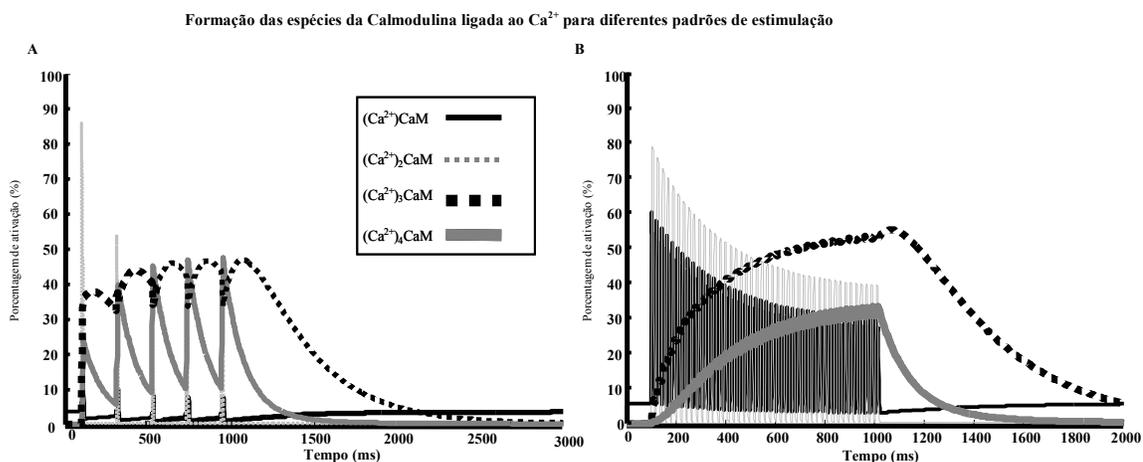


Figura 44: Formação das espécies de CaM associadas ao Ca^{2+} em função de padrões oscilatórios de variação na concentração desse íon. A CaM pode apresentar quatro espécies ligadas ao Ca^{2+} , $(\text{Ca}^{2+})\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_2\text{CaM}$, $(\text{Ca}^{2+})_3\text{CaM}$ e $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$, que se alternam em magnitude, indicada por porcentagem de ativação, de acordo com a amplitude, duração e freqüência dos pulsos de Ca^{2+} utilizados com estímulo. Para exemplificar esses comportamentos, em A é mostrada a resposta da CaM para pulsos de 5 Hz de Ca^{2+} , com concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e em B, a resposta para 100 Hz de Ca^{2+} , com concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por pulso.

Como a CaM apresenta um padrão de resposta altamente sensível as variações na concentração de Ca^{2+} , foi importante verificar qual é a extensão dessa sensibilidade para as demais moléculas essenciais da LTP, ou seja, a PKA e a ERK1/2. Para analisar esse ponto, as vias da PKA e da ERK1/2 foram expostas, isoladamente, a padrões de estimulação compostos por oscilações de Ca^{2+} . Como pode ser observados nas Fig. 45 e 46, ambas as vias são altamente sensíveis ao Ca^{2+} no seu primeiro nível, ou seja, na AC para a via da PKA e na Ras-GRF, para a via da MAPK ERK1/2. E essa sensibilidade indica que as enzimas que se ligam diretamente ao complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ nessas vias são capazes de se tornarem ativas, e em grande proporção, mesmo com estimulação composta por sinais breves de Ca^{2+} . Dessa

maneira, durante a indução de LTP, assim que há o aumento na concentração de Ca^{2+} no meio intracelular, elas rapidamente respondem e mediam a ativação dos demais componentes de suas vias. Com base nesses comportamentos observados, que emergem de propriedades intrínsecas dessas moléculas, é possível afirmar que, um dos pontos centrais para a ocorrência de LTP é, de fato, a habilidade de algumas moléculas para se tornarem ativas em função de um sinal breve, o que está em acordo com hipóteses sugeridas por alguns autores (Lisman, 1989; Zhabotinsky, 200; Dineley et al., 2001; Lisman et al., 2002).

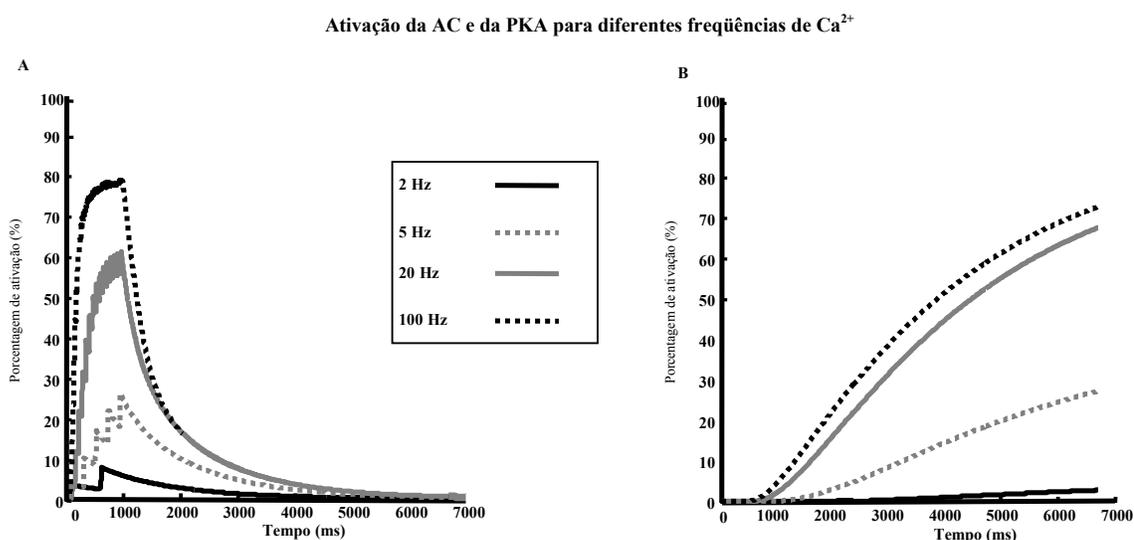


Figura 45: Estimulação da via da PKA para diferentes frequências de Ca^{2+} , compostas por pulsos de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com 10 ms de duração por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, em presença de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. Como é possível observar em A, enquanto a ativação da AC mostra um alto grau de variação oscilatória, acompanhando as frequências de Ca^{2+} , a PKA, mostrada em B, é ativada de maneira contínua, sem sofrer o efeito da variação temporal da AC. No entanto, esse padrão de ativação da AC pode permitir, durante a LTP, que a PKA seja ativada em função de uma variação breve na concentração intracelular de Ca^{2+} .

Porém, no meio intracelular, o aumento de Ca^{2+} necessário para induzir LTP pode ativar outras enzimas, destacando-se a calcineurina, que é uma fosfatase Ca^{2+} -dependente, e a enzima PDE, responsável pela hidrólise de AMPc. Ambas as proteínas apresentam um padrão de resposta similar frente ao Ca^{2+} , sendo ativadas em uma porcentagem muito menor do que

as outras moléculas anteriormente mostradas, fato que foi verificado utilizando os mesmos padrões de estimulação já descritos. Os resultados obtidos mostram que tanto a PDE quanto a calcineurina não apresentam atividade oscilatória, mas possuem uma ativação que aumenta, proporcionalmente, com a frequência de estimulação de Ca^{2+} utilizada. E esse comportamento deve ocorrer em função, principalmente, da soma na concentração de enzima ativa ao longo da ocorrência dos pulsos de Ca^{2+} . No entanto, em função, provavelmente, de taxas lentas de associação aos seus ativadores, ambas as enzimas apresentam uma porcentagem de ativação muito menor que as demais proteínas analisadas (Fig. 47). Vale ainda notar que a PDE, diferentemente das demais proteínas simuladas, reteve a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ por um período de tempo longo, mesmo após o término do estímulo. Essa característica é comum para algumas moléculas e tem sido apontada como um ponto essencial para a compreensão de diferentes eventos celulares (Xia e Storm, 2005).

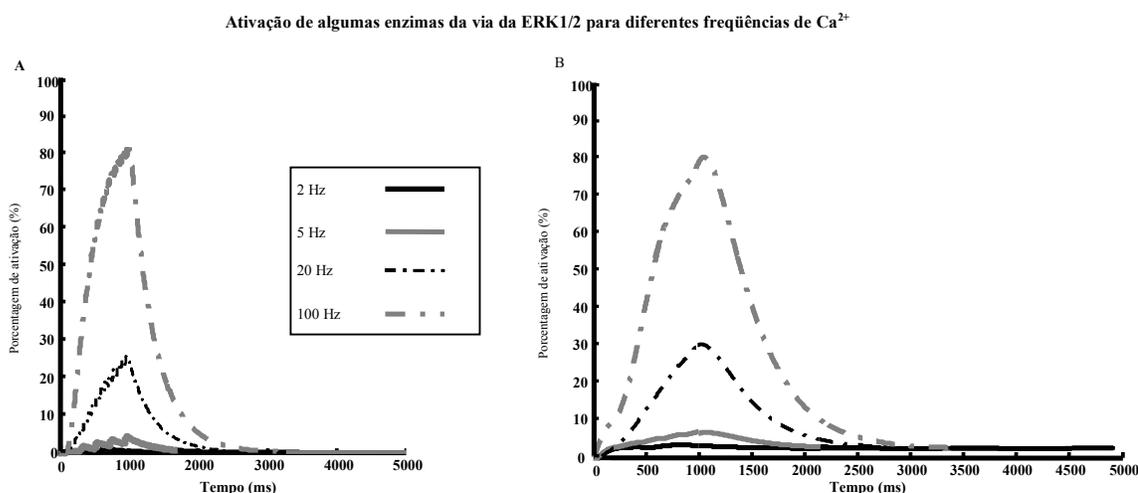


Figura 46: Ativação da Ras-GRF e da Ras para diferentes frequências de Ca^{2+} , compostas por pulsos de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com 10 ms de duração por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, em presença de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. No modelo de LTP inicial desenvolvido nesse trabalho, a ativação da ERK1/2 é mediada pelo Ca^{2+} através da ativação da Ras-GRF, mostrada em A, que requer $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ para se tornar ativa. Como é possível notar, enquanto a Ras-GRF é altamente sensível às oscilações de Ca^{2+} , acompanhando seu padrão pulsátil de variação, a Ras, em B, responde às oscilações da Ras-GRF apenas em magnitude de ativação, e transmite essa resposta para as demais enzimas da via.

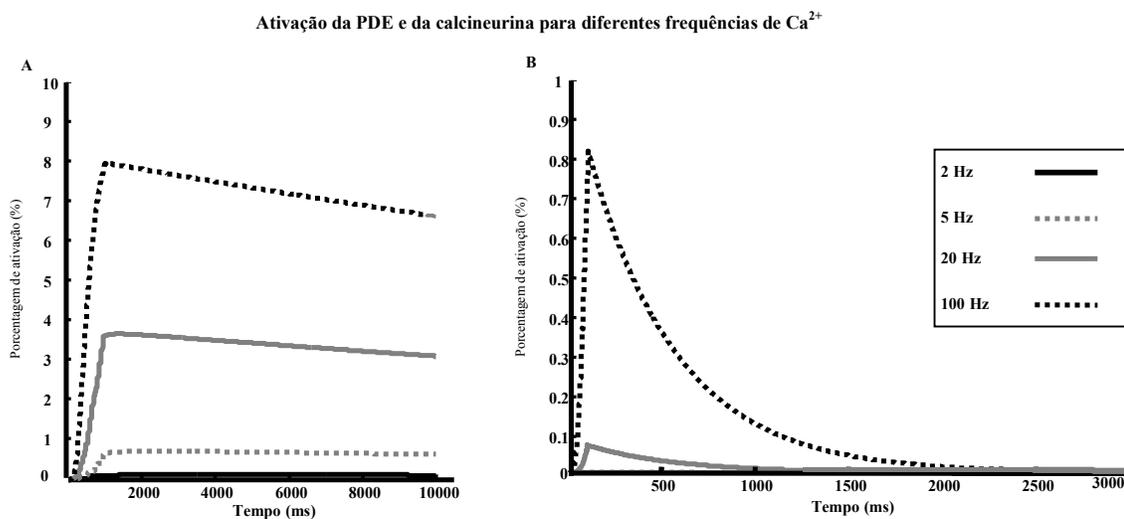


Figura 47: Ativação da PDE e da calcineurina por diferentes frequências de Ca^{2+} , compostas por pulsos de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com 10 ms de duração por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, em presença de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM. Como é demonstrado, apesar de serem ativadas diretamente por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, nem a PDE (A) nem a calcineurina (B) apresentam atividade oscilatória. Além disso, há uma percentagem de ativação bastante reduzida dessas enzimas em comparação com a ativação das demais moléculas mostradas, estimuladas pelos mesmos protocolos de estimulação. Vale atentar, no entanto, para ativação persistente da PDE, que retém a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ em sua estrutura.

A partir desses dados, pode-se sugerir que, apenas em função de suas características intrínsecas, uma intensa estimulação como a utilizada para a indução de LTP, determina um nível alto de ativação de todas as quinases fundamentais para sua ocorrência. E essa propriedade fica ainda mais evidente quando essas enzimas são analisadas por outros padrões de estimulação por Ca^{2+} . Com esse tipo de análise, como mostrado na Fig. 48, demonstra-se que as enzimas da LTP que se associam diretamente ao Ca^{2+} ou ao complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, são ativadas em grande percentagem por sinais de Ca^{2+} compostos por breves pulsos, mas com ampla magnitude, ou seja, alta concentração do íon, como ocorre durante a indução de LTP. Além disso, as moléculas fundamentais para a LTP que não se ligam diretamente ao Ca^{2+} ou ao complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ apresentam padrões de resposta altamente sensíveis à ativação de outras enzimas de suas vias o que determina que, para breves estímulos, elas sejam ativadas em grande percentagem. Nesse sentido, o que se torna evidente é que a LTP depende de proteínas cuja ativação ocorre facilmente com estímulos breves, como os utilizados para

induzir esse fenômeno. E essa característica se torna mais evidente quando se compara os dados mostrados na Fig. 48, com os dados da calcineurina (Fig. 49).

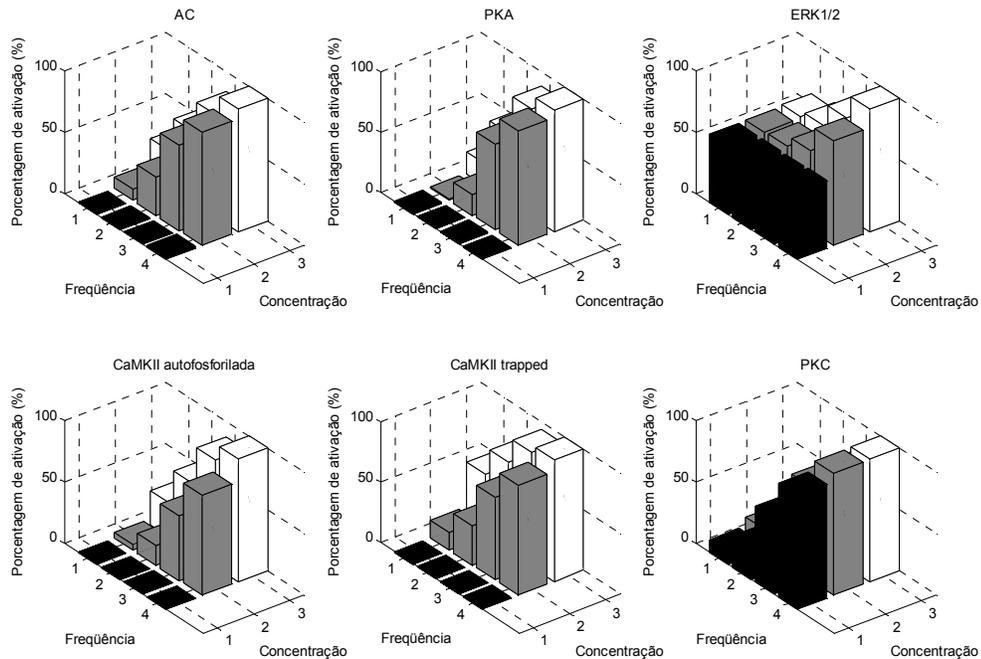


Figura 48: A sensibilidade intrínseca de algumas enzimas implicadas com a LTP às oscilações de Ca^{2+} . Para verificar como as moléculas simuladas respondem a diferentes padrões de estímulos de Ca^{2+} , elas foram expostas, individualmente ou em presença de CaM, para os casos das moléculas que não se ligam diretamente a esses íons, a nove protocolos distintos, que variaram em concentração de Ca^{2+} (1: $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 2: $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 3: $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$), e em frequência de oscilação (1: 2 Hz, 2: 5 Hz, 3: 20 Hz, 4: 100 Hz). Com esses padrões de estimulação, utilizando sempre uma concentração de $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da molécula analisada, foi possível perceber que há uma grande diferença no comportamento dessas enzimas frente ao Ca^{2+} . Para quantificar essa diferença, a curva de concentração do estado ativo de cada molécula simulada, obtida em função de cada protocolo usado, foi integrada. O valor máximo obtido com essa integração foi considerado como 100% de ativação. E, os demais valores, foram transformados em porcentagem de ativação em função do valor definido como 100%. Com esse procedimento, foi possível observar que a ativação das enzimas mostradas é maior conforme se utiliza protocolos de estimulação compostos por pulsos com intensidade maior e apresentados em altas frequências, como ocorre durante a indução de LTP.

A calcineurina tem uma das maiores afinidade por CaM reportada, no entanto, suas taxas de associação e de dissociação com seu ativador são lentas. Por isso, sua resposta à presença de Ca^{2+} não é rápida, ou seja, é necessário haver uma grande variação na concentração iônica, ou, provavelmente, uma variação por um longo período, para que essa

enzima passe a responder. Esse fato, certamente, explica por que a LTD, processo no qual a atuação da calcineurina é essencial, requer protocolos de indução compostos por cerca de 900 pulsos de estimulação com 1 Hz de frequência (Taube e Schwartzkroin, 1988; Sweatt, 2003).

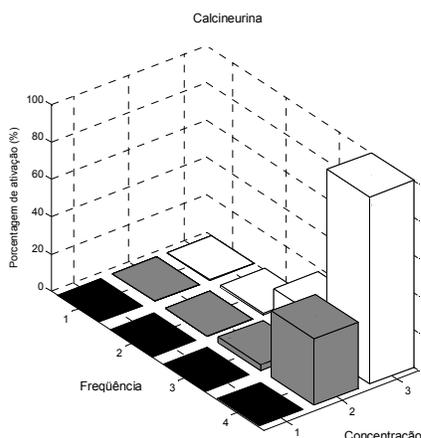


Figura 49: A sensibilidade da calcineurina às oscilações de Ca^{2+} . Para verificar como a calcineurina responde ao Ca^{2+} , foram utilizadas 3 concentrações diferentes de Ca^{2+} (1: $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 2: $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 3: $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$), com frequências de oscilações distintas (1: 2 Hz, 2: 5 Hz, 3: 20 Hz, 4: 100 Hz). Com esses padrões de estimulação, e utilizando $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da calcineurina, foi possível observar que essa enzima requer uma grande variação na concentração de Ca^{2+} para se tornar ativa. Mas, vale ressaltar que, nesse gráfico, a porcentagem de ativação da enzima foi calculada a partir da integração da área de sua curva de ativação. Nesse sentido, a ativação mais alta obtida para um protocolo específico foi considerada como 100 %. Os demais valores de ativação foram colocados em porcentagens a partir desse valor máximo. Portanto, vale ressaltar que, nessas situações, embora não seja demonstrado, a ativação da calcineurina, em concentração, é, sempre, baixa.

No entanto, no meio intracelular, além da calcineurina, existem outras fosfatases, e várias delas são constitucionalmente ativas. Com isso, a ativação das enzimas requeridas pela LTP pode ser, rapidamente, revertida. Nesse sentido, apesar da sensibilidade intrínseca dessas moléculas ao Ca^{2+} favorecer suas ativações para os protocolos de indução da LTP, após o término do estímulo, elas são desativadas.

A ação das fosfatases sobre as enzimas que integram a LTP pode ser facilmente ilustrada considerando, por exemplo, a rápida inativação que elas promovem na CaMKII. A CaMKII é apontada, por muitos autores, como a principal molécula para a ocorrência de LTP (Lledo et al., 1995; Lisman et al., 2002; Sanhueza et al., 2007). Esse fato se explica por sua

capacidade de se autofosforilar e permanecer ativa por longos períodos de tempo (Zhabotinsky, 2000), situação que é revertida por duas fosfatases, a PP2A e a PP1, que são proteínas abundantes nos neurônios piramidais da área CA1 (Strack et al., 1997a; Winder e Sweatt, 2001). Uma vez presentes no meio, essas enzimas inativam a CaMKII e inibem a manutenção de seu estado persistentemente ativo impedindo, como consequência, sua ação durante a LTP. Para ilustrar esse fato, o modelo da CaMKII foi exposto, brevemente, a um estímulo de Ca^{2+} , o que determinou a ativação da enzima, e, em seguida, foi simulada a presença de PP1 por um pequeno intervalo. Como pode ser observado na Fig. 50, essa situação simulada resultou na total reversão da ativação da CaMKII indicando que, só a presença de Ca^{2+} não é capaz de induzir a manutenção da atividade dessa enzima.

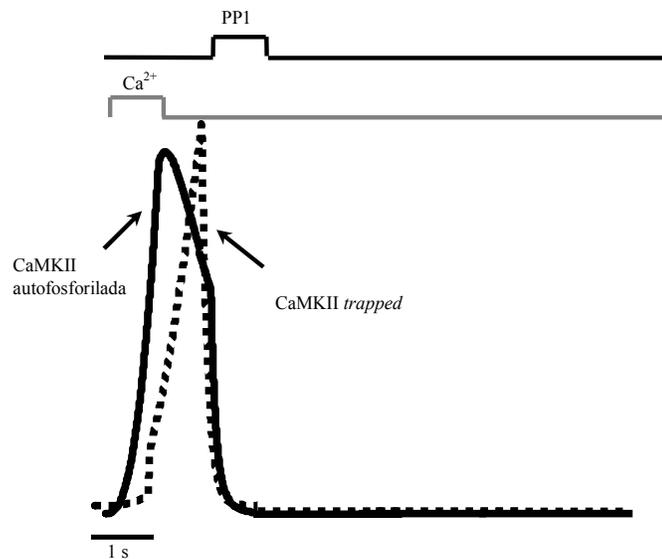


Figura 50: A inativação da CaMKII pela PP1. A CaMKII é uma das enzimas principais para a ocorrência de LTP e destaca-se das demais por possuir um complexo padrão de autofosforilação, que possibilita sua permanência em um estado ativo autônomo. No entanto, a presença de fosfatases rapidamente causa sua inativação, através de sua desfosforilação. Para ilustrar esse processo, o modelo da CaMKII ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi estimulado por 1 s por Ca^{2+} ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), em presença de CaM ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$), o que promoveu a rápida autofosforilação da enzima. Em seguida, com o término do estímulo de Ca^{2+} , a CaMKII passa de seu estado autofosforilado para o *trapped*. Para verificar a ação da fosfatase PP1 nesse processo, no período de 3 a 4 s, uma concentração de PP1 ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), foi inserida no modelo e depois retirada. Rapidamente, as duas espécies de CaMKII foram inativadas.

Certamente, quando se consideram as moléculas da LTP integradas e estimuladas por padrões de variação na concentração de Ca^{2+} , a resposta obtida é diferente. Para observar essa resposta, primeiro é importante verificar, exatamente, como é o padrão de variação intracelular de Ca^{2+} durante a indução de LTP, o que foi feito através da exposição do modelo do neurônio piramidal, contendo os receptores glutamatérgicos, para um protocolo de indução de LTP. Mas, inicialmente, não foram inseridas as vias intracelulares no modelo, para que fosse possível analisar, sem interferências, o aumento na concentração de Ca^{2+} produzido. A estimulação utilizada consistiu em um único trem de L-glutamato com frequência de 100 Hz e amplitude de 1 mmol.L^{-1} , em acordo com a concentração que é liberada na fenda sináptica (Danbolt, 2001). É importante notar que, durante as simulações de indução de LTP, a densidade de receptores de NMDA utilizado foi de 83.3 receptores por μm^2 , e a de AMPA foi de 62.5 por μm^2 . Com isso, a despolarização medida na cabeça da espinha dendrítica tem uma componente mediada pelo NMDA maior. Mas esse fato era esperado. A quantidade de AMPAs por sinapse varia muito, podendo chegar até a sua ausência total (Liao et al., 1995; Nusser et al., 1998; Nusser, 2000; Matsuzaki et al., 2001). No entanto, o valor usado como inicial para a densidade de AMPAs foi escolhido com base na densidade média de canais mostradas em dados obtidos com análises proteômicas recentes, utilizando semi-quantificações e quantificações absolutas medidas por MALD-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight*) (Husi et al., 2003; Peng et al., 2004; Sheng e Hoogenraad, 2007).

Mesmo com uma densidade de AMPAs relativamente baixa, a estimulação do modelo com L-glutamato aplicado em alta frequência possibilitou um aumento grande na concentração de Ca^{2+} , de acordo com o que era esperado. Em função do tamanho reduzido da espinha dendrítica, a variação na concentração de Ca^{2+} induzida por uma única sinapse é

bastante intensa, ficando em torno de $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Sabatini et al., 2002). Para o protocolo utilizado para induzir LTP, em decorrência de somação, esse valor foi mais alto (Fig. 51).

Posteriormente a essa verificação, as vias que compõem a LTP foram inseridas no modelo, porém, as fosfatases e demais enzimas que, diretamente, contribuem para a inativação das quinases requeridas para a ocorrência de aumento de peso sináptico também foram incluídas (Fig. 52).

O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} durante a indução de LTP

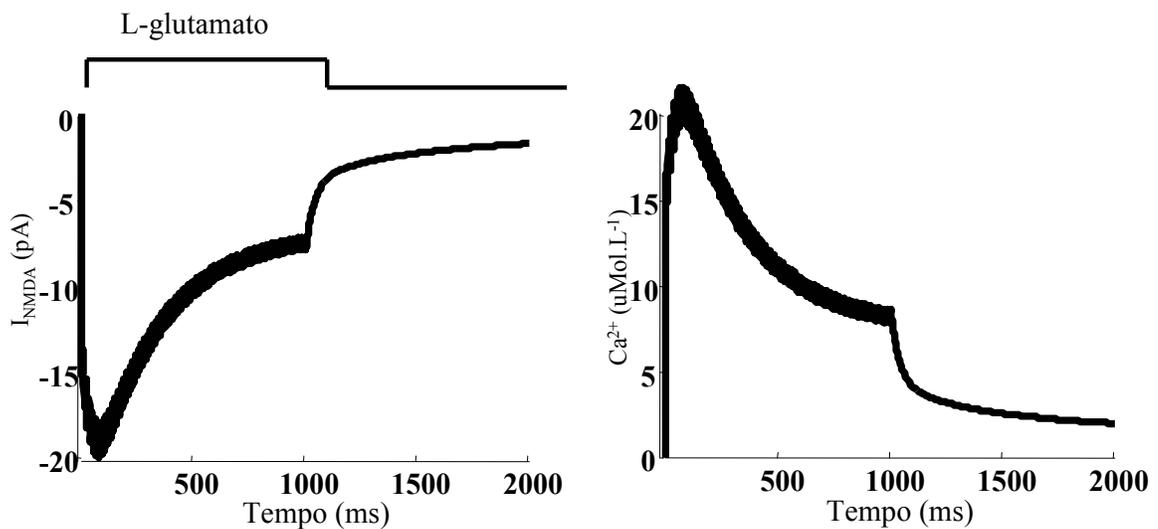


Figura 51: O padrão de aumento na concentração de Ca^{2+} em função da indução de LTP por um pulso de 100 Hz de L-glutamato durante 1s. A LTP é induzida por protocolos específicos de estimulação que determinam a rápida ativação dos receptores AMPA, seguida pela despolarização local da membrana celular, o que determina a ativação dos receptores NMDA, cuja corrente é mostrada à esquerda, e, em consequência, um intenso aumento na concentração local de Ca^{2+} , mostrado à direita.

Entre as enzimas que integram a LTP, três são diretamente inativadas por fosfatases: a CaMKII, pela PP1 e pela PP2A, a MEK1/2, pela PP2A, e a ERK1/2, pela MKP (Shields et al., 1985; Strack et al., 1997a; 1997b; Millward et al., 1999; Winder e Sweatt, 2001; Ceulemans e Bollen, 2003; Dickinson e Keyse, 2006). A presença dessas fosfatases determina, rapidamente, o retorno dessas enzimas para seu estado basal. Além da ação dessas fosfatases,

há ainda a PDE1 (representada apenas por PDE), que é dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, e a PDE10, que não requer ativador, que hidrolisam o AMPc, ocasionando a inativação, indiretamente, da PKA (Domez-Lopacinska e Strosznajder, 2005; Goraya e Cooper, 2005). E, em adição a essas moléculas, há a SynGAP, enzima que acelera a taxa de inativação da Ras e, conseqüentemente, determina o término da ativação da via da ERK1/2 (Chen et al., 1998; Kim et al., 1998; Oh et al., 2004; Kennedy et al., 2005). A SynGAP atua sobre a Ras tanto em seu estado basal, quanto fosforilada pela CaMKII, o que causa um aumento em sua taxa catalítica (Chen et al., 1998; Oh et al., 2004). Essa organização, envolvendo as quinases e as demais enzimas mencionadas, simulada de maneira integrada de acordo com o esquema mostrado na Fig. 52, quando estimulada pelo mesmo protocolo de LTP utilizado para gerar os dados mostrados na Fig. 51, impede ou inibe a ativação de algumas das proteínas essenciais para a LTP inicial (Fig. 53). Com isso, o que fica evidente é que a LTP não é um processo que depende, apenas, da habilidade de algumas moléculas em se tornarem ativas quando são estimuladas por sinais breves.

É comum, na literatura, a tentativa de explicar a LTP com base, exclusivamente, nas características intrínsecas de algumas de suas moléculas essenciais. Ou seja, a habilidade de algumas enzimas em permanecerem persistentemente ativas, aliada a uma porcentagem de ativação alta obtida mesmo para estímulos breves. Nesse sentido, é fácil compreender a LTP exclusivamente como um evento no qual a utilização de um protocolo de estimulação breve e intenso determina a ativação superior de algumas quinases que, por características estruturais, permanecem ativas por longos períodos de tempo e, nesse estado, agem livremente fosforilando o AMPA, o NMDA e outros substratos estratégicos que determinam o aumento do peso sináptico.

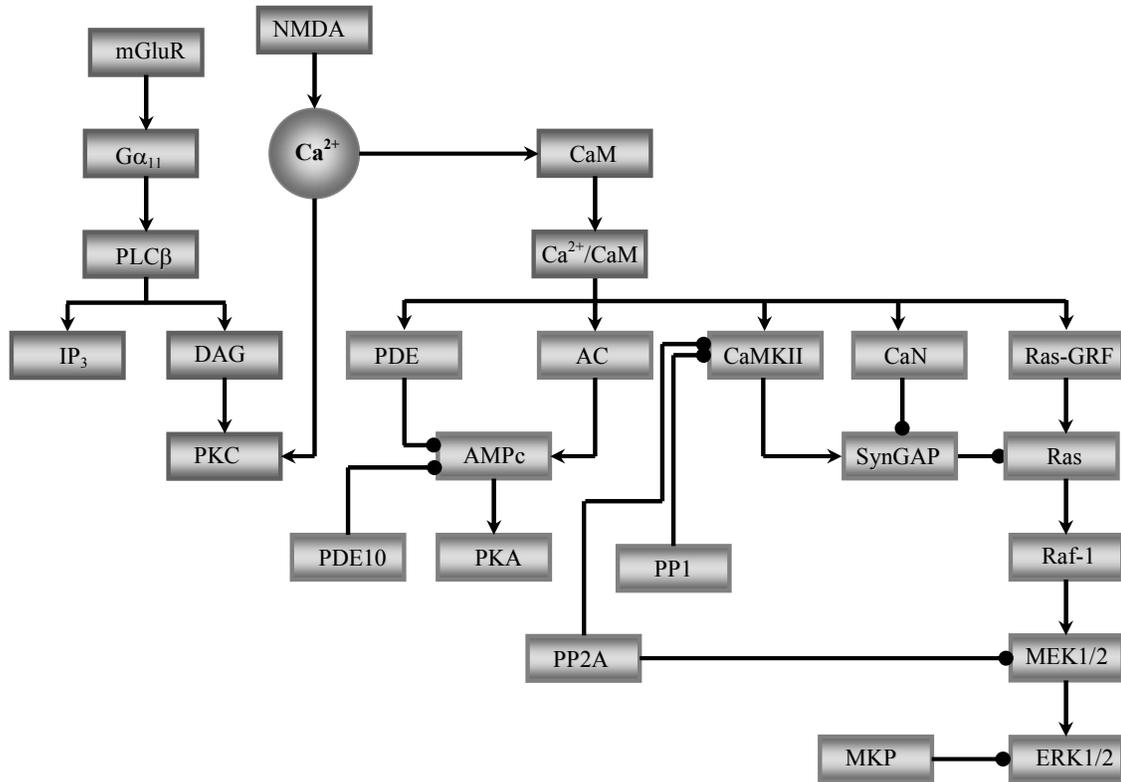


Figura 52: As enzimas que integram o modelo simulado. A LTP inicial hipocampal requer a ativação de quatro proteínas: a CaMKII, a PKC, a PKA e a ERK1/2. No entanto, no meio intracelular, existem diversas moléculas que atuam determinando a inativação dessas enzimas. Por essa razão, a compreensão da LTP envolve, necessariamente, a análise dos mecanismos que possibilitam que moléculas específicas sejam preferencialmente ativadas. Entre essas moléculas destacam-se a CaMKII, que pode ser inativada pela PP1 e pela PP2A, a PKC, a PKA, cuja ativação é regulada, indiretamente, pela PDE1, representada por PDE, e pela PDE10, e a ERK1/2, que é inativada pela fosfatase MKP e, indiretamente, pela PP2A, além de ser regulada pela SynGAP, enzima que acelera a taxa de inativação da Ras. Cabe ainda ressaltar que a SynGAP pode atuar sobre a Ras tanto em seu estado desfosforilado, que é catalisado pela calcineurina (CaN), quanto após a sua fosforilação por CaMKII, fato que aumenta a sua atividade sobre a Ras.

Portanto, como foi demonstrado, a LTP não requer, apenas, um alto aumento na concentração de Ca^{2+} para ser induzida, o que indica que esse processo não é fruto, simplesmente, de características moleculares intrínsecas de algumas proteínas, mas é um evento que emerge de um complexo padrão de integração temporal e espacial. Nesse sentido, a compreensão da LTP vai além do entendimento das propriedades intrínsecas de algumas proteínas e abrange, necessariamente, as propriedades que resultam da integração entre seus componentes.

Ativação da CaMKII, PKA, PKC e ERK1/2 durante a LTP

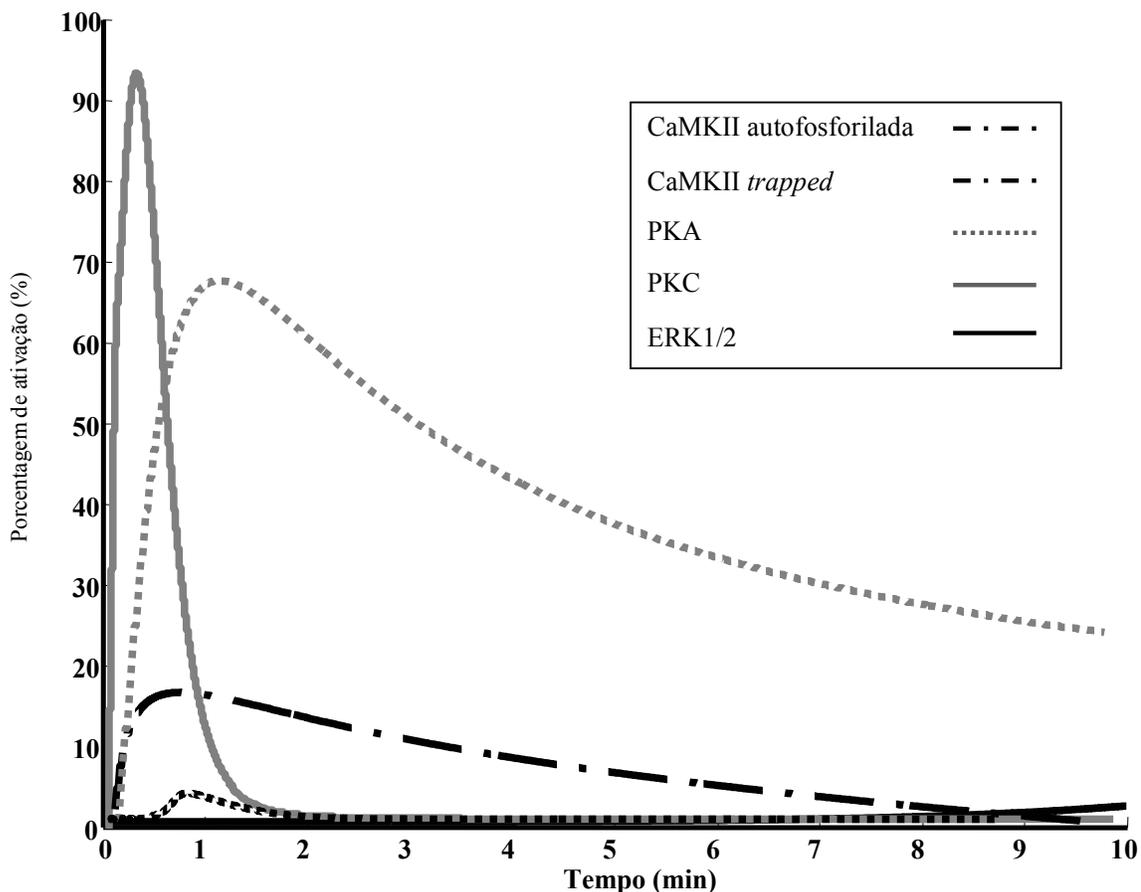


Figura 53: Ativação das enzimas essenciais da LTP, em função de 1 s de estimulação por pulsos de 1 mol.L^{-1} de L-glutamato simulados com 100Hz de frequência, considerando sua organização intracelular juntamente com a ação de fosfatases e demais moléculas. As proteínas requeridas para a indução de LTP inicial, ou seja, a ERK1/2, a PKA, a PKC e a CaMKII, indicada em dois estados de ativação (autofosforilada e *trapped*), apesar de serem altamente sensíveis ao aumento intracelular na concentração de Ca^{2+} , fato que determina que elas sejam capazes de se tornarem ativas mesmo em decorrência de variações breves na concentração desse íon, não permanecem persistentemente ativas quando se considera a coordenação entre a suas ativações e a ação das fosfatases, PDEs e da SynGAP. Nesse sentido, a compreensão da ocorrência de LTP requer, necessariamente, que a organização temporal e espacial entre seus componentes seja considerada.

4.3 A LTP inicial e as propriedades de sua rede de sinalização: amplificação, coordenação e integração temporal

A LTP inicial hipocampal é um processo que apresenta três características fundamentais em suas vias bioquímicas: elas amplificam o sinal de entrada, se coordenam e se

integram (Bhalla e Iyengar, 1999; Dineley et al., 2001; Kennedy et al., 2005). São essas características, aliadas às propriedades intrínsecas de algumas moléculas, que possibilitam grande parte da ativação persistente de enzimas específicas. Para entender, exatamente, como isso ocorre, é necessário considerar como as vias da LTP se organizam, para amplificar a estimulação intracelular que inicia a sua ocorrência e, posteriormente, com elas se coordenam e se integram.

A amplificação de sinal é uma propriedade importante da LTP, pois o aumento de Ca^{2+} no meio intracelular, embora pareça elevado, é um fator limitante. Além disso, apesar do requerimento de Ca^{2+} disponível ser fundamental, é a CaM que atua, muitas vezes, como o principal limitante da ocorrência da LTP. E isso se explica pelo grande número de moléculas que precisam se associar a CaM para se tornarem ativas. Entre as enzimas implicadas com processos plásticos e incluídas no modelo, seis dependem de associação direta com o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (CaMKII, AC, PDE, Ras-GRF, NOS e calcineurina) e apenas uma (a PKC) se liga ao Ca^{2+} sem o intermédio da CaM. No entanto, enquanto a concentração de CaM no citoplasma dos neurônios piramidais fica em torno de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, só a concentração de CaMKII é estimada em $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Erondu e Kennedy, 1985; Peng et al., 2004; Sheng e Hoogenraad, 20007). Esse valor, somado a concentração das outras moléculas que se ligam à $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, determina que logo se estabeleça, no meio intracelular, uma competição na qual vencem as enzimas que possuem não apenas maior afinidade por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, mas, no caso específico da LTP, que apresentam uma velocidade de associação com esse complexo alta (Persechini e Stemmer, 2002; Tran et al., 2003).

No meio intracelular, porém, a CaM não está livre, mesmo em ausência de Ca^{2+} . Durante as concentrações basais de Ca^{2+} , a CaM se encontra associada a algumas proteínas específicas: as proteínas de interação com a ApoCaM. No hipocampo em particular, uma dessas proteínas, a neurogranina é encontrada em concentrações equivalentes a concentração

da própria CaM (Repressa et al., 1990), o que indica que, quando a concentração citoplasmática de Ca^{2+} é baixa, a maior parte da CaM está interagindo com essa proteína. Além disso, a neurogranina é capaz de permanecer ligada a CaM mesmo em presença de Ca^{2+} , embora com afinidade menor (Gerendasy et al., 1994; Gaertner et al., 2004a). Dessa forma, um aspecto importante a ser ressaltado é que a presença de neurogranina impede e/ou retarda a ativação das enzimas que requerem Ca^{2+} /CaM para se tornarem ativas, fato que, embora amplamente aceito (Dineley et al., 2001), nunca foi demonstrado experimentalmente.

Para verificar a extensão da presença de neurogranina, o modelo de interação de CaM com a neurogranina foi isolado dos demais e exposto à diferentes frequências de pulso de Ca^{2+} com alta amplitude ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Como pode ser observado na Fig. 54, em presença de concentração elevada de neurogranina ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM), a interação do Ca^{2+} com a CaM é praticamente suprimida. E isso se deve a uma característica especial da neurogranina: além de competir diretamente com os demais alvos de CaM, ela acelera a taxa de dissociação do Ca^{2+} da CaM, comprometendo, portanto, a formação do complexo Ca^{2+} /CaM (Gaertner et al., 2004a).

A neurogranina não possui atividade enzimática e sua função parece ser exclusivamente acumular CaM em locais estratégicos, como as espinhas dendríticas, o que leva alguns autores a defenderem que ela é fundamental para a LTP (Pak et al., 2000; Zhabotinsky et al., 2006). Porém, sua presença também compete, diretamente, com as moléculas que devem ser ativadas durante esse evento (Xia e Storm, 2005). E, embora esses pontos pareçam não ser relacionados, eles compõem o principal aspecto da amplificação de sinal da LTP, já que a neurogranina é um dos melhores substratos da PKC na célula pós-sináptica (Alexander et al., 1987). Com isso, assim que há o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , a PKC fosforila a neurogranina, o que determina o término de interação de sua com a CaM, favorecendo, conseqüentemente, a ativação das enzimas Ca^{2+} /CaM-

dependentes (Ramakers et al., 1995; Huang et al., 2000). No entanto, esse aspecto nunca foi demonstrado diretamente, embora existam fortes evidências de que ele ocorre *in vivo* e durante a LTP (Prichard et al., 1999; Xia e Storm, 2005). Para verificá-lo, o modelo de interação entre a neurogranina e a CaM foi exposto, isoladamente, à presença de PKC, para averiguar se, de fato, a PKC é capaz de reduzir, rápida e significativamente, a interação entre a neurogranina e a CaM (Fig. 55). Posteriormente, essa interação foi considerada no modelo das vias da LTP incluídas no neurônio piramidal simulado.

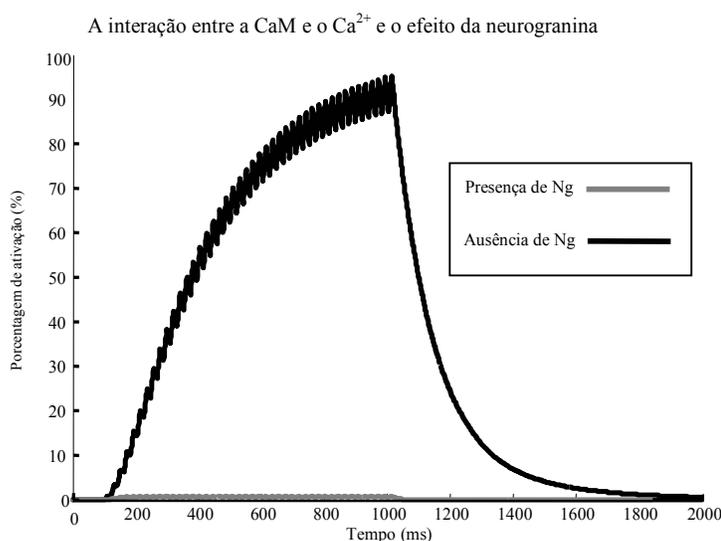


Figura 54: O efeito da neurogranina sobre a formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. A neurogranina é uma proteína de interação com a ApoCaM que mantém a CaM armazenada em concentrações basais de Ca^{2+} . Mas, além disso, ela dificulta a formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, por promover uma aceleração na taxa de dissociação do Ca^{2+} . Com isso, mesmo diante de uma forte estimulação (100 Hz de Ca^{2+} , com 10 ms de duração por pulso, para $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CaM), apenas a presença de neurogranina ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) é capaz de suprimir quase totalmente a formação da espécie $(\text{Ca}^{2+})_4\text{CaM}$.

A demonstração de que a PKC pode fosforilar a neurogranina foi um ponto importante para a compreensão dos mecanismos de amplificação presentes entre as moléculas que atuam na LTP. Mas não foi o único. Embora menos estudado, um outro aspecto que deve ser considerado no favorecimento da dissociação entre a neurogranina e a CaM é mediado pela ação da NOS.

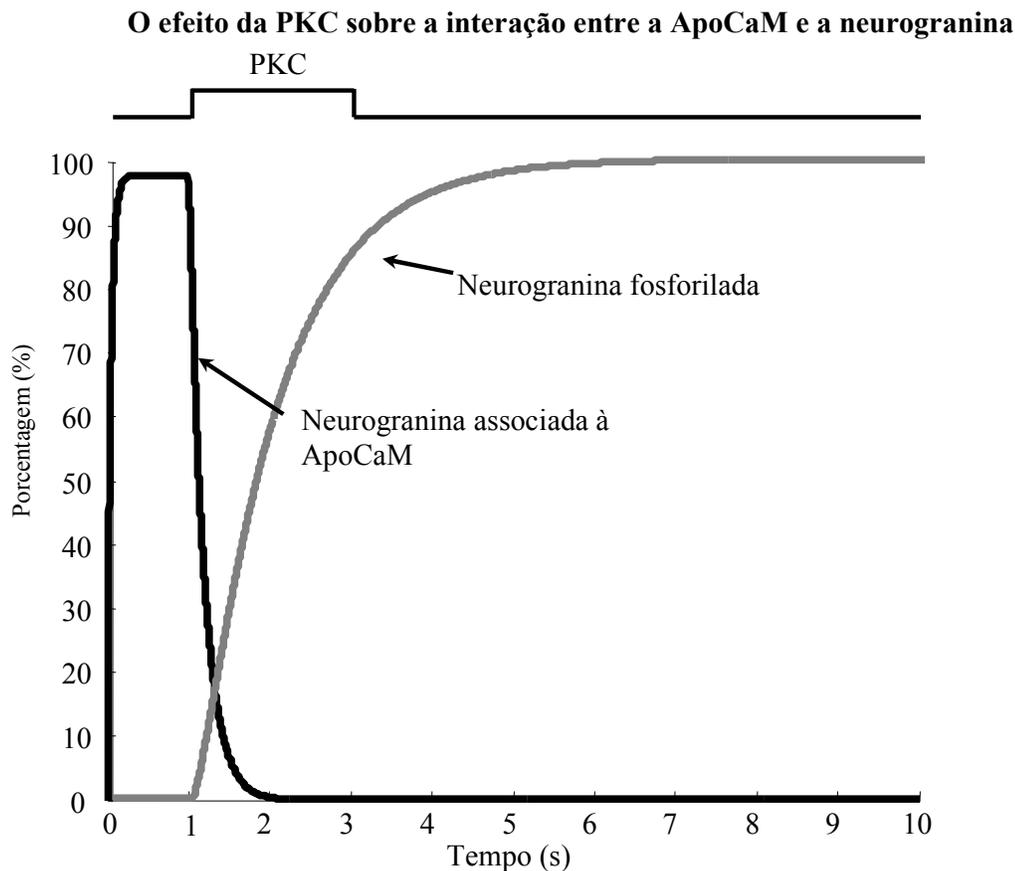


Figura 55: A neurogranina e o papel da PKC na amplificação de sinal da LTP inicial. Para verificar a ação da PKC no término da interação entre a neurogranina e a CaM, o modelo dessas proteínas foi isolado das demais e, inicialmente, a concentração de PKC foi mantida em zero. A neurogranina permaneceu, no início da simulação, em presença de CaM ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada uma) e Ca^{2+} ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, por um período de 2 s, o modelo foi exposto à PKC ativa ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Como é possível observar, apenas a presença momentânea de PKC ativa já é suficiente para fosforilar a neurogranina e impedir a formação do complexo entre essa proteína e a ApoCaM.

A NOS é uma enzima amplamente implicada com a LTP, sobretudo com os seus aspectos pré-sinápticos (Sweatt, 2003; Hopper e Garthwaite, 2006). Cabe ressaltar no entanto, que sua vinculação com a LTP é apenas com um caráter modulatório, ou seja, a atividade da NOS não é essencial para sua ocorrência.

A ação da NOS na LTP é mediada por um dos produtos de sua atividade catalítica, o NO. O NO atua em inúmeros processos celulares como segundo mensageiro (Garthwaite,

1991; Garthwaite e Boulton, 1995). Seu mecanismo de ação mais estudado e caracterizado é a ativação da enzima sGC, que produz o GMPc (Denninger e Marletta, 1999; Bon e Garthwaite, 2003; Toda e Okamura, 2003). Além dessa atuação, o NO é um potente agente oxidante no meio intracelular, característica muito estudada em situações patológicas, mas desconsiderada em grande parte nos eventos plásticos como a LTP (Radi et al., 1991; Girard e Potier, 1993; Wink et al., 1997). Recentemente, no entanto, essa sua ação como oxidante foi verificada e demonstrou-se que um de seu alvo é a neurogranina.

Estruturalmente, a neurogranina possui quatro resíduos cisteína que podem ser facilmente oxidados por derivados de NO (Mahoney et al., 1996; Miao et al., 2000). Uma vez oxidados, dois desses resíduos se unem e formam pontes dissulfeto que impedem a associação da neurogranina com a CaM (Sheu et al., 1996). Dessa maneira, assim que há o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , a NOS, que é facilmente ativada por se localizar logo abaixo do receptor NMDA (Valtschanoff e Weinberg, 2001), catalisa a produção de NO e determina a oxidação da neurogranina, favorecendo, conseqüentemente, a ativação das outras moléculas que requerem Ca^{2+} /CaM. A simulação desse processo foi feita e inserida no modelo da LTP inicial. Porém, apenas para ilustrar a contribuição exata da atividade da NOS, o modelo da integração da neurogranina e da CaM foi exposto, brevemente, a presença de NOS (Fig. 56). Como é possível observar, esse mecanismo não é tão intenso quanto a atividade da PKC sobre a neurogranina, especialmente por que a NOS é encontrada em baixas concentrações no hipocampo (Bredt e Snyder, 1990; Valtschanoff e Weinberg, 2001).

A ação da PKC e da NOS sobre a neurogranina são os principais processos de amplificação da LTP e foram incorporados na organização da rede de sinalização descrita nesse trabalho, seguindo o esquema descrito na Fig. 57. Mas esses processos não são os únicos eventos celulares que determinam a ocorrência de LTP. Em adição a esses mecanismos, a LTP possui eventos muito característicos de coordenação entre moléculas,

representados, sobretudo, por retroalimentações. E, entre eles, se destaca a ação coordenada entre a PKA e a CaMKII.

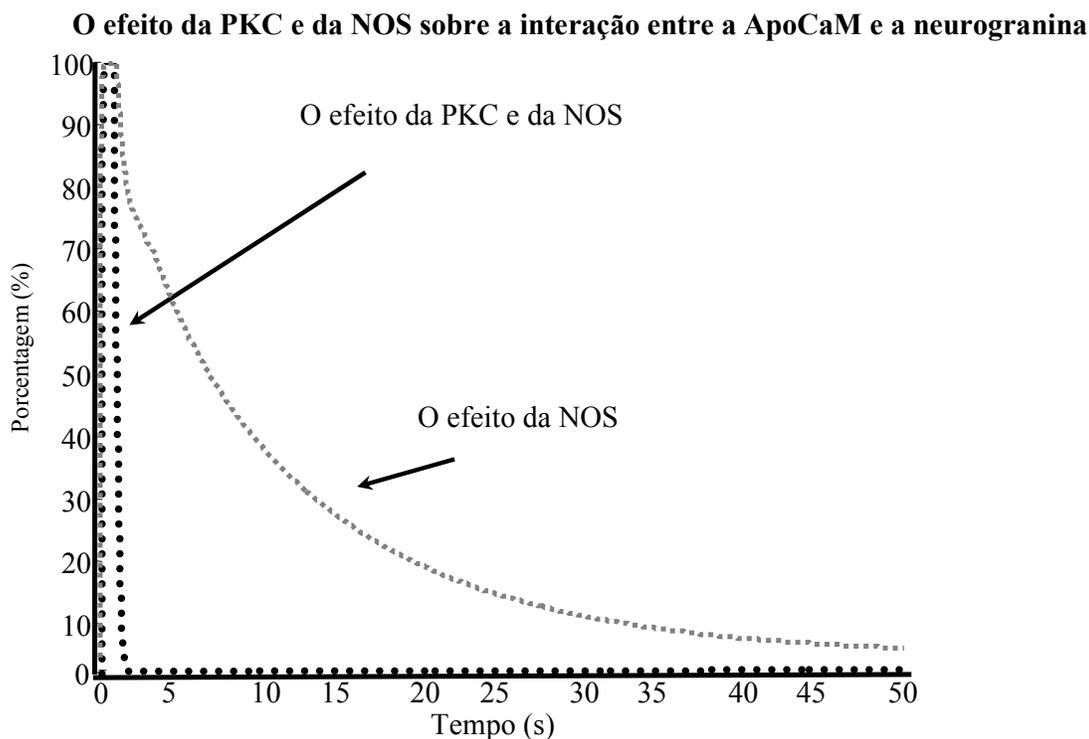


Figura 56: A neurogranina e o papel da PKC e da NOS na amplificação de sinal da LTP inicial. Para verificar a ação da PKC e da NOS no término da interação entre a neurogranina e a CaM, o modelo dessas proteínas foi isolado das demais e, inicialmente, a concentração de PKC e NOS foi mantida em zero. A concentração de neurogranina e de CaM simuladas foram equimolares ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada uma), além disso, foi, o modelo foi mantido em presença de Ca^{2+} ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Por um período de 1s, o modelo foi exposto a NOS ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Em uma segunda simulação, o modelo foi exposto por 1s a NOS e à PKC juntas e, como mostrado, determinou um rápido término na interação entre a neurogranina e a ApoCaM.

Assim que há o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} e há a disponibilidade de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ no meio intracelular, ocorre à ativação das enzimas PKA e CaMKII. No entanto, como a CaMKII é ativada por autofosforilação, ela é muito susceptível à ação das fosfatases, que logo determinam seu retorno a sua atividade basal. Mas, durante a LTP, um mecanismo

de coordenação da CaMKII com a PKA inibe, parcialmente, sua desfosforilação: a fosforilação do In-1.

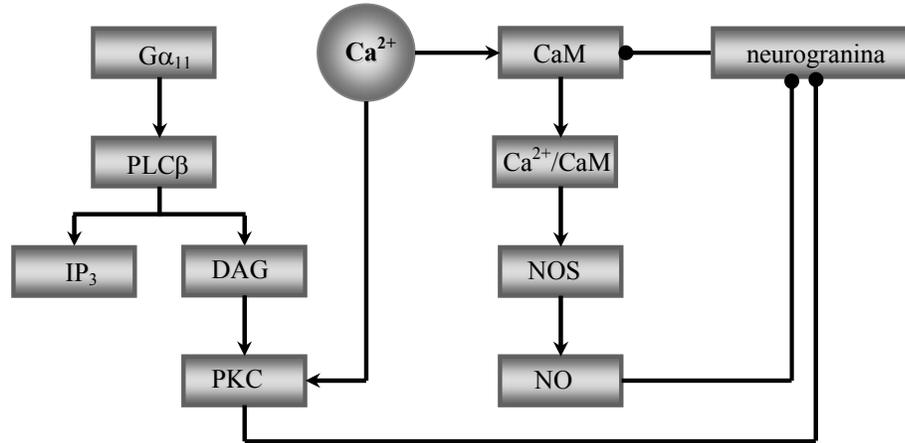


Figura 57: Amplificação de sinal: a ação da PKC e da NOS. Tanto a PKC quanto a NOS são ativadas assim que há o aumento intracelular na concentração de Ca^{2+} . Uma vez ativas, essas enzimas atuam na amplificação de sinal da LTP através da fosforilação e oxidação, mediada por NO, da neurogranina, impedindo que ela se associe com a CaM. Dessa maneira, há um aumento na concentração de CaM disponível para ativar as demais moléculas que irão atuar na LTP.

No citoplasma, a CaMKII é desfosforilada apenas por duas enzimas, a PP2A e a PP1. Ambas são enzimas constitucionalmente ativas, porém, a PP1 é fortemente inibida através de sua associação com o In-1 fosforilado (Cohen, 2002). Esse processo é observado durante a LTP e foi simulado no modelo desenvolvido nesse trabalho (Fig. 58). Para isso, foi feita a reação de fosforilação do In-1, catalisada pela PKA (revisto em Nguyen e Woo, 2003), e, em seu estado fosforilado, o In-1 foi considerado capaz de se associar à PP1, impedindo sua ação enzimática. Dessa maneira, a PKA atua na manutenção da atividade da CaMKII (Blitzer et al., 1995; 1998). Esse mecanismo de coordenação entre a atividade da CaMKII e da PKA é bem caracterizado. Porém, ele pode ser revertido pela ação da calcineurina, que desfosforila o In-1 (Klee et al., 1998). Mas, para evitar essa desfosforilação, há ainda dois pontos de coordenação dessas vias que foram incluídos no modelo: a inibição da calcineurina e da PDE pela CaMKII (Fig. 58).

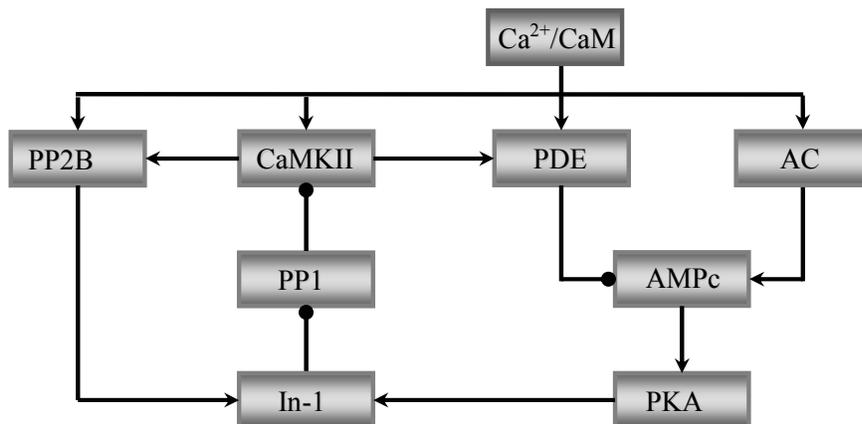


Figura 58: Coordenação e integração da PKA e da CaMKII. A ativação da PKA e da CaMKII é altamente integrada. Assim, enquanto a PKA age inibindo, indiretamente, a PP1, que é uma das fosfatases que inativam a CaMKII, a CaMKII inibe a calcineurina, fosfatase que reverte esse processo, além de inibir também a PDE, enzima que termina a sinalização mediada por AMPc.

Em seu estado ativo, a CaMKII atua sobre uma ampla gama de substratos. E, entre eles, estão a PDE e a calcineurina (Sharma et al., 1986; Hashimoto et al., 1988). A fosforilação dessas duas enzimas ocorre exatamente nos sítios de interação com a Ca^{2+}/CaM . Fosforiladas nesses sítios, a calcineurina e a PDE são inibidas através da perda de sua afinidade por Ca^{2+}/CaM . Esse processo contribui para a manutenção do estado ativo da PKA e do estado fosforilado do n-1, favorecendo, conseqüentemente, a manutenção da atividade da CaMKII. Por isso, esses processos foram incluídos no modelo de LTP inicial desenvolvido nesse trabalho. Para incorporar esses eventos no modelo, foi necessário considerar que a fosforilação da calcineurina e da PDE só ocorre em seus estados inativos, já que o grupo fosfato é inserido pela CaMKII no sítio de ligação da Ca^{2+}/CaM . Ou seja, quando a calcineurina ou a PDE estão ativas, o acesso da CaMKII aos sítios de fosforilação dessas duas enzimas está bloqueado (Sharma et al., 1986; Hashimoto et al., 1988; Hanson e Schulman, 1992). Por isso, os resultados obtidos mostram que esse processo é gradual (Fig. 59), mas, certamente, contribui para a ativação da CaMKII e da PKA.

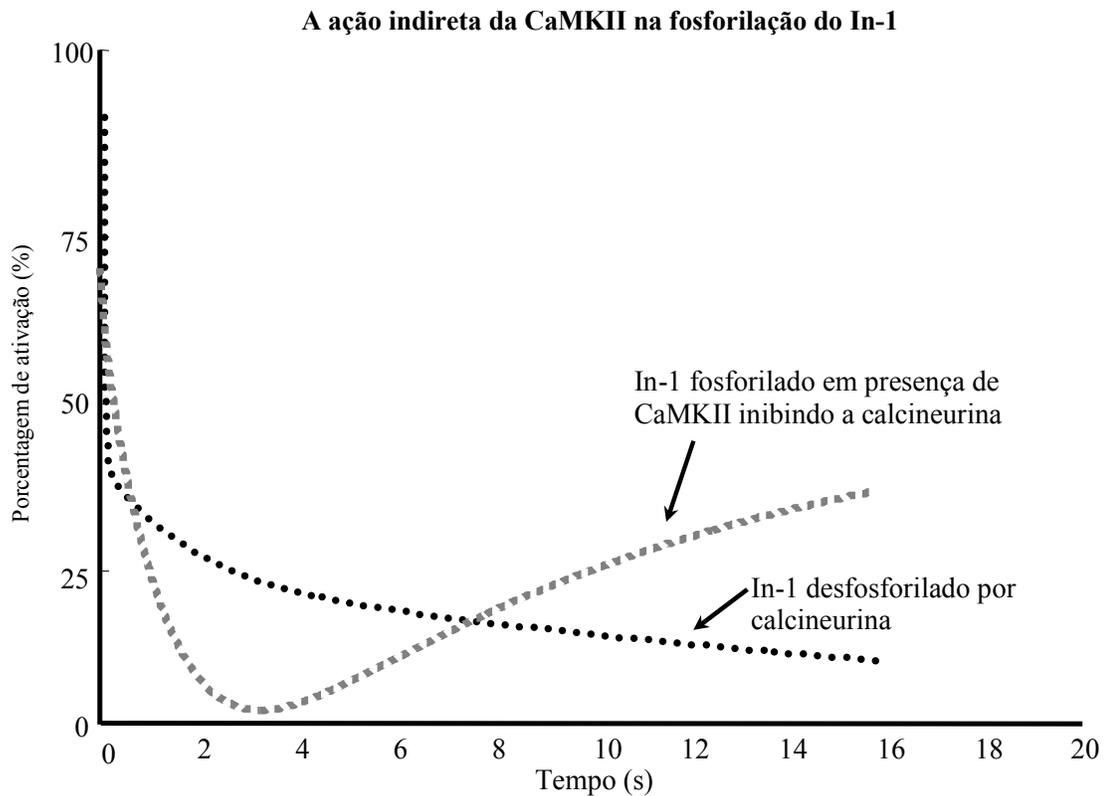


Figura 59: A inibição da PP1 mediada pela CaMKII. A CaMKII facilita a inibição da PP1 fosforilando a calcineurina e a PDE, enzimas que atuam na desfosforilação do In-1 e na hidrólise do AMPc, respectivamente. A inclusão dessas fosforilações no modelo contribuiu para a manutenção da atividade da CaMKII que, em seu estado ativo, gradualmente impede a desinibição da PP1. E, para ilustrar a simulação desse processo, as enzimas calcineurina, PKA, e PP1, em presença de In-1 fosforilado, foram mantidas em baixa concentração de Ca^{2+}/CaM , o que possibilitou a ocorrência de uma ativação lenta das enzimas PKA e calcineurina. Com esse panorama, duas situações foram modeladas. Em uma delas, o modelo manteve a concentração de CaMKII como zero (curva em preto) e, em outro, em $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (curva em cinza). Como é possível observar, com a concentração Ca^{2+}/CaM persistente no meio, logo a calcineurina iniciou sua ação desfosforilando o In-1. Porém, em presença de CaMKII, curva em cinza, esse processo gradualmente foi sendo revertido. Ou seja, a CaMKII presente no meio inibiu a atuação da calcineurina e determinou o aumento da concentração de In-1 fosforilado.

Há ainda um outro aspecto que também favorece a ativação da PKA: a atividade catalítica da NOS. A NOS, ao produzir NO, ocasiona, conseqüentemente, a ativação da enzima sGC, que produz o GMPc. Tanto o GMPc quanto o AMPc são hidrolisados por PDE. No hipocampo, as principais PDEs presentes são da classe 1, que dependem de Ca^{2+}/CaM para se tornarem ativas. No entanto, há ainda a presença, em menor quantidade, de uma outra classe de PDE: a PDE10. Essas enzimas não possuem ativadores e são específicas para a

hidrólise de AMPc. Dessa maneira, as PDEs10 podem, gradualmente, hidrolisar o AMPc produzido e terminar a sinalização mediada por PKA. A presença de GMPc, no entanto, inibe a atividade das PDEs10, favorecendo, portanto, a manutenção a ativação da PKA. Cabe ressaltar, portanto, que esse mecanismo tem caráter apenas modulatório, já que as enzimas PDE10 são encontradas em baixas concentrações no hipocampo (Domez-Lopacinska e Strosznajder, 2005). Com base nisso, sua inclusão foi feita, mas apenas por períodos de tempos longos de simulação é possível observar seu efeito, como exemplificado na Fig. 60.

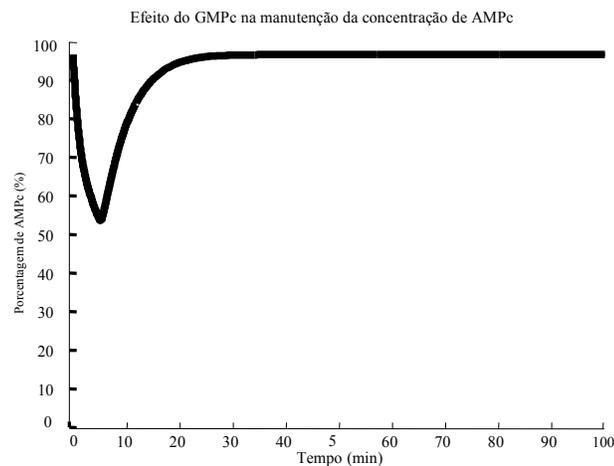


Figura 60: A ação do GMPc sobre a manutenção da concentração de AMPc. O GMPc, no hipocampo, atua pós-sinapticamente na inibição da PDE10, enzima que gradativamente degrada o AMPc formado após a indução de LTP. Esse processo foi simulado, mas sua ação só é perceptível após um longo período de tempo. Para ilustrar esse processo, na situação mostrada acima, o AMPc, produzido pela AC, foi mantido sem ser consumido através de sua hidrólise por PDE1, assumindo-se, portanto, que apenas a PDE10 atua em sua degradação. Como é possível observar, sua concentração cai gradualmente, mas, a medida que GMPc é produzido, há o restabelecimento da concentração de AMPc.

Com esses mecanismos, a atividade da NOS, da PKA e da CaMKII se integram e se coordenam, auxiliando na manutenção da ativação persistente da CaMKII e, simultaneamente, mantendo também a PKA ativa por mais tempo. Da mesma maneira, a ação da PKC favorece a ativação de ambas as enzimas, pois determina a liberação de CaM livre no citoplasma,

aumentando, conseqüentemente, a quantidade de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ disponível. No entanto, há ainda uma outra via essencial para a LTP inicial: a da ERK1/2.

As MAPKs são, certamente, as enzimas essenciais menos caracterizadas para a LTP, embora, atualmente, elas tenham recebido considerável atenção (Adams et al., 2000; Thomas e Huganir, 2005). Como já foi mencionado, essa via está sobre um intenso controle mediado por Ca^{2+} . Mas, diferentemente das demais enzimas implicadas com a LTP, para as quais os protocolos de indução e padrões de aumento na concentração de Ca^{2+} favorecem, de maneira evidente, sua ativação, o papel do Ca^{2+} sobre a via da MAPK ERK1/2 é bastante complexo. E isso se deve especialmente aos mecanismos de controle da atividade da Ras (Cook e Lockyer, 2006; Kupzig et al., 2006; Rumbaugh et al., 2006; Yarwood et al., 2006).

A Ras é altamente regulada pelas moléculas que catalisam sua ativação, as GRFs, e pelas enzimas que aceleram seu retorno ao estado basal, as GAPs. Nos neurônios piramidais hipocampais, as enzimas Ras-GRF1 e Ras-GRF2 são dependentes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, fato que estabelece um vínculo claro entre o aumento na concentração de Ca^{2+} e a conseqüente ativação da Ras, Raf-1, MEK1/2 e ERK1/2 (Fig. 61).

Porém, o mesmo Ca^{2+} que ativa essa via é responsável por sua inibição através das GAPs. Existem diversas GAPs no hipocampo e, especialmente uma delas, a SynGAP recebe considerável atenção por ser uma das enzimas presentes em maior concentração nas espinhas dendríticas, sendo menos abundante apenas do que a CaMKII (Chen et al., 1998; Kim et al., 1998; Peng et al., 2004). Além disso, outro fato chama a atenção: a SynGAP, que atua como GAP mesmo em seu estado desfosforilado, é um importante substrato da CaMKII e, fosforilada, tem um aumento de cerca de 75% em sua atividade (Oh et al., 2004). Ou seja, a CaMKII atua inibindo a via da ERK1/2, mas ambas as enzimas são fundamentais para a LTP.

Efeito da enzima Ras-GRF na ativação da MEK1/2 e da ERK1/2

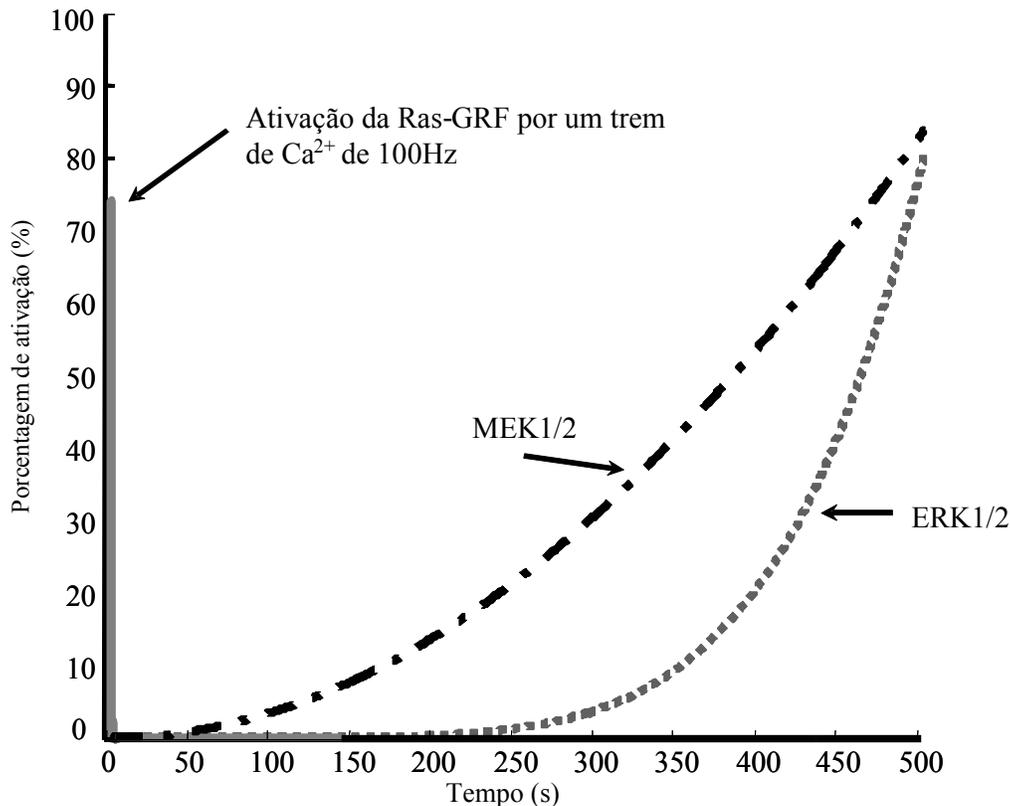


Figura 61: A ativação da via da ERK1/2 induzida pelo Ca^{2+} . Para ilustrar o papel do Ca^{2+} na ativação da via da ERK1/2, esse modelo foi isolado das demais moléculas simuladas, e mantido apenas em presença de suas enzimas (Ras, Raf-1 MEK1/2 e ERK1/2), além de Ras-GRF e ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e CaM ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A alta concentração dessas últimas duas moléculas é proposital, e tem o objetivo de evitar que elas sejam fatores limitantes. Com essa situação, a introdução no modelo, por apenas 1 s, de pulsos de Ca^{2+} com 100 Hz de frequência é capaz de induzir uma rápida ativação da Ras-GRF, seguida pela ativação das demais enzimas da via.

Esse fato tem gerado extrema perplexidade na área, sobretudo por que, quando a SynGAP foi descoberta, a ação da CaMKII sobre sua atividade foi reportada como inibitória (Chen et al., 1998). Apenas alguns anos depois da publicação original, o mesmo grupo que descobriu a SynGAP corrigiu seu erro inicial e demonstrou que, na verdade, a CaMKII é responsável pela estimulação, e não inibição, da atividade de GAP da SynGAP (Oh et al., 2004). Com isso, alguns trabalhos que foram publicados baseados na idéia inicial de que a SynGAP é inibida por CaMKII estão sendo reavaliados. Independentemente desse fato, o

importante a ser ressaltado é que, assim que há Ca^{2+} no meio intracelular, há a ativação, simultaneamente, de mecanismos que estimulam e que inibem a Ras, o que torna a sua ativação final um evento que emerge da coordenação entre as enzimas que integram esses mecanismos. Para ilustrar o papel inibitório da SynGAP sobre a Ras, seu modelo de ativação foi isolado e mantido com CaM, Ca^{2+} e Ras-GRF. Em presença desses componentes, duas situações foram simuladas: a ativação da Ras em presença constante de SynGAP fosforilada (1) e sua exposição por um breve intervalo de tempo (5 segundos) à SynGAP fosforilada (2). Como é demonstrado na Fig. 62, a SynGAP rapidamente determina a inibição da Ras e impede sua ativação máxima.

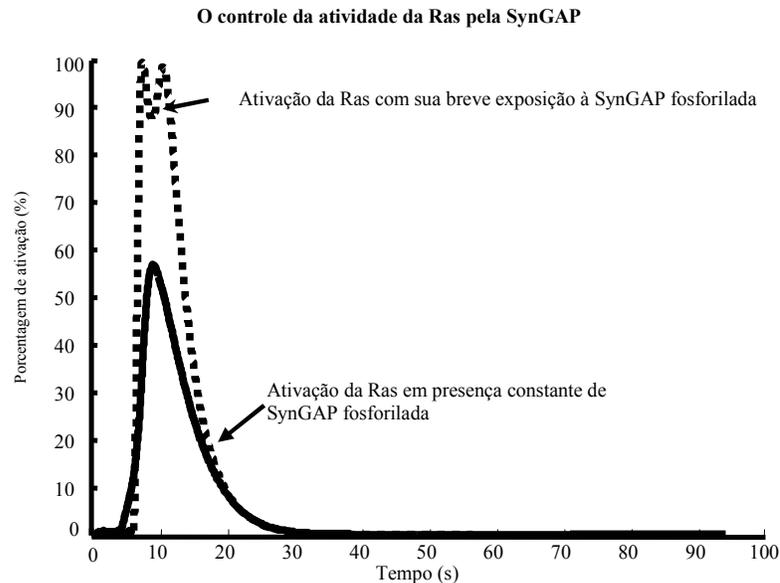


Figura 62: O efeito da SynGAP sobre a atividade da Ras. Para evidenciar o papel inibitório da SynGAP na ativação da Ras, ela foi simulada e, de maneira ilustrativa, o modelo da Ras foi isolado em presença de CaM, Ca^{2+} e Ras-GRF constante. Em uma situação, a SynGAP fosforilada foi mantida continuamente no modelo (curva em preto). Em outra, ela foi introduzida apenas por 5 segundos, ilustrando seu rápido efeito sobre a atividade da Ras.

No modelo de LTP simulado, a presença da SynGAP é um fator que inibe, consideravelmente, a ativação das enzimas que compõem a via da ERK1/2. E esse ponto é

importante para ilustrar que a coordenação temporal entre as enzimas que compõem a LTP é fundamental para sua ocorrência, mas não é o único fator determinante de sua indução e manutenção. Nesse sentido, é importante ressaltar que a organização incorporada no modelo e descritas até o momento são capazes de determinar a ativação da PKA de maneira prolongada, além de favorecerem uma maior ativação da CaMKII, porém, essa ativação não é persistente, fato que é essencial para a LTP. Da mesma maneira, a ativação da ERK1/2 é, até essa etapa do modelo, pequena, o que se deve à ação da SynGAP somada à das MKPs. Porém, ainda em relação a ERK1/2, outros aspectos sobre sua via ainda devem ser considerados.

Entre todas as vias incorporadas no modelo, a da ERK1/2, foi, sem dúvida, a que se mostrou mais trabalhosa, e foi necessário que alguns aspectos de sua regulação que não são normalmente incluídos em esquemas de LTP fossem considerados. O primeiro desses aspectos se refere às enzimas diretamente ativadas pela Ras, a Raf-1.

A Raf-1 é a principal MAPKKK implicada com a ativação, mediada pela MEK1/2, da ERK1/2. No entanto, nos neurônios, a Raf-1 localiza-se, principalmente, no soma e nas regiões adjacentes. Nos dendritos e espinhas dendríticas, a MAPKKK predominante é denominada B-Raf, enzima que atua na ativação de outra proteína MAPK, a p38 (Morice et al., 1999; Pearson et al., 2001; Thomas e Huganir, 2005).

A B-Raf pode ser ativada pela Ras, assim como a Raf-1 (Jaiswal et al., 1994). Além disso, a B-Raf pode ser ativada por outra proteína G monomérica, a Rap (Ohtsuka et al., 1996). A Rap, assim como a Ras, é uma proteína G monomérica e que pertence a subfamília da Ras (Takai et al., 2001). Em diversos tecidos, a Rap e a Ras possuem ação antagônica (Stork, 2003). E, especificamente em processos plásticos, enquanto a Ras é implicada com a LTP, a Rap parece atuar na LTD (Zhu et al., 2002).

A ação da Rap é mediada, principalmente, por uma via específica, a da MAPK p38. Essa via, de maneira análoga a da ERK1/2, é composta por três quinases acopladas em série: a

B-Raf (MAPKKK), as MAPKKs chamadas MKK3 e MKK6, agrupadas, em função de sua homologia, como MKK3/6, e a MAPK p38 (Fig. 63).

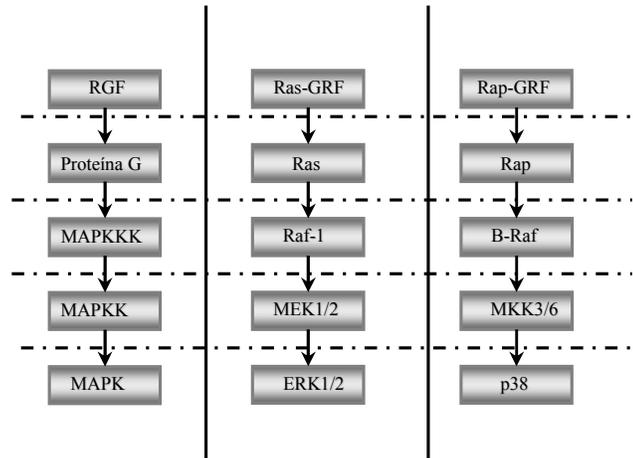


Figura 63: Vias das MAPKs ERK1/2 e p38. Tanto a ERK1/2 quanto a p38 têm sua ativação mediada por proteínas GRF específicas, que ativam as proteínas G monoméricas Ras e Rap. Mas, enquanto a Ras é relacionada com a ativação da ERK1/2, através da Raf-1 e da MEK1/2, a Rap relaciona-se com a ativação da p38, mediada pelas enzimas B-Raf e MKK3/6.

Tanto a p38 quanto a ERK1/2 são encontradas no hipocampo (Lee et al., 2000), região na qual ambas as enzimas atuam em eventos plásticos, mas, enquanto a ERK1/2 insere AMPAs na membrana e causa o aumento do peso sináptico, a p38 media processos de remoção desses receptores (Zhu et al., 2002; Qin et al., 2005). Existem evidências, portanto, que colocam a p38 como uma enzima importante para a ocorrência de LTD. Porém, alguns pontos de sua via de ativação apresentam alta interação com as enzimas que integram a via da ERK1/2, e representam formas alternativas para a sua ativação. Com base nesse fato, alguns desses pontos de interação entre essas vias foram simulados. Mas, como a ativação da ERK1/2 e da p38 é um processo, em alguns níveis, antagônicos, foi importante considerar as principais enzimas que compõem ambas as vias. Ou seja, a via da p38 teve que ser incorporada no modelo. Para isso, portanto, foi necessário considerar a ação da proteína G monomérica que determina sua ativação, a Rap.

Em eventos plásticos no hipocampo, a ativação da Rap está associada sobretudo com a via da PKA (Grewal et al., 2000). Sabe-se que a PKA pode fosforilar diretamente a Rap, porém, essa fosforilação não resulta em sua ativação (Altschuler et al., 1995). Recentemente, foi descoberta uma classe de enzimas que age como GAP para a Rap e é ativada por AMPc. Mas essa família de proteínas, denominada EPACs (*exchange proteins directly activated by cAMP*), concentra-se principalmente na membrana perinuclear e não estão implicadas com a ação da Rap sobre a B-Raf (Wang e al., 2006). Assim, aparentemente, a PKA media a ativação da Rap por outro mecanismo envolvendo, diretamente, a fosforilação de um proteína tirosina quinase, a Src que, fosforilada, recruta, através da mediação da proteína adaptadora Crk, e ativa a C3G, que é uma enzima com ação específica de Rap-GAP (Tanaka et al. 1994; van den Bergher et al., 1997; Ichiba et al., 1999; van den Bergher et al., 1999; Grewal et al., 2000; Schmitt e Stork, 2002a; Obara et al., 2007). Cabe ressaltar que, embora a fosforilação da proteína Src por outras enzimas esteja implicada com rotas diferentes de ativação da Ras, sua fosforilação pela PKA não causa esse efeito e age exclusivamente sobre a Rap (Schmitt e Stork, 2002b; Obara e al., 2004). Dessa maneira, a simulação desse processo foi feita com base na fosforilação da Src pela PKA, seguida pelo recrutamento da C3G e a ativação da Rap. Uma vez ativa, a Rap ativa a B-Raf, que age sobre a MKK3/6 que, por sua vez, fosforila e ativa a p38 (Fig. 64).

Após o desenvolvimento do modelo dessa via, ele foi unificado com a via da ERK1/2 considerando os seguintes pontos de cruzamento: a B-Raf, além de ativar a MKK3/6, ativa a MEK1/2 (Moodie et al., 1994; Catling et al., 1994; Reuter et al., 1995), por sua vez, a B-Raf pode ser ativada também pela Ras e pela Rap, enquanto a Raf-1 é ativada pela Ras e inibida pela Rap (Jaiswal et al., 1994; Hu et al., 1997) (Fig. 65).

Esses pontos de cruzamento, mostrados na Fig. 65, foram inseridos no modelo desenvolvido, porém, de maneira simplificada, já que não há parâmetros disponíveis sobre as

enzimas que constituem a via da p38, nem sobre os pontos em que as duas vias, a da p38 e a da ERK1/2, se intercalam. Em função disso, ambas as vias foram simuladas com taxas iguais para a ativação sequencial das três quinases que compõem cada uma e, para os pontos de cruzamento, foi assumido que as reações de fosforilação ocorrem com uma taxa catalítica 50% menor, já que essas interações, teoricamente, não constituem as principais reações dessas enzimas. Além disso, a Rap também é inibida pela SynGAP, o que também foi simulado (Krapivinsky et al., 2004).

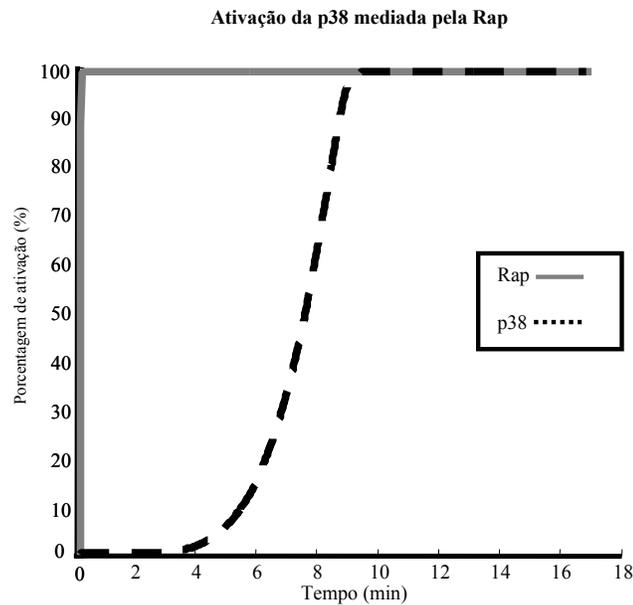


Figura 64: A simulação da ativação da p38 mediada pela Rap. A via da p38 possui, como principal forma de ativação, a ação da proteína G monomérica Rap. Uma vez ativa, as enzimas que integram a via da p38 tem a atividade altamente coordenada com as da via da ERK1/2. Por esse motivo, foi importante simular a via da p38 no modelo desenvolvido nesse trabalho. Alguns resultados iniciais obtidos com a simulação dessa via são mostrados acima, onde é possível observar a ativação da p38 em decorrência da ativação prévia, mediada pela PKA, da Rap.

Essas vias, após a terem sido simuladas de maneira coordenada, foram estimuladas, de maneira isolada dos demais componentes do modelo, por um breve trem de 100 Hz de Ca^{2+} . Assim, como é demonstrado na Fig. 66, para a estimulação das vias da p38 e da ERK1/2 integradas, com o uso de um trem de 100 Hz de Ca^{2+} , houve a ativação igual das proteínas

p38 e ERK1/2. Esse fato se explica, provavelmente, pelo alto grau de biestabilidade que há nas vias da ERK1/2 e da p38, e que determina uma grande porcentagem de ativação de ambas as enzimas, mesmo em função de breves estimulações (Huang e Ferrel, 1996; Ferrel, 2002). Certamente, o uso de parâmetros que não foram estimados experimentalmente para a simulação da via da p38 pode ter contribuído para o resultado observado. Mesmo variando-se a concentração dos componentes dessa via e algumas de suas taxas catalíticas, os resultados obtidos para a situação simulada na Fig. 66 foram os mesmos. No entanto, esse aspecto ressalta ainda mais que a integração temporal observada nas moléculas que compõem a LTP é responsável por uma parte de sua ocorrência, mas outros fatores devem operar.

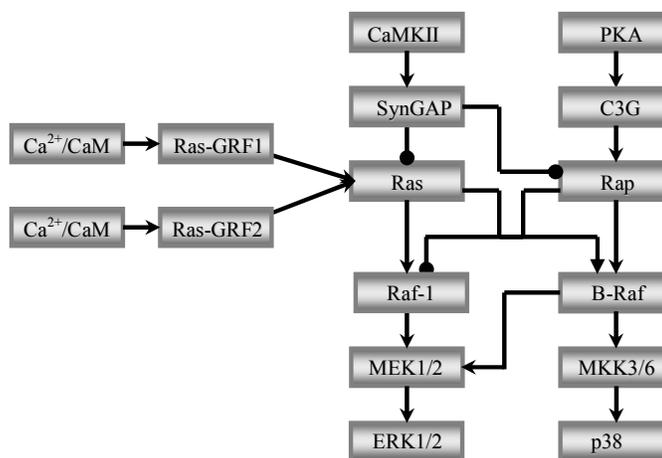


Figura 65: Modelo integrado das vias da ERK1/2 e da p38. A ativação das duas vias envolve o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} que determina a ativação da Ras mediada pelas proteínas Ras-GRF1 e Ras-GRF2 ativadas, por sua vez, através de sua associação de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Já a ativação da Rap ocorre por meio da PKA, que fosforila a proteína Src que determina, por sua vez, a ativação da C3G, enzima que catalisa a ativação da Rap. Uma vez ativas, a Ras e a Rap ativam a B-Raf. Além disso, a Rap ativa a Raf-1, que é inibida pela Rap. A B-Raf representa um importante ponto de cruzamento e é responsável, diretamente, pela ativação da ERK1/2, através da MEK1/2, e da p38, através da MKK3/6.

E isso fica evidente quando o modelo, alterado para incluir os pontos de coordenação temporal descritos ao longo dessa sessão, é estimulado por 100Hz de 1 mmol.L^{-1} de L-glutamato por 1 s (Fig. 67).

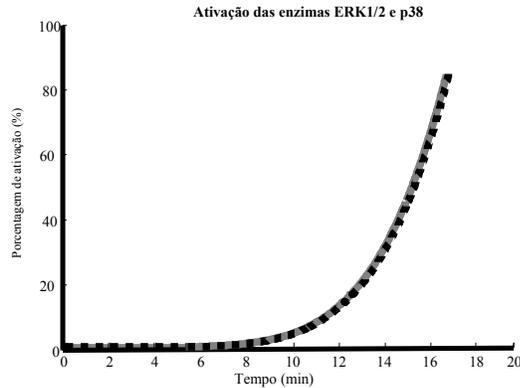


Figura 66: A ativação da ERK1/2 e da p38 para um trem de 100 Hz de Ca^{2+} . Após as vias da p38 e da ERK1/2 terem sido simuladas, elas foram unificadas através dos pontos de integração da atividade de alguns de seus componentes. Com essa integração, a estimulação do modelo com 1 trem de Ca^{2+} com 100 Hz de frequência, $10\mu\text{mol. L}^{-1}$ por pulso e 1 s de tempo total de estimulação, resultou em uma ativação igual das duas enzimas finais das vias, ou seja, da ERK1/2 e da p38.

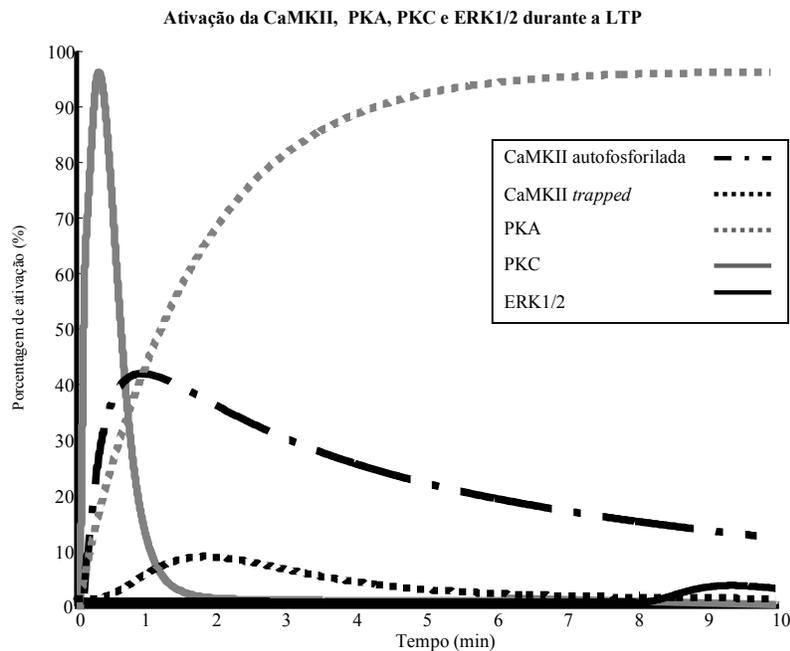


Figura 67: Ativação das enzimas essenciais da LTP, considerando a presença dos mecanismos de amplificação de sinal, coordenação e integração entre a atividade de algumas de suas moléculas, em função de 1 s de estimulação por pulsos de 1 mol.L^{-1} de L-glutamato simulados com 100Hz de frequência. Como foi discutido, a LTP inicial hipocampal é caracterizada por apresentar uma ampla coordenação temporal na atividade de algumas de suas enzimas. Essa integração, embora esteja envolvida com a sua ocorrência, não é capaz de produzir a ativação, em grande porcentagem, da CaMKII e da ERK1/2, enzimas que atuam de maneira fundamental nesse processo. A CaMKII, porém, apresenta uma porcentagem de ativação maior nessa situação, em comparação com os dados obtidos para o mesmo protocolo de estimulação, mas sem considerar a ação coordenada entre as vias simuladas (Fig. 53).

Assim, como mostrado na Fig. 67, mesmo com a inclusão dos pontos de integração descritos anteriormente, o modelo continua sem apresentar ativação persistente da CaMKII e da ERK1/2. Dessa maneira, é necessário considerar outros fatores que determinam a ocorrência de LTP. Inúmeros fatores podem contribuir para isso, no entanto, para a LTP inicial hipocampal, um requerimento específico se destaca: a atuação essencial dos receptores NMDA.

4.4 O NMDA, a compartimentalização bioquímica e a integração espaço-temporal da LTP

Um fato central para a LTP hipocampal é que ela é NMDA-dependente. Existe apenas um protocolo específico, composto por 3-4 trens de pulsos com 200Hz de frequência de estimulação elétrica no colateral de Schaffer, que pode ocorrer sem a participação do NMDA, e utiliza, como origem de Ca^{2+} para o meio intracelular, canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem (Grover e Tyler, 1990). Todos os demais protocolos de indução de LTP inicial hipocampal requerem a ativação dos receptores NMDAs (Collingridge, 1983a; Bliss e Collingridge, 1993; Malenka e Nicoll, 1993).

A dependência da ativação de receptores NMDA para a ocorrência da LTP é explicada, principalmente, em função de sua atuação como principal fonte de Ca^{2+} para o meio intracelular (Lynch et al., 1983; Nowak et al., 1984), mas ela também se relaciona com características específicas apresentadas por um heterômero do NMDA, o NR1/NR2A (Köhr et al., 2003; Liu et al., 2004; Berberich et al., 2007). Ou seja, a LTP é dependente do NMDA, e, especificamente, do heterômero NR1/NR2A (Liu et al., 2004; Erreger et al., 2005).

O NR1/NR2A é o heterômero do NMDA mais abundante na zona sináptica, enquanto o NR1/NR2B concentra-se, principalmente, nas regiões extra-sinápticas (Stocca e Vicini, 1998; Tovar e Westbrook, 1999; Coltrap et al., 2005; Janssen et al., 2005). No entanto, não

há uma segregação absoluta entre esses receptores (Cull-Candy et al., 2001; Thomas et al., 2006). Os dados atuais apontam para uma população sináptica de NMDAs composta por 60-70% dos receptores NR1/NR2A, enquanto o restante é constituído por receptores NR1/NR2B e, possivelmente, por um terceiro tipo, formado pelas subunidades NR1/NR2A/NR2B (Cull-Candy et al., 2001; Yoshimura et al., 2004; Janssen et al., 2005; Thomas et al., 2006). É importante enfatizar que, independente dos heterômeros considerados, as populações de AMPAs e de NMDAs são, em média, pequenas (Watanabe et al., 1998; Racca et al., 2000; Sheng e Hoogenraad; 2007). E, enquanto o AMPA pode variar muito em quantidade, em função da atividade sináptica, o NMDA é, numericamente, uma população estável (Nusser et al., 1998; Cotrell et al., 2000; Racca et al., 2000; Tardin et al., 2003).

Independente do tamanho de sua população, o NMDA é fundamental para a LTP hipocampal por ser a principal fonte de Ca^{2+} para o meio intracelular (Bliss e Collingridge, 1993; Malenka e Nicoll, 1993). Mas, além disso, o fato da LTP requerer, especificamente, a participação do NR1/NR2A indica que outras características desses receptores são importantes para a sua atuação nesse processo (Liu et al., 2004; Erreger et al., 2005; Berberich et al., 2007). Nesse sentido, um ponto que foi analisado nesse trabalho foi qual é, exatamente, o comportamento de cada heterômero do NMDA simulado durante a indução de LTP.

A partir do momento que, na literatura, foi reportado que a LTP é dependente, especificamente, do NMDA NR1/NR2A, a primeira hipótese levantada por muitos autores para explicar esse requerimento baseou-se na quantidade total de Ca^{2+} que deve fluir por cada heterômero presente na região sináptica dos neurônios piramidais hipocampais. Ou seja, partindo-se do fato de que o NMDA NR1/NR2A e o NR1/NR2B distribuem-se de maneira desigual entre as zonas sinápticas e extra-sinápticas e, além disso, apresentam taxas de ativação, desativação e dessensibilização distintas, a quantidade de Ca^{2+} que flui pelo canal ligado a cada um desses heterômeros é diferente. Nesse sentido, acredita-se que o NR1/NR2A

é requerido para a LTP por que é através dele que entra a maior parte do Ca^{2+} que irá induzir, intracelularmente, a ativação das vias que participam desse processo (Erreger et al., 2005; Berberich et al., 2007).

Para verificar a participação exata de cada heterômero do NMDA o modelo de LTP inicial construído, que contém na zona sináptica, 65% do total de receptores do tipo NR1/NR2A e, o restante, NR1/NR2B, foi estimulado com pulsos de 1 mol.L^{-1} de L-glutamato liberados com 100 Hz de frequência, durante 1 s. Nessa situação, as vias de sinalização simuladas foram, inicialmente, suprimidas do modelo, para que fosse possível observar apenas a variação na concentração de Ca^{2+} mediada por cada tipo de NMDA simulado. O resultado, mostrado na Fig. 68, indica a contribuição exata de cada receptor para o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} . Assim, é possível observar que o NMDA NR1/NR2A determina o influxo de Ca^{2+} maior, em função de sua taxa de ativação elevada e a sua densidade de canais superior na zona sináptica. No entanto, o NR1/NR2B permanece aberto por mais tempo e é responsável pelo prolongamento do período total do aumento na concentração de Ca^{2+} no meio intracelular.

Em seguida a essa verificação, as vias de ativação das quinases essenciais para a LTP, organizadas como no esquema apresentado na Fig. 41, que não contém fosfatases e outras enzimas que atuam na inativação das moléculas que integram a LTP, foram inseridas no modelo do neurônio desenvolvido e foi feita a discriminação da origem de Ca^{2+} para as suas ativações. Ou seja, metade da concentração total de cada enzima considerada passou a ser ativada, no modelo, pelo Ca^{2+} que flui por apenas um dos heterômeros de NMDA simulados, com a intenção de se analisar, exatamente, qual é a diferença na porcentagem de ativação desses componentes bioquímicos em função dos dois padrões de influxo de Ca^{2+} mediados pelos tipos de receptores NMDA.

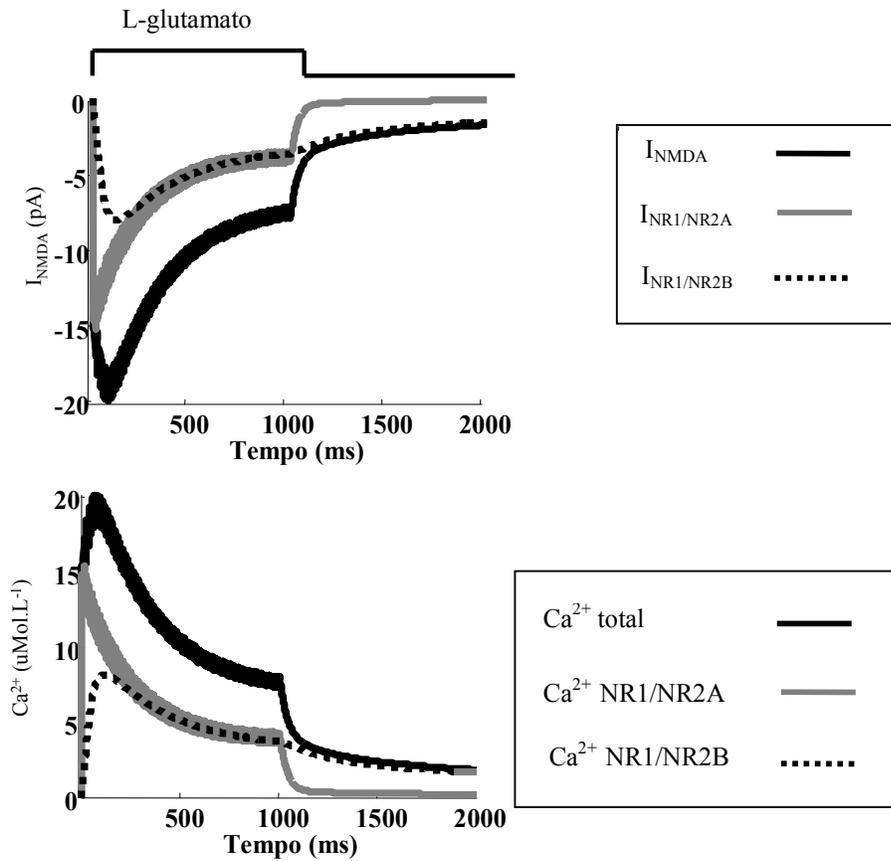


Figura 68: Contribuições específicas do NMDA NR1/NR2A e NR1/NR2B para o aumento de Ca^{2+} no meio intracelular. Para verificar as possíveis causas da seletividade da LTP no requerimento da ativação do NMDA NR1/NR2A, o modelo foi alterado para incorporar a contribuição exatada de cada subtipo de NMDA na indução da LTP. Na zona sináptica, os heterômeros NR1/NR2A correspondem a cerca de 65% do total de NMDAs, o que foi considerado no modelo. O restante de receptores foi simulado como heterômeros NR1/NR2B. Com essa composição, a indução de LTP gera um influxo de Ca^{2+} maior, em magnitude, mediado pelos NMDAs NR1/NR2A.

Como é possível observar na Fig. 69, há, de fato, uma ativação maior de algumas enzimas essenciais para a LTP em função do Ca^{2+} que entra, exclusivamente, através do NR1/NR2A. Mas essa ativação não é tão significativa a ponto de explicar a dependência da LTP pela ativação do NR1/NR2A. Ou seja, embora haja uma ativação maior das enzimas simuladas pelo Ca^{2+} que flui através do heterômero NR1/NR2A, essa diferença, quando não há fosfatases no modelo, não é intensa o ponto justificar o requerimento apenas desse tipo de NMDA.

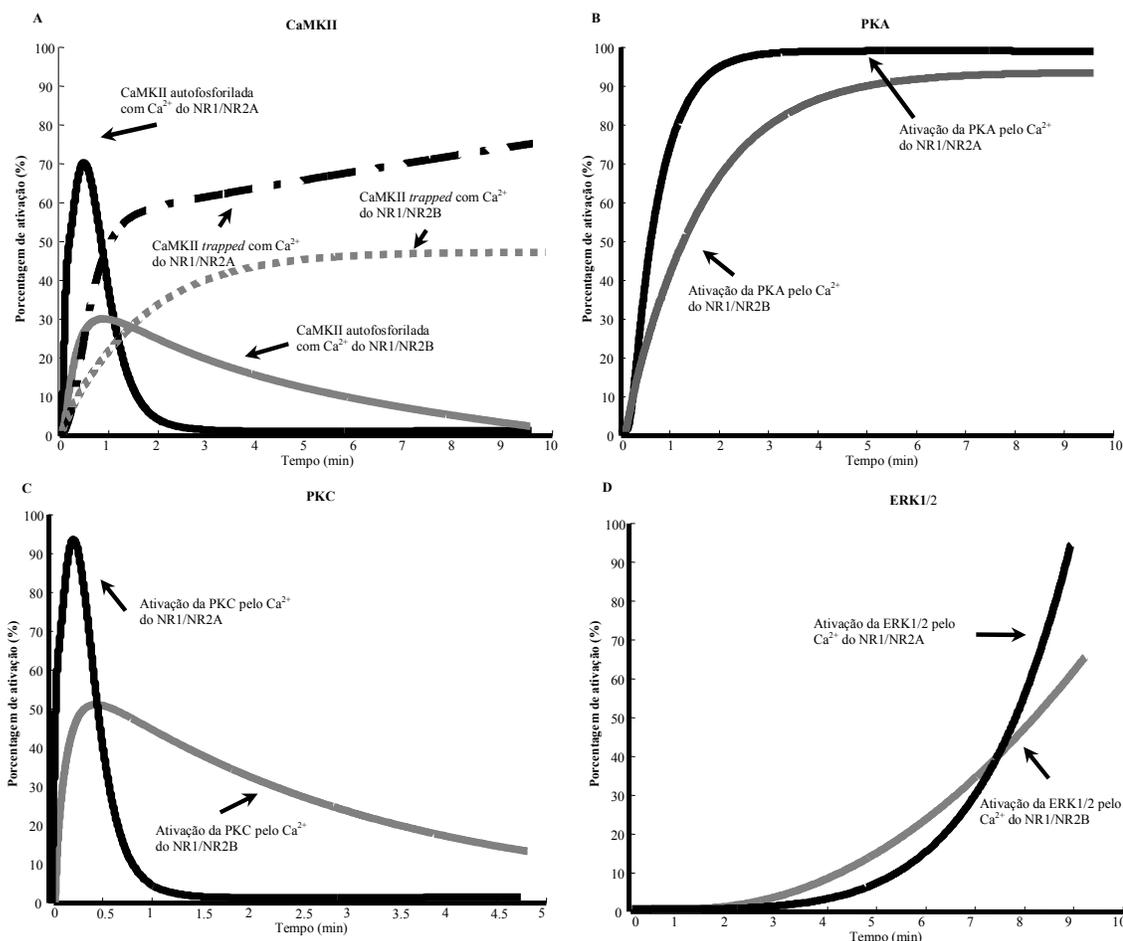


Figura 69: A ativação das enzimas CaMKII, PKA, PKC e ERK1/2 em função do Ca^{2+} que entra para o meio intracelular pelos diferentes heterômeros de NMDA simulados. Para a obtenção desses resultados, as vias simuladas foram incorporadas no modelo do neurônio piramidal desenvolvido, sem considerar, no entanto, a presença de fosfatases e demais proteínas que atuam na inibição de suas ativações. Metade da concentração de cada molécula incorporada nesse modelo recebeu Ca^{2+} provindo apenas de um dos heterômeros de NMDA simulados. Como pode ser observado, a CaMKII (A) responde com uma porcentagem de ativação maior para o Ca^{2+} provindo do NMDA NR1/NR2A, em comparação com sua ativação em função do Ca^{2+} do NR1/NR2B. O mesmo resultado foi obtido para a ativação da PKC (C), no entanto, a PKA exibiu ativação similar para o Ca^{2+} dos dois heterômeros de NMDA considerados (B). Já a ERK1/2, apresentou uma porcentagem de ativação em um intervalo de tempo menor em função do Ca^{2+} que flui através do NR1/NR2A, porém, sua ativação em estado-estável foi a mesma independente da origem do Ca^{2+} considerada. Vale ressaltar que, nesses gráficos, a porcentagem máxima de ativação se refere apenas a concentração total de proteínas acoplada com cada receptor NMDA, que é 50% de sua concentração total.

Porém, quando se considera o modelo da LTP desenvolvido, contendo as quinases, fosfatases e demais enzimas já organizadas de maneira integrada, se evidencia que há uma contribuição maior do NR1/NR2A para a LTP, pois, por sua taxa de abertura mais rápida e

maior densidade de canais, ele favorece a ativação das enzimas essenciais desse processo (Fig. 70).

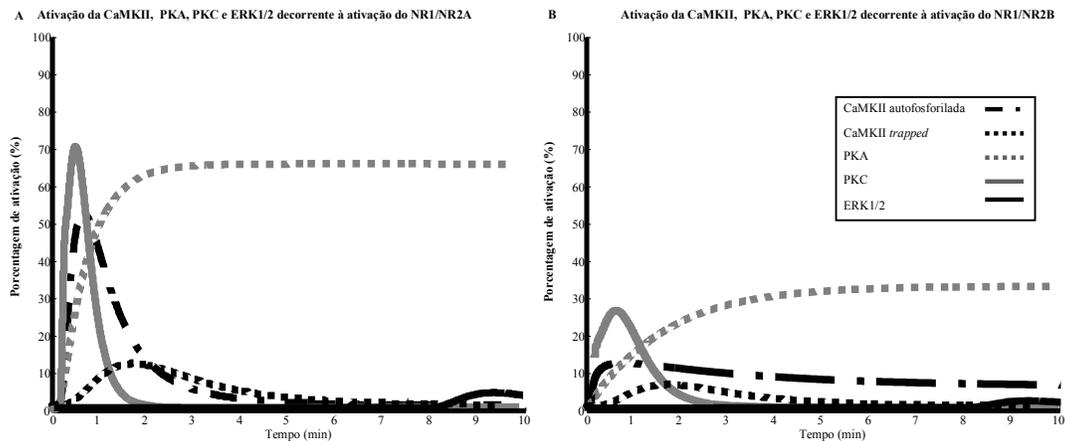


Figura 70: A ativação das enzimas CaMKII, PKA, PKC e ERK1/2 em função do Ca^{2+} que entra para o meio intracelular pelos diferentes heterômeros de NMDA simulados, considerando a presença das fosfatases e demais moléculas que contribuem para a inativação dessas quinases. Para a obtenção desses resultados, as vias simuladas foram inseridas no modelo do neurônio piramidal desenvolvido, e metade da concentração de cada molécula recebeu Ca^{2+} provindo apenas de um dos heterômeros de NMDA simulados. Como pode ser observado, o Ca^{2+} provindo do NMDA NR1/NR2A (A) promoveu uma ativação maior de todas as quinases essenciais para a ocorrência de LTP. Vale ressaltar que, nesses gráficos, a porcentagem máxima de ativação se refere apenas a concentração total de proteínas acoplada com cada receptor NMDA, que é 50% de sua concentração total.

Além do papel do NR1/NR2A em proporcionar uma ativação maior das enzimas da LTP em função do influxo de Ca^{2+} , outras características desse heterômero determinam que ele tenha uma atuação fundamental na mediação da ativação das enzimas requeridas para esse evento. E, entre essas características, se destaca o seu papel na compartimentalização bioquímica.

No meio intracelular, o NMDA é, sobretudo, um organizador espacial, e isso se deve a sua interação com um grande número de proteínas, formando complexos altamente especializados na densidade pós-sináptica (Husi et al., 2003). A densidade pós-sináptica é uma pequena estrutura, constituída por filamentos de actina e outros componentes do citoesqueleto, além de uma grande concentração protéica (Sheng e Hoogenraad, 2007). Entre

as proteínas da região da densidade pós-sináptica, estão as proteínas adaptadoras, que possuem domínios especializados para a interação proteína-proteína, destacando-se os domínios PDZ. É a presença dessas proteínas que permite a organização precisa da densidade pós-sináptica através da formação dos complexos multiprotéicos (Peng et al., 2004; Yoshimura et al., 2004; Petralia et al., 2005).

As proteínas adaptadoras da densidade pós-sináptica são divididas em grupos, de acordo com sua composição multi-domínios. A principal classe de proteínas adaptadoras da densidade pós-sináptica é denominada MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*), e seus membros contém diversos domínios PDZ, um domínio SH3 (*Src-homology domain*) e um domínio guanilato quinase inativo. A proteína MAGUK mais abundante é a PSD-95 (*Post-Synaptic Density 95*), que constitui 73% do total de proteínas PDZ da densidade pós-sináptica (Cheng et al., 2006; Sheng e Hoogenraad, 2007).

Para a LTP, a informação mais relevante sobre essas proteínas MAGUKs é a seguinte: elas são moléculas constituídas, normalmente, por múltiplos domínios PDZ. Esses domínios são classificados em subtipos (PDZ1, PDZ2, PDZ3,...), que se associam com proteínas específicas (Hung e Sheng, 2002). Geralmente, uma proteína MAGUK é formada por inúmeros domínios PDZs, sendo cada um de um tipo diferente. Assim, elas atuam na densidade pós-sináptica posicionando moléculas específicas lado a lado (Nourry et al., 2003).

Entre as principais proteínas que interagem com as MAGUKs estão as subunidades dos receptores NMDA. O NMDA interage com a PSD-95 através da associação de sua subunidade NR2 (A, B, C ou D), com o primeiro domínio PDZ da PSD-95. E, em função da grande abundância de PSD-95 em comparação com a quantidade de NMDAs (relação de 20:1), a maior parte desses receptores está interagindo com a PSD-95 permanentemente (Watanabe et al., 1998; Yoshimura et al., 2004). Essa interação é importante pois a PSD-95 forma dímeros e se associa com outras proteínas adaptadoras, gerando grandes complexos ao

redor do NMDA, e que são ativado preferencialmente quando há a entrada de Ca^{2+} na célula. Nesse sentido, é necessário considerar que há uma grande distinção entre as proteínas encontradas nos complexos protéicos dos receptores NR1/NR2A e NR1/NR2B (Köhr e al., 2003; Lim et al., 2003).

O heterômero NR1/NR2B é especialmente seletivo e mantém, ao seu redor, a CaMKII e duas moléculas vitais para a via da ERK1/2: a Ras-GRF1 e a SynGAP. Além delas, há ainda a própria ERK1/2, suas fosfatases, e algumas proteínas tirosina quinases que estão implicadas com a fosforilação do NMDA (Husi et al., 2003; Nourry et al., 2003; Skeberdis et al., 2006). Com essa organização, a atuação do NMDA na organização espacial das vias da LTP é bastante relevante, sobretudo para a ativação da ERK1/2 (Kim et al., 2005; Waxman e Lynch; 2005; Ivanov et al., 2006; Li et al., 2006; Rockliffe e Gawler, 2006). Ou seja, como foi mencionado, o NR1/NR2B posiciona, ao seu redor, as enzimas Ras-GRF1, CaMKII e SynGAP, mediando, simultaneamente, a ativação e inibição da Ras. Além disso, há, nesse complexo, a proteína STEP (*Striatal enriched tyrosine phosphatase*), que é uma tirosina fosfatase implicada com a inativação da ERK1/2, além de fosfatases MKP (Braithwaite et al., 2006). Com isso, os heterômeros NR1/NR2B, em função de seu padrão de influxo de Ca^{2+} e da organização espacial imposta para algumas proteínas, são implicados especialmente com a LTD e com a inativação da via da ERK1/2 (Liu et al., 2004; Ivanov et al., 2006; Li et al., 2006). Já o NR1/NR2A, que é envolvido com a LTP, ativa apenas a enzima Ras-GRF2, sem ativar, portanto, a SynGAP e outras enzimas responsáveis pela inibição da ERK1/2 (Kennedy et al., 2005; Li et al., 2006). Dessa maneira, esse heterômero relaciona-se apenas com a ativação da via da ERK1/2 (Li et al., 2006). Com o requerimento da via da ERK1/2 para a LTP, esse é um ponto muito relevante para a diferenciação do papel dos heterômeros do NMDA para a LTP e outras formas de plasticidade sináptica.

Com base na relevância desses aspectos, o modelo teve que ser adaptado para fazer a diferenciação da origem de Ca^{2+} , mas agora não mais apenas para saber qual a porcentagem de contribuição de cada heterômero para a ativação das moléculas essenciais da LTP. Ou seja, essa nova alteração já incorporou no modelo, exatamente, que moléculas são ativado por qual NMDA. Assim, de acordo com os dados existentes, a CaMKII pode ser ativada pelos dois, enquanto a SynGAP e a Ras-GRF1 são apenas pelo NR1/NR2B, de maneira similar a o que ocorre com a NOS. Já a Ras-GRF2 é ativada exclusivamente pelo NR1/NR2A, mediando a ativação da via da ERK1/2 sem a interferência da SynGAP. As demais proteínas do modelo são ativadas pelo Ca^{2+} restante, ou seja, o Ca^{2+} que entra no meio intracelular pelos dois NMDAs e que não é utilizado para ativação das enzimas posicionadas diretamente em seus complexos multiprotéicos, ou ainda pelo Ca^{2+} que é liberado das vesículas intracelulares. Com base nessas incorporações, a ERK1/2 passou a ser ativada em grande porcentagem no modelo, em função, principalmente, da discriminação da origem do Ca^{2+} para a ativação das enzimas que integram a sua via (Fig. 71).

A localização espacial precisa de algumas enzimas é uma propriedade dos neurônios fundamental para que a LTP ocorra. E, em função dessa relevância, a maior parte das moléculas encontra-se localizadas em pontos estratégicos das espinhas dendríticas. Para isso, elas podem interagir com o NMDA, com outros receptores, com a membrana, com proteínas adaptadoras, ou ainda, com ancoradoures.

Durante a LTP a ERK1/2 é posicionada em locais específicos da célula através da sua interação com as proteínas que integram sua via, e, também, com inúmeras proteínas adaptadoras (Ebisuya et al., 2005). Já a PKC é mantida posicionada, principalmente, através de sua associação direta com a membrana celular (Sweatt, 2003). A PKA, porém, possui uma classe específica de ancoradoures, composta pelas proteínas AKAPs (*A-kinase anchoring*

proteins), cujo papel para a LTP é fundamental (Dell'Acqua e Scott, 1997; Dell'Acqua et al., 2006).

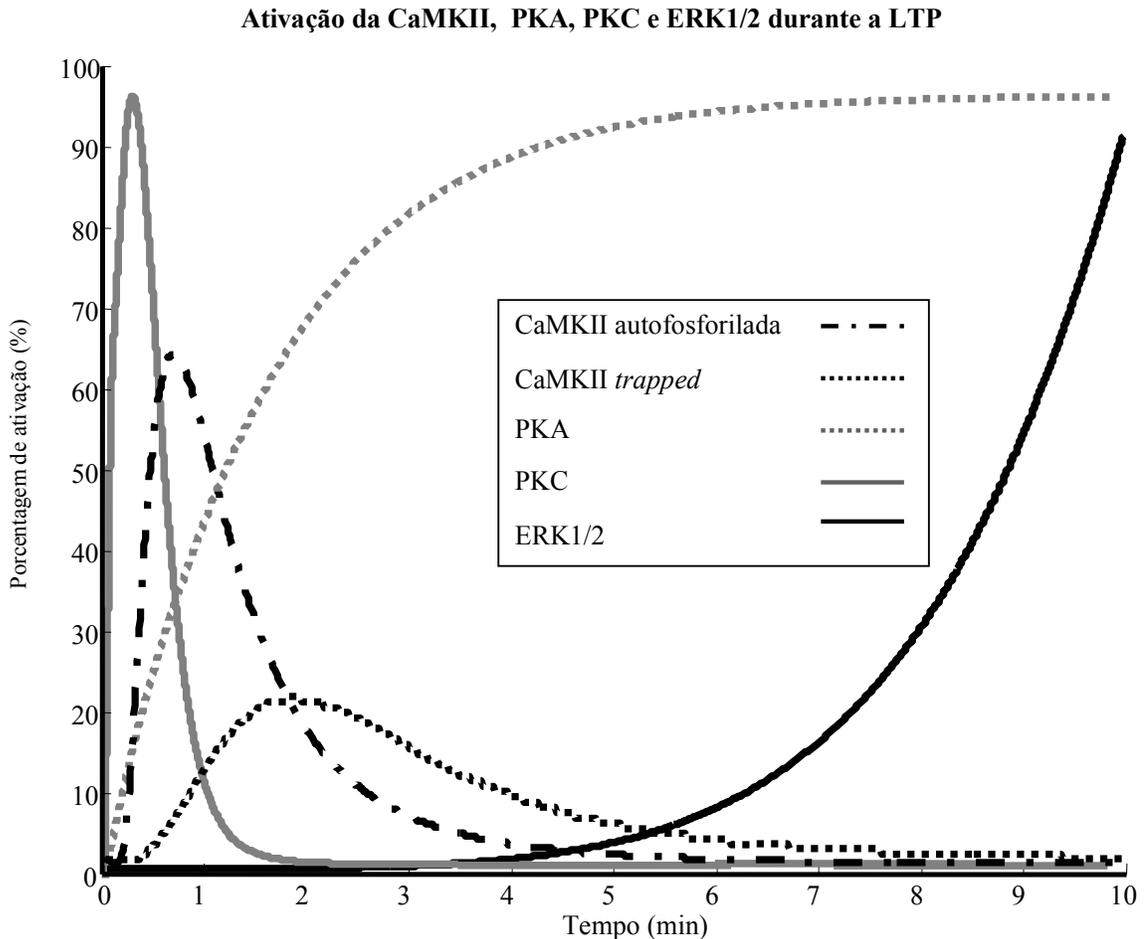


Figura 71: Ativação das enzimas essenciais da LTP quando se considera sua integração temporal e a distinção na fonte de Ca^{2+} que atua na ativação específica de cada molécula. A LTP é um processo que requer, além de coordenação temporal entre algumas proteínas, uma organização espacial precisa, que atua possibilitando a sua ocorrência através do favorecimento da ativação de algumas proteínas. E essa organização é especialmente relevante para a ERK1/2, que é ativada, nesse processo, através de seu posicionamento junto ao heterômero NR1/NR2A. Esse posicionamento favorece sua ativação pois a mantém isolada de enzimas que atuam em sua inativação. Dessa maneira, a incorporação desses processos no modelo de LTP inicial desenvolvido resultou na obtenção de uma grande porcentagem de ativação da ERK1/2.

Existem diversas AKAPs, porém, no hipocampo, apenas um tipo é encontrado em maior quantidade e está diretamente implicado com a ocorrência de LTP e LTD: a AKAP79/150. As AKAP79/150s se associam diretamente à subunidade R da PKA e, através

de interações hidrofóbicas com a camada lipídica, a posiciona na membrana da densidade pós-sináptica. As AKAP79/150s também interagem com proteínas PDZ e localizam a PKA diretamente ao lado dos receptores AMPAs e NMDA, entre outros alvos (Bregman et al., 1989; Dell'Acqua e Scott, 1997; Dell'Acqua et al., 2006; Smith et al., 2006). Dessa maneira, estabelece-se um microdomínio, no qual a PKA, em seu estado ativo, atua sobre o substrato imediatamente adjacente a ela. Em adição a isso, geralmente, a AKAP79/150 localiza a PKA próxima às enzimas AC e, por criar um impedimento estérico, dificulta a ação das PDEs na degradação de AMPc. Assim, há um direcionamento da ação e uma preservação da ativação da PKA associada a AKAP79/150.

Mas a ação das AKAPs79/150 não se restringe apenas à PKA. Um fato importante sobre as AKAP79/150s é que elas atuam com âncoras para a PKA e, simultaneamente, para a calcineurina, posicionando quinase e fosfatase lado a lado (Oliveria et al., 2003). No entanto, as AKAPs inibem cerca de 90% da atividade catalítica da calcineurina, favorecendo, portanto, a atuação da PKA (Dell'Acqua et al., 2002). Com base nesses aspectos, e na concentração de AKAP79/150, é possível afirmar que, durante a LTP, a maior parte da calcineurina está parcialmente inibida. Em função desse ponto, a interação entre a AKAP79/150, a calcineurina e a PKA foi simulada, fato que determinou, no modelo, a diminuição da ação dessa fosfatase (Fig. 72). Vale lembrar que, no modelo, a calcineurina atua, entre outras coisas, na inibição indireta da CaMKII. Dessa maneira, a simulação da presença da AKPA79/150 contribui para a ativação persistente da CaMKII.

O posicionamento da calcineurina pelas AKAPs é importante, pois impede, localmente, sua ação. Da mesma maneira, o ancoramento da PKA favorece sua atuação em alvos presentes nas regiões próximas às AKAPs. E esse fato é importante, pois apenas posicionada pela AKAP79150 é que a PKA fosforila o AMPA (Dell'Acqua et al., 2006).

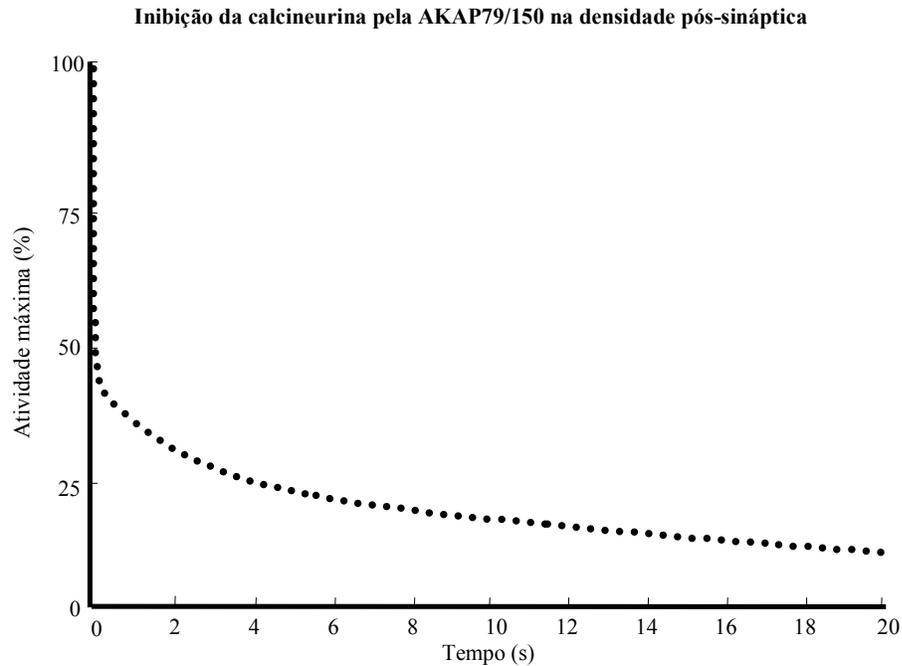


Figura 72: A inibição da calcineurina através de sua interação com a AKAP79/150. No modelo construído, a principal função da AKAP79/150 foi inibir a calcineurina, reduzindo sua atividade catalítica para apenas 10% em comparação com sua forma livre. Dessa maneira, a calcineurina, mesmo que se encontre próxima à seus substratos, tem sua atuação bastante limitada.

No meio intracelular, cada uma das quinases que atuam na LTP possui uma grande gama de alvos de ação. Nesse sentido, a simples ativação dessas enzimas não determina a ocorrência de LTP. Ou seja, para a LTP ocorrer, é necessário que a PKA, a PKC, a ERK1/2 e a CaMKII sejam ativadas e que atuem sobre substratos específicos, destacando-se, entre eles, o AMPA. Porém, o AMPA não é um bom substrato para a maioria dessas quinases, apesar de ser fosforilado em decorrência da LTP (Barria et al., 1997; Benke et al., 1998; Lee et al., 1998; Dingledine et al., 1999). E esse fato indica que a LTP possui não apenas mecanismos de ativação que determinam a ativação preferencial e algumas enzimas, mas também que direcionam seu alvo de atuação. Ou seja, a PKA, ancorada pela AKAP, fosforila, principalmente, o AMPA (Dell'Acqua et al., 2006). Da mesma maneira, na densidade pós-sináptica, a PKC age sobre esse receptor (Boehm et al., 2006). A ERK1/2, embora possua uma grande gama de substratos nas espinhas dendríticas, não fosforila, diretamente, o AMPA

(Dingledine et al., 1999). No entanto, ela atua em sua inserção na membrana, o que implica que, certamente, sua ação catalítica tem como alvo outras moléculas que mediam esse processo. Já a CaMKII, que está relacionada com a estabilização do AMPA na zona sináptica, precisa estar posicionada em locais específicos para atuar sobre esse receptor, fato que é observado durante a LTP.

A CaMKII não interage nem com as AKAPs e nem com a membrana, mas é a quinase mais abundante da densidade pós-sináptica (Petersen et al., 2003; Yoshimura et al., 2004; Chen et al., 2005). Da mesma forma, é a quinase encontrada em maior concentração no citoplasma dos neurônios piramidais da área CA1 (Erundo e Kennedy, 1985). No entanto, para a LTP, sua ação na densidade pós-sináptica é mais importante. E, para favorecer essa ação, a indução de LTP causa a rápida translocação da CaMKII do citoplasma para a densidade pós-sináptica (Strack et al., 1997b; Yoshimura e Yamauchi, 1997; Otmakhov et al., 2006).

A translocação da CaMKII tem diversas conseqüências. Uma delas é que a enzima deixa de ser substrato da PP2A (Strack et al., 1997a). A razão exata para esse fato não é conhecida, especula-se, no entanto, que a CaMKII, na densidade pós-sináptica, mude sua conformação. A PP1, outra enzima que inativa a CaMKII, é encontrada na densidade pós-sináptica, mas em concentrações muito abaixo das requeridas para desfosforilar toda a CaMKII concentrada na região (Bayer e Schulman; 2001; Lisman et al., 2002). Assim, a CaMKII na densidade pós-sináptica é muito mais resistente à inativação.

Com base na relevância da translocação da CaMKII para a manutenção de sua atividade, esse processo foi inserido no modelo de LTP inicial desenvolvido. Para isso, foram criadas duas espécies de CaMKII diferenciadas em função de sua localização: citoplasmática ou na densidade pós-sináptica. E, uma vez autofosforilada, a CaMKII citoplasmática migra para a densidade pós-sináptica onde permanece, persistentemente, ativada (Fig. 73).

Translocação da CaMKII

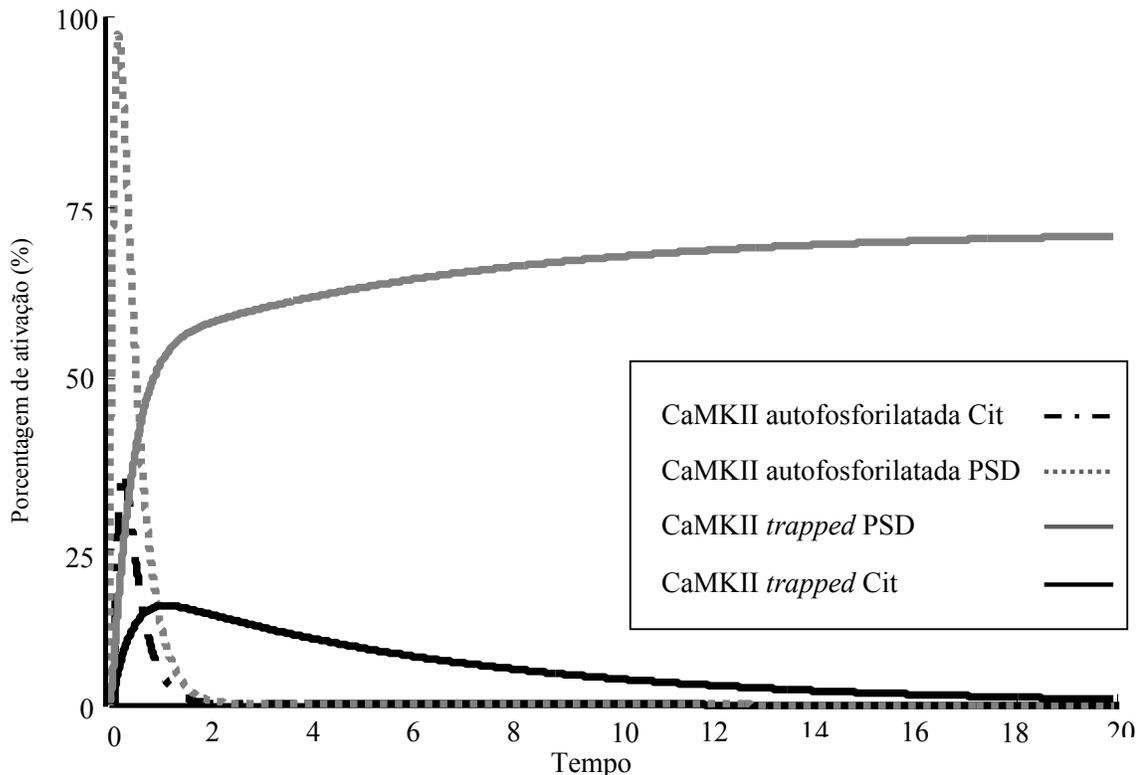


Figura 73: A translocação da CaMKII no modelo de LTP desenvolvido. Após se autofosforilar, a CaMKII rapidamente migra do citoplasma (Cit) para a densidade pós-sináptica (PSD), onde ela é resistente à ação das fosfatases e permanece persistentemente ativa.

Com a inclusão da translocação da CaMKII no modelo de LTP desenvolvido, obteve-se, finalmente, a ativação de todas as enzimas requeridas (Fig. 74). Essa ativação é decorrente portanto, do influxo de Ca^{2+} , que determina a ativação da PKC e, indiretamente, da PKA, do posicionamento estratégico da ERK1/2 no complexo protéico do NR1/NR2A, e da translocação da CaMKII, fato que favorece sua atuação pois impede o acesso das fosfatases à sua estrutura.

Com a ativação da PKC, PKA, ERK1/2 e da CaMKII no modelo, foi necessário partir para a etapa final de seu desenvolvimento, que se concentrou em como essas enzimas atuam e determinam o aumento do peso sináptico.

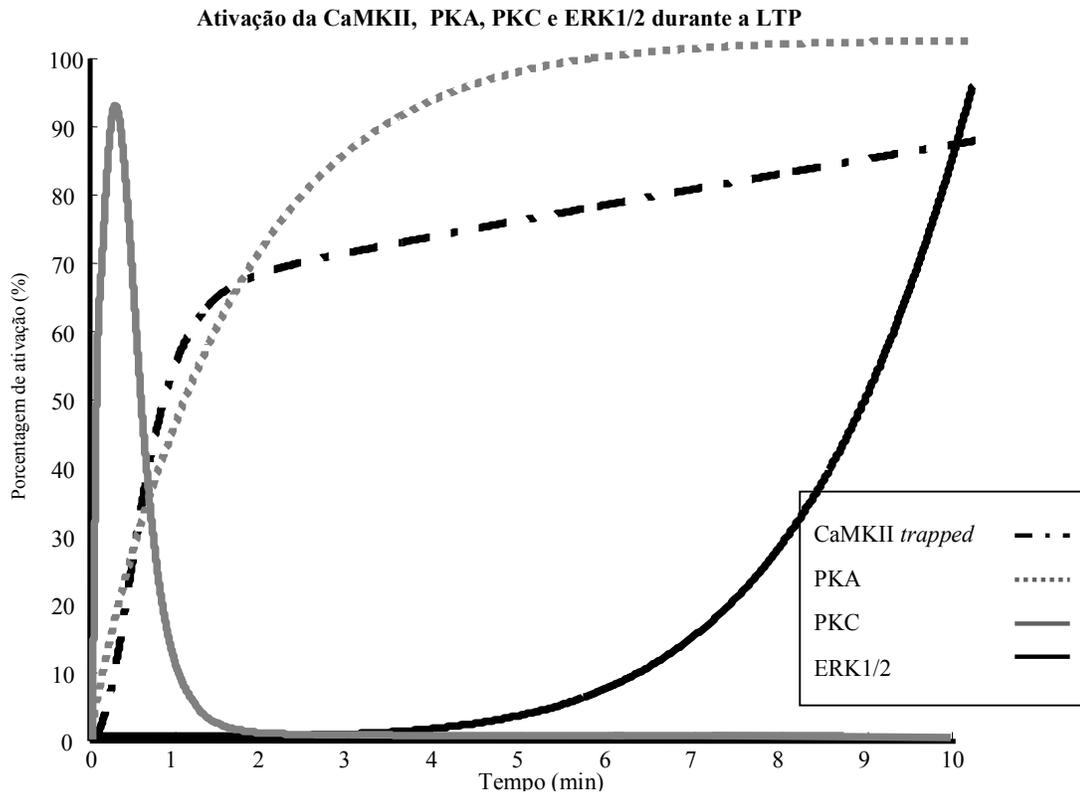


Figura 74: A ativação da CaMKII, da PKA, PKC e ERK1/2 durante a LTP inicial hipocampal. Através da combinação de uma organização espacial e temporal precisa, a indução de LTP determinou, no modelo, a ativação das enzimas que mediam o aumento do peso sináptico.

4.5 O aumento do peso sináptico e os movimentos do AMPA

Desde a descoberta da LTP, inúmeros cientistas de renome se dedicaram à busca pelos mecanismos que determinam, durante a sua ocorrência, o aumento do peso sináptico.

Logo que a LTP foi descoberta, identificou-se que ela requeria a ativação de receptores NMDA (Collingridge et al., 1983a; 1983b). No entanto, apenas a presença de L-glutamato não é suficiente para a abertura dos canais do NMDA, que são bloqueados por Mg^{2+} de maneira voltagem-dependente (Nowak et al., 1984; Coan e Collingridge, 1985). Esses aspectos indicaram que a LTP envolve a participação de mais algum tipo de receptor glutamatérgico, que é responsável por causar a despolarização da membrana celular requerida

pelo NMDA (Malinow e Miller, 1986; Bliss e Collingridge, 1993). Dessa maneira, 15 anos após a descoberta da LTP, demonstrou-se a ação fundamental do AMPA para sua ocorrência (Kauer et al., 1988; Muller e Lynch, 1988).

A partir do descobrimento da participação do AMPA na LTP, as pesquisas na área voltaram sua atenção para as possíveis alterações que esse receptor poderia sofrer durante esse processo. Com isso, em poucos anos foi demonstrado que o AMPA apresenta um aumento em sua condutância em função da ocorrência de LTP (Barria et al., 1997; Benke e al., 1998), e que esse aumento, aparentemente, é a principal alteração pós-sináptica implicada com a mudança no peso sináptico observada (Malinow e Miller, 1986; Malinow et al., 2000; Lisman e Raghavachari, 2006).

Simultaneamente à descoberta do papel central do AMPA para a LTP, começaram a ser investigados os mecanismos intracelulares implicados com a ocorrência desse evento. Assim, gradativamente, as enzimas essenciais para a LTP foram sendo identificadas, e foi sendo demonstrado que esse processo envolve a participação essencial de quatro quinases: a PKA, a CaMKII, a PKC e a ERK1/2 (Malinow et al., 1989; Lledo et al., 1995; English e Sweatt; 1997; Sweatt 1999; Winder et al., 1999).

A constatação da atuação fundamental dessas quinases e de que a mudança de condutância do AMPA determina o aumento do peso sináptico na LTP logo foram unificadas em uma única hipótese: o AMPA é o alvo de atuação dessas enzimas. E essa hipótese foi comprovada através da demonstração de que o AMPA é fosforilado durante a LTP e que, *in vitro*, sua fosforilação determina o aumento em sua condutância unitária (Barria et al., 1997; Benke e al., 1998; Lee et al., 1998; 2000). No entanto, apesar de, *in vitro*, os sítios do AMPA serem fosforilados, e essas fosforilações causarem um aumento na condutância unitária de seu canal, *in vivo* a história é diferente. A observação do aumento na condutância unitária do AMPA sempre foi feita, *in vitro*, para o receptor homomérico (Barria et al., 1997; Benke e al.,

1998; Lee et al., 1998; Banke et al., 2000). Mas, quando se considera sua composição heteromérica, o efeito da fosforilação é suprimido, ou seja, no AMPA nativo, a fosforilação, ao que se sabe, não causa alteração em sua condutância unitária (Andrásfalvy e Magee, 2004; Oh e Derkach; 2005; Derkach et al., 2007). Antes da demonstração desse aspecto, porém, já começaram a surgir dados que mudavam a compreensão que se tinha, até o momento, sobre as possibilidades de mudança na condutância do AMPA. E, entre essas constatações, certamente a mais relevante para iniciar a vinculação da LTP com outras formas de alterações do AMPA foi a descoberta das sinapses silenciosas (Liao et al., 1995).

As sinapses silenciosas, em linhas gerais, são sinapses que contêm NMDA, mas que não possuem AMPAs funcionais (Liao et al., 1995). No entanto, essa situação é transitória e, quando essas sinapses são estimuladas, há, rapidamente, a expressão de AMPAs funcionais na zona sináptica, o que evidencia que esses receptores são capazes de variar em número, em função da atividade sináptica (Lüscher et al., 1998; Noel et al., 1999; Shi et al., 1999; 2001).

Com essa observação, somada à evidências que sugeriam que o aumento da condutância unitária do AMPA não deve ocorrer *in vivo*, iniciaram-se os estudos sobre os mecanismos de variação no número de receptores AMPA na sinapse. Assim, gradualmente, foi demonstrado que os AMPAs se movem lateralmente, além de entrarem e saírem da membrana (Passafaro et al., 2001; Ashby et al., 2004; Adesnick et al., 2005). Todos esses padrões de movimentação são rápidos (Shi et al., 1999; Passafaro et al., 2001). Alguns deles ocorrem espontaneamente, mas todos podem ser regulados pela atividade sináptica (revisto em Palmer et al., 2006; Derkach et al., 2007). Portanto, em poucos anos foi evidenciado que, durante a LTP inicial, alguns desses movimentos do AMPA ocorrem e são regulados por reações de fosforilação, que mediam tanto a inserção quanto o acúmulo de receptores na zona sináptica, determinando o aumento do peso sináptico não através de uma mudança

macroscópica na condutância do AMPA (Malinow e Malenka, 2002; Bredt e Nicoll, 2003; Palmer et al., 2006).

Com base nesses dados, o modelo de LTP inicial desenvolvido nesse trabalho teve que incorporar os movimentos do AMPA como o mecanismo responsável pelo aumento do peso sináptico. Para isso, dois movimentos foram considerados separadamente: a difusão lateral e a inserção na membrana.

A difusão lateral do AMPA começou a ganhar notoriedade na literatura após sucessivos trabalhos realizados por pesquisadores franceses que, com o desenvolvimento de uma técnica específica, conseguem filmar o receptor se movimentando ao longo das zonas sinápticas e extra-sinápticas e, a partir desses dados, calculam seus coeficientes de difusão em cada região (Borgdorff e Choquet, 2002; Tardin et al., 2003; Bats et al., 2007). Os dados obtidos por esses autores demonstram que, em condições de atividade celular basal, tanto o AMPA sináptico quanto o extra-sináptico se movimentam incessantemente, embora, na zona sináptica, esses movimentos sejam mais lentos, em função da grande concentração protéica. No entanto, é apenas uma população específica de AMPAs que se move lateralmente, composta pelos heterômeros de cauda longa, os seja, os GluR1/GluR2 (Palmer et al., 2006). Os movimentos desses receptores são contínuos até que a atividade sináptica determine sua fixação na região sináptica (Bats et al., 2007).

Para simular esse processo, foi necessário considerar que o AMPA GluR1/GluR2 se move, com taxas de difusão distintas, alternando-se entre a região sináptica e extra-sináptica. Durante a LTP, esse movimento cessa e os receptores são estabilizados na zona sináptica. Para isso, existe a mediação de reações de fosforilação, catalisadas pela CaMKII e pela PKC (Boehm et al.; 2006; Palmer et al., 2006) que, no modelo, têm que estar na densidade pós-sináptica para desempenharem tal ação (Tsui et al., 2005; Tsui e Malenka, 2006), e o AMPA,

para ser estabilizado, precisa estar associado às TARPs (Nicoll et al., 2006; Derkach et al., 2007; Ziff, 2007).

Com a incorporação desses critérios no modelo, durante a indução da LTP, o acúmulo de CaMKII na densidade pós-sináptica, combinada com a ação da PKC, determinam, gradualmente, a fixação de AMPAs na sinapse. Além disso, se observou também que a ação da PKC na estabilização do AMPA foi menor, o que se deve à sua ativação transiente. Já a CaMKII, no modelo, contribuiu mais para o aumento do número de AMPAs, pois, através de sua ativação persistente, ela pode fosforilar os receptores disponíveis na membrana por um longo período. Ou seja, nesse processo, o principal fator limitante da ação da CaMKII no aumento do peso sináptico será o número de receptores disponíveis para serem fosforilados (Fig. 75).

Já em relação a inserção de AMPAs, outras enzimas são requeridas, mas o mecanismo exato desse processo é menos conhecido, embora se saiba que ele envolve proteínas e etapas comuns de processos de fusão de membrana (Brown et al., 2005; Gerges et al., 2006). Portanto, em função da ausência de informações precisas sobre as etapas de inserção do AMPA na membrana celular, no modelo, apenas alguns critérios para a ocorrência desse evento foram considerados. Assim, de acordo com dados da literatura, a inserção do AMPA é mediada pela ação de três quinases: a PKA, a PKC e a MAPK ERK1/2. Porém, enquanto a PKA e a PKC mediam a inserção do AMPA através da fosforilação de seus resíduos citoplasmáticos (Boehm et al., 2006; Oh et al., 2006), a ERK1/2 media esse processo através de sua atuação em um alvo ainda não identificado (Zhu et al., 2002). Com base nesses aspectos, foi assumido, no modelo de LTP desenvolvido, que a fosforilação do AMPA pela PKA ou PKC é suficiente para inseri-lo na membrana extra-sináptica. O receptor fosforilado pela PKC pode, em seguida, difundir até a zona sináptica e ser estabilizado, sem requerer nova fosforilação (Boehm et al., 2006).

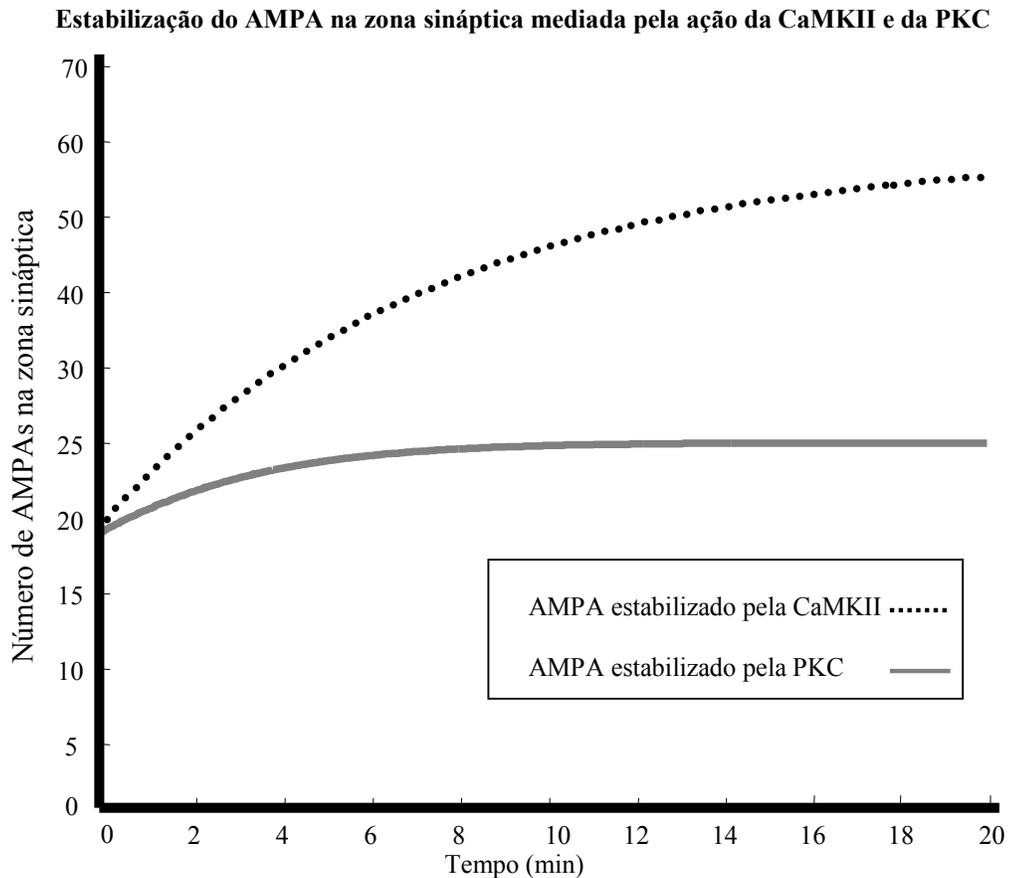


Figura 75: A estabilização dos AMPAs na membrana sináptica mediada pela PKC e pela CaMKII após a indução de LTP. Enquanto a PKC atua na estabilização do AMPA apenas por um breve intervalo de tempo, em acordo com sua ativação transitente, a CaMKII contribui mais para o aumento do número de AMPAs, já que ela permanece persistentemente ativa. Dessa maneira, o principal fator limitante, durante esse processo, para a atuação da CaMKII será o número de receptores na membrana celular disponíveis para serem fosforilado.

Já a atuação da ERK1/2 foi simulada de forma mais simplificada. O papel da ERK1/2 na inserção do AMPA é uma descoberta relativamente recente e requer a ativação prévia da Ras (Zhu et al., 2002). No entanto, a ERK1/2 não fosforila o AMPA. Existem evidências da atuação de algumas MAPKs no controle do tráfego de vesículas através de regulações das enzimas Rab, mas não há, ainda, demonstrações semelhantes envolvendo a ERK1/2, especialmente na área de LTP (Huang et al., 2004). Até o momento, porém, o único fato conhecido relevante para o modelo desenvolvido é que a ativação da ERK1/2 determina a

entrada do AMPA na membrana. Com base nisso, no modelo, a ativação da ERK1/2 foi considerada como um evento que determina, diretamente, a inserção de AMPAs, mas não foi possível estabelecer nenhum tipo de mecanismo que poderia mediar esse processo (Fig. 76).

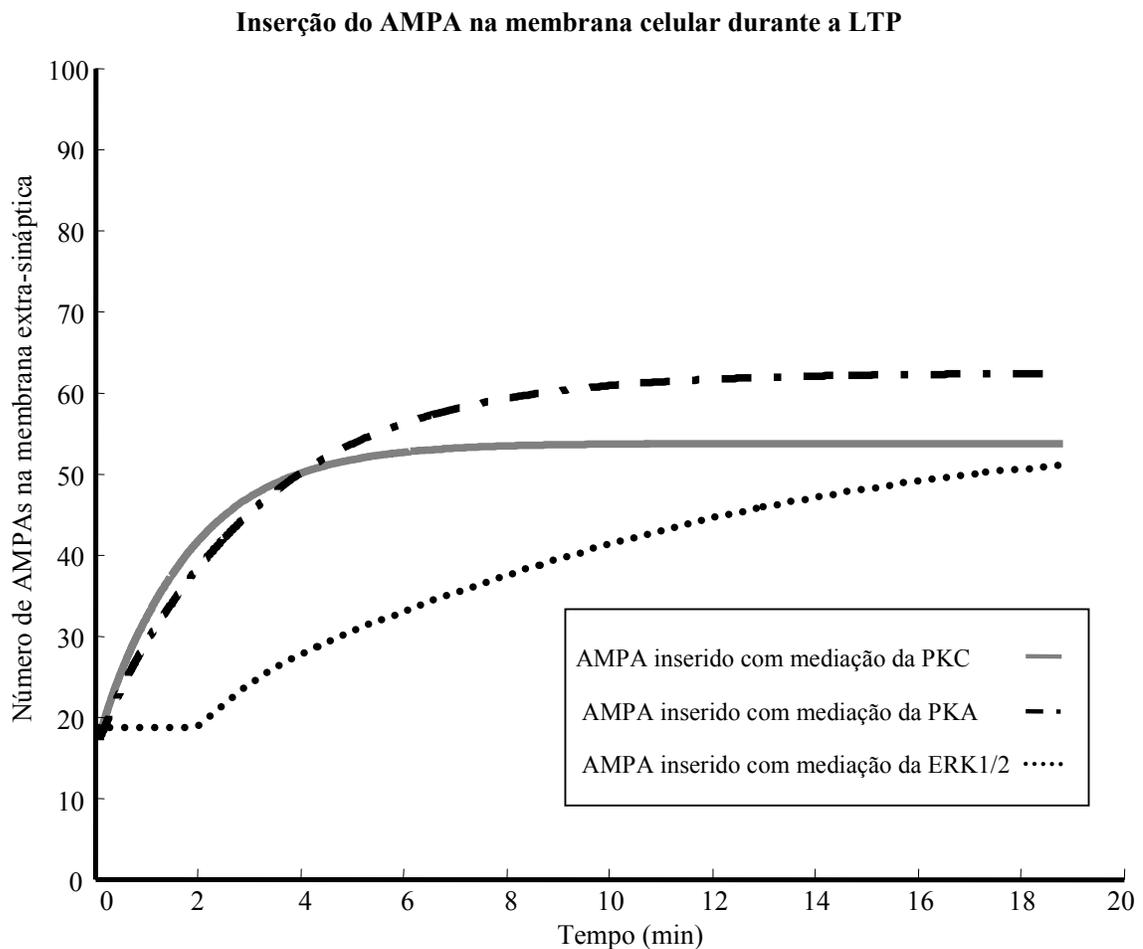


Figura 76: A inserção dos AMPAs na membrana sináptica mediada pela PKC, PKA e ERK1/2 que, em função de padrões temporais de ativação distintos e concentrações diferentes, geram períodos de aumento de AMPAs na membrana diferenciados.

Assim, o aumento do peso sináptico foi simulado considerando que, enquanto a ERK1/2, a PKC e a PKA inserem AMPAs na membrana, a CaMKII e a PKC estabilizam esses receptores na sinapse. Os receptores inseridos pela PKA e ERK1/2 devem ser, posteriormente, fosforilados pela PKC ou CaMKII para serem estabilizados na zona sináptica,

já os receptores inseridos pela ação da PKC não precisam de novas fosforilações. Com esses mecanismos incorporados de maneira simultânea no modelo, a indução de LTP leva a um grande aumento no número de receptores sinápticos (Fig. 77). Cabe ressaltar que o número máximo de receptores que puderam ser inseridos na zona sináptica foi estabelecido em 150, em função do número total de AMPAs considerados com intracelulares. Esse valor está de acordo com as quantidades máximas de receptores AMPAs reportados em uma única sinapse. Assim, considerando a duração total da LTP inicial com de duas horas, o tempo necessário para alcançar esse valor máximo de AMPAs foi de cerca de meia hora (Fig. 78).

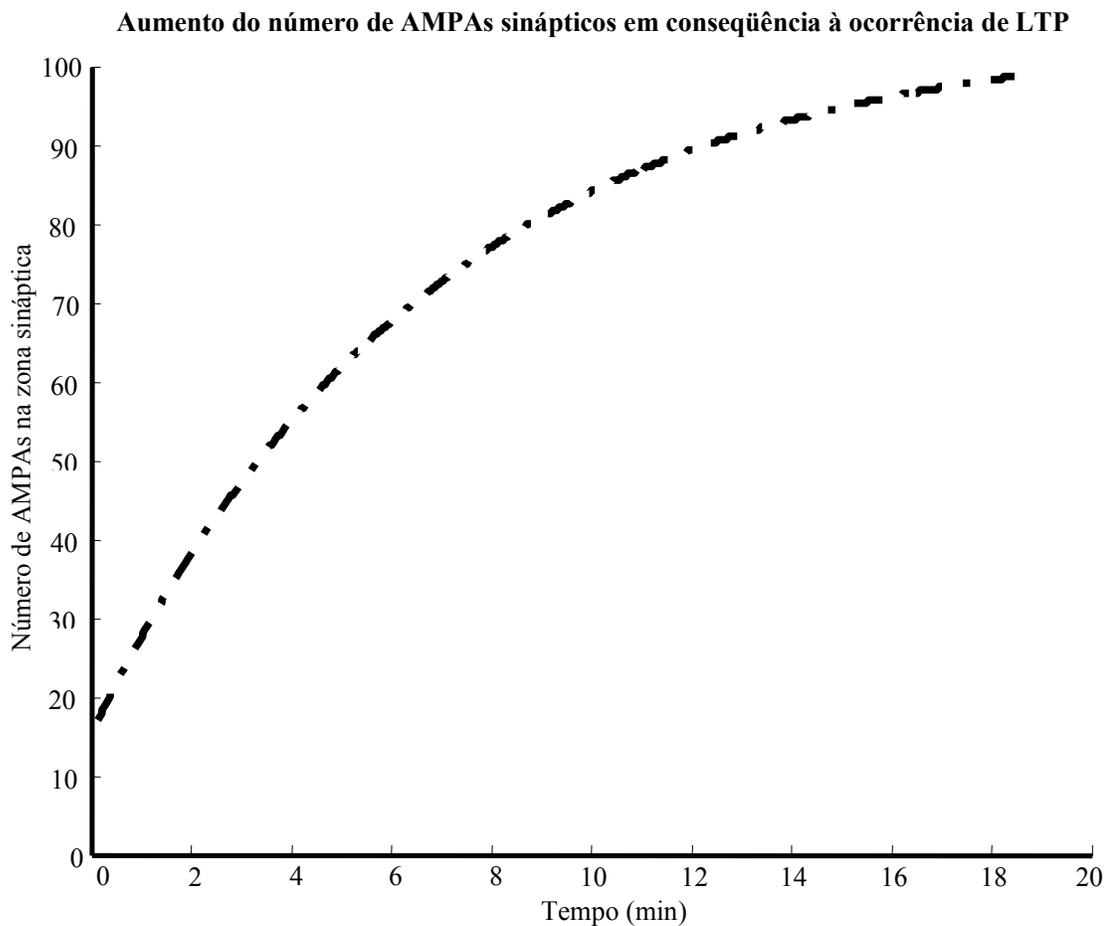


Figura 77: O aumento no número de AMPAs como consequência à LTP. No modelo desenvolvido, a ação coordenada da CaMKII, PKA, ERK1/2 e PKC resultou na inserção de AMPAs na membrana e de sua estabilização na zona sináptica. Com esses processos, houve um grande aumento no número total de AMPAs.

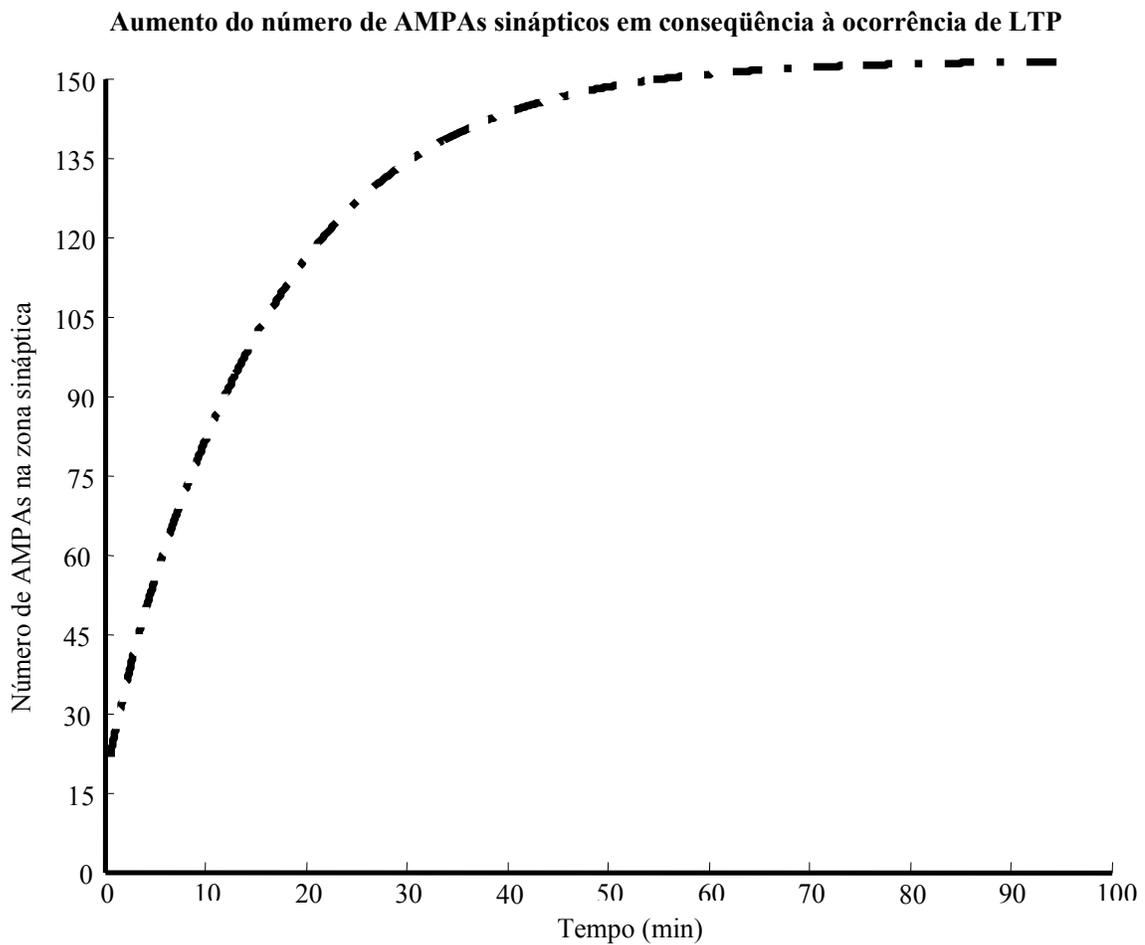


Figura 78: O aumento no número de AMPAs como consequência à LTP. Em cerca de meia hora após a indução de LTP, o número máximo de receptores AMPA possível no modelo já foi atingido e se mantém estável ao longo de duas horas, de acordo com a duração total da LTP inicial.

Com a simulação desses mecanismos, ao final do desenvolvimento do modelo, a indução de LTP inicial através do L-glutamato foi capaz de ativar as enzimas requeridas para fosforilar, estabilizar e inserir o AMPA na membrana, determinando o aumento do peso sináptico. Esse aumento é independente de síntese protéica, em acordo com os dados da literatura, e pode ser verificado, posteriormente, por exemplo, com a estimulação da célula por 1 pulso de L-glutamato, indicando uma despolarização maior da membrana celular (Fig. 79), e que contém um acréscimo em sua componente mediada pelo AMPA.

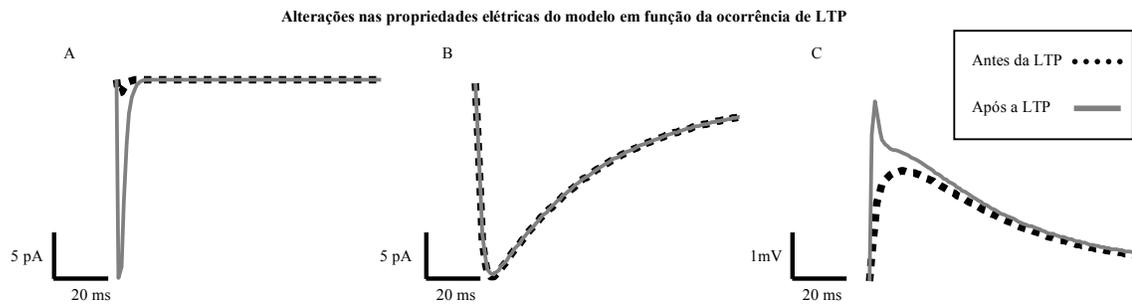
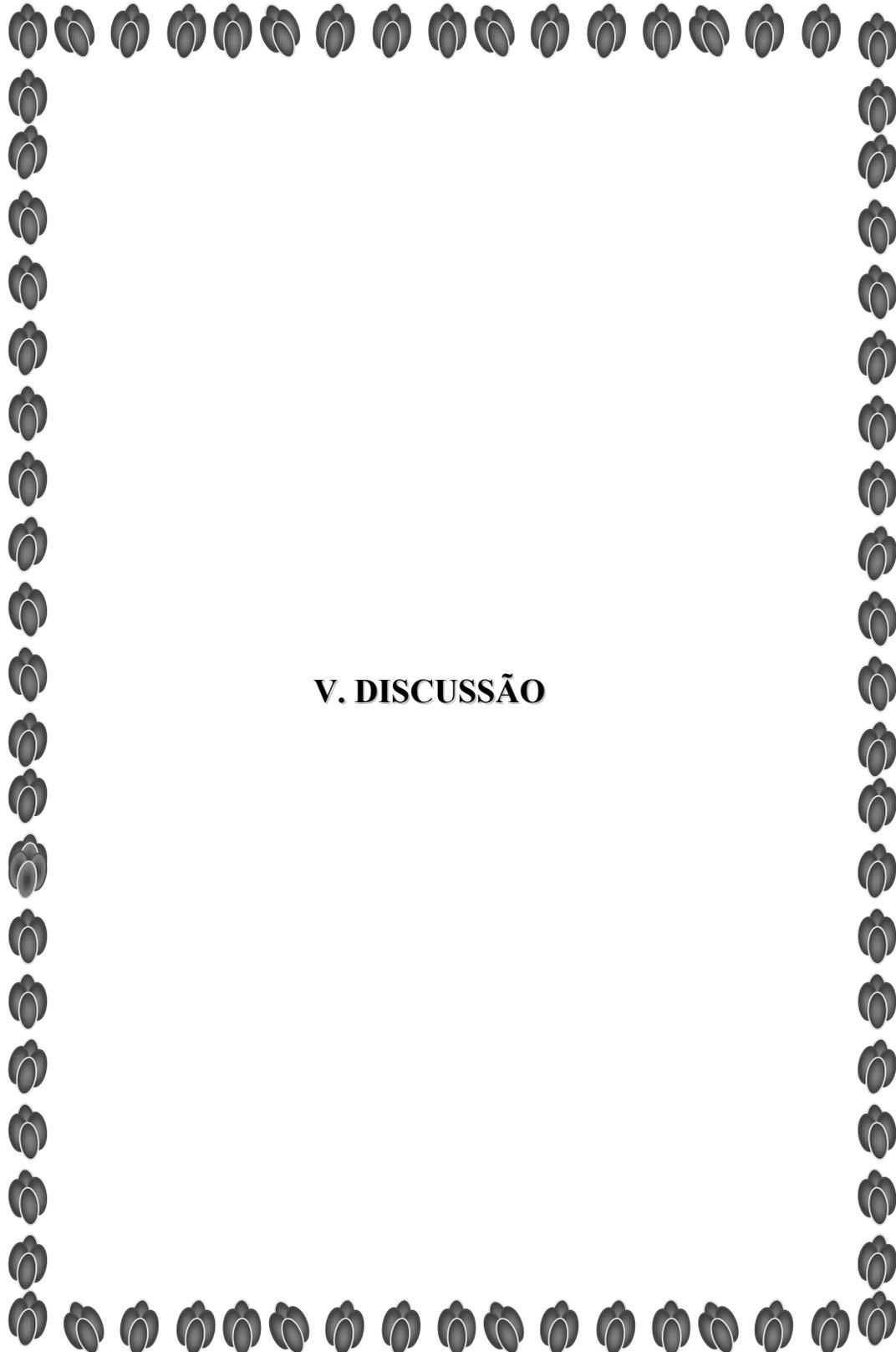


Figura 79: As alterações da LTP podem ser observadas pelo aumento da corrente ou do potencial de membrana medido na célula pós-sináptica. Para ilustrar esse aumento, o comportamento do modelo foi comparado antes e depois da indução de LTP. Como é observado, para apenas um pulso de L-glutamato (1 mmol.L^{-1}), há a alteração da corrente mediada pelo AMPA (A) e, conseqüentemente, do potencial da membrana celular (C), medido na espinha dendrítica, que passa a apresentar uma componente resultante da ativação dos receptores AMPA maior. Em B está mostrada a corrente do canal do NMDA, que manteve-se inalterada.



V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

A LTP é, sem dúvida, um dos principais temas estudados em neurociência. Porém, inúmeros aspectos implicados com sua ocorrência ainda são mal compreendidos. Em função disso, esse trabalho foi desenvolvido para investigar e testar algumas hipóteses sobre os mecanismos que podem estar operando na LTP. E, para isso, utilizou-se a construção de um modelo computacional.

Modelos computacionais, embora possam ser aplicados para diversos eventos, ainda não tem sido usados para o estudo da LTP, considerando-a de maneira global. Ou seja, existem diversos modelos de eventos relacionados com a ocorrência de processos de plasticidade sináptica, incluindo a LTP. Mas, nenhum deles, incorpora, simultaneamente, as alterações elétricas e bioquímicas envolvidas com esses fenômenos. Isto é, esses modelos são feitos concentrando-se apenas em alguns aspectos, biofísicos ou bioquímicos, relacionados com as diversas formas de plasticidade sináptica. Com base nesse fato, o modelo desenvolvido nesse trabalho é o único que simula a LTP considerando, de maneira integrada, todas as alterações requeridas para a sua ocorrência.

Certamente, a ausência de outros modelos computacionais semelhantes ao desenvolvido nesse trabalho se explica, em parte, pela grande quantidade de dados necessários para seu desenvolvimento, incluindo parâmetros e informações sobre o funcionamento de enzimas, receptores e demais componentes simulados, o que torna sua construção trabalhosa. No entanto, considerando que a neurociência computacional se baseia na simulação das características biofísicas e bioquímicas, de determinadas áreas ou células do cérebro, para o estudo dos processos que emergem da sua integração, é impossível desenvolver um modelo de LTP sem incluir os componentes básicos que a compõem. Ou seja, apenas um modelo que contém, de maneira integrada, célula, receptores, dinâmica de Ca^{2+} ,

ativação de vias e os mecanismos de aumento do peso sináptico, apresenta os componentes mínimos necessários para simular e analisar a LTP. Nesse sentido, os demais trabalhos existentes que simulam processos relacionados com eventos plásticos, apesar de terem gerado importantes contribuições, não podem ser considerados modelos de LTP.

Entre os primeiros modelos computacionais que exploraram algumas propriedades da LTP destacam-se o de Holmes e Levy (1990) e Zador et al. (1990), que desenvolveram simulações de espinhas dendríticas contendo os receptores AMPA e NMDA, além de mecanismos de dinâmica de Ca^{2+} . Com esses modelos, os autores concentraram-se nos processos relacionados com a indução de LTP, isto é, a ativação do NMDA com o consequente influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. Nesses trabalhos, foi demonstrado o importante papel das espinhas dendríticas para a ocorrência de LTP, pois essas estruturas, em função de seu tamanho reduzido, apresentam uma grande variação na concentração de Ca^{2+} , em decorrência da atividade sináptica, o que possibilita a ativação das vias requeridas para a LTP. Além disso, nesses modelos também foi explorado o papel do NMDA como um detector de coincidência da despolarização da membrana celular e da presença de L-glutamato na fenda sináptica. Com esses pontos, foi possível fortalecer o estabelecimento do NMDA como um elemento central para a indução da LTP inicial.

No mesmo período desses artigos, Lisman (1989) publicou um modelo que é considerado, por muitos autores, como a primeira hipótese para explicar os mecanismos intracelulares implicados com a LTP. Nesse trabalho, foi explorada a ativação da CaMKII em decorrência do aumento na concentração de Ca^{2+} observado durante a indução de LTP. Para isso, o autor desenvolveu um modelo simplificado, contendo a ativação da CaMKII em função do Ca^{2+} e a sua inativação em decorrência da ação da PP1. Além dessas proteínas, foram simuladas as atividades da AC e da PKA. Com esses componentes, durante a indução de LTP, o modelo de Lisman (1989) simula a ativação da PKA que atua na fosforilação do In-

1, que também foi simulado. O In-1 fosforilado se associa e inibe a PP1, possibilitando, no modelo, que a CaMKII se autofosforile e permaneça ativa por longos períodos de tempo. Com esse modelo, Lisman (1989) foi capaz de estabelecer algumas bases para a bidirecionalidade sináptica, apontando que, enquanto a LTP requer um grande e rápido aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , fato que resulta na ativação da PKA e da CaMKII, a LTD é mediada por um aumento de Ca^{2+} menor, mas prolongado, que ocasiona a ativação da calcineurina, que desfosforila o In-1 e restabelece a ação da PP1. Com essas simulações, Lisman (1989) propôs, pela primeira vez, processos que, de fato, pertencem à LTP e à LTD, e foram comprovados apenas alguns anos depois (Mulkey et al., 1994; Blitzer et al., 1995; 1998). No entanto, embora contenha mecanismos da LTP e LTD, o modelo de Lisman não explora como a mudança do peso sináptico ocorre e não vincula a ativação das vias de sinalização simuladas com o influxo de Ca^{2+} pelo NMDA. Além disso, esse trabalho incorporou a atividade das proteínas consideradas de maneira bastante simplificada, sem levar em conta mecanismos de regulação e ativação precisos, e não utilizou parâmetros medidos experimentalmente, ou seja, as taxas catalíticas usadas nas simulações foram escolhidas aleatoriamente pelo autor.

O modelo desenvolvido por Lisman (1989) foi, posteriormente, aprimorado para o estudo de outras questões implicadas com a LTP. Assim, Lisman e Zhabotinsky (2001), utilizando, como base, o modelo de Lisman (1989) e de Zhabotinsky (2000), propuseram alguns mecanismos que poderiam explicar o aumento do peso sináptico durante a LTP. Para isso, esses autores se basearam no fato de que, em seu estado ativo, a CaMKII pode se associar à filamentos de actina e, simultaneamente, ao receptor NMDA (McNeill e Colbran, 1995; Strack e Colbran, 1998). Esses filamentos de actina, associados à CaMKII podem se ligar à proteína 4.1N, que é encontrada associada às subunidades GluR1 do AMPA. Dessa maneira, seriam formados complexos estáveis na zona sináptica contendo a CaMKII, o

NMDA e o AMPA. Mas, embora Lisman e Zhabotinsky (2001) discutam esse mecanismo, ele não foi simulado nesse trabalho. Ou seja, a estrutura do modelo apresentado nesse artigo contém a ativação da CaMKII e de outras enzimas, mas não simula o AMPA, o NMDA, nem a actina. Assim, nesse trabalho, os autores utilizaram seu modelo apenas para argumentar que, na densidade pós-sináptica, a atividade coordenada entre a PKA e a CaMKII determina a ativação persistente dessa última, que, nesse estado, poderia mediar o aumento do peso sináptico estabilizando o AMPA de acordo com o processo proposto apenas teoricamente. Mas, cabe ressaltar, em relação ao processo de aumento de peso sináptico apresentado por esses autores, que embora se saiba que a CaMKII se associa a filamentos de actina (Leonard et al., 2002), nunca foi demonstrado que haja a formação de complexos entre ela, a actina, o NMDA e o AMPA.

Recentemente, em outro trabalho, Zhabotinsky et al. (2006) simularam parte do processo de aumento do peso sináptico discutido em Lisman e Zhabotinsky (2001), incluindo a ativação da CaMKII e seu papel no aumento do peso sináptico através da estabilização do AMPA na zona sináptica. Para isso, esses autores assumiram que a CaMKII fosforila o AMPA, que é então estabilizado na membrana sináptica através de sua interação com a SAP97, proteína que pertence ao complexo protéico da densidade pós-sináptica. Para essa interação ocorrer, a SAP97, segundo os autores, também deve ser fosforilada pela CaMKII. Porém, o papel central para a SAP97 no aumento do peso sináptico, defendido por Zhabotinsky et al. (2006), tem sido descartado na literatura (Groc e Choquet, 2006; Ziff, 2007). É importante ressaltar, no entanto, que ao longo do desenvolvimento de um modelo, é desejado que se testem hipóteses e que se sugiram idéias para explicar o funcionamento de um determinado fenômeno, mas esses aspectos têm que ser analisados, constantemente, com base nos dados da literatura, para que os modelos possam ser reestruturados a partir de seus pontos que se mostram falhos.

Entre os trabalhos que se dedicaram ao estudo de algumas características e componentes da LTP, ainda é fundamental destacar o modelo desenvolvido por Bhalla e Iyengar (1999), que incorpora uma ampla rede bioquímica implicada com a LTP. Esse trabalho é um marco para a neurociência computacional, pois demonstra que eventos como a LTP emergem, necessariamente, a partir das interações entre seus diversos componentes. Assim, o artigo de Bhalla e Iyengar (1999) evidenciou que a LTP é um fenômeno que resulta de uma precisa organização molecular. Esses autores, no entanto, não incorporaram, em seu modelo, a parte elétrica do neurônio piramidal, embora tenham simulado uma célula. No entanto, essa célula foi utilizada apenas para determinar a variação na concentração intracelular de Ca^{2+} em função de um protocolo de indução de LTP, que foi usada como entrada do modelo bioquímico. Posteriormente a essa publicação, o modelo de Bhalla e Iyengar foi aplicado para o estudo de outras questões relacionadas com a LTP, como o tráfego de AMPAs (Hayer e Bhalla, 2005), porém, considerando todos os seus componentes apenas em função de suas interações bioquímicas.

Além desses modelos, existem outros que, como já foi mencionado, concentram-se apenas em alguns processos e características da LTP e não simulam, portanto, esse fenômeno de forma global. As principais contribuições que esses trabalhos têm gerado à área de pesquisa em LTP se relacionam com as integrações temporais presentes entre alguns componentes desse fenômeno e o papel da variação da concentração do Ca^{2+} na determinação da ocorrência de LTP ou LTD. Assim, tem sido explorada, principalmente, a ação coordenada da PKA, CaMKII, PP1 e calcineurina, determinando a variação no peso sináptico em função da desfosforilação/fosforilação do AMPA (Castellani et al., 2001; D'Alcantara et al., 2003). No entanto, nesses trabalhos, a integração entre a ativação dos receptores NMDA e o aumento do peso sináptico é, sistematicamente, desconsiderada.

A LTP piramidal tem que ser iniciada, no meio intracelular, pelo aumento na concentração de Ca^{2+} mediado pelos NMDAs, que, em função de suas propriedades biofísicas e bioquímicas, determinam a ativação, em maior porcentagem, das enzimas que atuam na LTP. Ou seja, essa ativação não é resultado apenas do influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, mas de um processo que envolve múltiplas formas de integração temporal e espacial. E, certamente, um modelo de LTP deve conter essas características.

Para simular a LTP, o modelo descrito nessa tese baseou-se em um amplo levantamento bibliográfico sobre suas principais enzimas, considerando, em detalhes, seus mecanismos de ativação e regulação através da estimulação celular por L-glutamato. Com esse levantamento, foi possível desenvolver equações, solucionadas com parâmetros retirados de artigos experimentais, que descrevem a atividade de cada molécula considerada. Nesse sentido, uma importante contribuição desse trabalho foi equacionar e simular a atividade de diversas enzimas, já incorporando dados bastante atuais sobre suas regulações, que podem, posteriormente, ser utilizadas de maneira isolada, ou com outras formas de organização, para o estudo de questões particulares.

No que se refere especificamente à LTP, os modelos das atividades das proteínas desenvolvidos nesse trabalho permitiram analisar a sensibilidade que elas possuem a padrões distintos de variações na concentração de Ca^{2+} . Com essa verificação, foi possível comprovar que as moléculas implicadas com a LTP são bastante sensível às variações na concentração de Ca^{2+} , característica que contribui para que elas sejam ativadas por estímulos transientes breves. No entanto, um ponto importante demonstrado ao longo desses resultados é que, embora a ativação em alta proporção de algumas enzimas em decorrência de sinais breves de Ca^{2+} ser um aspecto importante para a LTP, ela não pode ser usada como base para explicar esse fenômeno. Assim, foi necessário incorporar também a coordenação que existe entre a atividade das moléculas simuladas.

A atividade coordenada entre algumas proteínas que integram a LTP é um dos principais pontos explorados na literatura (Dineley et al., 2001; Kennedy et al., 2005). Porém, sua análise, experimentalmente, esbarra em uma série de limitações como a falta de inibidores seletivos e a impossibilidade de se evitar que uma molécula desempenhe parte da função de outra que foi inibida ou suprimida do sistema de estudo. Nesse sentido, o uso de modelos computacionais é uma ferramenta importante, pois possibilita que se considere interações específicas. Por apresentar essa vantagem, diversos modelos computacionais têm sido desenvolvidos para explorar a coordenação entre algumas moléculas implicadas com a ocorrência de eventos plásticos. No entanto, esses trabalhos concentram-se, na maior parte das vezes, apenas em poucas moléculas, destacando a CaMKII e a PKA (Lisman, 1989; Castellani et al., 2001; Lisman e Zhabotinsky, 2001; D'Alcantara et al., 2003; Zhabotinsky et al., 2006), e desconsideram outras proteínas que também são requeridas para a ocorrência de LTP e outras formas de plasticidade sináptica (Sweatt, 1999).

Diferentemente dos trabalhos de outros autores, o modelo da rede de sinalização da LTP desenvolvido nessa tese se baseou nos dados existentes na literatura para determinar que vias seriam consideradas necessárias para a ocorrência de LTP. E, uma vez que essa determinação foi feita, estipulando que a CaMKII, a PKA, a PKC e a ERK1/2 seriam enzimas centrais para o modelo desenvolvido, elas foram simuladas contendo seus mecanismos principais de ativação e regulação mediados pela estimulação celular por L-glutamato. Com essa organização, o objetivo desse trabalho não foi, em nenhum momento, gerar um modelo mínimo de plasticidade, mas entender como a LTP pode, de fato, ocorrer. Para isso, quinases, fosfatases e demais moléculas foram integradas em uma única rede de sinalização, e foi possível determinar que, embora a coordenação entre a atividade de algumas enzimas contribua para a LTP, esse mecanismo não é suficiente para explicar sua ocorrência. Ou seja, esses resultados mostram, diferentemente dos resultados de Bhalla e Iyengar (1999), que a

LTP requer, além da integração temporal entre a ativação de suas vias, a presença de outros mecanismos. Portanto, para a simulação da LTP, não é preciso incorporar apenas as proteínas que atuam nesse processo, mas também seus outros componentes.

Um fato importante sobre a LTP hipocampal é a sua dependência pela ativação dos receptores NMDAs (Collingridge et al., 1983a; Bliss e Collingridge, 1993). Ao longo de vários anos, esse requerimento foi explicado, exclusivamente, em função da atuação do NMDA como principal mediador do aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} . No entanto, em função da presença de dois heterômeros do NMDA na zona sináptica, o NR1/NR2B e o NR1/NR2A (Tovar e Westbrook; 1999; Thomas et al., 2006), que apresentam densidade de canais, e taxas de ativação, desativação e dessensibilização distintas (Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004), o influxo de Ca^{2+} tem, pelo menos, dois padrões diferentes, e que são relacionados, de maneira seletiva, com a indução de LTP ou LTD (Liu et al., 2004 ; Erreger et al., 2005; Köhr, 2006; Berberich et al., 2007). A partir desse ponto, parte desse trabalho explorou algumas características específicas dos heterômeros do NMDA presentes nas espinhas dendríticas para a ocorrência de LTP.

Grande parte dos modelos computacionais existentes na literatura e que contém a presença de receptores NMDA, simulam apenas a corrente mediada por sua abertura, e de maneira bastante simplificada. Esse tipo de simulação, embora seja adequada para o estudo de diversas questões, é impróprio para um modelo de LTP. Porém, até o momento, o modelo descrito nessa tese é o primeiro a incorporar dois tipos de NMDAs, o que foi fundamental para investigar alguns mecanismos necessários para a ocorrência de LTP.

O NR1/NR2A e o NR1/NR2B foram simulados a partir de esquemas cinéticos desenvolvidos com base nos dados experimentais sobre seus funcionamentos. Após isso, esses dois heterômeros foram inseridos na zona sináptica da espinha dendrítica simulada, considerando a densidade de canais específica para cada um deles, ou seja, a população de

NMDA do modelo foi composta por 65% de NR1/NR2A e 35% de NR1/NR2B. Com essa organização, foi possível determinar, especificamente, a porcentagem de ativação das vias de sinalização da LTP em função do Ca^{2+} que flui por cada um dos heterômeros do NMDA simulados. E, com esse modelo, foi demonstrado que, em concordância com artigos experimentais (Köhr et al., 2003; Berberich et al., 2007), o NR1/NR2A é responsável por uma ativação maior de algumas moléculas necessárias para o aumento do peso sináptico, em função da quantidade e do padrão de Ca^{2+} que entra pelo seu canal. No entanto, essa não é a única propriedade desse heterômero importante para determinar a ocorrência de LTP.

Outro aspecto analisado em relação à atuação diferencial dos heterômeros do NMDA para a LTP se referiu ao seus papéis como formadores de complexos protéicos no meio intracelular. Assim, no modelo desenvolvido, foram especificadas quais moléculas estão associadas, diretamente, com cada heterômero do NMDA. Com a simulação desse aspecto, foi possível estabelecer a origem exata do Ca^{2+} para a ativação de enzimas específicas. Nesse sentido, esse trabalho mostrou que o NMDA, além de possuir um papel fundamental mediando o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular durante a LTP, também atua favorecendo a ativação de enzimas essenciais para a sua ocorrência através de sua ação como um integrador espacial.

A organização espacial, sem dúvida, é uma das principais vantagens desse modelo em relação a outros existentes na literatura e foi um aspecto fundamental para explicar a ativação das enzimas requeridas para a LTP. Ou seja, diferentemente de outros modelos, mas em acordo com alguns dados experimentais, no modelo desenvolvido nessa tese, a ativação da rede de sinalização requerida para a LTP emerge, necessariamente, da coordenação temporal e espacial dos componentes simulados. E, com base nesse aspecto, ficou demonstrado que a organização espacial é um fator essencial para a LTP. No entanto, a relevância da organização espacial no modelo não foi vinculada apenas com o favorecimento da ativação de algumas

enzimas, mas também para introduzir uma idéia que é pouco comentada nos trabalhos sobre LTP, e que parece ser fundamental para a sua compreensão: o direcionamento da ação catalítica.

Um fato que chama a atenção na literatura sobre a LTP é que, geralmente, a fosforilação do AMPA, ocasionando o aumento do peso sináptico, é tratada como um evento de fácil ocorrência, ou seja, basta a ativação de algumas quinases para iniciar esse evento. No entanto, o AMPA não é um bom substrato para muitas enzimas, incluindo aquelas que atuam sobre ele durante a LTP (Dingledine et al., 1999). Dessa maneira, para desenvolver esse trabalho, foi necessário estabelecer critérios, baseados em dados disponíveis na literatura, que tiveram que ser seguidos para que houvesse a fosforilação do AMPA durante a ocorrência de LTP simulada. Assim, no modelo desenvolvido, considerou-se que, apenas em determinados locais do meio intracelular, as enzimas CaMKII, PKA e PKC podem fosforilar o AMPA. Essa incorporação baseou-se em duas idéias principais: o acúmulo de enzimas em regiões específicas, como a densidade pós-sináptica, deve forçar sua atuação em substratos que, normalmente, não seriam seus alvos, ou ainda, a existência de moléculas ancoradoras e adaptadoras, ao posicionar enzima e substrato lado a lado, direcionam sua ação catalítica. Para simular essas situações, o modelo teve que ser feito considerando a existência de proteínas ancoradoras e movimentos de translocação ao longo de alguns compartimentos celulares, aspectos que são relatados na literatura, mas que nunca haviam sido modelados e discutidos, de maneira unificada, como importantes para o aumento do peso sináptico.

A última etapa desse trabalho, portanto, foi dedicada à construção dos possíveis mecanismos do aumento do peso sináptico da LTP. De acordo com a literatura, a principal origem do aumento do peso sináptico não é a mudança na condutância unitária do AMPA, fato que foi defendido durante alguns anos (Barria et al., 1997; Benke et al., 1998; Lee et al., 1998; 2000), mas sim, o acúmulo de receptores na zona sináptica em função de sua inserção e

difusão lateral na membrana celular (Malinow e Malenka, 2002; Brecht e Nicoll, 2003; Palmer et al., 2006; Groc e Choquet, 2006; Derkach et al., 2007; Ziff, 2007). E, para a incorporação desses movimentos no modelo construído, o primeiro aspecto considerado foi a existência de heterômeros do AMPA distintos no modelo. Esse fato, que está em acordo com a distribuição de AMPAs observada nos neurônios piramidais hipocâmpais (Wenthold et al., 1996), foi importante, pois a variação no número de AMPAs, observada em eventos como a LTP e a LTD, relaciona-se com composições específicas desse receptor (Lüscher et al., 1998; Noel et al., 1999; Shi et al., 1999; Hayashi et al., 2000; Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001; Lee et al., 2002; Seidnman et al., 2003; Holman et al., 2007). Assim, com base nos dados existentes sobre o funcionamento do AMPA retirados de artigos experimentais, foi possível desenvolver o modelo de seus dois heterômeros, o que nunca havia sido feito. Com esses modelos, foram observadas algumas diferenças nas propriedades biofísicas desses heterômeros que ainda são desconhecidas na literatura, já que, experimentalmente, o AMPA é estudado apenas em sua composição homomérica. Além disso, a presença dos heterômeros diferentes foi utilizada para incorporar as interações específicas de uma população do AMPA e a sua vinculação com o aumento do peso sináptico.

O modelo de LTP construído nesse trabalho simulou também as alterações do AMPA mediadas pela sua interação com as TARPs. A presença de TARPs associada com a maior parte dos receptores AMPA nativos é um fato mostrado apenas recentemente (Tomita et al., 2003; Nakagawa et al., 2005), mas que tem ganhado bastante relevância na literatura sobre LTP, pois essas proteínas causam uma profunda mudança no funcionamento desses receptores (Tomita et al., 2005b; Osten e Stern-Bach, 2006). Com o modelo construído nesse trabalho, foi possível observar que a presença de TARPs altera o funcionamento do AMPA determinando uma grande mudança na magnitude e duração de sua corrente. E, em função disso, um ponto importante para ser apontado é que, no modelo construído, a organização dos

receptores AMPAs considerada foi capaz de gerar, para situação de estimulação que mimetizam um protocolo de indução de LTP, a ativação dos receptores NMDAs e, conseqüentemente, um influxo de Ca^{2+} , em grande concordância com valores experimentais relatados (Sabatini et al., 2002). E esse aspecto deve ser enfatizado pois, em trabalhos anteriores, muitos autores tiveram que se basear na ocorrência simultânea de diversas sinapses ou no uso de densidades de canais AMPA e NMDA muito acima dos valores observados experimentalmente para obterem variações na concentração de Ca^{2+} que se aproximassem de valores reportados para o sistema biológico (Holmes e Levy, 1990; Zador et al., 1990; Pongrácz et al., 1992). Ou seja, em contraste com esses trabalhos, os resultados obtidos com o modelo apresentado nesse trabalho indicam que a intensidade da variação na concentração de Ca^{2+} , observada na espinha dendrítica, pode ser resultado apenas da ativação de AMPAs com uma condutância maior, e que mediam, localmente, a ativação dos NMDAs. Assim, a presença de TARPs no modelo está envolvida com a LTP por que essas proteínas alteram o funcionamento do AMPA, o que tem fundamentação experimental (Nicoll et al, 2006) e, além disso, por que elas mediam seu trânsito ao longo dos compartimentos celulares.

O modelo de LTP inicial desenvolvido nesse trabalho assume, portanto, que as TARPs são essenciais para os movimentos do AMPA durante a LTP. E essa incorporação se deve a evidências recentes que apontam que as TARPs são fundamentais para que o AMPA deixe as vesículas intracelulares, seja inserido na membrana extra-sináptica e, posteriormente, seja estabilizado na região sináptica (Tomita et al., 2005a; Palmer et al., 2006; Bats et al., 2007). Porém, em adição à presença de TARPs no AMPA, o aumento do peso sináptico depende de reações de fosforilação (Barria et al., 1997; Mammen et al., 1997; Benke et al., 1998; Esteban et al., 2003; Boehm et al., 2006; Gao et al., 2006; Groc e Choquet, 2006). E, a partir desses aspectos, foi necessário propor, no modelo, um mecanismo que relaciona a ativação das quinases implicadas com a LTP, sua ação, os movimentos do AMPA e as TARPs. Para isso,

foram utilizados os seguintes critérios: existem dois movimentos do AMPA implicados com a LTP, ou seja, sua inserção na membrana extra-sináptica e sua difusão lateral, que pode resultar na sua estabilização na zona sináptica. A inserção do AMPA, durante a LTP, depende de sua fosforilação, que é catalisada, nessa etapa, pela PKA ou pela PKC (Esteban et al., 2003; Sun et al., 2005; Boehm et al., 2006; Oh et al., 2006). E, em adição a isso, essa inserção pode ocorrer em consequência à ativação da ERK1/2 (Zhu et al., 2002). Mas, para ser inserido na membrana, além de ser fosforilado, o AMPA tem que estar associado às TARPs. Uma vez na membrana, o AMPA, se foi inserido em decorrência da ação da PKC, se difunde e se estabiliza na zona sináptica. Mas, se essa inserção foi mediada pela PKA ou pela ERK1/2, o AMPA deve ser novamente fosforilado, pela CaMKII posicionada na densidade pós-sináptica, ou pela PKC, e, através dessa segunda fosforilação, ser estabilizado na zona sináptica. Com essa organização, que foi proposta pela primeira vez nesse trabalho, mas que se baseia em, grande parte, em evidências obtidas através de um amplo levantamento bibliográfico, foi possível simular o aumento do peso sináptico. Ao fim desse trabalho, portanto, obteve-se um modelo de LTP inicial hipocampal bastante completo e que propõem, passo a passo, os mecanismos que devem estar operando nesse processo.



**VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS E
PERSPECTIVAS**

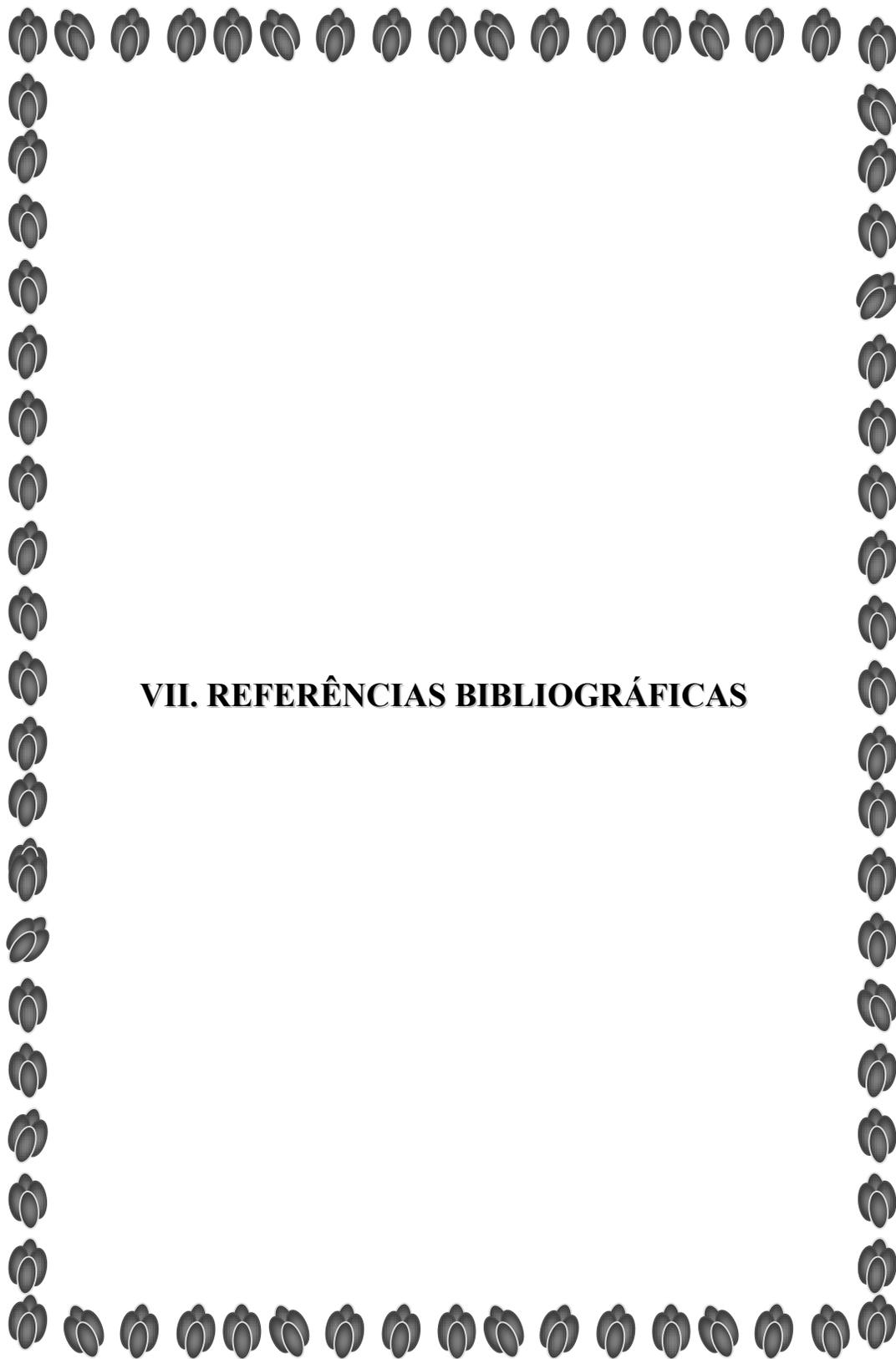
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Desde o início desse trabalho, seu desenvolvimento foi feito seguindo os dados e evidências existentes na literatura sobre o funcionamento das vias e demais componentes implicados com a LTP inicial hipocampal. Mesmo com esse procedimento, certamente, o modelo computacional de LTP inicial construído tem inúmeras limitações, especialmente no que se refere à omissão de alguns eventos e processos que, no meio intracelular, podem ser decisivos para a sua ocorrência. Evidentemente, por mais que se tente seguir os dados relevantes existentes na literatura, a construção de um modelo computacional é sempre um recorte, que considera apenas um momento e uma parte das informações sobre o sistema de interesse e, portanto, deve ser continuamente revisto. Nesse sentido, o modelo descrito nesse trabalho tem que ser pensando apenas como uma etapa inicial que, se for continuada, deve caminhar em acordo constante com os dados novos que foram sendo reportados, e buscando aprimorar pontos que ficaram falhos.

No entanto, mesmo que apresente limitações, o modelo desenvolvido nesse trabalho conseguiu simular, de maneira única, a LTP inicial hipocampal. Dessa maneira, sua implementação fornece uma nova proposta para explicar a ocorrência desse fenômeno, estruturada com base em parâmetros experimentais e baseada na coordenação espacial e temporal de alguns de seus componentes. No entanto, essa proposta concentra-se, exclusivamente, nos aspectos pós-sinápticos da LTP, fato que foi decidido logo no início desse trabalho, considerando que, embora a LTP envolva duas células conectadas sinapticamente, suas alterações pré-sinápticas são menos conhecidas. Existem evidências de que há um aumento na quantidade de vesículas liberadas por sinapse, ou ainda, apenas uma modificação na taxa dessa liberação. Porém, esses dados são contraditórios e, por isso, não foram simulados.

Ainda cabe ressaltar que, ao longo desse trabalho, a possibilidade da construção de um modelo bidirecional de plasticidade sináptica, incorporando a LTP e a LTD, também foi desconsiderada. E isso se deve a um fato bastante simples: a LTP e a LTD, apesar de possuírem alguns requerimentos em comum, ou seja, a ativação de receptores NMDA e o aumento intracelular de Ca^{2+} , não são processos simétricos. Isto é, o oposto da LTP não é a LTD, mas sim a despotenciação sináptica.

Dentro desse panorama, as alterações que devem ser feitas, dando seqüência a esse trabalho, irão continuar se concentrando nos mecanismos pós-sinápticos da LTP inicial hipocampal. Essas alterações devem envolver, especialmente, o aprimoramento de algumas vias já simuladas e à exploração de aspectos do modelo que podem ser aprofundados. Posteriormente, outras vias devem ser inseridas no modelo desenvolvido, o que irá possibilitar a incorporação de novos aspectos relacionados com a LTP inicial.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. **Chemical Reviews**, vol. 101, p. 2271-2290, 2001.

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

ADAMS, J.P., SWEATT, J.D. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 42, p. 135-163, 2002.

ADESNIK, H., NICOLL, R.A., ENGLAND, P.M. Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking. **Neuron**, vol. 48, p. 977-985, 2005.

ADESNIK, H., NICOLL, R.A., Conservation of glutamate receptor 2-containing AMPA receptors during long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol. 27, p. 4598-4602, 2007.

ALEXANDER, K.A., CIMLER, B.M., MEIER, K.E., STORM, D.R. Regulation of calmodulin binding to P-57. A specific calmodulin binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, p. 6108-6113, 1987.

ALTSCHULER, D.L., PETERSON, S.N., OSTROWSKI, M.C., LAPETINA, E.G. Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 10373-10376, 1995.

ALVAREZ, V.A., SABATINI, B.L. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. **Annual Review of Neuroscience**, vol. 30, p. 79-97, 2007.

AMARAL, D.G. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 3, p. 225-229, 1993.

AMARAL, D.G., WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, vol. 31, p. 571-591, 1989.

ANDERSEN, P. A prelude to long-term potentiation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, vol. 35, p. 613-615, 2003.

ANDRÁSFALVY, B.K., MAGEE, J.C. Distance-dependent increase in AMPA receptor number in the dendrites of adult hippocampal CA1 pyramidal neurons. **The Journal of Neuroscience**, vol. 21, p. 9151-9159, 2001.

ANDRÁSFALVY, B.K., MAGEE, J.C. Changes in AMPA receptor current following LTP induction on rat CA1 pyramidal neurones. **The Journal of Physiology**, vol. 559, p. 543-554, 2004.

ANANTHANARAYANAN, B., STAHELIN, R.V., DIGMAN, M.A., CHO, W. Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the Ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, p. 46886-46894, 2003.

ASHBY, M.C., DE LA RUE, S.A., RALPH, G.S., UNEY, J., COLLINGRIDGE, G.L., HENLEY, J.M. Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. **The Journal of Neuroscience**, vol. 24, p. 5172-5176, 2004.

ASHBY, M.C., MAIER, S.R., NISHIMUNE, A., HENLEY, J.M. Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26, p. 7046-7055, 2006.

BANKE, T.G., BOWIE, D., LEE, H.-K. TRAYNELIS, S.F. Control of GluR1 receptor function by cAMP-dependent protein kinase. **The Journal of Neuroscience**, vol. 20, p. 80-102, 2000.

- BANKE, T.G., TRAYNELIS, S.F. Activation of NR1/NR2 NMDA receptors. **Nature Neuroscience**, vol. 6, p. 144-152, 2003.
- BARAN, I. Integrated luminal and cytosolic aspects of the calcium release control. **Biophysical Journal**, vol. 84, p. 1470-1485, 2003.
- BARRIA, A., MULLER, D., DERKACH, V., GRIFFITH, L.C., SODERLING, T.R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. **Science**, vol. 276, p. 2042-2045, 1997.
- BARRY, M.F., ZIFF, E.B. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. **Current Opinion in Neurology**, vol. 12, p. 279-286, 2002.
- BATS, C., GROG, L., CHOQUET, D. The interaction between stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. **Neuron**, vol. 53, p. 719-734, 2007.
- BAUDIER, J., BRONNER, C., KLIGMAN, D., COLE, D.R. Protein kinase C substrates from bovine brain. Purification and characterization of neuromodulin, a neuron-specific calmodulin binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 264, p. 1824-1828, 1989.
- BAUDRY, M. Synaptic plasticity and learning and memory: 15 years of progress. **Neurobiology of Learning and memory**, vol. 70, p. 113-118, 1998.
- BAYER, K.U., DE KONINCK, P., LEONARD A.S., HELL, J.W., SCHULMAN, H. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. **Nature**, vol. 411, p. 801-805, 2001.
- BAYER, K.U., LEBEL, E., MCDONALD, G.L., O'LEARY, H., SCHULMAN, H., DE KONINCK, P. Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26, p. 1164-1174, 2006.
- BAYER, K.U., SCHULMAN, H. Regulation of signal transduction by protein targeting: the case of CaMKII. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 289, p. 917-923, 2001.

BAYLEY, P.M., FINDLAY, W.A., MARTIN, S.R. Target recognition by calmodulin: dissecting the kinetics and affinity of interaction using short peptide sequences. **Protein Science**, vol. 5, p. 1215-1228, 1996.

BEDOUKIAN, M.A., WEEKS, A.M. PARTIN, K.M. Different domains of the AMPA receptor direct stargazin-mediated trafficking and stargazin-mediated modulation of kinetics. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 23908-23921, 2006.

BEKKERS, J.M., STEVENS, C.F. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in hippocampus. **Nature**, vol. 346, p. 724-729, 1990.

BELLAMY, T.C., GARTHWAITE, J. Sub-second kinetics of the nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase, in intact cerebellar cells. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 4287-4292, 2001.

BENKE, T.A., LÜTHI, A., ISAAC, J.T.R., COLLINGRIDGE, G.L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. **Nature**, vol. 393, p. 793-797, 1998.

BENKE, T.A., LÜTHI, A., PLAMER, M.J., WIKSTRÖM, M.A., ANDERSON, W.W., ISAAC, J.T.R., COLLINGRIDGE, G.L. Mathematical modeling of non-stationary fluctuation analysis for studying channel properties of synaptic AMPA receptors. **Journal of Physiology**, vol. 537, p. 407-420, 2001.

BENOWITZ, L.I., ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends in Neurosciences**, vol. 20: 84-91, 1997.

BERBERICH, S., JENSEN, V., HVALBY, O., SEEBURG, P.H., KÖHR, G. The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction. **Neuropharmacology**, vol. 52, p. 7786, 2007.

BERRIDGE, M.J. Neuronal calcium signaling. **Neuron**, vol. 21, p. 13-6, 1998.

BERRIDGE, M.J., BOOTMAN, M.D., RODERICK, H.L. Calcium signaling: dynamics, homeostasis, and remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 4, p. 517-529, 2003.

BERRIDGE, M.J., IRVINE, R.F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, vol. 312, p. 315-161, 1984.

BEZPROZVANNY, I., WATRAS, J., EHRLICH, R.E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. **Nature**, vol. 351, p. 751-754, 1991.

BHALLA, U.S., IYENGAR, R. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. **Science**, vol. 283, p. 381-387, 1999.

BI, G.Q., POO, M.M. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. **Annual Review of Neuroscience**, vol. 24, p. 139-166, 2001.

BIDDLECOME, G.H., BERSTEIN, G., ROSS, E.M. Regulation of Phospholipase C- β 1 by G_q and m1 muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated and GTPase-activating protein-promoted deactivation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 7999-8007, 1996.

BITTOVA, L., STAHELIN, R.V., CHO, W. Roles of ionic residues of the 1 domain in protein kinase C- α activation and the origin of phosphatidylserine specific. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 4218-4226, 2001.

BLANK, J.L., ROSS, A.H., EXTON, J.H. Purification and characterization of two G-proteins that activate the β 1 isozyme of phosphoinositide-specific Phospholipase C. Identification as members of the G_q class. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 266, p. 18206-18216, 1991.

BLISS, T.V.P., A journey from the neocortex to hippocampus. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, vol. 358, p. 621-623, 2003.

BLISS, T.V.P., COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, vol. 361, p. 31-39, 1993.

BLISS, T.V., GARDNER-MEDWIN, A.R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **Journal of Physiology**, vol. 232, p. 357-374, 1973.

BLISS, T.V.P., LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **Journal of Physiology**, vol. 232, p. 331-356, 1973.

BLITZER, R.D. Ligand-gated ion channels. **Science STKE**, vol. 280, p. tr12, 2005.

BLITZER, R.D., CONNOR, J.H., BROWN, G.P., WONG, T., SHENOLIKAR, S., IYENGAR, R., LANDAU, E.M. Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. **Science**, vol. 280, p. 1940-1942, 1998.

BLITZER, R.D., IYENGAR, R., LANDAU, E.M. Postsynaptic signaling networks: cellular cogwheels underlying long-term plasticity. **Biological Psychiatry**, vol. 57, p. 113-119, 2005.

BLITZER, R.D., WONG, T., Nouranifar, R., Iyengar, R., Landau, E.M. Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 regions. **Neuron**, vol. 15, p. 1403-1414, 1995.

BLOODGOOD, B.L., SABATINI, B.L. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. **Science**, vol. 310, p. 866-869, 2005.

BLOODGOOD, B.L., SABATINI, B.L. Ca²⁺ signaling in dendritic spines. **Current Opinion in Neurobiology**, No Prelo (doi: 10.1016/j.conb.2007.04.003), 2007.

BOEHM, J., KANG, M.-G., JOHNSON, R.C., ESTEBAN, J., HUGANIR, R.L., MALINOW, R. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. **Neuron**, vol. 51, p. 213-225, 2006.

BORGDORFF, A.J., CHOQUET, D. Regulation of AMPA receptor lateral movements. **Nature**, vol. 417, p. 649-653, 2002.

BORTOLOTTO, Z.A., CLARKE, V.R.J., DELANY, C.M., PARRY, M.C., SMOLDER, I., VIGNES, M., HO, K.H., MIU, P., BRINTON, B.T., FANTASKE, R., OGDEN, A., GATES, M., ORNSTEIN, P.L., LODGE, D., BLEAKMAN, D., COLLINGRIDGE, G.L. Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. **Nature**, vol. 402, p. 297-301, 1999.

BOS, J.L., REHMANN, H., WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. **Cell**, vol. 129, p. 865-877, 2007.

BOURNE, H.R. How receptors talk to trimeric G proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 9, p. 134-142, 1997.

BOWIE, D., LANGE, G.D., MAYER, M.L. Activity-dependent modulation of glutamate receptors by polyamines. **The Journal of Neuroscience**, vol. 18, p. 8175-8185, 1998.

BOWER, J.M., BOLOURI, H. **Computational modeling of genetic and biochemical networks**. Massachusetts, MA, USA: MIT Press, 2001.

BRADSHAW, J.M., HUDMON, A., SCHULMAN, H. Chemical quenched flow kinetic studies indicate an intraholoenzyme autophosphorylation mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 20991-20998, 2002.

BRAGIN, A., JANGÓ, G., NÁDASKI, Z., HETKE, J., WISE, K., BUZSÁKI, G. Gamma oscillation in the hippocampus of the behaving rat. **The Journal of Neuroscience**, vol. 15, p. 47-60, 1995.

BRAITHWAITE, S.P., MEYER, G., HENLEY, J.M. Interactions between AMPA and intracellular proteins. **Neuropharmacology**, vol.39, p. 919-930, 2000.

BRAITHWAITE, S.P., PAUL, S., NAIRN, A.C., LOMBROSO, P.J. Synaptic plasticity: one STEP at a time. **Trends in Neuroscience**, vol. 29, p. 452-45, 2006.

BRAITHWAITE, S.P., XIA, H., MALENKA, R.C. Differential roles for NSF and GRIP/ABP in AMPA receptor cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 99, p. 7096-7001, 2002.

BREDT, D.S., NICOLL, R.A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. **Neuron**, vol. 40, p. 361-379, 2003.

BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 87, p. 682-685, 1990.

BREGMAN, D.B., BHATTACHARYYA, N., RUBIN, C.S. High affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II-B. Cloning, characterization, and expression of cDNAs for rat brain P150. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 264, p. 4648-4656, 1989.

BRIDGES, D., MOORHEAD, G.B.G. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. **Science STKE**, vol. 296, p. re10, 2005.

BROCKE, L., CHIANG, L.W., WAGNER, P.D., SCHULMAN, H. Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 22713-22122, 1999.

BROWN, M.T., COOPER, J.A. Regulation, substrates and function of src. **Biochimia et Biophysica Acta**, vol. 1287, p. 121-149, 1996.

BROWNING, M., DUNWISSIE, T., BENNET, W., GISPEN, W., LYNCH, G. Synaptic phosphoproteins: specific changes after repetitive stimulation of the hippocampal slice. **Science**, vol. 203 p. 60-62, 1979.

BROSTROM, M.A., BROSTROM, C.O., BRECKENRIDGE, B.M., WOLFF, D.J. Regulation of adenylate cyclase from glial tumor cells by calcium and calcium-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 251, p. 4744-4750, 1976.

BROWN, T.C., TRAN, I.C., BACKOS, D.S., ESTEBAN, J.A. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTP. **Neuron**, vol. 45, p. 81-94, 2005.

BROWNING, M., DUNWIDDIE, T., BENNET, W., GISPEN, W., LYNCH, G. Synaptic phosphoproteins: specific changes after repetitive stimulation of hippocampal slices. **Science**, vol. 203, p. 60-62, 1979.

BROWN, S.E., MARTIN, S.R., BAYLEY, P.M. Kinetic control of the dissociation pathway of calmodulin-peptide complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 3389-3397, 1997.

BROWN, T.C., TRAN, I.C., BACKOS, DS., ESTEBAN, J.A. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTP. **Neuron**, vol. 45, p. 81-94, 2005.

BUCHSBAUM, R., TELLEZ, J.-B., GOONESEKERA, S., FEIG, L.A. The N-terminal pleckstrin, coiled-coil, and IQ domains of the exchange factor Ras-GRF act cooperatively to facilitate activation by calcium. **Molecular and Cellular Biology** vol. 16, p. 4888-4896, 1996.

BURNHAM, M.R., BRUCE-STASKAL, J., HARTE, M.T., WEIDOW, C.L., MA, A., WEED, S.A., BOUTON, A.H. Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 20, p. 5865-5878, 2000.

CABRERA-VERA, T.M., VANHAUWE, J., THOMAS, T.O., MEDKOVA, M., PREININGER, A., MAZZONI, M.R., HAMM, H.E. Insights into G protein structure, function, and regulation. **Endocrinology Reviews**, vol. 24, p. 765-781, 2003.

CALLI, J.J., ZWAAGSTRA, J.C., MONS, N., COOPER, D.M.F. KRUPINSKI, J. Type VIII adenylyl cyclase. A Ca^{2+} /calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p.12190-12195, 1994.

CANAGARAJAH, B.J., KHOKHLATCHEV, A., COBB, M.H., GOLDSMITH, E.J. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. **Cell**, vol. 90, p. 859-869, 1997.

CARR, D.W., STOFKO-HAHN, R.E., FRASER, I.D.C., BISHOP, S.M., ACOTT, T.S., BRENNAN, R.G., SCOTT, J.D. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with II-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 266, p. 14188-14192, 1991.

CATLING, A.D., REUTER, C.W.M., COX, M.E., PARSONS, S.J., WEBER, M.J. Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or B-Raf-associated activity. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p. 30014-30021, 1994.

CARY, S.P.L., WINGER, J.A., DERBYSHIRE, E.R., MARLETTA, M.A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 31, p. 231-239, 2006.

CASTELLANI, G.C., QUINLAN, E.M., COOPER, L.N., SHOUVAL, H.Z. A biophysical model of bidirectional synaptic plasticity: dependence on AMPA and NMDA receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 98, p. 12772-12777, 2001.

CENSAREK, P., BEYERMANN, M., KOCH, K.-W. Target recognition of Apocalmodulin by nitric oxide synthase I peptides. **Biochemistry**, vol. 41, p. 8598-864, 2002.

CEULEMANS, H., BOLLEN, M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. **Physiological Review**, vol. 81, p. 1-29, 2003.

CHEN, H.-J., ROJAS-SOTO, M., OGUNI, A., KENNEDY, M.B. A synaptic Ras-GTPase activating protein p135 (SynGAP) inhibited by CaM kinase II. **Neuron**, vol. 20, p. 895-904, 1998.

CHEN, X., VINADE, L., LEAPMAN, R.D., PETERSEN, J.D., NAKAGAWA T., PHILLIPS, T.M., SHENG, M., REESE, T.S. Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 102, p. 11551-11556, 2005.

CHENG, D., HOOGENRAAD, C.C., RUSH, J., RAMM, E., SCHLAGER, M.A., DUONG, D.N., XU, P., WIJAYAWARANA, S.R., HALFELT, J., NAKAGAWA, T., SHENG, M., PENG, J. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. **Molecular & Cellular Proteomics**, vol. 5.6, p. 1158-1170, 2006.

CHEUNG, W.Y., LYNCH, T.J., WALLACE, R.W., TALLANT, E.A. cAMP renders Ca^{2+} -dependent phosphodiesterase refractory to inhibition by a calmodulin-binding protein (calcineurin). **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 256, p. 4439-4443, 1981.

CHIDIAC, P., MARKIN, V.S., ROSS, E.M. Kinetic control of guanine nucleotide binding to soluble $G\alpha_q$. **Biochemical Pharmacology**, vol. 58, p. 39-48, 1999.

CHIDIAC, P., ROSS, E.M. Phospholipase C- β 1 directly accelerates GTP hydrolysis by $G\alpha_q$ and acceleration is inhibited by $G\beta\gamma$ subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, vol.274, p. 19639-19643, 1999.

CHIN, D., MEANS, A.R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, vol. 10, p. 322-328, 2000.

CHOI, E.-J., WONG, S.T., HINDS, T.R., STORM, D.R. Calcium and muscarinic agonist stimulation of Type I adenylylcyclase in whole cells. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 267, p. 12440-12442, 1992.

CHOI, J., KO, J., PARK, E., LEE, J.-R., YOON, J., LIM, S., KIM, E. Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 12359-12363, 2002.

CHOU, M.M., HOU, W., JOHNSON, J., GRAHAM, L.K., LEE, M.H., CHEN, C.-S., NEWTON, A.C., SCHAFFHAUSEN, B.S., TOKER, A. Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. **Current Biology**, vol. 8, p. 1069-1077, 1998.

CLARKE, R.J., JOHNSON, J.W. NMDA receptor NR2 subunit dependence of the slow component of magnesium unblock. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26, p. 5825-5834, 2006.

COAN, E.J., COLLINGRIDGE, G.L. Magnesium ions block an N-methyl-D-aspartate receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, vol. 53, p. 21-26, 1985.

COBB, M.H., GOLDSMITH, E.J. How MAP kinases are regulated. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 14843-14846, 1995.

COGNET, L., GROG, L., LOUNIS, B., COQUET, D. Multiple routes for glutamate receptor trafficking: surface diffusion and membrane traffic cooperate to bring receptors to synapses. **Science STKE**, vol. 327, pe13, 2006.

COHEN, N.J., Squire, L.R. Preserved learning and retention of patterns analyzing skill amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, vol. 210, p. 207-209, 1980.

COHEN, P.T.W. Protein phosphatase 1 – targeted in many directions. **Journal of Cell Science**, vol. 115, p. 241-258, 2002.

COLLEY, P.A., SHEU, F.-S., ROUTTENBERG, A. Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact. **The Journal of Neuroscience**, vol. 10, p. 3353-3360, 1990.

COLLIN, C., MIYAGUCHI, K., SEGAL, M. Dendritic spine density and LTP in cultured hippocampal slices. **Journal of Neurophysiology**, vol. 77, p. 1614-1623, 1997.

COLLINGRIDGE, G.L. Long term potentiation in the hippocampus: mechanisms of initiation and modulation by neurotransmitters. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 6, p. 294-411, 1985.

COLLINGRIDGE, G.L., KEHL, S.J., MCLENNAN, H. The action of an N-methylaspartate antagonist on synaptic processes in rat hippocampus. **Journal of Physiology**, vol. 338, p. 33-46, 1983a.

COLLINGRIDGE, G.L., KEHL, S.J., MCLENNAN, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. **Journal of Physiology**, vol. 334, p. 33-46, 1983b.

COLLINGRIDGE, G.L., SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 11, p. 290-296, 1990.

COLLINS, M.O., YU, L., COBA, M.P., HUSI, H., CAMPUZZO, I., BLACKSTOCK, W.P., CHOUDHARY, J.S., GRANT, S.G. Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. **The Journal of Neuroscience**, vol. 280, p. 5972-5982, 2005.

COLQUHOUN D., JONAS, P., SAKMANN, B. Action of brief pulses of glutamate on AMPA/kainite receptors in patches from different neurons of rat hippocampal slices. **Journal of Physiology**, vol. 458, p. 261-287, 1992.

COULTRAP, S.J., NIXON, K.M., ALVESTAD, R.M., VALENZUELA, C.F., BROWNING, M.D. Differential expression of NMDA receptor subunits and splice variants among the CA1, CA3 and dentate gyrus of adult rat. **Molecular Brain Research**, vol. 135, p. 104-111, 2005.

CONN, P.J., BATTAGLIA, G., MARINO, M.J., NICOLETTI, F. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 6, p. 787-798, 2005.

CONNORS, K.A. **Chemical kinetics – The study of reactions rates in solution**. New York: VCH Publishers, 1990.

COOK, S.J., LOCKYER, P.J. Recent advances in Ca^{2+} -dependent Ras regulation and cell proliferation. **Cell Calcium**, vol. 39, p. 101-112, 2006.

COOPER, D.M.F. Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. **Biochemical Society Transactions**, vol. 31, p. 912-915, 2003a.

COOPER, D.M.F. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. **Biochemical Journal**, vol. 375, p. 517-529, 2003b.

COOPER, D.M.F., MONS, N., KARPEN, J.W. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. **Nature**, vol. 374, p. 421-424, 1995.

CORBIN, J.D., SUGDEN, P.H., WEST, L., FLOCKHAT, D.A., LINCOLN, T.M., MCCARTHY, D. Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 253, p. 3997-4003, 1978.

COTTRELL, J.R., DUBE, G.R., EGLES, C., LIU, G. Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. **The Journal of Neurophysiology**, vol. 84, p.: 1573-1587, 2000.

COX, J.A. Interactive properties of calmodulin. **Biochemical Journal**, vol. 249, p. 621-629, 1988.

COX, J.A., MAHOE, A., STEIN, E.A. Regulation of brain cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin – a quantitative analysis. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 256, p. 3218-3222, 1981.

CROUCH, T.H., KLEE, C.B. Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. **Biochemistry**, vol. 19, p. 3692-3698, 1980.

CULL-CANDY, S.G., BRICKLEY, S., FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 11: 327-335, 2001.

CULL-CANDY, S.G., LESZKIEWICZ, D.N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Science STKE**, vol. 255, p. re16, 2004.

CULLEN, P.J. Decoding complex Ca^{2+} signal through the modulation of Ras signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 18, p. 157-161, 2006.

CULLEN, P.J., LOCKYER, P.J. Integration of calcium and Ras signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 3, p. 339-348, 2002.

CZECH, M.P. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. **Cell**, vol. 100, p. 603-606, 2000.

D'ALCANTARA, P., SCHIFFMANN, S.N., SWILLENS, S. Bidirectional synaptic plasticity as a consequence of interdependent Ca^{2+} -controlled phosphorylation and dephosphorylation pathways. **European Journal of Neuroscience**, vol. 17, p. 2521-2528, 2003.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, vol. 65: 1-105, 2001.

DAOUDAL, G., HANADA, Y., DEBANNE, D. Bidirectional plasticity of excitatory postsynaptic potential (EPSP)-spike coupling in CA1 hippocampal pyramidal neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 99, p. 14512-14517, 2002.

DE KONINCK, P., SCHULMAN, H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequencies of calcium oscillations. **Science**, vol. 279, p. 227-230, 1998.

DELL'ACQUA, M.L., DODGE, K.L., TAVALIN, S.J., SCOTT, J.D. Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315-360. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 48796-48902, 2002.

DELL'ACQUA, M.L., SCOTT, J.D. Protein kinase A anchoring. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 12881-12884, 1997.

DELL'ACQUA, M.L., SMITH, K.E., GORSKI, J.A., HORNE, E.A., GIBSON, E.S., GOMEZ, L.L. Regulation of neuronal PKA signaling through APAK targeting dynamics. **European Journal of Cell Biology**, vol. 85, p. 627-633, 2006.

DERKACH, V., BARRIA, A., SODERLING, T.R. Ca^{2+} /calmodulin-kinase II enhances conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 96, p. 3269-3274, 1999.

DERCHACH, V.A., OH, M.C., GUIRE, E.S., SODERLING, T.R. Regulatory mechanism of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 8, p. 101-113, 2007.

DEV, K.K., NISHIMUNE, A., HENLEY, J.M., NAKANISHI, S. The protein kinase C alpha binding protein PICK1 interacts with short but no long form alternative splice variants of AMPA receptor subunits. **Neuropharmacology**, vol. 38, p. 635-644, 1999.

DIAMOND, J.S., JAHR, C.E. Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. **The Journal of Neuroscience**, vol. 17, p. 4672-4697, 1997.

DICKINSON, R.J., KEYSE, S.M. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. **Journal of Cell Science**, vol. 119, p. 4607-4615, 2006.

DINELEY, K.T., WEEBER, E.J., ATKINS, C., ADAMS, J.P., ANDERSON, A.E., SWEATT, J.D. Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration and coordination. **Journal of Neurochemistry**, vol. 77, p. 961-971, 2001.

DINGLELINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacological Reviews**, vol. 61, p. 7-61, 1999.

DOMEZ-LOPACINSKA, K., STROSZNAJDER, J.B. Cyclic GMP metabolism and its role in rain physiology. **Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 56, p. 15-34, 2005.

DONG, H., O'BRIEN, R.J., FUNG, E.T., LANAHAN, A.A., WORLEY, P.F., HUGANIR, R.L. GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. **Nature**, vol. 386, p. 279-284, 1997.

DONG, H., ZHANG, P., SONG, I., PETRALIA, R.S., LIAO, D., HUGANIR, R.L. Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2. **The Journal of Neuroscience**, vol. 19, p. 6930-6941, 1999.

DOSEMECI, A., CHENG, J.-H., VINADE, L., WITERS, C.A., POZZO-MILLER, L., REESE, T.S. Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 98, p. 10428-10432, 2001.

DRIERS, D.R., GALLEGOS, L.L., NEWTON, A.C. A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 282, p. 826-830, 2007.

DRUEY, K.M. Bridging with GAPs: receptor communication through RGS proteins. **Science STKE**, vol. 104, p. re14, 2001.

DUMAZ, N., MARAIS, R. Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, p. 29819-29823, 2003.

DZUBAY, J.A., JAHR, C.E. Kinetics of NMDA channel opening. **The Journal of Neuroscience**, vol. 16, p. 4129-4134, 1996.

EARNSHAW, B.A., BRESSLOFF, P.C. Biophysical model of AMPA receptor trafficking and its regulation during long-term potentiation/long-term depression. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26, p. 12362-12373, 2006.

EBIHARA, T., KAWABATA, I., USUI, S., SOBUE, K., OKABE, S. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal

neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with green fluorescent protein. **The Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 217-2180, 2003.

EBISUYA, M., KONDOH, K., NISHIDA, E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. **Journal of Cell Science**, vol. 118, p. 2997-3002, 2005.

ECCLES, J.C. **The physiology of synapses**. Berlin: Springer-Verlag, 1964.

EDWARDS, A.S., NEWTON, A.C. Regulation of protein kinase C β II by its C2 domain. **Biochemistry**, vol. 36, p. 15615-15623, 1997.

EHLERS, M.D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. **Neuron**, vol. 28, p. 511-525, 2000.

EHLERS, M.D., ZHANG, S., BERNHARDT, J.P., HUGANIR, R.L. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. **Cell**, vol. 84, p. 745-755, 1996.

EICHENBAUM, H., DUCHENKO, P., WOOD, E., SHAPIRO, M., TANILA, H. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? **Neuron**, vol. 23, p. 209-226, 1999.

ENGERT, F., BONHOEFFER, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. **Nature**, vol. 399, p. 66-70, 1999.

ENGLISH, J.D., SWEATT, J.D. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 19103-19106, 1997.

ERONDU, N.E., KENNEDY, M.B. Regional distribution of type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. **The Journal of Neuroscience**, vol. 5, p. 3270-3277, 1985.

ERREGER, K., DRAVID, S.M., BANKE, T.G., WYLLIE, D.J.A., TRAYNELIS, S.F. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signaling profiles. **The Journal of Physiology**, vol. 563, p. 345-358, 2005.

ESTEBAN, J.A., SHI, S.-H., WILSON, C., NURIYA, M., HUGANIR, R.L., MALINOW, R. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunit controls synaptic trafficking underlining plasticity. **Nature Neuroscience**, vol. 6, p. 136-143, 2003.

EXTON, J.H. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 36, p. 481-509, 1996.

FAM, N.P., FAN, W.-T., WANG, Z., ZHANG, L.-J., CHEN, H., MORAN, M.F. Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 17, p. 1396-1406, 1997.

FAN, W.-T., KOCH C.A., HOOG, C.L., FAM, N.P., MORAN, M.F. The exchange factor Ras-GRF2 activates Ras-dependent and Rac-dependent mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Biology**, vol. 8, p. 935-938, 1998.

FARNSWORTH, C.L., FRESHNEY, N.W., ROSEN, L.B., GHOSH, A., GREENBERG, M.E., FEIG, L.A. Calcium activation of Ras mediated by the neuronal exchange factor as-GRF. **Nature**, vol. 376, p.524-527, 1995.

FARROQ, A., ZHOU, M.-M. Structure and regulation of MAPK phosphatase. **Cellular Signalling**, vol. 16, p. 769-779, 2004.

FENG, B., STEMMER, P.M. Interactions of calcineurin A, calcineurin B, and Ca²⁺. **Biochemistry**, vol. 38, p. 12481-12489, 1999.

FENG, B., STEMMER, P.M. Ca²⁺ binding site 2 in calcineurin-B modulates calmodulin-dependent calcineurin phosphatase activity. **Biochemistry**, vol. 40, p. 8808-8814, 2001.

FERGUSON, G.D., STORM, D.R. Why calcium-stimulated adenylyl cyclases? **Physiology**, vol. 19, p. 271-276, 2004.

FERGUSON, S.S.G. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacological Reviews**, vol. 53, p. 1-24, 2001.

FERNÁNDEZ-ALFONSO, T., RYAN, T.A. The efficiency of the synaptic vesicle cycle at central nervous system synapses. **Trends in Cell Biology**, vol. 16, p. 413-420, 2006.

FERRAGUTI, F., SHIGEMOTO, R. Metabotropic glutamate receptors. **Cell Tissue Research**, vol. 326, p. 483-504, 2006.

FERRELL JR., J.E. Building a cellular switch: more lessons from a good egg. **BioEssay**, vol. 21, p. 866-870, 1999.

FERRELL JR., J.E. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 6, p. 140-148, 2002.

FINKBEINER, S., TAVAZOIE, S.F., MALORATSKI, A., JACOBS, K.M., HARRIS, K.M., GREENBERG, M.E. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. **Neuron**, vol. 19, p. 1031-1047, 1997.

FISHER, Y. The hippocampal intrinsic network oscillator. **Journal of Physiology**, vol. 554, p. 156-174, 2003.

FIVAZ, M., MEYER, T. Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca^{2+} /calmodulin. **The Journal of Cell Biology**, vol. 170, p. 429-441, 2005.

FLEMINGS, I.N., ELLIOT, C.M., BUCHANAN F.G., DOWNES, C.P., EXTON, J.H. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 27, p. 12753-12758, 1999.

- FOSKETT, J.K., WHITE, C., CHEUNG, K.-H., MAK, D.-O.D. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. **Physiological Reviews**, vol. 87, p. 593-658, 2007.
- FRANCIS, S.H., CORBIN, J.D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, vol. 36, p. 275-328, 1999.
- FRESHNEY, N.W., GOONESEKERA, S.D., FEIG, L.A. Activation of the exchange factor Ras-GRF by calcium requires an intact Db1 homology domain. **FEBS Letters**, vol. 407, p. 111-115, 1997.
- FREY, U., KRUG, M., REYMANN, K.G., MATTIES, H. Anisomycine, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. **Brain Research**, vol. 452, p. 57-65, 1988.
- FU, J., DESOUZA, S., ZIFF, E.B. Intracellular membrane targeting and suppression of Ser880 phosphorylation of glutamate receptor 2 by the linker I-set II domain of AMPA receptor-binding protein. **The Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 7592-7601, 2003.
- GAERTNER, T.R., PUTKEY, J.A., WAXHAM, M.N. RC3/neurogranin and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II produce opposing effects on the affinity of calmodulin for calcium. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 39374-39382, 2004a.
- GAERTNER, T.R., KOLODZIEJ, S.J., WANG, D., KOBAYASHI, R., KOOMEN, J.M., STOOPS, J.K., WAXHAM, M.N. Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of α , β , γ , and δ isoforms of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 12484-12494, 2004b.
- GALLEGOS, L.L., KUNKEL, M.T., NEWTON, A.C. Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 30947-30956, 2006.

GALLAGHER, S.C., GO, Z.-H., LI, S., DYER, R.B., TREWHELLA, J., BLEE, C.B. There is communication between all four Ca^{2+} -bindings sites of calcineurin B. **Biochemistry**, vol. 40, p. 12094-12102, 2001.

GAMBY, C., WAAGE, M.C., ALLEN, R.C., BAIZER, L. Analysis on the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 26698-266705, 1996.

GAO, Z.H., KREBS, J., VANBERKUM, M.F.A., TANG, W.-J., MAUNE, J.F., MEANS, A.R., STULL, J.T., BECKINGHAM, K. Activation of four enzymes by two series of calmodulin mutants with point mutations in individual Ca^{2+} binding sites. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 268, p. 20096-20104, 1993.

GAO, C., SUN, X., WOLF, M.E. Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons **Journal of Neurochemistry**, vol. 98, p. 1664-1677, 2006.

GARNER, C.C., NASH, J., HUGANIR, R.L. PDZ domains in synapse assembly and signaling. **Trends in Cell Biology**, vol. 10, p. 274- 280, 2000.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, vol. 14, p. 60-67, 1991.

GARTHWAITE, J., BOULON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, vol. 57, p. 683-706, 1995.

GERGES, N., BACKOS, D.S., RUPASINGHE, C.N., SPALLER, M.R., ESTEBAN, J.A. Dual role of the exocist in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. **The EMBO Journal**, vol. 25, p. 1623-1634, 2006.

GERDIN, M.J., EIDEN, L.E. Regulation of PC12 cell differentiation by cAMP signaling t ERK independent of PKA: do all the connections add up? **Science STKE**, vol. 382, pe15, 2007.

GERENDASY, D.D., HERRON, S.R., WATSON, J.B., SUTCLIFFE, J.G. Mutational and biophysical studies suggest RC3/neurogranin regulates calmodulin availability. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p. 22420-22426, 1994.

GERENDASY, D.D., HERRON, S.R., JENNINGS, P.A., SUTCLIFFE, J.G. Calmodulin stabilizes an amphiphilic α -helix within RC3/neurogranin and GAP-43/neuromodulin only when Ca^{2+} is absent. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 6741-6750, 1995.

GIBSON, R.M., TAYLOR, S.S. Dissecting the cooperative reassociation of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Roles of Trp-196 in the catalytic subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 31998-32005, 1997.

GIESE, K.P., FRIEDMAN, E., TELLIEZ, J.-B., FEDOROV, N.B., WINES, M., FEIG, L.A., SILVA, A.J. Hippocampus-dependent learning and memory is impaired in mice lacking the Ras-guanine-nucleotide releasing factor 1 (Ras-GFF1). **Neuropharmacology**, vol. 41, p. 791-800, 2001.

GILL, D.L., CHUEH, S.-H., WHITLOW, C.L. Functional importance of the synaptic plasma membrane calcium pump and sodium-calcium exchanger. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 259, p. 10807-10813, 1984.

GILLI, R., LAFITTE, D., LOPEZ, C., KILHOFFER, M.-C., MAKAROV, A., BRIAND, C., HAIECH, J. Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin. **Biochemistry**, vol. 37, p. 5450-5456, 1998.

GIORGIONE, J.R., LIN, J.-H., MCCAMMON, A., NEWTON, A.C. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase C δ for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 1660-1669, 2006.

GIORGIONE, J., HYSELL, M., HARVEY, D.F., NEWTON, A.C. Contribution of the CA1 and C1B domains to the membrane interaction of protein kinase C. **Biochemistry**, vol. 42, p. 11194-11202, 2003.

- GIRARD, P., POTIER, P. NO, thiols, and disulfides. **FEBS**, vol. 320, p. 7-8, 1993.
- GOLDMAN-RAKIC, P.S. Regional and cellular fraction of working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 93, p. 13473-13480, 1996.
- GORAYA, T.A, COOPER, D.M.F. Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. **Cellular Signalling**, vol. 17, p. 789-797, 2005.
- GORMAN, C., SKINNER, R.H., SKELLY, J.V., NEIDLE, S., LOWE, P.N. Equilibrium and kinetic measurements reveal rapidly reversible binding of Ras to Raf. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 6713-6719, 1996.
- GOTOH, T., NIINO, Y., TOKUDA, M., HATASE, O., NAKAMURA, S., MATSUDA, M., HATTORI, S. Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 18602-18607, 1997.
- GOUAUX, E. Structure and function of AMPA receptors. **Journal of Physiology**, vol. 554, p. 249-253, 2003.
- GRAB, D.J., CRALIN, R.K., SIELKEVITZ, P. Function of calmodulin in postsynaptic densities I. Presence of a calmodulin-activatable cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. **The Journal of Cell Biology**, vol. 89, p. 433-439, 1981.
- GREWAL, S.J., HORGAN, A.M., YORG, R.D., WITHERS, G.S., BANKER, G.A., STORK, P.J.S. Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine-mono-phosphate-dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 275: 3722-3728, 2000.
- GRIFFITH, L.C., LU, C.S., SUN, X.X. CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. **Molecular Interventions**, vol. 3, p. 386-403, 2003.
- GROC, L., CHOQUET, D. AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. **Cell Tissue Research**, vol. 326, p. 423-438, 2006.

GROC, L., HEINE, M., COGNET, L., BRICKLEY, K., STEPHENSON, F.A., LOUNIS, B., CHOQUET, D. Differential activity-dependent regulation of the lateral motilities of AMPA and NMDA receptors. **Nature Neuroscience**, vol. 7, p. 695-696, 2004.

GROVER, L.M., TYLER, T.J. Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. **Nature**, vol. 347, p. 67-69, 1990.

GU, C., COOPER, M.F. Calmodulin-binding sites on adenylyl cyclase type VIII. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 8012-8021, 1999.

GUILLOU, J.-L., NAKATA, H., COOPER, D.M.F. Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 35539-35545, 1999a.

GUILLOU, J.-L., ROSE, G.M., COOPER, D.M.F. Differential activation of adenylyl cyclases by spatial and procedural learning. **The Journal of Neuroscience**, vol. 19, p. 6183-6190, 1999b.

HAIECH, J., KLEE, C.B., DEMAILLE, J.G. Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin-stimulated enzymes. **Biochemistry**, vol. 20, p. 3890-3897, 1981.

HALL, R.A., SODERLING, T.R. Quantitation of AMPA receptor expression in cultured hippocampal neurons. **Neuroscience**, vol. 78, p. 361-371, 1997.

HALLBERG, B., RAYTER, S.I., DOWNWARD, J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p. 3913-3916, 1994.

HANOUNE, J., DEFER, N. Regulation and role of adenylyl cyclases isoforms. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 41, p. 145-174, 2001.

HANSEN, K., YUAN, H., TRAYNELIS, S.F. Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation. **Current Opinion in Neurobiology**, No Prelo (doi: 10.1016/j.conb2007.0.014), 2007.

HANSON, P.I., SCHULMAN, H. Neuronal Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinases. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 61, p. 559-601, 1992.

HARRIS, K.M., STEVENS, J.K. Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. **The Journal of Neuroscience**, vol. 9, p. 2982-2997, 1989.

HASHIMOTO, Y., KING, M.M., SODERLING, T.R. Regulatory interactions of calmodulin-binding proteins: phosphorylation of calcineurin by autophosphorylated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 85, p. 7001-7005, 1988.

HASHIMOTO, Y., PERRINO, B.A., SODERLING, T.R. Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 265: 1924-1927, 1990.

HATTORI, M., MINATO, N. Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. **Journal of Biochemistry**, vol. 134, p. 479-484, 2003.

HAYASHI, Y., SHI, S.H., ESTEBAN, J.A., PICCINI, A., PONCER, J.C., MALINOW, R. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. **Science**, vol. 287, p. 2262-2267, 2000.

HAYER, A., BHALLA, U.S. Molecular switches at the synapse emerge from receptor and kinase traffic. **PLOS Computational Biology**, vol. 1, p. 137-154, 2005.

HEIDMAN, W., WIERMAN, B.M., STORM, D.R. GTP is not required for calmodulin stimulation of bovine brain adenylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 79, p. 1462-1465, 1982.

HEMMINGS, H.C. JR., NAIRN, A.C., GREENGARD, P. DARP-32, a dopamine- and adenosine 3'-5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein II. Comparison of the kinetics of phosphorylation of DARP-32 and phosphatase inhibitor 1. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 259, p. 14491-14497, p. 1984.

- HENLEY, J.M. Proteins interactions implicated in AMPA receptor trafficking: a clear destination and an improving route map. **Neuroscience Research**, vol. 45, p. 243-254, 2003.
- HIRAI, T., CHIDA, K. Protein kinase C ζ (PKC ζ) activation mechanisms and cellular functions. **Journal of Biochemistry**, vol. 133, p. 1-7, 2003.
- HIRBEC, H., PERESTENKO, O., NISHIMUNE, A., MEYER, G., NAKANISHI, S., HENLEY, J.M., DEV, K.K. The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 15221-15224, 2002.
- HOEFLICH, K.P., IKURA, M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation. **Cell**, vol. 108, p. 739-742, 2002.
- HÖFER, T., VENANCE, L., GIAUME, C. Control and plasticity of intracellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. **The Journal of Neuroscience**, vol. 22, p. 4850-4859, 2002.
- HOKIN, L.E. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 54, p. 205-235, 1985.
- HOLTHOFF, K., TSAY, D., YUSTE, R. Calcium dynamics of spines dependent on their dendritic location. **Neuron**, vol. 33, p. 425-437, 2002.
- HOLMAN, D., FELIGIONI, M., Henley, J.M. Differential redistribution of native AMPA receptor complexes following LTD induction in acute hippocampal slices. **Neuropharmacology**, vol. 52, p. 92-99, 2007.
- HOLMES, W.R., LEVY, W.B. Insights into associative long-term potentiation from computational models of NMDA receptor-mediated calcium influx and intracellular calcium concentration changes. **Journal of Neurophysiology**, vol. 63, p. 1148-1168, 1990.
- HOLZ, G.G., KANG, G., HARBECK, M., ROE, M.W., CHEPURNY, O.G. Cell physiology of cAMP sensor Epac. **The Journal of Physiology**, vol. 577, p. 5-15, 2006.

HOOK, S.S., MEANS, A.R. Ca^{2+} /CaM-dependent kinases: from activation to function. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 41, p. 471-505, 2001.

HOPPER, R.A., GARTHWAITE, J. Tonic and Phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26, p. 11521-11513, 2006.

HOUDUSSE, A., COHEN, C. Target sequence recognition by the calmodulin superfamily: implications from light chain binding to the regulatory domain of scallop myosin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 92, p. 10644-10647, 1995.

HOUSLAY, M.D., KOLCH, W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. **Molecular Pharmacology**, vol. 58, p. 659-668, 2000.

HU, C.-D., KARIYA, K.-I., KOTANI, G., SHIROUZU, M., YOKOYAMA, S., KATAOKA, T. Coassociation of Rap-1 and Ha-Ras with Raf-1 N-terminal region interfere with Ras-dependent activation of Raf-1. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 11702-11705, 1997.

HUANG, C.-C., YOU, J.-L., Wu, M.-Y., Hsu, K.-S. Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 12286-12292, 2004.

HUANG, C.-H., FERRELL, J.E. JR. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 93, p. 10078-10083, 1996.

HUANG, C.Y., CHAU, V., CHOCK, P.B., WANG, J.H., SHARMA, R.K. Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: requirement of the binding of four Ca^{2+} to calmodulin activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 78, p. 871-874, 1981.

- HUANG, E.J., REICHARDT, L.F. TRK receptors: role in neuronal signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 72, p. 609-642, 2003.
- HUANG, K.-P., HUANG, F.L., LI, J., SCHUNK, P., MCPHIE, P. Calcium-sensitive interaction between calmodulin and modified forms of rat brain Neurogranin/RC3. **Biochemistry**, vol. 39, p. 7291-7299, 2000.
- HUANG, K.-P., HUANG, F.L., JAGER, T., LI, J.F., REYMANN, K., BALSCHUN, D. Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling. **The Journal of Neuroscience**, vol. 24, p. 10660-10669, 2004.
- HUANG, Y.Y., MALENKA, R.C. Examination of TEA-induced synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus: the role of voltage-dependent Ca^{2+} channels in the induction of LTP. **The Journal of Neuroscience**, vol. 13, p. 568-576, 1993.
- HUBBARD, M.J., KLEE, C.B. Calmodulin binding by calcineurin. Ligand-induced renaturation of protein immobilized on nitrocellulose. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, p. 15062-15070, 1987.
- HUBBARD, S.R., TILL, J.H. Protein tyrosine kinase structure and function. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 69, p. 373-398, 2000.
- HUBLER, L., GILL, G.N., BERTICSN, P.J. Reversibility of the epidermal growth factor receptor self-phosphorylation reaction - evidence for formation of a high energy phosphotyrosine bond. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 264, p. 1558-1564, 1989.
- HUNG, A.Y., SHENG, M. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 5699-5702, 2002.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, vol. 80, p. 225-236, 1995.

HUSI, H., WARD, M.A., Choudhary, I.S., Blackstock, W.P., Grant, S.G.N. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. **Nature Neuroscience**, vol. 3, p. 661-669, 2003.

ICHIBA, T., KURAIISHI, Y., SAKAI, O., NAGATA, O., GROFFEN, J., KURATA, T., HATTORI, S., MATSUDA, M. Enhancement of guanine-nucleotide exchange activity of C3G for Rap1 by the expression of Crk, CrkL, and GRB2. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 22215-22220, 1997.

ICHIBA, T., HASHIMOTO, Y., NAKAYA, M., KURAIASHI, Y., TANAKA, S., KURATA, T., MOCHIZUKI, N., MATSUDA, M. Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 14376-14381, 1999.

IMPEY, S., OBRIETAN, K., STORM, D.R. Making new connections: role of ERK/MAP signaling in neuronal plasticity. **Neuron**, vol. 23, p. 11-14, 1999.

IVANOV, A., PELLEGRINO, C., RAMA, S., DUMALSKA, I., SALYHA, Y., BEN-ARI, Y., MEDINA, I. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. **Journal of Physiology**, vol. 572, p. 789-798, 2006.

IWAKURA, Y., NAGANO, T., KAWAURA, M., HORIKAWA, H., IBARAKI, K., TAKEI, N., NAWA, H. N-methyl-D-aspartate-induced α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor down-regulation involves interaction of the carboxyl terminus of *GruR2/3* with PICK. Ligand-binding studies using *sindbis* vectors carrying AMPA receptors decoys. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 40025-40032, 2001.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, vol. 63, p. 19-32, 1995.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H., VIANNA, M.R.M., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioral Brain Research**, vol. 103, p. 1-11, 1999.

IZUMI, Y., CLIFFORD, D.B., ZORUMSKI, C.F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. **Science**, vol. 257, p. 1273-1276, 1992.

JACKSON, M.B., CHAPMAN, E.R. Fusion pores and fusion machines in Ca^{2+} -triggered exocytosis. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, vol. 35, p. 135-160, 2006.

JAISWAL, R.M., MOODIE, S.A., WOLFMAN, A., LANDRETH, G.E. The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 14, p. 6944-6953, 1994.

JANSSENS, V., GORIS, J. PROTEIN PHOSPHATASE 2A: a highly regulated family of serine threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. **Biochemical Journal**, vol. 353, p. 417-439, 2001.

JANSSEN, W.G.M., VISSAVAJIHALA, P., ANDREWS, G., MORAN, T., HOF, P.R., MORRISON, J.H. Cellular and synaptic distribution of NR2A and NR2B in macaque monkey and rat hippocampus as visualized with subunit-specific monoclonal antibodies. **Experimental Neurology**, vol. 191, p. S28-S44, 2005.

JAMES, S.R., PATERSON, A., HARDEN, T.K., DOWNES, C.P. Kinetic analysis of phospholipase C β isoforms using phospholipids-detergent mixed micelles. Evidence for

interfacial catalysis involving distinct micelle binding and catalytic steps. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 11872-1191, 1995.

JANSSEN, W.G.M., VISSAVAJHALA, P., ANDREWS, G., MORAN, T., HOF, P.R., MORRISON, J.H. Cellular and synaptic distribution of NR2A and NR2B in macaque monkey and rat hippocampus as visualized with subunit-specific monoclonal antibodies. **Experimental Neurology**, vol. 191, p. S28-S44, 2005.

JENCKS, W.P. How does a calcium pump pump calcium? **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 264, p. 18855-18858, 1989.

JENCO, J.M., BECKER, K.P., MORRIS, A.J. Membrane-binding properties of phospholipase C- β_1 and phospholipase C- β_2 : role of the C-terminus and effects of polyphosphoinositides, G-proteins and Ca²⁺. **Biochemical Journal**, vol. 327, p. 431-437, 1997.

JENSEN, A.A., SHEPPARD, P.O., JENSEN, L.B., O'HARA, P.J., BRÄUNER-OSBORNE, H. Construction of a high affinity zinc binding site in the metabotropic glutamate receptor mGluR1. Noncompetitive antagonism originating from the amino-terminal domain of a family C G-protein-coupled receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 10110-10118, 2001.

JIA, Z., MIU, P., XIONG, Z., HENDERSON, J., GERLAI, R., TAVERNA, F.A., VELUMIAN, A., MCDONALD, J., CARLEN, P., ABRAMOW-NEWERLY, W., RODER, J. Enhanced LTP in mice deficient in AMPA receptor GluR2. **Neuron**, vol. 17, p. 945-956, 1996.

JINGAMI, H., NAKANISHI, S., MORIKAWA, K. Structure of the metabotropic glutamate receptor. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 13, p. 271-278, 2003.

JURADO, L.A., CHOCKALINGAM, P.S., JARRET, H.W. Apocalmodulin. **Physiological Reviews**, vol. 79, p. 661-682, 1999.

- JOHNSON, J.W., ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, vol. 325, p. 529-531, 1987.
- JOHNSON, J.D., SNYDER, C., WALSH, M., FLYNN, M. Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca^{2+} exchange with the N- and C-terminal Ca^{2+} binding sites of calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 761-767, 1996.
- JONAS, P., BURNASHEV, N. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. **Neuron**, vol. 15, p. 987-990, 1995.
- JURADO, L.A., CHOCKALINGAM, P.S., JARRETT, H.W. Apocalmodulin. **Physiological Reviews**, vol. 79, p. 661-682, 1999.
- KAKALIS, L.T., KENNEDY, M., SIKKINK, R., RUSNAK, F., ARMITAGE, I.M. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. **FEBS Letters**, vol. 362, p. 55-58, 1995.
- KAMPA, B.M., CLEMENTS, J., JONAS, P., STUART, G.J. Kinetics of Mg^{2+} unblock of NMDA receptors: implication for spike-timing dependent synaptic plasticity. **Journal of Physiology**, vol. 556, p. 337-345, 2004.
- KANDEL, E.R. Genes, synapses, and long-term memory. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 173, p. 124-125, 1997.
- KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, vol. 294, p. 1030-1038, 2001.
- KATAN, M. New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward. **Biochemical Journal**, vol. 391, p. e7-e9, 2005.
- KATH, W.L. Computational modeling of dendrites. **Journal of Neurobiology**, vol. 64, p. 91-99, 2005.
- KAUER, J.A., MALENKA, R.C., NICOLL, R.A. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. **Neuron**, vol. 1, p. 911-917, 1998.

KENNEDY, M.B., BEALE, H.C., CARLISLE, H.J. WASHBURN, L.R. Integration of biochemical signaling in spines. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 6, p. 423-434, 2005.

KERANEN, L.M., NEWTON, A.C. Ca^{2+} differentially regulates conventional protein kinase Cs' membrane interaction and activation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 25959-25967, 1997.

KIEL, C., SELZER, T., SHAUL, Y., SCHREIBER, G., HERMANN, C. Electrostatically optimized Ras-binding Raf guanine dissociation stimulator mutants increase the rate of association by stabilizing the encounter complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 101, p. 9223-9228, 2004.

KIM, J.H., LIAO, D., LAU, L.-F., HUGANIR, R.L. SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD95/SAP90 protein family. **Neuron**, vol. 20, p. 683-691, 1998.

KIM, M.J., DUNAH, A.W., WANG, Y.T., SHENG, M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. **Neuron**, vol. 46, p. 745-760, 2005.

KIM, S.A., HEINZE, K.G, WAXHAM, M.N, SCHWILLE, P. Intracellular calmodulin availability accessed with two-photon cross-correlation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 101, p. 105-110,2004.

KINCAID, R.L., VAUGHAN, M. Direct comparison of Ca^{2+} requirements for calmodulin interaction and activation of protein phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 83, p. 1193-1197, 1986.

KINCAID, R.L., KEMPNER, E., MANGANIELLO, V.C., OSBORNE, J.C., VAUGHAN, M. Calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase form brain – relationship of subunit structure to activity assessed by radiation inactivation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 256, p. 11351-11355, 1981.

KINCAID, R.L., MANGANIELLO, V.C., ODYA, C.E., OSBORNE JR, J.C., STITH-COLEMAN, I.E., DANIELLO, M.A., VAUGHAN, M. Purification and properties of calmodulin-stimulated phosphodiesterase from mammalian brain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 259, p. 5158-5166, 1984.

KITAYAMA, H., SUGIMOTO, Y., MATSUZAKI, T., IKAWA, Y., NODA, M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. **Cell**, vol. 56, p. 77-84, 1989.

KIYATKIN, A., AKSAMITIENE, E., MARVERICK, N.I., BORISOV, N, HOEK, J.B., KHOLODENKO, .N. Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 19925-19938, 2006.

KLANN, E., CHAN, S.J., SWEATT, J.D. Persistent protein kinase activation in the maintenance phase of long-term potentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 266, p. 24253-24256, 1991.

KLANN, E., CHAN, S.J., SWEATT, J.D. Mechanism of protein kinase C activation during the induction and maintenance of long-term potentiation probed using a selective peptide substrate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 90, p. 8337-8341, 1993.

KLEE, C.B., MEANS, A. R. Keeping up with calcium. **EMBO Reports**, vol. 3, p. 823-827, 2002.

KLEE, C.B., CROUCH, T.H., KRINKS, M.H. Calcineurin: a calcium and calmodulin-binding protein of the nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 76, p. 6270-6273, 1979.

KLEE, C.B., REN, H., WANG, X. Regulation of the calmodulin-stimulated phosphatase, calcineurin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 273, p. 13367-13370, 1998.

KLEPPE, I.C., ROBINSON, H.P.C. Determining the activation time course of synaptic AMPA receptors from openings of colocalized NMDA receptors. **Biophysical Journal**, vol. 77, p. 1418-1427, 1999.

KNUDSEN, B.S., FELLER, S.M., HANAFUSA, H. Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p. 32781-32787, 1994.

KOCH, C., SEGEV, I. **Methods in neuronal modeling – from ions to networks**. 2nd Edition. Cambridge: A Bradford Book, 1998.

KOHOUT, S.C., CORBALÁN-GARCÍA, S., TORRECILLAS, A., COMÉZ-FERNANDÉZ, J.C., FALKE, J.J. C2 domain of protein kinase C isoforms α , β , and γ : activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state. **Biochemistry**, vol. 41, p. 11411-11424, 2001.

KÖHR, G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. **Cell Tissue Research**, vol. 326, p. 439-446, 2006.

KÖHR, G., JENSEN, V., KOESTER, H.J., MIHALJEVIC, A.L.A., UTVIK, J.K., KVELLO, A., OTTERSEN, O.P., SEEBURG P.H., SPRENGEL, R., HVALBY, O. Intracellular domains of NMDA receptor subtypes are determinants for long-term potentiation induction. **The Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 10791-10799, 2003.

KOMIYAMA, N., WATABE, A.M., CARLISLE, H.J., PORTER, K., CHARLESWORTH, P., MONTI, J., STRATHDEE, D.J.C., O'CARROLL, C., MARTIN, S.J., MORRIS, R.G., O'DELL, T.J., GRANT, S.G.N. SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. **The Journal of Neuroscience**, vol. 22, p. 9721-9732, 2002.

KOTT, S., WERNER, M., KÖRBER, C, HOLLMANN, M. Electrophysiological properties of AMPA receptor are differentially modulated depending on the associated member of the TARPs family. **The Journal of Neuroscience**, vol. 27, p. 378-3789, 2007.

KOVALCHUK, Y., HANSEN, E., KAFITZ, K.W., KONNERTH, A. Postsynaptic induced of BDNF-mediated long-term potentiation. **Science**, vol. 295, p. 1729-1734, 2002.

KRAPIVINSKY, G., KRAPIVINSKY L., MANASIAN, Y., IVANOV, A., TYSIO, R., PELLEGRINO, C. BEN-ARI, Y., CLAPMAN, D.E., MEDINA, I. The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and rasGRF1. **Neuron**, vol. 40, p. 775-784, 2003.

KRAPIVINSKY, G., MEDINA, I., KRAPIVINSKY, L., GAPON, S., CLAPHAM, D.E. SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA potentiation. **Neuron**, vol. 43, p. 563-574, 2004.

KHARITONOV, V.G., SUDQUIST, A.R., SHARMA, V.S. Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 28158-28164, 1995.

KRISTENSEN, A.S., TRAYNELIS, S.F. An intrusive chaperone. **Nature**, vol. 435, p. 1042-1043, 2005.

KUBO, Y., TATEYAMA, M. Towards a view of functioning dimeric metabotropic receptors. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 15, p. 289-295, 2005.

KUPZIG, S., DEACONESCU, D., BOUYOUCHEF, D., WALKER, S.A., LIU, Q., POLTE, C.L., DAUMKE, O. ISHIZAKI, T., LOCKYER, P.J., WITTINGHOFER, A., CULLEN, P.J. GAP1 family members constitute bifunctional Ras and Rap GTPase-activating proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 9891-9900, 2006.

KUPZIG, S., WALKER, S.A., CULLEN, P.J. The frequencies of calcium oscillation are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and ERK/MAPK cascade.

- Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, vol. 102, p. 7577-7582, 2005.
- KYRIAKIS, J.M. The integration of signaling by multiprotein complexes containing Raf kinases. **Biochimia et Biophysica Acta**, no prelo (10.1016/j.bbamcr.2006.11.003), 2007.
- KYRIAKIS, J.M., APP, H., ZHANG, X.-F., BANERJEE, P., BRAUTIGAN, D.L., RAPP, U.R., AVRUCH, J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. **Nature**, vol. 358, p. 417-421, 1992.
- LEE, C.H., PARK, D., WU, D., RHEE, S.G., SIMON, M.I. Members of the G_q α subunit gene family activate Phospholipase C β isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 267, p. 16044-16047, 1992.
- LEE, H.-K., KAMEYAMA, K., HUGANIR, R.L., BEAR, M.F. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. **Neuron**, vol. 21, p. 1151-1162, 1998.
- LEE, H.-K., BARBAROSIE, M., KAMEYAMA, K., BEAR, M.F., HUGANIR, R.L. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation during bidirectional synaptic plasticity. **Nature**, vol. 405, p. 955-959, 2000.
- LEE, S.H., LIU L., WANG, Y.T., SHENG, M. Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. **Neuron**, vol. 36, p. 661-674, 2002.
- LEE, S.H., PARK, J., CHE, Y., HAN, P.-L., LEE, J.-K. Constitutive activity and differential localization of p38 α and p38 β MAPKs in adult mouse brain. **Journal of Neuroscience Research**, vol. 60, p. 623-631, 2000.
- LEE, S.H., SIMONETTA, A., SHENG, M. Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. **Neuron**, vol. 43, p. 221-236, 2004.
- LENZEN, C., COOL, R.H., PRINZ, H., KUHLMANN, J., WITTINGHOFER, A. Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25^{Mn}. **Biochemistry**, vol. 37, p. 7420-7430, 1998.

LEONARD, A.S., DAVARE, M.A., HORNE, M.C., HELL, J.W. SAP97 is associated with the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 273, p. 19518-19524, 1998.

LEONARD, A.S., BAYER, K.-U., MERRILL, M.A., LIM, I.A., SHEA, M.A., SCHULMAN, H., HELL J.W. Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II docking to N-methyl-D-aspartate receptors by calcium/calmodulin and α -actin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 48441-48448, 2002.

LERMA, J. Roles and rules of kainate receptors in the synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 4, p. 481-495, 2003.

LETTS, V.A., FELIX, R., BIDDLECOME, G.H., ARIKKANTH, J., MAHAFFEY, C.L., VALENZUELA, A., BARTLETT II, F. MORI, Y., CAMPBELL, K.P., FRANKEL, W.N. The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel γ subunit. **Nature Genetics**, vol.19, p. 340-347, 1998.

LI, J., PAK, H., HUANG, F.L., Huang, K.P. N-methyl-D-aspartate induces neurogranin/RC3 oxidation on rat brain slices. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 1294-1300, 1999.

LI, Z., SACKS, D.B. Elucidation of the interaction of calmodulin with the IQ motifs of IQGAP1. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, p. 4347-4352, 2003.

LI, S., TIAN, X., HARTLEY, D.M., FEIG, L.A. Distinct roles for Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) and Ras-GRF2 in the induction of long-term potentiation and long-term depression. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26, p. 1721-1729, 2006.

LIAO, D., HESSLER, N.A., MALINOW, R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. **Nature**, vol. 375, p. 400-404, 1995.

LIM, I.A., MERRILL, M.A., CHEN, Y., HELL, J.W. Disruption of the NMDA receptor-PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect. **Neuropharmacology**, vol. 45, p. 738-754, 2003.

LIN, J.W., FOSTER, K., LEE, S.H., AHMADIAN, G., WYSZYNSKI, M., WANG, Y.T., SHENG, M. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. **Nature Neuroscience**, vol. 3, p. 1282-1290, 2000.

LINSE, S., HELMERSSON, A., FORSÉN, S. Calcium binding to calmodulin and its globular domains. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 266, p. 8050-8054, 1991.

LIPTON, S.A., CHOI, Y.-B., PAN, Z.H., LEI, S.Z., CHEN, H.-S.V., SUCHER, N.J., LOSCALZO, J., SINGEL, D.J., STAMLER, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, vol. 364, p. 626-632, 1993.

LISMAN, J.E. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 86, p. 9574-9578, 1989.

LISMAN, J., RAGHAVACHARI, S. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. **Science STKE**, vol. 35, p. re11, 2006.

LISMAN, J., SCHULMAN, H., CLINE, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 3, p. 175-190, 2002.

LISMAN, J.E., ZHABOTINSKY, A.M. A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing and AMPA receptor anchoring assembly. **Neuron**, vol. 31, p. 191-201, 2001.

LIU, Q., WALKER, S.A., GAO, D., TAYLOR, J.A., DAI, Y.-F., ARKELL, R.S., BOOTMAN, M.D., RODERICK, H.L., CULLEN, P.J., LOCKYER, P.J. CAPRI and RASAL

impose different modes of information processing on Ras due to contrasting temporal filtering of Ca^{2+} . **The Journal of Cell Biology**, vol. 170, p. 183-190, 2005.

LIU, Y., STORM, D.R. Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. **Trends in Physiological Sciences**, vol. 11, p. 107-111, 1990.

LLEDO, P.M., HJELMSTAD, G.O., MUJKERJI, S., SODERLING, T.R., MALENKA, R.C., NICOLL, R.A. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 92, p. 11175-11179, 1995.

LLEDO, P.M., ZHANG, X., SÜDHOF, T.C., MALENKA, R.C., NICOLL, R.A. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. **Science**, vol. 279, p. 399-403, 1998.

LOMO, T. The discovery of long-term potentiation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, vol. 35, p. 617-620, 2003.

LU, W., MAN, H., JU, W., TRIMBLE, W.S., MCDONALD, J.F., WANG, Y.T. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampus neurons. **Neuron**, vol. 29, p. 243-254, 2001.

LUCAS, K.A., PITARI, G.M., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHLZ, S., CHEPENIK, K.P., WALDMAN, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, vol. 52, p. 375-413, 2000.

LUJÁN, R., NUSSER, Z., ROBERTS, J.D.B., SHIGEMOTO, R., SOMOGYI, P. Perisynaptic localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, vol. 8, p. 1488-1500, 1996.

LÜSCHER C., XIA, H., BEATTIE, E.C., CARROLL, R.C., VON ZASTROW, M., MALENKA, R.C., NICOLL, R.A. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. **Neuron**, vol. 24, p. 649-658, 1999.

LÜTHI, A., CHITTAJALLU, R., DUPRAT, F., PALMER, M.J., BENKE, T.A., KIDD, F.L., HENLEY, J.M., ISAAC, J.T., COLLINGRIDGE, G.L. Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by NSF-GluR2 interaction. **Neuron**, vol. 24, p. 389-399, 1999.

LYNCH, G. Long-term potentiation in the Eocene. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, vol. 35, p. 625-628, 2003.

LYNCH, G., BAUDRY, M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. **Science**, vol. 224, p. 1057-1063, 1984.

LYNCH, G., LARSON, J., KELSON, S., BARRINUEVO, G., SCHOTTLER, F. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, vol. 305, p. 115-118, 1983.

LYNCH, G.S., DNWIDDIE, T., GRIBKOFF, V. Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. **Nature**, vol. 266, p. 737-739, 1977.

LYNCH, M.A. Long term potentiation and memory. **Physiological Review**, vol. 84, p. 87-126, 2004.

MACARA, I.G., LOUNSBURY, K.M., RICHARDS, S.A., MICKIERNAN, C., BAR-SAGI, D. The ras superfamily of GTPases. **FASEB Journal**, vol. 10, p. 625-630, 1996.

Madden, D.R. The structure and function of glutamate receptor ion channels. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 3, p. 91-101, 2002.

MAGEE, J., HOFFMAN, D., COLBERT, C., JOHNSTON, D. Electrical and calcium signaling in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. **Annual Review of Physiology**, vol. 60, p. 327-346, 1998.

MAHONEY, C.W., PAK, J.H., HUANG, K.-P. Nitric oxide modification of rat brain neurogranin. Identification of the cysteine residues involved in intramolecular disulfide bridge

formation using site-direct mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 28798-28804, 1996.

MAHUT, H. MOSS, M., ZOLA-MORGAN, S. Retention deficits after combined amygdalo-hippocampal and selective hippocampal resections in the monkey. **Neuropsychologia**, vol. 19, p. 201-225, 1981.

MAINEN, Z.F., CARNEVALE, N.T., ZADOR, A.M., CLAIBORNE, B.J., BROWN, T.H. Electrotonic architecture of hippocampal CA1 pyramidal neurons based on three-dimensional reconstructions. **Journal of Neurophysiology**, vol. 76, p. 1904-1923, 1996.

MAJERUS, P.W., CONNOLLY, T.M., DECKMYN, H., ROSS, T.S., BROSS, T.E., ISHII, H., BANSAL, V.S., WILSON, D.B. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. **Science**, vol. 234, p. 1519-1526, 1986.

MAK, D.-O., MCBRIDE, S.M., FOSKETT, J.K. Spontaneous channel activity of the inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor (InsP₃R). Application of allosteric modeling to calcium and InsP₃ regulation of InsP₃ single regulation of InsP₃R single-channel gating. **Journal of General Physiology**, vol. 122, p. 583-603, 2003.

MALENKA, R.C., BEAR, M.F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, vol. 44, p. 5-21, 2004.

MALENKA, R.C., NICOLL, R.A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiples forms and mechanisms. **Trends in Neuroscience**, vol. 16, p. 521-527, 1993.

MALINOW, R., MAINEN, Z.F., HAYASHI, Y. LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 10, p. 352-357, 2000.

MALINOW, R., MADISON, D.V., TSIEN, R.W. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. **Nature**, vol. 335, p. 820-824, 1988.

MALINOW, R., MALENKA, R.C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, vol. 25, p. 103-126, 2002.

MALINOW, R., MILLER, J.P. Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. **Nature**, vol. 320, p. 529-530, 1986.

MALINOW, R., SCHULMAN, H., TSIEN, R.W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. **Science**, vol. 245, p. 862-866, 1989.

MALINOW, R., TSIEN R.W. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. **Nature**, vol. 346, p. 177-180, 1990.

MAN, H.-Y., LIN, J.W., JU, W.H., AHMADIAN, G., LIU, L., BECKER, L.E., SHENG, M., WANG, Y.T. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. **Neuron**, vol. 25, p. 649-662, 2000.

MANNAIONI, G., MARINO, M.J., VALENTI, O., TRAYNELIS, S.F., CONN, P.J. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. **The Journal of Neuroscience**, vol. 21, p. 5925-5934, 2001.

MARAIS, R., LIGHT, Y., PATERSON, H.F., MASON, C.S., MARSHALL, C.J. Differential regulation of Ra-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic Ras and tyrosine kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 4378-4383, 1997.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 268, p. 12231-12234, 1993.

MARTÍN, H., FLÁNDEZ, M., NOMBELA, C., MOLINA, M. Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. **Molecular Microbiology**, vol. 58, p. 6-16, 2005.

MARTÍN, M., SANZ, J.M., CUBERO, A. Characterization of metabotropic glutamate receptors coupled to a pertussis toxin sensitive G-protein in bovine brain coated vesicles. **FEBS Letters**, vol. 2, p. 191-196, 1993.

MARTIN, S.J., GRINWOOD, P.D., MORRIS, R.G.M. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. **Annual Review of Neuroscience**, vol. 23, p. 649-711, 2000.

- MARTIN, S.J., MORRIS, R.G.M. New life and old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. **Hippocampus**, vol. 12, p. 609-636, 2002.
- MARTIN, S.R., MAUNE, J.F., BECKINGHAM, K., BAYLEY, P.M. Stopped-flow studies of calcium dissociation from calcium-binding-site mutants of *Drosophila melanogaster* calmodulin. **European Journal of Biochemistry**, vol. 205, p. 1107-1114, 1992.
- MARTIN, S.R., TELEMAN, A., BAYLEY, P.M., DRAKENBERG, T., FORSÉN, S. Kinetics of calcium dissociation from calmodulin and its tryptic fragments – a stopped-flow fluorescence study using Quin 2 reveals a two-domain structure. **European Journal of Biochemistry**, vol. 151, p. 543-550, 1985.
- MARTZEN, M.R., SLEMMON, J.R. The dendritic peptide neurogranin can regulate a calmodulin-dependent target. **Journal of Neurochemistry**, vol. 64, p. 92-100, 1995.
- MASTER, B.S.S. Nitric oxide synthases: why so complex? **Annual Review of Nutrition**, vol. 14, p. 131-145, 1994.
- MATSUZAKI, M., ELLIS-DAVIES, G.C.R., NEMOTO, T., MIYASHITA, Y., IINO, M., KASAI, H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Nature Neuroscience**, vol. 4, p. 1086-1092, 2001.
- MAYER, M.L., ARMSTRONG, N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. **Annual Review of Physiology**, vol. 66, p. 161-181, 2004.
- MCCLELLAND, J.L., MCNAUGHTON, B.L., O'REILLY, R.C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failure of connectionist models of learning and memory. **Psychological Reviews**, vol. 102, p. 419-457, 1995.
- MCLAUGHLIN, S., WANG, J., GAMBHIR, A., MURRAY, D. PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow. **Annual Review of Biomolecular Structure**, vol. 31, p. 151-175, 2002.

MCNAUGHTON, B.L. Long-term potentiation, cooperativity and Hebb's cell assemblies: a personal history. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, vol. 35, p. 629-634, 2003.

MCNEILL, R.B., COLBRAN, R.J. Interaction of autophosphorylated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II with neuronal cytoskeletal proteins. Characterization of binding to a 190kDa postsynaptic density protein. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 10043-10049, 1995.

MERAT, D.L., HU, Z.Y., CARTER, T.E., CHEUNG, W.Y. Bovine brain calmodulin-dependent protein phosphatase. Regulation of subunit A activity by calmodulin and subunit B. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 260, p. 11053-11059, 1985.

MEYER, T., HANSON, P.I., STRYER, L., Schulman, H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. **Science**, vol. 256, p. 1199-1202, 1992.

MEYER, T., WENSEL, T., STRYER, L. Kinetics of calcium channel opening by inositol 1,4,5-trisphosphate. **Biochemistry**, vol. 29, p. 32-37, 1999.

MIAO, H.H., YE, J.S., WONG, S.L.Y., WANG, B.X., LI, X.Y., SHEU, F.S. Oxidative modifications of neurogranin by nitric oxide: an amperometric study. **Bioelectrochemistry**, vol. 51, p. 163-173, 2000.

MIGNERY, G.A., NEWTON, C.L., ARCHER III, B.T., SÜDHOF, T.C. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 265, p. 12679-12685, 1990.

MILLER, S.G., PATTON, B.L., KENNEDY, M.B. Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca^{2+} -independent activity. **Neuron**, vol. 1, p. 593-64, 1988.

MILNER, B., SQUIRE, L.R., KANDEL, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, vol. 20, p. 445-468, 1998.

MILLWARD, T.A., ZOLNIEROWICZ, S., HEMMING, B.A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 24, p. 186-191, 1999.

MISHKIN, M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not separate removal of amygdala and hippocampus. **Nature**, vol. 273, p. 297-298, 1978.

MITCHELL, N.A., FLECK, M.W. Targeting AMPA receptor gating processes with allosteric modulators and mutations. **Biophysical Journal**, vol. 92, p. 2392-2402, 2007.

MITIN, N., ROSSMAN, K.L., DER, C.J. Signaling interplay in Ras superfamily function. **Current Biology**, vol. 15, p. R563-R574, 2005.

MOGAMI, H., ZHANG, H., SUZUKI, Y., URANO, T., SAITO, N., KOJIMA, I., PETERSEN, O.H. Decoding of short-lived Ca^{2+} influx signals into long term substrate phosphorylation through activation of two distinct classes of protein kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, p. 9896-9904, 2003.

MOODIE, S.A., PARIS, M.J., KOLCH, W., WOLFMAN, A. Association of MEK1 with p21ras.GMPPNM is dependent on B-Raf. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 14, p. 7153-7162, 1994.

MOON, I.S., APPERSON, M.L., KENNEDY, M.B. The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 91, p. 3954-3958, 1994.

MONS, N., DECORTE, L., JAFFARD, R., COOPER, D.M.F. Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclase, key integrators of cellular signaling. **Life Sciences**, vol. 62, p. 1647-1652, 1998.

MORALES, M., GODA, Y. Nomadic AMPA receptors and LTP. **Neuron**, vol. 23, p. 431-434, 1999.

MORARU, I.I., KAFTAN, E.J., EHRLICH, B.E., WATRAS, J. Regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channels by InsP_3 calcium. Simulation of single channel

kinetics based on Ligand binding and electrophysiological analysis. **Journal of General Physiology**, vol. 113, p. 837-849, 1999.

MORICE, C., NOTHIAS, K., KÖING, S., VERNIER, P., BACCARINI, M., VINCENT, J.-D., BARNIER, J.V. Raf-1 and B-Raf proteins have similar regional distributions but differential subcellular localization in adult rat brain. **European Journal of Neuroscience**, vol. 11, p. 1995-2006, 1999.

MORRIS, R.G.M., GARRUD, P., NAWLINS, J.N.P., O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, vol. 297, p. 681-683, 1982.

MORRIS, R.G.M., MOSER, E.I., RIEDEL, G., MARTIN, S.J., SANDIN, J. DAY, M., O'CARROLL, C.O. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, vol. 358, p. 773-786, 2003.

MOSIOR, M., NEWTON, A.C. Mechanism of the apparent cooperativity in the interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. **Biochemistry**, vol. 37, p. 17271-17279, 1998.

MUKHERJI, S., SODERLING, T.R. Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by inter- and intrasubunit-catalyzed autophosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p. 13744-13747, 1994.

MUKHOPADHAYAY, S., ROSS, E.M. Rapid GTP binding and hydrolysis by Gq promoted by receptor and GTPase-activating proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 6, p. 9539-9544, 1999.

MULKEY, R.M., ENDO, S., SHENOLIKAR, S., MALENKA, R.C. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. **Nature**, vol. 369, p. 486-488, 1994.

MULLER, D., LYNCH, G.L. Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic response in hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 85, p. 9346-9350, 1988.

NADEL, L., MOSCOVITCH, M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 7, p. 217-227, 1997.

NAIRN, A.C., HEMMINGS, H.C.JR, GREENGARD, P. Protein kinases in the brain. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 54, p. 931-976, 1985.

NAKAGAWA, T., CHENG, Y., RAMM, E., SHENG, M., WALZ, T. Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes. **Nature**, vol. 433, p. 545-549, 2005.

NALEFSKI, E.A., NEWTON, A.C. Membrane binding kinetics of protein kinase C β II mediated by its C2 domain. **Biochemistry**, vol. 40, p. 13216-13229, 2001.

NEUNER-JEHLE, M., DENIZOT, J.-P., MALLETT, J. Neurogranin is locally concentrated in rat cortical and hippocampal neurons. **Brain Research**, vol. 733, p. 149-154, 1996.

NEWTON, A.C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 28495-28498, 1995.

NEWTON, A.C. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors and macromolecular interactions. **Chemical Reviews**, vol. 101, p. 2353-2364, 2001.

NEWTON, A.C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochemical Journal**, vol. 370, p. 361-371, 2003.

NEWTON, A.C., JOHNSON, J.E. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. **Biochimia et Biophysica Acta**, vol. 1376, p. 155-172, 1998.

NEWTON, A.C., KOSHLAND, D.E. High cooperativity, specificity, and multiplicity in the protein kinase C-lipid interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 264, p. 14909-14915, 1989.

NGUYEN, P.V., ABEL, T., KANDEL, E.R. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. **Science**, vol. 265, p. 1104-1107, 1994.

NGUYEN, P.V., WOO, N.H Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. **Progress in Neurobiology**, vol. 71: 401-437, 2003.

NICOLL, R.A., TOMITA, S., BREDT, D.S. Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. **Science**, vol. 311, p. 1253-1256, 2006.

NIELSEN, M.D., CHAN, G.C.K., POSER, S.W., STORM, D.R. Differential regulation of type I and type VIII Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases by G_i-coupled receptors *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 33308-33318, 1996.

NIMCHINSKY, E.A., SABATINI, B.L., SVOBODA, K. Structure and function of dendritic spines. **Annual Review of Physiology**, vol. 64, p. 313-353, 2002.

NISHIMUNE, A., ISAAC J.T.R., MOLNAR, E., NOEL, J., ASH, S.R., TAGAYA, M., COLLINGRIDGE, G.L., NAKANISHI, S., HENLEY, J.M. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. **Neuron**, vol. 21, p. 87-97, 1998.

NOWAK, L., BREGESTVSKI, P., ASCHER, P., HERBET, A., PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, vol. 307, p. 462-465, 1984.

NOEL, J., RALPH, G.S., PICKARD, L., WILLIAMS, J., MOLNAR, E., UNEY, J.B., COLLINGRIDGE, G.L., HENLEY, J.M. Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. **Neuron**, vol. 23, p. 365-376, 1999.

NOURRY, C., GRANT, S.G.N., BORG, J.-P. PDZ domain proteins: plug and play! **Science STKE**, vol. 179, p. re7, 2003.

NUSSER, Z. AMPA and NMDA receptors: similarities and differences in their synaptic distribution. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 10, p. 337-341, 2000.

NUSSER, Z., LUJAN, R., LAUBE, G., ROBERTS, J.D.B., MOLNAR, E., SOMOGYI, P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. **Neuron**, vol. 21, p. 545-559, 1998.

OANCEA, E., MEYER, T. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol. **Cell**, vol. 95, p. 307-318, 1998.

OBARA, Y., LABUDDA, K., DILLON, T.J., STORK, P.J.S. PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells. **Journal of Cell Science**, vol. 117, p. 6085-6094, 2004.

OBARA, Y., HORGAN, A.M., STORK, P.J.S. The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. **Journal of Neurochemistry**, vol. 101, p. 470-482, 2007.

OGREIG, D., DOSKELAND, S.O. Protein kinase II has two distinct binding sites for cyclic AMP, only one of which is detectable by conventional membrane filtration method. **FEBS Letters**, vol. 121, p. 340-344, 1980.

OGREIG, D., DOSKELAND, S.O. The kinetics of the interaction between cyclic AMP and the regulatory moiety of protein kinase II. **FEBS Letters**, vol. 129, p. 282-286, 1981a.

OGREIG, D., DOSKELAND, S.O. The kinetics of association of cyclic AMP to the two types of binding sites associated with protein kinase II from bovine myocardium. **FEBS Letters**, vol. 129, p. 287-292, 1981b.

OH, J.S., MANZERRA, P., KENNEDY, M.B. Regulation of the neuron-specific Ras GTPase-activating protein, synGAP, by Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 17980-17988, 2004.

OH, M.C., DERKACH, V.A., GUIRE, E.S., SODERLING, T.R. Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 752-758, 2006.

OHBA, Y., MOCHIZUKI, N., MATSUO, K., YAMASHITA, S., NAKAYA, M., HASHIMOTO, Y., HAMAGUCHI, M., KURATA, T., NAGASHIMA, K., MATSUDA, M. Rap2 as a slowly responding molecular switch in Rap1 signaling cascade. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 20, p. 6074-6083, 2000.

OHTSUKA, T., SHMIZU, K., YAMAMORI, B., KURODA, S., TAKAI, Y. Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 1258-1261, 1996.

OKADA, S., MATSUDA, M., ANAFI, M., PAWSON, T., PESSIN, J.E. Insulin regulates the dynamic balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and CrkII-C3G complexes. **The EMBO Journal**, vol. 17, p. 2554-2565, 1998.

O'KEEFE, J., DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, vol. 34, p. 171-175, 1971.

OLIVERIA, S.F., GOMEZ, L.L., DELL'ACQUA, M.L. Imaging kinase-AKAP79-phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy. **The Journal of Cell Biology**, vol. 160, p. 101-112, 2003.

OLWIN, B.B., EDELMAN, A.M., KREBS, E.G., STORM, D.R. Quantification of energy coupling between Ca^{2+} , calmodulin, skeletal muscle myosin light chain kinase, and kinase substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 259, p. 10949-10955, 1994.

OMKUMAR, R.V., KIELY, M.J., ROSENSTEIN, A.J., MIN, K.-T., KENNEDY, M.B. Identification of a phosphorylation site for Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 31670-31678, 1996.

ORITA, S., KAIBUCHI, K., KURODA, S., SHIMIZU, K., NAKANISHI, H., TAKAI, Y. Comparison of kinetic properties between two mammalian ras p21 GDP/GTP exchange proteins, ras guanine-nucleotide releasing factor and *smg* GDP dissociation stimulator. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 268, p. 25542-25546, 1993.

OST, T.W.B., DAFF, S. Thermodynamic and kinetic analysis of the nitrosyl, carbonyl, and dioxy heme complexes of neuronal nitric-oxide synthase. The roles of substrate and tetrahydrobiopterin in oxygen activation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 280, p. 965-973, 2005.

OSTEN, P., KHATRI, L., PEREZ, J.L., KOHR, G., GIESE, G., DALY, C. SCHULTZ, T.W., WENSKY, A., LEE, L.M., ZIFF, E.B. Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of AMPA receptor. **Neuron**, vol. 27, p. 313-325, 2000.

OSTEN, P., STERN-BACH, Y. Learning from stargazin: the mouse, the phenotype and the unexpected. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 16, p. 275-280, 2006.

OTMAKHOV, N., TAO-CHENG, J.-H., CARPENTER, S., ASRICAN, B., DOSEMECI, A., REESE, T.S., LISMAN, J. Persistent accumulation of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol. 24, p. 9324-9331, 2004.

OUIMET, C.C., CRUZ E SILVA, E.F., GREENGARD, P. The α and γ 1 isoforms of protein phosphatase 1 are highly and specifically concentrated in dendritic spines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 92, p. 3396-3400, 1995.

PAK, D.T.S., YANG, S., RUDOLPH-CORREIA, S., KIM, E., SHENG, M. Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. **Neuron**, vol. 31, p. 289-303, 2001.

PAK, J.H., HUANG, F.L., LI, J., BALSCHUN, D., REYMANN, K.G., CHIANG, C., WESTPHAL, H., HUANG, K.-P. Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial memory: a study with knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 97, p. 11232-11237, 2000.

PALLEN, C.J., WANG, J.H. Regulation of calcineurin by metal ions. Mechanism of activation by Ni²⁺ and an enhanced response to Ca²⁺/calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 259, p. 6134-6141, 1984.

PALMER, C.L., COTTON, L., HENLEY, J.M. The molecular pharmacology and cell biology of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. **Pharmacological Reviews**, vol. 57, p. 253-277, 2006.

PANDA, K., GHOSH, S., STUEHR, D.J. Calmodulin activates intersubunit electron transfer I the neuronal nitric-oxide synthase dimer. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 23349-23356, 2001.

PARK, M., PENICK, E.C., EDWARDS, J., KAUER, J.A., EHLERS M.D. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. **Science**, vol. 305, p. 1972-1975, 2004.

PASSAFARO, M., PIÉCH, V., SHENG, M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. **Nature Neuroscience**, vol. 4, p. 917-926, 2001.

PATTON, B.L., MILLER, S.G., KENNEDY, M.B. Activation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase by Ca²⁺/calmodulin is inhibited by autophosphorylation of threonine

within the calmodulin-binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 265, p. 11204-11212, 1990.

PATTERSON, R.L., BOEHNING, D., SNYDER, S.H. Inositol 1,4,5-thrisphosphate receptors as signal integrators. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 73, p. 37465, 2004.

PEARSON, G., ROBINSON, F., GIBSON, T.B., XU, B.-E., KARANDIKAR, M., Berman, K., COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, vol. 22, p. 153-183, 2001.

PEI, W., HUANG, Z., NIU, L. GluR3 flip and plop: differences in channel opening kinetics. **Biochemistry**, vol. 46, p. 2027-2036, 2007.

PENG, J., KIM, M.J., CHENG, D., DUONG, D.M., GYGI, S.P., SHENG, M. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 21003-21011, 2004.

PERESTENKO, P.V., HENLEY, J.M. Characterization of the intracellular transport of Glu1 and GluR2 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 275, p. 43525-43532, 2003.

PERRINO, B.A., NG, L.Y., SODERLING, T.R. Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 340-346, 1995.

PERRINO, A., WILSON, A., ELLISON, P., CLAPP, L.H. Substrate selectivity and sensitivity to inhibition by FK506 and cyclosporine A of calcineurin heterodimers composed of the α or β catalytic subunit. **European Journal of Biochemistry**, vol. 269, p. 3540-3548, 2002.

PERSECHINI, A., MCMILLAN, K., LEAKEY, P. Activation of myosin light chain kinase and nitric oxide synthase activities by calmodulin fragments. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p. 16148-16154, 1994.

PERSECHINI, A., STEMMER, P.M. Calmodulin is a limiting factor in the cell. **Trends in Cardiovascular Medicine**, vol. 12, p.32-37, 2002.

PERSECHINI, A., WHITE, H.D., GANSZ, K.J. Different mechanisms for Ca^{2+} dissociation from complexes of calmodulin with nitric oxide synthase or myosin light chain kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 62-67, 1996.

PERSECHINI, A., YANO, K., STEMMER, P.M. Ca^{2+} binding and energy coupling in the calmodulin-myosin light chain kinase complex. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 275, p. 4199-4204, 2000.

PETERSEN, J.D., CHEN, X., VINADE, L., DOSEMECI, A., LISMAN, J.E., REESE, T.S. Distribution of postsynaptic density (PSD)-95 and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II at the PSD. **The Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 1270-1278, 2003.

PETRALIA, R.S., SANS, N., WANG, Y.-X., WENTHOLD, R.J. Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. **Molecular and Cellular Neuroscience**, vol. 2, p. 436-452, 2005.

PIN, J.-P., KNIAZEFF, J., GOUDET, C., BESSIS, A.-S., LIU, J., GALVEZ, T., ACHER, F., RONDARD, P., PRÉZEAU, L. The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. **Biology of the Cell**, vol. 96, p. 335-342, 2004.

PLOWMAN, S.J., HANCOCK, J.F. Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. **Biochimia et Biophysica Acta**, vol. 1746, p. 274-283, 2005.

PONGRÁCZ, F., POOLOS, N.P., KOCSIS, J.D., SHEPHERD, G.M. A modelo of NMDA-mediated activity in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Journal of Neurophysiology**, vol. 68, p. 2248-2259, 1992.

- POPESCU, G., AUERBACH, A. Modal gating for NMDA receptors and the shape of their synaptic response. **Nature Neuroscience**, vol. 6, p. 476-483, 2003.
- POTTER, L.K., TOBIN, F.L. Perspectives on mathematical modeling for receptor-mediated processes. **Journal of Receptor and signal Transduction**, vol. 27, p. 1-25, 2007.
- PREININGER, A.M., HAMM, H.E. G protein signaling: insights from new structure. **Science STKE**, vol. 218, re3, 2004.
- PRICHARD, L., DELOUME, J.C., STORM, D.R. Interactions between neurogranin and calmodulin *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 7689-7694, 1999.
- PRIEL, A., KOLLEKER, A., AYALON, G., GILLOR, M., OSTEN, P., STERN-BACK, Y. Stargazin reduces desensitization and slow deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. **The Journal of Neuroscience**, vol. 25, p. 2682-2686, 2005.
- QIN, Y., ZHU, Y., BAUMGART, J.P., STORNETTA, R.L., SEIDNMAN, K., MACK, V., VAN AELST, L., ZHU, J.J. State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. **Genes and Development**, vol. 19, p. 2000-2015, 2005.
- QUINTANA, A.R., WANG, D., FORBES, J.E., WAXHAM, M.N. Kinetics of calmodulin binding to calcineurin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 334, p. 674-680, 2005.
- RACCA, C., STEPHENSON, F.A., STREIT, P., ROBERTS, J.D.B., Somogyi, P. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. **The Journal of Neuroscience**, vol. 20, p. 2512-2522, 2000.
- RÁCZ, B., BLANPIED, T.A., EHLERS, M.D., WEINBERG, R.J. Lateral organization of the endocytic machinery in the dendritic spines. **Nature Neuroscience**, vol. 7, p. 917-918, 2004.
- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls - The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 266, p. 4244-4250, 1991.

RAGHAVACHARI, S., LISMAN, J.E. Properties of quantal transmission at CA1 synapses. **Journal of Neurophysiology**, vol. 92, p. 2456-2467, 2004.

RAMARKERS, G.M.J., GRAAN, P.N.E., URBAN, I.J.A., KRAAY, D., TANG, T., PASINELLI, P., OESTREICHER, A.B., GISPEN, W.H. Temporal differences in the phosphorylation state of pre- and postsynaptic protein kinase C substrate B-50/GAP-43 and neurogranin during long-term potentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 13892-13898, 1995.

RAMEAU, G.A., CHIU, L.-Y., ZIFF, E.B. Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 14307-14314, 2004.

RANNELS, S.R., CORBIN, J.D. Two different intrachain cAMP binding sites of cAMP-dependent protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 255, p. 7085-7088, 1980.

RAY, L.B., STURGILL, T.W. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 263, p. 12721-12727, 1988.

REPRESSA, A., DELOUME, J.C., SENSENBRENNER, M., BEN-ARI, Y., BAUDIER, J. Neurogranin: immunocytochemical localization of a brain-specific protein kinase C substrate. **The Journal of Neuroscience**, vol. 10, p. 3782-3792, 1990.

REBECCHI, M.J., PENTYALA, S.N. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific Phospholipase C. **Physiological Reviews**, vol. 80, p. 1291-1335, 2000.

REUTER, C.W.M., CATLING, A.D., JELINEK, T., WEBER, M.J. Biochemical Analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 7644-7656, 1995.

- RHEE, S.G., HOI, K.D. Regulation of inositol phospholipids-specific phospholipase C isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 267, p. 12393-12396, 1992.
- RICH, R.C., SCHULMAN, H. Substrate-directed function of calmodulin in autophosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 273, p. 25424-25429, 1998.
- ROBBINS, D.J., ZHEN, E., OWAKI, H., VANDERBILT, C.A., EBERT, D., GEPPERT, T.D., COBB, M.H. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 268, p. 5097-5106, 1993.
- ROBERT, A., ARMSTRONG, N., GOUAUX, E., HOWE, J.R. AMPA receptor binding cleft mutations that alter affinity, efficacy, and recovery from desensitization. **The Journal of Neuroscience**, vol. 25, p. 3752-3762, 2005.
- ROBERT, A., HOWE, J.R. How AMPA receptor desensitization depends on receptor occupancy. **The Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 47-85, 2003.
- ROBERTS, D.J., WAELBROECK, M. G protein activation by G protein coupled receptors: ternary complex formation or catalyzed reaction. **Biochemical Pharmacology**, vol. 68, p. 799-806, 2004.
- ROBISON, A.J., BARTLETT, R.K., BASS, M.A., COLBRAN, R.J. Differential modulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activity by regulated interactions with N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunits and α -actin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 280, p. 39316-39323, 2005.
- ROCKLIFFE, N., GAWLER, D. Differential mechanisms of glutamate receptor regulation for SynGAP in cortical neurones. **FEBS Letters**, vol. 580, p. 831-838, 2006.
- ROMAN, F.S., STÄUBLI, U., LYNCH, G. Evidence for synaptic potentiation in a cortical network during learning. **Brain Research**, vol. 418, p. 221-226, 1987.

ROMAN, F.S., TRUCHET, B., MACHETTI, E., CHAILLAN, F.A., SOUMIREU-MOURAT, B. Correlations between electrophysiological observations of synaptic plasticity modifications and behavioral performance in mammals. **Progress in Neurobiology**, vol. 58, p. 61-87, 1999.

ROMANO, C., C., SESMA, M.A., MCDONALD, C.T., O'MALLEY, K., VAN DEN POL, A.N., OLNEY, J.W. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, vol. 355, p. 455-469, 1995.

ROSEN, L.B., GINTY, D.D., WEBER, M.J., GREENBERG, M.E. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. **Neuron**, vol. 12, p. 1207-1221, 1994.

ROSKOSKI JR., R. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 331, p. 1-14, 2005.

ROSS E.M., WILKIE, T.M. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 69, p. 795-827, 2000.

ROSSI, A.M., TAYLOR, C.W. Ca^{2+} regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: can Ca^{2+} function without calmodulin? **Molecular Pharmacology**, vol. 66, p. 199-202, 2004.

ROUACH, N., BYRD, K., PETRALIA, R.S., ELIAS, G.M., Adesnick, H., Tomita, S., Karimzadegan, S., KEALEY, C., BREDET, D.S., NICOLL, R.A. TARP γ -8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. **Nature Neuroscience**, vol. 8, p. 1525-1533, 2005.

ROUX, P.P., BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological function. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 68, p. 320-344, 2004.

- ROY, B., GARTHWAITE, J. Nitric oxide activation of guanylate cyclase in cells revisited. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 103, p. 12185-12190, 2006.
- Roy, B.C., Kohu, K., Matsuura, K., Yanai, H., Akiyama, T. SPAL, a Rap-specific GTPase activating protein, is presented in the NMDA receptor-PSD-95 complex in the hippocampus. **Genes to Cells**, vol. 7, p. 607-617, 2002.
- RUBIN, C.S., ROSEN, O.M. Protein phosphorylation. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 44, p. 831-876, 1975.
- RUMBAUGH, G., ADAMS, J.P., KIM, J.H., HUGANIR, R.L. SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinase in cultured neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 103, p. 4344-4351, 2006.
- RUSNAK, F., MERTZ, P. Calcineurin: form and function. **Physiological Reviews**, vol. 80, p. 1483-1521, 2000.
- RUSHWORTH, L.K., HINDLEY, A.D., O'NEILL, E., KOLCH, W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 26, p. 2262-2272, 2006.
- RYU, S.H., CHO, S., LEE, K.-Y., SUH, P.-G., RHEE, S.G. Purification and characterization of two immunological distinct phosphoinositide-specific phospholipase C from bovine brain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, p. 12511-12518, 1987.
- SABATINI, B.L., ORTNER, T.G., SVODOBA, K. The life cycle of Ca²⁺ ions in dendritic spines. **Neuron**, vol. 33, p. 439-452, 2002.
- SABATINI, B.L., REGEHR, W.G. Timing of synaptic transmission. **Annual Review of Physiology**, vol. 61, p. 521-542, 1999.
- SACKTOR, T.C., OSTEN, P., VALSAMIS, H., JIANG, X., NAIK, M.U., SUBLETTE, E. Persistent activation of the ζ isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term

potentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 90, p. 8342-8346, 1993.

SALA, C., SHENG, M. The fyn art of N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 96, p. 335-337, 1999.

SALTER, R.S., KRINKS, M.H., KLEE, C.B., NEER, E.J. Calmodulin activates the isolated catalytic unit of brain adenylate cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 256, p. 9830-9833, 1981.

SANHUEZA, M., MCINTYRE, C.C., LISMAN, J.E. Reversal of synaptic memory by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor. **The Journal of Neuroscience**, vol. 27, p. 5190-5199, 2007.

SANTOLINI, J., ADAK, S., CURRAN, C.M.L., STUEHR, D.J. A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 1233-1243, 2001.

SAURO, H.M., KHOLODENKO, B.N. Quantitative analysis of signaling networks. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, vol. 86, p. 5-43, 2004.

SCHMIDT, H.H.H., SMITH, R.M., NAKANE, M., MURAD, F. Ca^{2+} /calmodulin-dependent NO synthase type I: a biopteroflavoprotein with Ca^{2+} /calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. **Biochemistry**, vol. 31, p. 3243-3249, 1992.

SCHMITT, J.M., STORK, P.J.S. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap 1. **Molecular Cell**, vol. 9, p. 85-94, 2002a.

SCHMITT, J.M., STORK, P.J.S. $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ require distinct Src-dependent pathways to activate Rap1 and Ras. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 43024-43032, 2002b.

SCHULMAN, H. Activity-dependent regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II localization. **The Journal of Neuroscience**, vol. 24, p. 8399-8403, 2004.

SCHWARTZKROIN, P., WESTER, K. Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. **Brain Research**, vol. 89, p. 107-119, 1975.

SCHORGE, S., ELENES, S., COLQUHOUN, D. Maximum likelihood fitting of single NMDA activity with a mechanism composed of independent dimmers of subunits. **The Journal of Physiology**, vol. 569, p. 395-418, 2005.

SCOVILLE, W.B., MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesion. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, vol. 20, p. 11-21, 1957.

SEGAL, M. Dendritic spines and long-term plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 6, p. 277-284, 2005.

SEIDNMAN, K.J., STEINBERG, J.P., HUGANIR, R., MALINOW, R. Glutamate receptor subunit 2 serine 880 phosphorylation modulates synaptic transmission and mediates plasticity in CA1 pyramidal neurons. **The Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 9220-9228, 2003.

SERRANO, P., YAO, Y., SACKTAOR, T.C. Persistent phosphorylation by protein kinase M ζ maintains late-phase long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol. 25, p. 1979-1984, 2005.

SHARMA, R.K., WANG, J.H. Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 82, p. 2603-2607, 1985.

SHARMA, R.K., WANG, J.H. Calmodulin and Ca²⁺-dependent phosphorylation and dephosphorylation of 63-kDa subunit-containing bovine brain calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 261, p. 1322-1328, 1986.

SHARMA, R.K., WANG, T.H., WIRCH E., WANG, J.H. Purification and properties of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 255, p. 5916-5923, 1980.

SHENG, M., HOOGENRAAD, C.C. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 76, p. 1-125, 2007.

SHENG, M., KIM, M.J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. **Science**, vol. 298, p. 776-780, 2002.

SHENG, M., NAKAGAWA, T. Glutamate receptors on the move. **Nature**, vol. 417, p. 601-602, 2002.

SHENOLIKAR, S. Protein serine/threonine phosphatases – new avenues for cell regulation. **Annual Review of Cellular Biology**, vol.10, p. 55-86, 1994.

SHETA, E.A., MCMILLAN, K., MASTERS, B.S.S. Evidence for a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, p. 15147-15153, 1994.

SHEU, F.-S., MAHONEY, C.W., SEKI, K., HUANG, K.-P. Nitric oxide modification of rat brain Neurogranin affects its phosphorylation by PKC and affinity for calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 22407-22413, 1996.

SHI, S.H., HAYASHI, Y., PETRALIA, R.S., ZAMAN, S.H., WENTHOLD, R.J., SVOBODA, K., MALINOW, R. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. **Science**, vol. 284, p. 1811-1816, 1999.

SHI, S., HAYANISHI, Y., ESTEBAN, J.A., MALINOW, R Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. **Cell**, vol. 15, p. 331-343, 2001.

SHIFMAN, J.M., CHOI, M.H., MIHALAS, S., MAYO, S.L., KENNEDY, M.B. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is activated by calmodulin with two

bound calciums. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 103, p. 13968-13973, 2006.

SHIELDS, S.M., INGEBRITSEN, T.S., KELLY, P.T. Identification of protein phosphatase 1 in synaptic junctions: dephosphorylation of endogenous calmodulin-dependent kinase II and synapse-enriched phosphoproteins. **The Journal of Neuroscience**, vol. 5, p. 3414-3422, 1985.

SIMPSON, R.E., CIRUELA, A., COOPER, D.M.F. The role of calmodulin recruitment in Ca^{2+} stimulation of adenylyl cyclase type 8. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 17379-17389, 2006.

SINGH, R.J., HOGG, N., JOSEPH, J., KALYANARAMAN, B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, p. 18596-18603, 1996.

SINGLA, S.I., HUDMON, A., GOLDBERG, J.M., SMITH, J.L., SCHULMAN, H. Molecular characterization of calmodulin trapping by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 29353-29360, 2001.

SKEBERDIS, V.A., CHAVELEYRE, V., LAU, C.G., GOLDBERG, J.H., PETTIT, D.L., SUADICANI, S.O., LIN, Y., BENNET, M.V.L., YUSTE, R., CASTILLO, P.E., ZUKIN, R.S. Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. **Nature Neuroscience**, vol. 9, p. 501-510, 2006.

SLATER, S.J., SEIZ, J.L., COOK, A.C., BUZAS, J., MALINOWSKI, S.A., KERSHNER, J.L., STAGLIANO, B.A., STUBBS, C.D. Regulation of PKC α activity by C1-C2 domain interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 15277-15285, 2002.

SLATER, S.J., SEIZ, J.L., STAGLIANO, B.A., COOK, A.C., MILANO, S.K., HO, C., STUBBS, C.D. Low- and high-affinity phorbol ester and diglyceride interactions with protein

kinase C: 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycerol enhances phorbol ester- and diacylglycerol-induced activity but alone does not induce activity. **Biochemistry**, vol. 40, p. 6085-6092, 2001.

SMITH, F.D., LANGEBERG, L.K., SCOTT, J.D. The where's and when's of kinase anchoring. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 31, p. 316-323, 2006.

SODERLING, T.R., CHANG, B., BRICKEY, D. Cellular signaling through multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 3719-3723, 2001.

SONTAG, E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. **Cellular Signalling**, vol. 13, p. 7-16, 2001.

SORRA, K.E., HARRIS, K.M. Overview of the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. **Hippocampus**, vol. 10, p. 501-511, 2000.

SOSSA, K.G., COURT, B.L., CARROLL, R.C. NMDA receptors mediate calcium-dependent, bidirectional changes in dendritic PICK1 clustering. **Molecular and Cellular Neuroscience**, vol. 31, p. 574-585, 2006.

SPACEK, J., HARRIS, K.M. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. **The Journal of Neuroscience**, vol. 17, p. 190-203, 1997.

SPRANG, S.R. G protein mechanism: insights from structural analysis. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 66, p. 639-678, 1997.

SPRUSTON, N., JONAS, P., SAKMANN, B. Dendritic glutamate receptor channels in rat hippocampal CA3 and CA1 Pyramidal neurons. **Journal of Physiology**, vol. 482, p. 325-352, 1995.

SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological Review**, vol. 99, p. 195-231, 1992.

SQUIRE, L.R., BAYLEY, P.J. The neuroanatomy of very remote memory. **The Lancet**, vol. 5, p. 112-113, 2006.

SQUIRE, L.R., STARK, C.E.L., CLARCK, R.E. The medial temporal lobe. **Annual Review of Neuroscience**, vol. 27, p. 279-306, 2004.

SQUIRE, L.R., ZOLA-MORGAN, S. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 93, p. 13515-13522, 1996.

STAHELIN, R.V., WANG, J., BLATNER, N.R., RAFTER J.D., MURRAY, D., CHO, W. The origin of C1A-C2 interdomain interactions in protein kinase C α . **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 280, p. 36452-36463, 2005.

STAMLER, J.S., SIMON, D.I., OSBORNE, J.A., MULLINS, M.E., JARAKI, O., MICHEL, T., SINGLE, D.J., LOSCALZO, J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biological active compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 89, p. 444-448, 1992.

STAUDINGER, J., LU, J., OLSON, E.N. Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with the COOH terminus of protein kinase C- α . **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 32019-32024, 1997.

STEMMER, P.M., KLEE, C.B. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. **Biochemistry**, vol. 33, p. 6859-6866, 1994.

STEVENS, C.F. A million dollar question: does LTP = memory? **Neuron**, vol. 20, p. 1-2, 1998.

STOCCA, G., VICINI, S. Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. **Journal of Physiology**, vol. 507, p. 13-24, 1998.

STOCLET, J.C., GÉRARD, D., KILHOFFER, M.C., LUGNIER, C., MILLER, R., SCHAEFFER, P. Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. **Progress in Neurobiology**, vol. 29, p. 321-364, 1987.

STOKER, A.W. Protein tyrosine phosphatases and signalling. **Journal of Endocrinology**, vol. 185, p. 19-33, 2005.

STORK, P.J.S. Does Rap1 deserve a bad Rap? **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 28, p. 267-275, 2003.

STRACK, S., BARBAN, M.A., WADZINSKI, B.E., COLBRAN, R.J. Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. **Journal of Neurochemistry**, vol. 68, p. 2119-2128, 1997a.

STRACK, S., CHOI, S., LOVINGER, D.M., COLBRAN, R.J. Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 13467-13470, 1997b.

STRACK, S., COLBRAN, R.J. Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 273, p. 20689-20692, 1998.

STRACK, S., KINI, S., EBNER, F.F., WADZINSKI, B.E., COLBRAN, R.J. Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. **The Journal of Comparative Neurology**, vol. 413, p. 373-384, 1999.

STRAUDINGER, J., ZHOU, J., BURGESS, R. ELLEDGE, S.J., OLSON, E.N. PICK1: a perinuclear protein and substrate for protein kinase C isolated by two hybrid system. **The Journal of Cellular Biology**, vol. 128, p. 263-271, 1995.

- STRAUDINGER, J., LU, J., OLSON, E.N. Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with COOH terminus of protein kinase C- α . **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 32019-32024, 1997.
- STUEHR, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 37, p. 339-359, 1997.
- STUEHR, D., POU, S., ROSEN, G.M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, p. 14533-14536, 2001.
- STURANI, E., ABBONDIO, A., BRANDUARDI, P., FERRARI, C., ZIPPEL, R., MARTEGANI, E., VANONI, M., DENIS-DONINI, S. The Ras guanine nucleotide exchange factor CDC25Mn is present at the synaptic junction. **Experimental Cellular Research**, vol. 235, p.117-123, 1997.
- SU, Z., BLAZING, A., FAN, D., GERGE, S.E. The calmodulin-nitric oxide interactions – critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 29117-29122, 1995.
- SUN, X., ZHAO, Y., WOLF, M.E. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. **The Journal of Neuroscience**, vol. 25, p. 7342-7351, 2005.
- SUN, Y., OLSON, R., HORNING, M., ARMSTRONG, N., MAYER, M., GOUAUX, E. Mechanism of glutamate receptor desensitization. **Nature**, vol. 417, p. 245-253, 2002.
- SOBCZYK, A., SVOBODA, K. Activity-dependent plasticity of the NMDA-receptor fractional Ca^{2+} current. **Neuron**, vol. 57, p. 17-24, 2007.
- SWANSON, G.T., KAMBOJ, S.K., CULL-CANDY, S.G. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing splice variation, and subunit composition. **The Journal of Neuroscience**, vol. 17, p. 58-69, 1997.

SWEATT, J.D. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. **Learning & Memory**, vol.6, p. 399-416, 1999.

SWEATT, J.D. Memory mechanisms: the yin and yang of protein phosphorylation. **Current Biology**, vol. 11, p. R391-R394, 2001.

SWEATT, J.D. **Mechanisms of memory**. San Diego: Academic Press, 2003.

TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., INOUE, M., NISHIZUKA, Y. Studies of a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 252, p.7603-7609, 1977.

TAKAI, Y., SASAKI, T., MATOZANI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiological Reviews**, vol. 81, p. 153-207, 2001.

TAKUMI, Y., RAMÍREZ-LEÓN, V., LAAKE, P., RINVIK, E., OTTERSEN, O.P. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. **Nature Neuroscience**, vol. 2, p. 618-624, 1999.

TANAKA, J., NAKAGAWA, S., KUSHIYA, E., YAMASAKI, M., FUKAYA, M., IWANAGA, T., SIMON, M.I., SAKIMURA, K., KANO, M., WATANABE, M. Gq protein α subunit $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. **European Journal of Neuroscience**, vol. 12, p. 781-792, 2000.

TANAKA, J.-I., MATSUZAKI, M., TARUSAWA, E., MOMIYAMA, A., MOLNAR, E., KASAI, H., SHIGEMOTO, R. Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. **The Journal of Neuroscience**, vol. 25, p. 799-807, 2005.

TANAKA, S., MORISHITA, T., HASHIMOTO, Y., HATTORI, S., NAKAMURA, S., SHIBUYA, M., MATUOKA, K., TAKENAWA, T., KURATA, T., NAGASHIMA, K., MATSUDA, M. C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to

- the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 91, p. 3443-3447, 1994.
- TANEKA, K., MATSUZAWA, A., NISHITOH, H., TOBIUME, K., KISHIDA, S., NINOMIYA-TSUJI, J. MTSUMOTO, K., ICHIJO, H. Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation. **The EMBO Journal**, vol. 5, p. 161-166, 2004.
- TARDIN, C., COGNET, L., BATS, C., LOUNIS, B., CHOQUET, D. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. **The EMBO Journal**, vol. 22, p. 4656-4665, 2003.
- TAUBE, J.S., SCHWARTZKROIN, P.A. Mechanisms of long-term potentiation: PSP/spike dissociation, intradendritic recordings, and glutamate sensitivity. **The Journal of Neuroscience**, vol. 8, p. 1632-1644, 1988.
- TAUSSIG, R., GILMAN, A.G. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 1-4, 1995.
- TEO, T.S., WANG, J.H. Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions – identification of the protein activator as a Ca²⁺ binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 248, p. 5950-5955, 1973.
- THOMAS, C.J., DU, X., LI, P., WANG, Y., ROSS, E.M., SPRANG, S.R. Uncoupling conformational change from GTP hydrolysis in a heterotrimeric G protein {alpha}-subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 101, p. 7560-7565, 2004.
- THOMAS C.G., MILLER, A.J., WESTBROOK, G.L. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. **Journal of Neurophysiology**, vol. 95, p. 1727-1734, 2006.
- THOMAS, G.M., HUGANIR, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 5, p. 173-183, 2005.

TIAN, X., GOTOH, T., TSUJI, K., LO, E.H., HUANG, S., FEIG, L.A. Developmentally regulated role for Ras-GRFs in coupling NMDA receptors to Ras, Erk and CREB. **The EMBO Journal**, vol. 23, p. 1567-1575, 2004.

TIGARET, C.M., THALHAMMER, G.F., RAST, C.G., SPECHT, C.G., AUBERSON, Y.P., STEWART, M.G., SCHOEPFER, R. Subunit dependencies of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-induced α -amino-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor internalization. **Molecular Pharmacology**, vol. 69, p. 1251-1259, 2006.

TOMITA, S., ADESNICK, H., SEKIGUCHI, M., ZHANG, W., WADA, K., HOWE, J.R., NICOLL, R.A., BREDT, D.S. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. **Nature**, vol. 435, p. 1052-1058, 2005a.

TOMITA, S., CHEN, L., KAWASAKI, Y., PETRALIA, R.S., WENTHOLD, R.J., NICOLL, R.A., BREDT, D.S. Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. **The Journal of Cell Biology**, vol. 161, p. 805-816, 2003.

TOMITA, S., SEKIGUCHI, M., WADA, K., NICOLL, R.A., BREDT, D.S. Stargazin controls the pharmacology of AMPA receptors potentiators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 103, p. 10064-10067, 2006.

TOMITA, S., SHENOY, A., FUKATA, Y., NICOLL, R.A., BREDT, D.S. Stargazin interacts functionally with the AMPA receptor glutamate-binding module. **Neuropharmacology**, vol. 52, p. 87-91, 2007.

TOMITA, S., STEIN, V., STOCKER, T.J., NICOLL, R.A., BREDT, D.S. Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. **Neuron**, vol. 45, p. 269-277, 2005b.

TONI, N., BUCHS, P.-A., NIKONENKO, I., POVILAITITE, P., PARISI, L., MULLER, D. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol. 21, p. 6245-6251, 2001.

TORESSON, H., GRANT, S.G.N. Dynamic distribution of endoplasmic reticulum in hippocampal neurons dendritic spines. **European Journal of Neuroscience**, vol. 22, p. 1793-1798, 2005.

TOVAR, K.R., WESTBROOK, G.S. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. **The Journal of Neuroscience**, vol. 19, p. 4180-4188, 1999.

TOVAR, K.R., WESTBROOK, G.L. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. **Neuron**, vol. 34, p. 255-264, 2002.

TRAN, Q.-K., BLACK, D.J., PERSECHINI, A. Intracellular coupling via limiting calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, p. 24247-24250, 2003.

TRAUB, R.D., WONG, R.K.S., MILES, R., MICHELSON, H. A model of a CA3 hippocampal pyramidal neuron incorporating voltage-clamp data on intrinsic conductances. **Journal of Neurophysiology**, vol. 66, p. 635-650, 1991.

TSAY, D., YUSTE, R. Role of dendritic spines in action backpropagation: a numerical simulation study. **Journal of Neurophysiology**, vol. 88, p. 2834-2845, 2002.

TSAY, D., YUSTE, R. On the electrical function of dendritic spines. **Trends in Neurosciences**, vol. 27, p. 77-83, 2004.

TSUI, J., INAGAKI, M., SCHULMAN, H. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 280, p. 9210-9216, 2005.

TSUI, J., MALENKA, R.C. Substrate localization creates specificity in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling at synapses. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 13794-13804, 2006.

TURETSKY, D., GARRINGER, E., PATNEAU, D.K. Stargazin modulates native AMPA receptor functional properties by two distinct mechanisms. **The Journal of Neuroscience**, vol. 25, p. 7438-7448, 2005.

TYSON, J.J., CHEN, K.C., NOVAK, B. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 15, p. 221-231, 2003.

VALTSCHANOFF, J.G., WEINBERG, R.J. Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. **The Journal of Neuroscience**, vol. 21, p. 1211-1217, 2001.

VAN DEN BERGHE, N., COOL, R.H., WITTINGHOFFER, A. Discriminatory residues in Ras and Rap for guanine nucleotide exchange factor recognition. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 11078-11085, 1999.

VAN DEN BERGHE, N., COOL, R.H., HORN, G., WITTINGHOFFER, A. Biochemical characterization of C3G: an exchange factor that discriminates between Rap1 and Rap2 and is not inhibited by Rap1A(S17N). **Oncogene**, vol. 15, p. 845-850, 1997.

VAN DER GEER, P., HUNTER, T. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. **Annual Review of Cell Biology**, vol. 10, p. 251-337, 1994.

VARGAS-CABALLERO, M., ROBINSON, H.P.C. Fast and slow voltage-dependent dynamics of magnesium blocks in the NMDA receptor: the asymmetric trapping block model. **The Journal of Neuroscience**, vol. 24, p. 6171-6180, 2004.

VERTES, R.P., KOCSIS, B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. **Neuroscience**, vol. 81, p. 893-926, 1997.

- VICINI, S., WANG, J.F., LI, J.H., ZHU, W.J., WANG, Y.H., LUO, J.H., WOLFE, B.B., GRAYSON, D.R. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. **The Journal of Neurophysiology**, vol. 79, p. 555-566, 1998.
- VIOLIN, J.D., ZHANG, J., TSIEN, R.Y., NEWTON, A.C. A genetically encoded fluorescent protein reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. **Journal of Cell Biology**, vol. 161, p. 899-909, 2003.
- VOJTEK, A.B., DER, C.J. Increase complexity of the Ras signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 273, p. 19925-19928, 1998.
- VOLFOVSKY, N., PARNAS, H., SEGAL, M., KORKORIAN, E. Geometry of dendritic spine affects calcium dynamics in hippocampal neurons: theory and experiments. **Journal of Neurophysiology**, vol. 81, p. 450-462, 1999.
- WALKER, S.A., KUPZIG, S., BOUYOUCEF, D., DAVIES, L.C., TSUBOI, T., BIVONA, T.G., COZIER, G.E., LOCKYER, P.J., BUCKLER, A., RUTTER, G., ALLEN, M.J., PHILIPS, M.R., CULLEN, P.J. Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca^{2+} oscillations. **The EMBO Journal**, vol. 23, p. 1749-1760, 2004.
- WALLACE, R.W., TALLANT E.A., CHEUNG, W.Y. High level of heat-labile calmodulin-binding protein (CaM-BP80) in bovine neostriatum. **Biochemistry**, vol. 19, p. 1832-1837, 1980.
- WALSH, D.A., PERKINS, J.P., KREBS, E.G. An adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 243, p. 3763-3774, 1968.
- WANG, H., PINEDA, V.V., CHAN, G.C.K., WONG, S.T., MUGIA, L.J., STORM, D.R. Type 8 adenylyl cyclase is targeted to excitatory synapses and required for mossy fiber long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 9710-9718, 2003.

WANG, H., FERGUSON, G.D., PINEDA, V.V., CUNDIFF, P.E., STORM, D.R. Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. **Nature Neuroscience**, vol. 7, p. 635-642, 2004.

WANG J.Q. FIBUCH, E.E., MAO, L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. **Journal of Neurochemistry**, vol. 100, p. 1-11, 2007.

WANG, T., PENTYALA, S., ELLIOT, J.T., DOWAL, L., GUPTA, E., REBECCHI, M.J., SCARLATA, S. Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C- β_1 and β_2 with activated G α_q subunits: an alternative function for C2-signaling modules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 96, p. 7843-7846, 1999.

WANG, Z., DILLON, T.J., POKALA, V., MISHRA, S., LABUDDA, K., HUNTER, B., STORK, P.J.S. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases b cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 26, p. 2130-2145, 2006.

WATANABE, Y., SONG, T., SUGIMOTO, K., HORII, M., AAKI, N., TOKUMITSU, H., TEZUKA, T., YAMAMOTO, T., TOKUDA, M. Post-synaptic density-95 promotes calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated Ser847 phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase. **Biochemical Journal**, vol. 372, p. 465-471, 2003.

WATANABE, M., FUKAYA, M., SAKIMURA, F., MANABE, T., MISHIMA, M., INOUE, Y. Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidus (mossy fiber recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. **European Journal of Neuroscience**, vol. 10, p. 478-487, 1998.

WAXMAN, E.A., LYNCH, D.R. N-methyl-D-aspartate receptor subtype bidirectional control of p38 mitogen-activated protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 280, p. 29322-29333, 2005.

- WEEBER, E.J., SWEATT, J.D. Molecular neurobiology of human cognition. **Neuron**, vol. 33, p. 845-848, 2002.
- WENG, G., BHALLA, U.S., IYENGAR, RAVI. Complexity in biological signaling systems. **Science**, vol. 284, p. 92-96, 1999.
- WENTHOLD, R.J., PETRALIA, R.S., BLAHOS II, J., NIEDZIELSKI, A.S. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. **The Journal of Neuroscience**, vol. 16, p. 1982-1989, 1996.
- WESTCOTT, W.R., LA PORTE, D.C., STORM, D.R. Resolution of adenylyate cyclase sensitive and insensitive to Ca^{2+} and calcium-dependent regulatory protein by CDR-sepharose affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, vol. 76, p. 204-208, 1979.
- WESTON, M.C., SCHUCK, P., GHOSAL, A., ROSENMUND, C., MAYER, M.L. Conformational restriction blocks glutamate receptor desensitization. **Nature Structural & Molecular Biology**, vol. 13, p. 1120-1127, 2006.
- WHITLOCK, J., HEYNEN, A.J., SHULER, M.G., BEAR, M.F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science**, vol. 313, p. 1093-1097, 2006.
- WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M.B., JOHNSON, G.L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**, vol. 79, p. 143-180, 1999.
- WINDER, D.G., MARTIN, K.C., MUZZIO, I.A., ROHRER, D., CHUSCINSKI, A., KOBILKA, B., KANDEL, E.R. ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by β -adrenergic receptors. **Neuron**, vol. 24, p. 715-726, 1999.
- WINDER, D.G., SWEATT, J.D. Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 2, p. 461-474, 2001.

WISDEN, W., SEEBURG, P.H. Mammalian ionotropic glutamate receptors. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 3, p. 291-298, 1993.

WORLEY, P.F., BARABAN, J.M., SUPATTAPONE, S., WILSON, V.S., SYNDER, S.H. Characterization of inositol trisphosphate receptor binding in brain – regulation by pH and calcium. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, p. 12132-12136, 1987.

WYLLIE, D.J., BEHE, P., COLQUHOUN, D. SINGLE-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D. **The Journal of Physiology**, vol. 510, p. 1-18, 1998.

WYSZYNSKI, M., VALTSCHANOFF, J.G., NISBITT, S., DUNAH, A.W. KIM, E., STANDAERT, D.G., WEINBERG, R., SHENG, M. Association of AMPA receptors with a subset of glutamate receptor-interacting protein *in vivo*. **The Journal of Neuroscience**, vol. 19, p. 6528-6537, 1999.

WYSZYNSKI, M., LIN, J., RAO, A., NIGH, E., BEGGS, A.H., CRAIG, A.M., SHENG, M. Competitive binding of α -actinin and calmodulin to the NMDA receptor. **Nature**, vol. 385, p. 439-442, 1997.

XIA, J., STAUDINGER, J., HUGANIR, R.L. Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK. **Neuron**, vol. 22, p. 179-187, 1999.

XIA, Z., STORM, D.R. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 6, p. 267-276, 2005.

YAMAUCHI, T. Molecular constituents and phosphorylation-dependent regulation of the post-synaptic density. **Mass Spectrometry Reviews**, vol. 21, p. 266-286, 2002.

YANG, H., MATTINGLY, R.R. The Ras-GRF1 exchange factor coordinates activation of H-Rs and Rac1 to control neuronal morphology. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 17, p. 2177-2189, 2006.

- YANG, S.-A., KLEE, C.B. Low affinity Ca^{2+} -binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. **Biochemistry**, vol. 36, p. 16147-16154, 2000.
- YANG, S.D., TALLANT, E.A., CHEUNG, W.Y. CALCINEURIN is a calmodulin-dependent protein phosphatase. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, vol. 106, p. 1419-1425, 1982.
- YARWOOD, S., BOUYOUCHEF-CHERCHALLI, D., CULLEN, P.J., KUPZIG, S. The GAP1 family of GTPase-activating proteins: spatial and temporal regulators of small GTPase signalling. **Biochemical Society Transactions**, vol. 34, p. 846-850, 2006.
- YOSHIMURA, Y., YAMAUCHI, T. Phosphorylation-dependent reversible association of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic densities. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, p. 26354-26359, 1997.
- YOSHIMURA, Y., YAMAUCHI, Y., SHINKAWA, T., TAOKA, M., DONAI, H., TAKAHASHI, N., ISOBE, T., YAMAUCHI, T. Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Neurochemistry**, vol. 88, p. 759-768, 2004.
- YUAN, T., WALSH, M.P., SUTHERLAND, C., FABIAN, H., VOGEL, H.J. Calcium-dependent and independent interactions of the calmodulin-binding domain of cyclic nucleotide phosphodiesterase with calmodulin. **Biochemistry**, vol. 38, p. 1446-1455, 1999.
- ZAWADZDI, K.M., TAYLOR, S.S. cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit II β . Active site mutations define an isoform-specific network for allosteric signaling by cAMP. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 7029-7036, 2004.
- ZHABOTINSKY, A.M. Bistability in the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase-phosphatase system. **Biophysical Journal**, vol. 79 p. 2211-2221, 2000.

ZHABOTINSKY, A.M., CAMP, R.N., EPSTEIN, I.R., LISMAN, J.E. Role of the neurogranin concentrated in spines in the induction of long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol. 26, p. 7337-7347, 2006.

ZHAKHARENKO, S.S., ZABLOW, L., SIEGELBAUM, S.A. Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. **Nature Neuroscience**, vol. 4, p. 771-717, 2001.

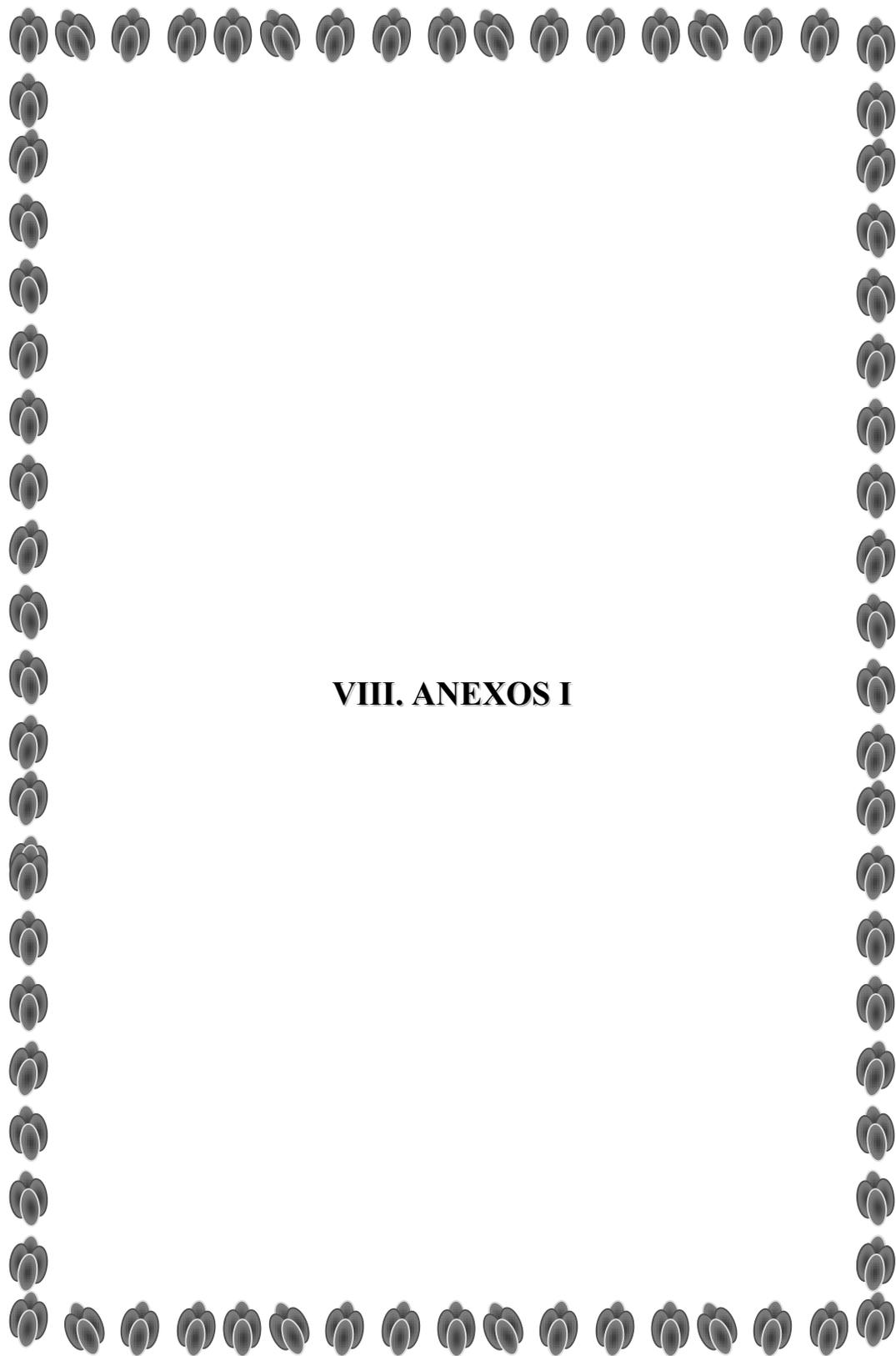
ZHENG, C.-F., GUAN, K.-L. Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 268, p. 16116-16119, 1993.

ZHOU, B., WANG, Z.-X., ZHAO, Y., BRAUTIGAN, D.L., ZHANG, Z.-Y. The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 31818-31825, 2002.

ZHU, J.J., QIN, Y., ZHAO, M., AELST, L.V., MALINOW, R. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. **Cell**, vol. 110, p. 443-455, 2002.

ZIFF, E.B. TARPs and AMPA receptor trafficking paradox. **Neuron**, vol. 53: 627-633, 2007.

ZOCHE, M., BEYERMANN, M., KOCH, K.W. Distinct molecular recognition of calmodulin-binding sites in the neuronal and macrophage nitric oxide synthases: a surface plasmon resonance study. **Biochemistry**, vol. 35, p. 8742-8747, 1996.



VIII. ANEXOS I

VIII. ANEXOS I

Tabela 1: Parâmetros para o modelo dos receptores AMPAs de acordo com suas isoformas e com a presença de TARPs

Símbolo	Unidade	AMPA GluR1/GluR2	AMPA GluR2/GluR3	AMPA GluR1/GluR2 com TARP	AMPA GluR2/GluR3 com TARP
k_1	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	80	40	80	40
k_{-1}	s^{-1}	9000	20000	4500	10000
k_2	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	60	30	60	30
k_{-2}	s^{-1}	1800	40000	900	20000
k_3	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	20	20	20^{-1}	20
k_{-3}	s^{-1}	60000	60000	30000	30000
k_4	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	10	10	10	10
k_{-4}	s^{-1}	80000	80000	40000	40000
k_5	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	60	30	60	30
k_{-5}	s^{-1}	0.41	1	0.205	0.5
k_6	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	60	30	60	30
k_{-6}	s^{-1}	9000	20000	4500	10000
k_7	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	20	20	20	20
k_{-7}	s^{-1}	18000	40000	9000 s^{-1}	20000 s^{-1}
k_8	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	10	10	10	$10 \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_{-8}	s^{-1}	60000	60000	30000	30000
k_9	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	20	20	20	20
k_{-9}	s^{-1}	80000	20000	40000	10000

k_{10}	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	10	10	10	10
k_{-10}	s^{-1}	60000	40000	30000	20000
k_{11}	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	20	20	20	20
k_{-11}	s^{-1}	80000	20000	40000	10000
k_{12}	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	10	10	10	10
k_{-12}	s^{-1}	60000	40000	30000	20000
k_{13}	s^{-1}	0.12	0.12	0.06	0.06
k_{-13}	s^{-1}	1	1	1.2	1.2
k_{14}	s^{-1}	1800	350	900	175
k_{-14}	s^{-1}	7.6	60	9.12	72
k_{15}	s^{-1}	3600	700	1800	350
k_{-15}	s^{-1}	7.6	60	9.12	72
k_{16}	s^{-1}	1050	1050	525	525
k_{-16}	s^{-1}	60	60	72	72
k_{17}	s^{-1}	1400	1400	700	700
k_{-17}	s^{-1}	70	70	84	84
k_{18}	s^{-1}	70	1000	35	500
k_{-18}	s^{-1}	200	130	240	156
k_{19}	s^{-1}	2000	2000	1000	1000
k_{-19}	s^{-1}	130	130	156	156
k_{20}	s^{-1}	3000	3000	1500	1500
k_{-20}	s^{-1}	130	130	156	156
k_{21}	s^{-1}	16000	10000	16000	10000
k_{-21}	s^{-1}	3100	4000	1550	2000
k_{22}	s^{-1}	15000	15000	15000	15000
k_{-22}	s^{-1}	4000	4000	2000	2000
k_{23}	s^{-1}	2000	20000	2000	2000
k_{-23}	s^{-1}	4000	4000	2000	2000
D_s^*	$\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$	0.003	D_{es}^*	$\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$	$0.054\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$

D_s – Coeficiente de difusão do AMPA sináptico; D_{es} – Coeficiente de difusão do AMPA extra-sináptico.

Tabela 2: Parâmetros para os modelos do NMDA NR1/NR2A e NR1/NR2B

Símbolo	NMDA NR1/NR2A	NMDA NR1/NR2B
k_1	$62.2 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$5.66 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{-1}	1010 s^{-1}	114 s^{-1}
k_2	$31.6 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$2.831 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{-2}	2020 s^{-1}	228.6 s^{-1}
k_3	$62.2 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$5.66 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{-3}	3030 s^{-1}	38.1 s^{-1}
k_4	$31.6 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$2.831 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{-4}	6060 s^{-1}	76.2 s^{-1}
k_5	20 s^{-1}	81 s^{-1}
k_{-5}	80 s^{-1}	55 s^{-1}
k_6	20 s^{-1}	81 s^{-1}
k_{-6}	40 s^{-1}	25 s^{-1}
k_7	115 s^{-1}	112 s^{-1}
k_{-7}	10 s^{-1}	0.9 s^{-1}
k_8	200 s^{-1}	66 s^{-1}
k_{-8}	10 s^{-1}	0.9 s^{-1}
k_9	340 s^{-1}	286 s^{-1}
k_{-9}	14 s^{-1}	17 s^{-1}
k_{10}	340 s^{-1}	286 s^{-1}
k_{-10}	14 s^{-1}	17 s^{-1}
k_{Mg}	$610e^{(-V_m/17)} (\text{mmol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1*}$	$610e^{(-V_m/17)} (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{-Mg}	$5400e^{(-V_m/47)} \text{ s}^{-1}$	$5400e^{(-V_m/47)} \text{ s}^{-1}$

(*) V_m é a voltagem da membrana celular.

Tabela 3: Parâmetros para a via da PKC

Símbolo	Valor	Símbolo	Valor
k_{a1}	$289 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{d6}	0.0011 s^{-1}
k_{d1}	0.029 s^{-1}	k_{a7}	$780 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

k_{a2}	$0.1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{d7}	1s^{-1}
k_{d2}	1.5s^{-1}	k_{a8}	$120 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{a3}	$0.1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{d8}	2.2s^{-1}
k_{d3}	0.00001s^{-1}	k_{a9}	$118 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{GTPase}	39s^{-1}	K_{d9}	65s^{-1}
$k_{\text{GTPase}'}$	600s^{-1}	K_s	$170 \mu\text{mol.L}^{-1}$
k_{a4}	0.00833s^{-1}	k_{catPLC}	0.1s^{-1}
k_{deg}	0.08s^{-1}	f	0.08s^{-1}
k_{d4}	$0.095 \text{s}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	H^+	3.9
k_{a5}	$480 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	K_i	$50 (\mu\text{mol.L}^{-1})$
k_{d5}	600s^{-1}	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$	$500 (\mu\text{mol.L}^{-1})$
k_{a6}	$7.4 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$		

Tabela 4: Parâmetros para a interação entre a CaM, o Ca^{2+} e a neurogranina

Símbolo	Valor	Símbolo	Valor
k_{f1}	$140 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b7}	54s^{-1}
k_{b1}	605s^{-1}	k_{f8}	$1.6 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{f2}	$130 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b8}	900s^{-1}
k_{b2}	605s^{-1}	k_{f9}	$1 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{f3}	$1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b9}	540s^{-1}
k_{b3}	3s^{-1}	k_{f10}	$0.011 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{f4}	$1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b10}	6.5s^{-1}
k_{b4}	8s^{-1}	k_{f11}	$1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{f5}	$1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b11}	5400s^{-1}
k_{b5}	5.4s^{-1}	k_{f12}	$0.011 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{f6}	$14 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b12}	65s^{-1}
k_{b6}	800s^{-1}	k_{f13}	$1 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{f7}	$1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b13}	54000s^{-1}

Tabela 5: Parâmetros para a ativação da CaMKII

Símbolo	Valor	Símbolo	Valor
k_{f15}	$0.21 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{cat}	4.9 s^{-1}
k_{b15}	0.0003 s^{-1}	$k_{\text{cat}2}$	0.46 s^{-1}
k_{f16}	$0.21 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k_{f\text{des}}$	$0.01 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{b16}	0.000083 s^{-1}	$k_{b\text{des}}$	0.001 s^{-1}
k_{f17}	$0.21 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}3} (\text{PP1})$	0.5 s^{-1}
k_{b17}	$0.0000014574 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{cat}3} (\text{PP2A})$	0.1 s^{-1}

Tabela 6: Parâmetros para a via da PKA

Símbolo	Valor	Símbolo	Valor
$k_{f18} (\text{AC})$	$0.0391157 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k_{f24} (\text{AC})$	$0.0391157 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{f18} (\text{PDE})$	$0.001 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k_{f24} (\text{PDE})$	$0.01 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{b18} (\text{AC})$	0.191667 s^{-1}	$k_{b24} (\text{AC})$	$0.000191667 \text{ s}^{-1}$
$k_{b18} (\text{PDE})$	0.01 s^{-1}	$k_{b24} (\text{PDE})$	0.00001 s^{-1}
$k_{f19} (\text{AC})$	$0.13 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{f25}	$0.1522 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{f19} (\text{PDE})$	$0.13 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$		
$k_{b19} (\text{AC})$	0.025 s^{-1}	k_{b25}	0.000011 s^{-1}
$k_{b19} (\text{PDE})$	0.025 s^{-1}		
$k_{f20} (\text{AC})$	$0.0391157 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{f26}	$0.1834 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{f20} (\text{PDE})$	$0.001 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$		
$k_{b20} (\text{AC})$	0.0191667 s^{-1}	k_{b26}	0.0011059 s^{-1}
$k_{b20} (\text{PDE})$	0.001 s^{-1}		
$k_{f21} (\text{AC})$	$0.001 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b27}	0.00017 s^{-1}
$k_{f21} (\text{PDE})$	$0.001 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$		
$k_{b21} (\text{AC})$	0.00085 s^{-1}	k_{f27}	$0.0016 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{b21} (\text{PDE})$	0.00085 s^{-1}		
$k_{f22} (\text{AC})$	$0.0391157 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	K_i	$0.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$
$k_{f22} (\text{PDE})$	$0.01 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$		
$k_{b22} (\text{AC})$	$0.00191667 \text{ s}^{-1}$	K_{M_AC}	$340 \mu\text{mol.L}^{-1}$

k_{b22} (PDE)	0.0001 s^{-1}		
k_{f23} (AC)	$0.001 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat_AC}}$	60 s^{-1}
k_{f23} (PDE)	$0.001 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$		
k_{b23} (AC)	0.0002 s^{-1}	K_{M_PDE}	$12 \mu\text{M}$
k_{b23} (PDE)	0.0002 s^{-1}		

Tabela 7: Parâmetros para a via da ERK/12

Símbolo	Valor	Símbolo	Valor
k_{f34}	$0.33 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	k_{b38}	$(\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_{b34}	0.01 s^{-1}	k_{c39}	10 s^{-1}
k_{f35}	$3.9 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	k_{f40}	$80 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_{b35}	20.4 s^{-1}	k_{b40}	780 s^{-1}
k_{f36}	$2.4 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	k_{f40}	$0.65 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_{b36}	20 s^{-1}	k_{b41}	0.065 s^{-1}
k_{f37}	$10.7 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	k_{c41}	0.18 s^{-1}
k_{b37}	90 s^{-1}	k_{f41}	$0.88 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$

Tabela 8: Parâmetros para a via da NOS

Símbolo	Valor	Símbolo	Valor
k_1	1.4s^{-1}	k_{10}	$0.009 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_2	$0.9 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	k_{ox1}	$6.3 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_3	26s^{-1}	k_{ox2}	$1100 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_4	1.4s^{-1}	k_{ox3}	$6.4 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_5	$0.9 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	k_{ox4}	0.1s^{-1}
k_6	26s^{-1}	k_{12}	1000 s^{-1}
k_7	10^{-4}s^{-1}	k_{-12}	280 s^{-1}
k_8	19s^{-1}	k_{11}	$300 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$
k_9	5s^{-1}	k_{-11}	14 s^{-1}

Tabela 9: Parâmetros para o modelo da Calcineurina

Símbolo	Valor	Símbolo	Valor
k_{f1}	$0.104762 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b2}	0.0303 s^{-1}
k_{b1}	0.0044 s^{-1}	k_{f3}	$46 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{f2}	$0.0721429 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{b3}	0.0012 s^{-1}

Tabela 10: Parâmetros diversos

Parâmetro	Valor
Desfosforilação da CaMKII por PP2A k_f	$0.1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Desfosforilação da CaMKII por PP2A k_b	0.01 s^{-1}
Desfosforilação da CaMKII por PP2A k_{cat}	3 s^{-1}
Desfosforilação da CaMKII por PP1 k_f	$0.1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Desfosforilação da CaMKII por PP1 k_b	0.01 s^{-1}
Desfosforilação da CaMKII por PP1 k_{cat}	1 s^{-1}
Desfosforilação do In-1 por calcineurina k_f	$0.28 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Desfosforilação do In-1 por calcineurina k_b	0.01 s^{-1}
Desfosforilação do In-1 por calcineurina k_{cat}	0.1 s^{-1}
Fosforilação do In-1 por PKA k_f	$0.1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Fosforilação do In-1 por PKA k_b	0.1 s^{-1}
Fosforilação do In-1 por PKA k_{cat}	1.3 s^{-1}
Associação do In-1 fosforilado com a PP1 k_1	$0.1 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Associação do In-1 fosforilado com a PP1 k_1	0.01 s^{-1}
Rap: taxa de GTPase	0.00036 s^{-1}
Rap: taxa de GTPase com C3G	0.00109 s^{-1}
Fosforilação da Scr por PKA k_f	$0.05 (\mu\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Fosforilação da Scr por PKA k_b	0.5 s^{-1}
Fosforilação da Scr por PKA k_{cat}	0.1 s^{-1}
Km da sGC	10 mol L^{-1}
k_{cat} da sGC	0.1 s^{-1}
Taxa de translocação da CaMKII para a densidade pós-sináptica	0.0154 s^{-1}

Taxa associação da PKA com a Akap79/150	0.00093 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ⁻¹ .s ⁻¹
Taxa dissociação da PKA com a Akap79/150	0.00042 s ⁻¹
Taxa associação da calcineurina com a Akap79/150	0.003 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ⁻¹ .s ⁻¹
Taxa calcineurina da PKA com a Akap79/150	0.0002 s ⁻¹

Tabela 11: Concentrações

Molécula	Valor ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
CaMKII	10
PKA	2
Akap79150	0.672
Calcineurina	2
PP1	1
PP2A	1.5
PKC	0.89
CaM	20
Ras	0.313
Raf	0.0017
MEK1/2	0.06
ERK1/2	0.125
PDE	0.02
AC	0.065
SynGAP	7.705
Ras-GRF	0.7705

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)