



**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

DANIEL VELOSO CADILHE

**REGULAÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA POR RECEPTORES
NMDA EM CULTURAS DE RETINA: ENVOLVIMENTO DA eEF2
CINASE**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
FLUMINENSE VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM NEUROIMUNOLOGIA**

Orientador: Roberto Paes de Carvalho

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Daniel Veloso Cadilhe

**REGULAÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA POR RECEPTORES
NMDA EM CULTURAS DE RETINA: ENVOLVIMENTO DA eEF2
CINASE**

Trabalho desenvolvido no laboratório de Neurobiologia Celular do
Departamento de Neurobiologia, Instituto de Biologia, UFF.

Dissertação de Mestrado submetida
à Universidade Federal Fluminense
como requisito para obtenção de
grau de Mestre em Neuroimunologia.

Orientador: Roberto Paes de Carvalho

Niterói
2006

Cadilhe, Daniel Veloso

Regulação da síntese proteica por receptores NMDA em culturas de retina: Envolvimento da eEF2 cinase /

Daniel Veloso Cadilhe. _____ Niterói: [s.n.], 2006.

120il.

Dissertação. _____ (Mestrado em Neuroimunologia). _____
Universidade Federal Fluminense, 2006.

1. Retina.
2. Receptores NMDA.
3. Síntese de Proteínas.
4. Fator de alongamento eucariótico 2.

I. Universidade Federal Fluminense.

II. Título.



Universidade Federal Fluminense
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Neuroimunologia

DANIEL VELOSO CADILHE

**REGULAÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA POR RECEPTORES
NMDA EM CULTURAS DE RETINA: ENVOLVIMENTO DA eEF2
CINASE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Fluminense
como requisito para obtenção do
título de Mestre em Neuroimunologia

Prof. Dr. Cláudio Alberto Serfaty - UFF

Prof^a. Dr^a. Izabel Christina de Palmer Paixão Frugulhetti - UFF

Prof^a. Dr^a. Debora Foguel - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Paula Campello Costa Lopes - (Revisora e Suplente) - UFF

Prof. Dr. Roberto Paes de Carvalho - (Coordenador e Orientador) - UFF

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA CELULAR, DO PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE SOB ORIENTAÇÃO DE ROBERTO PAES DE CARVALHO E NA VIGÊNCIA DE AUXÍLIOS CONCEDIDOS PELO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR (CAPES) E FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ).

AGRADECIMENTOS

Como não podia ser diferente, agradeço à minha mãe simplesmente por ser quem é. Esta pessoa incrível que me valoriza muito acima da bolsa Dow Jones. Nunca houve ação mais bem cotada no mercado. Ao meu pai e aos meus irmãos, pois sem família não somos ninguém. Aprendemos muito com os erros e qualidades de cada um. Agradeço a Deus por colocá-los na minha vida.

Agradeço ao Professor Roberto por investir em mim, por ser justo e sempre empolgado com a ciência. Isto nos ajudou muito a não desanimar com as dificuldades.

Ao Marcelo que me ajudou a dar os primeiros passos na ciência e que eu ajudei a dar os primeiros passos numa arte chamada organização.

Aos Professores do Departamento de Neurobiologia que muitas vezes foram mais que professores foram grandes amigos. Nos respeitam como pesquisadores e nos tratam como iguais. Duvido que exista um outro local de trabalho no meio científico com tanta interação entre mestres e alunos e em que os alunos se aproveitem tanto da boa vontade deles (rsrs). Em especial, Paulinha, Karin, Claudio, Ana e Adriana.

Aos companheiros de laboratório Mariana (que eu consegui ver sair do sério pelo menos uma vez. Quem perdeu vai ter que acreditar em mim), Jaine (a mais dedicada e que agora é vista nos EUA em rodas com Kandel, Malenka e Constatine-Paton), Alex (O cara! Esse não se encontra em qualquer lugar. Grande companheiro), Cris (durante a gravidez adorava um cochilo na hora do expediente), Telmo (acho que o diálogo entre os portugueses e índios era mais fácil), Tatávia (pessoa de quem sentirei muita falta. Ela é capaz de nos tirar do sério em certos momentos, mas não conseguimos viver sem ela. Ah, acho que

seria de grande utilidade para a NASA nos estudos sobre buracos negros, pois ela tem um bem no lugar do estômago), Camila (que eu adotei pra mim e também vou sentir muita falta. Dona de um sorriso cativante, me salvou nos momentos finais da dissertação lavando dezenas de vials pra mim. Obrigadão Camiloca!), Renato (esse cara tem um futuro brilhante. Lembra de umas coisas que até Deus já esqueceu), Raquel (Ah, como eu sacaneio ela tadinha! Raquel é uma pessoa ímpar. Dona de um humor sensacional e de uma memória que dá pena! Nossa! Como me farão falta as nossas conversas. Muita falta mesmo!), Luciane (agora brincando na Geoquímica), Orlando (parece um guarda-costas de boate), Rafael (poderia ser garoto propaganda de creme dental. O nosso sorriso), Vivian (porque os nossos japoneses são melhores que os dos outros), Tati (sócia das lojas de calça no Rio de Janeiro), Elisa (chamar de mascote é até promoção, ela deveria ser colocada em uma categoria anterior por causa da idade. Ela é quase um desenho japonês), Márcia (infelizmente mais longe de nós agora. A irmã que eu não tive. Quem sente muito a falta dela é a Raquel que diz que a vida dela não tem mais graça sem a Márcia).

Aos demais amigos, sem os quais certos momentos seriam quase insuportáveis. Muitas vezes são mais que uma família em nossas vidas. Alguns me acompanham há anos. Pablo, mais que um amigo, um irmão. Ísis (uma nova tecnologia a serviço da ciência), Aninha (fala tão baixinho que mal se ouve), Rachel (a menos tempo na equipe, mas a gente nem percebe isso), Gaby (um doce de menina), Marcelinha (também mostrando o talento dos brasileiros nos EUA). Aos amigos que não são da UFF: Aninha e Silvinha (grandes amigas que estão sempre ao meu lado), Izabela (sempre me incentivando). Ao amigo Raul (sem ele eu não estaria aqui hoje).

"O que me preocupa não é o grito dos
maus. É o silêncio dos bons".

Martin Luther King

Dedico este trabalho primeiramente à minha querida mãe. Exemplo de força, coragem e abnegação à família. Agradeço a Deus por este anjo na minha vida.

Dedico também a meu pai e meus irmãos Marcelo e André.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 A Retina.....	1
1.1.1 Desenvolvimento da Retina.....	4
1.2 Glutamato, seus Receptores e Funções.....	5
1.2.1 Receptores AMPA e Kainato.....	7
1.2.2 Receptores NMDA.....	7
1.3 A L-Arginina.....	13
1.4 Óxido Nítrico.....	15
1.5 Óxido Nítrico e Receptores NMDA.....	20
1.6 Do mRNA à Proteína.....	23
1.6.1 RNAs - Transporte e Estabilidade.....	27
1.6.2 Síntese de Proteínas e sua Regulação.....	32
2. Objetivos.....	43
3. Métodos.....	44
3.1 Culturas.....	44

3.2	Captação de [³ H]L-arginina/[³⁵ S]Metionina.....	45
3.3	Captação de [³ H]L-arginina/[³⁵ S]Metionina - Curva de Tempo.....	46
3.4	Medida de incorporação de [³ H]L-arginina/[³⁵ S]Metionina nas proteínas intracelulares.....	46
3.5	Dosagem de Proteína, Eletroforese e Análise de Western Blot.....	47
3.5.1	Eletroforese e western blot.....	48
3.6	Análise Estatística.....	51
4.	Resultados.....	52
4.1	Inibição da Síntese de Proteínas por Estimulação de Receptores do Tipo NMDA.....	52
4.2	Participação do Óxido Nítrico na Síntese de Proteínas.....	58
4.3	Efeito da Retirada do Mg ²⁺ e do NMDA na Fosforilação do eEF2.....	61
4.4	Participação da ERK na fosforilação do eEF2.....	64
5.	Discussão.....	68
6.	Referências Bibliográficas.....	87
	Anexo	109

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α amino-5-metil-4-isoxalona propionato.
AMP	Adenosina Monofosfato.
AMPc	Adenosina 3' -5' monofosfato.
AMPK	Proteína Cinase Dependente de AMP.
APV	Ácido 2-amino-5-fosfovalérico.
ATP	Adenosina 5' -trifosfato.
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro.
BSA	Albumina Sérica Bovina.
Ca ²⁺	Cálcio.
CA1	Região 1 do Corno de Amon no hipocampo.
CaMKII	Cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II.
CaMKII α	Subunidade α da cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II.
CaMKIII	Cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo III.
C6	Sexto dia de cultivo da cultura.
CHO	Células de Ovário de Hamster.
CHX	Cicloheximida.
CMF	Salina sem cálcio e magnésio.
CO	Monóxido de Carbono.
DCG-IV	(2S,2'R,3'R)-2-(2'3'-dicarboxiciclopropil)glicina
DHPG	(RS)-3,5-dihidroxifenilglicina.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético.
En	Enésimo dia de estágio de desenvolvimento embrionário (Ex.: E8 - oitavo dia de estágio de desenvolvimento).
eIF	Fator eucariótico de Iniciação.
eEF	Fator eucariótico de Alongamento.
eEF2K	Cinase do Fator eucariótico de Alongamento 2.
ERK	Proteína Cinase Ativada por Sinal Extracelular.
GABA	Ácido Gama Amino Butírico.
GAP-43	Proteína Associada ao Crescimento de 43 KDa.

GCs	Guanilato Ciclase Solúvel.
GDP	Guanosina Difosfato.
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico.
GTP	Guanosina Trifosfato.
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio.
JNK	Cinase Jun N-terminal.
Kainato	Ácido 2-carboxi-4-(1-metiletetil)-3-pirrolidinacético.
L-AP4	Ácido L(+)-2-Amino-4-fosfonobutírico.
L-Arg	L-Arginina.
[³ H]L-Arg	L-Arginina marcada radioativamente com trítio.
L-Cit	L-Citrulina.
L-NA	L-Nitroarginina.
LTD	Depressão de Longa Duração.
LTP	Potenciação de Longa Duração.
MAP2	Proteína Associada aos Microtúbulos 2.
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno.
MBP	Proteína Básica de Mielina.
Met	Metionina.
[³⁵ S]-Met	Metionina marcada radioativamente com enxofre 35.
MEM	Meio Essencial Mínimo.
Mg ²⁺	Magnésio.
MK-801	(5R,2S)-(+)-5-Metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imine hidrogênio maleato.
mM	Mili molar.
μCi	Micro Curie.
μM	Micro molar.
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro.
mTOR	Alvo da Rapamicina em mamíferos.
NaCl	Cloreto de Sódio.
NaOH	Hidróxido de Sódio.
nM	Nanômetro.
NMDA	N-Metil-D-Aspartato.
NMDAR	Receptor N-Metil-D-Aspartato.
NO	Óxido nítrico.
NOS	Óxido Nítrico Sintase.

O ₂ ⁻	ânion Superóxido.
ONOO ⁻	Peroxinitrito.
PABP	Proteína Ligante da Cauda de Poli A.
PD98059	Inibidor da MEK.
P-eEF2	Fator de Alongamento 2 fosforilado.
PI3K	Proteína Cinase dependente de IP3.
PKA	Proteína Cinase dependente de AMPc.
PKC	Proteína Cinase dependente de Cálcio.
PKG	Proteína Cinase dependente de GMPc.
PP2A	Proteína Fosfatase 2A.
PP2B	Calcineurina.
PSD-95	Proteína de Densidade pós-sináptica de 95KDa.
PTNs	Proteínas.
Rpm	Rotações por minuto.
SAPK	Proteína Cinase Ativada por Estresse.
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio.
Ser	Resíduo de Serina.
S6K1	Cinase da Proteína Ribossomal S6.
SNC	Sistema Nervoso Central.
TBS	Solução Tampão Tris.
TBS-T	Solução Tampão Tris + Tween-20.
TCA	Ácido tricloroacético.
Thr	Resíduo de Treonina.
Tris	[hidroximetil]amino-metano.
tRNA	Ácido Ribonucleico transportador.
UTR	Região não traduzida.
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo.
ZBP	Proteína Ligante de Zipcode.

RESUMO

A síntese de proteínas é um fenômeno que controla eventos importantes no desenvolvimento como sobrevivência, morte e diferenciação. Pode ser regulada por inúmeras vias e cinases em diferentes momentos da transcrição e tradução. Uma delas, a eEF2 cinase (eEF2K), inibe o alongamento da cadeia peptídica fosforilando o fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2). A eEF2K é dependente de Ca^{2+} /calmodulina sendo estimulada pelo influxo de Ca^{2+} através de receptores NMDA (NMDAR). Neste trabalho mostramos a participação do NMDAR, da via das cinases ativadas por sinal extracelular (ERKs) e do óxido nítrico (NO) no controle da síntese de proteínas. Culturas de retina de embriões de galinha foram incubadas com [^{35}S]-metionina ou [3H]-arginina em diferentes tratamentos, lisadas com TCA 5% e a radioatividade do precipitado determinada. Outras culturas foram lisadas com SDS e suas proteínas dosadas e separadas em gel de eletroforese, transferidas para membrana de PVDF e submetidas à imunomarcação com anticorpo anti-fosfoeEF2 (P-eEF2). O NMDA inibiu a incorporação de [^{35}S]-metionina e [3H]-arginina em proteínas, sendo o maior efeito obtido na concentração de 1mM (47.5±5.9% e 61.8±12.7% de inibição, respectivamente, n=4). O inibidor da MEK PD98059 (25µM) promoveu efeito igual ao NMDA, mas a incubação com ambos compostos não aumentou o efeito (n=3). Porém, 500µM de L-Nitroarginina, inibidor da NOS promoveu um aumento na incorporação de [^{35}S]-metionina de 129,4±5.67% (n=3). NMDA também aumentou P-eEF2 em 15 minutos (158,4±26,7%) (n=3). No entanto, PD98059 diminuiu fortemente o teor de P-eEF2 (27,9±4,3%) e o tratamento conjunto inibiu parcialmente a fosforilação (75,7±1,1%) (n=3). Mostramos que a ativação de NMDAR promove aumento de P-eEF2 e inibição da síntese proteica, com aumento de L-arginina livre e produção de NO. Já o PD98059 produziu efeito oposto embora diminua a incorporação de aminoácidos em proteínas. Sugerimos que este mecanismo pode ser importante na regulação da formação de sinapses durante o desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Protein synthesis is a phenomenon that controls important developmental events such as survival, cell death and differentiation. It can be regulated by many pathways and protein kinases in different points of transcription and translation. One of these kinases, eEF2K, inhibits peptide chain elongation by phosphorylating the eucaryotic elongation factor 2 (eEF2). eEF2K is Ca^{2+} /calmodulin-dependent and is stimulated by calcium influx through NMDA receptors (NMDAR). In the present work, we show the participation of NMDAR, ERK pathway and NO in the control of protein synthesis. Chick embryo retina cultures are incubated with [^{35}S]-methionine or [^3H]-L-arginine using different protocols, lysed with 5% TCA and the precipitated radioactivity determined. Other cultures were lysed with SDS and after measurement of protein concentration were separated by SDS PAGE, transferred to PVDF membranes and incubated with anti-phospho-eEF2 antibody (P-eEF2). NMDA inhibited both [^{35}S]-methionine or [^3H]-L-arginine incorporation in proteins, and the maximal effect was observed with 1mM ($47.5\pm 5.9\%$ and $61.8\pm 12.7\%$ of inhibition, respectively, $n=4$). The MEK inhibitor, PD 98059 ($25\mu\text{M}$), promoted an effect similar to NMDA, but incubation with both compounds showed no additive effect ($n=3$). However, L-Nitroarginine (L-NA - inhibitor of NOS) ($500\mu\text{M}$) increased the [^{35}S]-methionine incorporation by $129.4\pm 5.67\%$ ($n=3$). NMDA also increased P-eEF2 in 15 minutes ($158.4\pm 26.7\%$) ($n=3$). However, PD98059 strongly diminished P-eEF2 ($27.9\pm 4.3\%$) and the concomitant treatment with both NMDA and PD98059 partially inhibited the phosphorylation ($75.7\pm 1.1\%$) ($n=3$). We have shown that NMDAR activation promotes an increase in P-eEF2 and inhibition of protein synthesis with concomitant elevation of free L-Arginine levels and NO production. PD98059 promotes an opposite effect even so diminishes the amino acid incorporation in proteins. We suggest that this mechanism can be very important in the regulation of synapse formation during embryonic development.

1. Introdução.

1.1 A retina.

A visão talvez seja a função mais complexa do nosso sistema sensorial. Através dos seus muitos componentes, é capaz de formar imagens extremamente ricas em cores, formas e texturas a partir de um sinal luminoso que chega nos fotorreceptores da retina. Toda luz não captada é absorvida pelo epitélio pigmentar (rico em melanina) que se localiza atrás da retina, impedindo que a luz seja refletida pelo fundo do olho e volte para a retina (Kandel *et al.*, 1995). O sinal luminoso é transduzido em sinal eletroquímico pelos variados tipos celulares que compõem a retina e que modificam e organizam esta informação do ambiente externo. Estas células se dividem em camadas laminares muito bem definidas e o impulso caminha em sentido oposto ao da luz em direção às células ganglionares na camada mais interna da retina (Fig. 1). Os axônios das células ganglionares formam o nervo óptico e enviam o impulso nervoso para as áreas sub-corticais (ex.: Núcleo Geniculado Lateral). Destas saem projeções para corticais (ex.: córtex visual) do Sistema Nervoso Central (SNC), que integram as informações para posterior interpretação do estímulo.

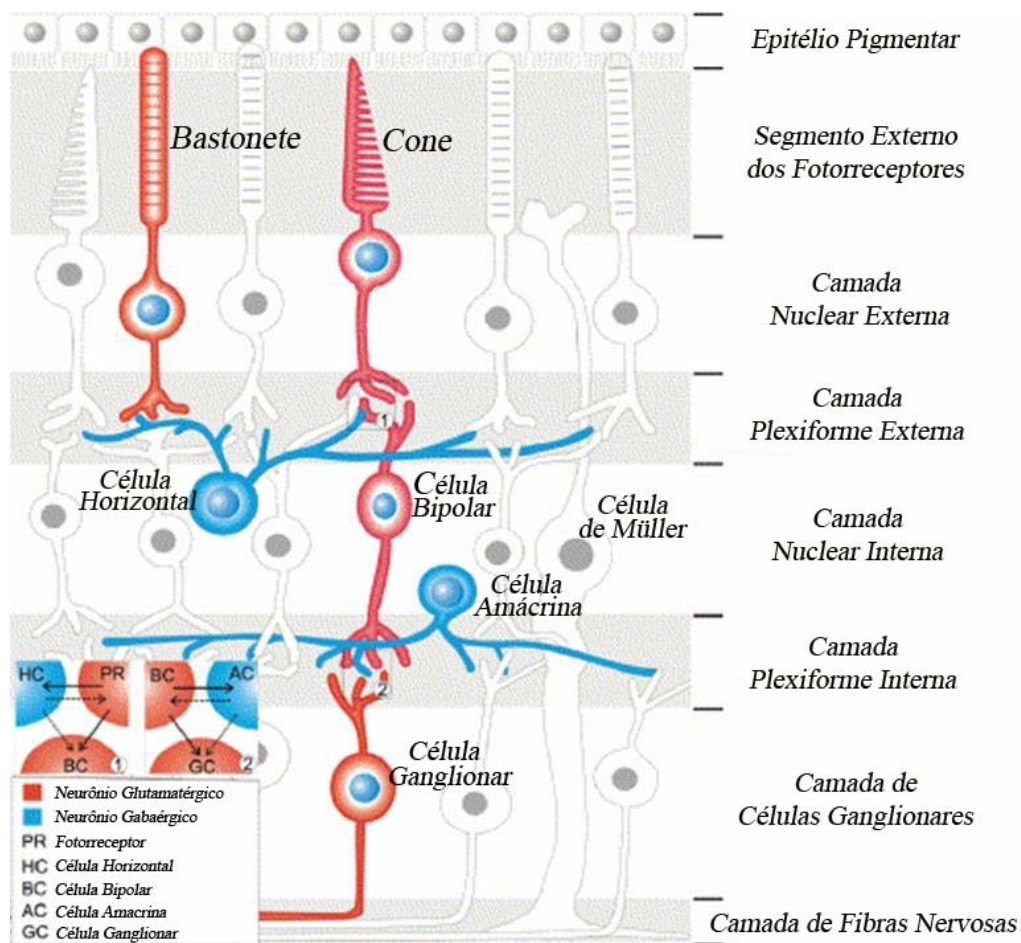


Figura 1: Desenho esquemático mostrando as camadas celulares e a organização da retina de vertebrados. Sinais gerados em fotorreceptores (cones e bastonetes) passam através das células bipolares para as ganglionares, que enviam os sinais para os centros visuais através do nervo óptico. Esta linha direta de fluxo de informações é modulada por células horizontais na camada plexiforme externa (OPL) a por células amácrinas na camada plexiforme interna (IPL). Glutamato e GABA são os principais neurotransmissores excitatório e inibitório na retina, respectivamente. Neurônios glutamatérgicos (fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares) estão em vermelho, ao passo que, neurônios GABAérgicos estão em azul. Na OPL, células horizontais recebem *input* de fotorreceptores. As células bipolares recebem tanto dos fotorreceptores quanto das células horizontais. Na IPL, células bipolares e amácrinas conectam-se através de sinapses recíprocas e ambas provêm *inputs* para as células ganglionares. Células de Müller compõem o principal tipo de célula glial que está presente em toda a extensão da retina neural. (Modificado de Yang, 2004).

A retina de embrião de galinha possui inúmeras vantagens que a tornam um excelente modelo para estudos de proliferação, comunicação e desenvolvimento celular (Coloumbre, 1955). Entre estas vantagens estão, o fato de fazer parte do SNC, a sua fácil acessibilidade e obtenção nos mais variados estágios do desenvolvimento, o conhecimento de sua morfologia, possibilitando assim, o preparo de culturas de células que podem ser mantidas por períodos de tempo relativamente longos (para revisão ver Lolley, 1969). Estas culturas possibilitam estudos farmacológicos, principalmente porque possuem muitas das propriedades do tecido *in vivo* (de Mello *et al.*, 1982; Paes-de-Carvalho & de Mello, 1985; Paes-de-Carvalho *et al.*, 1990).

Outro ponto que torna a retina um objeto atrativo de estudo é o fato de que possui diversos sistemas de neurotransmissores presentes em outras áreas do SNC, tais como: sistema colinérgico com seus receptores localizados principalmente na camada plexiforme interna (Vogel & Nirenberg, 1976; Sugiyama *et al.*, 1977); o sistema gabaérgico, com o GABA já podendo ser detectado no 6º dia embrionário (de Mello *et al.*, 1976); o sistema dopaminérgico, no qual a dopamina é a principal catecolamina da retina de diversas espécies (Haggendal & Malforms, 1965; Ehinger & Falck, 1969) e seus distintos subtipos de receptores são encontrados em diferentes estágios do

embrião, promovendo mudanças nos níveis de AMPc desde estágios mais precoces do desenvolvimento (de Mello, 1978); o sistema purinérgico, que possui diferentes funções na retina embrionária e na retina madura (Paes-de-Carvalho *et al.*, 1990; Paes-de-Carvalho *et al.*, 1992), tal como bloquear a morte neuronal induzida por glutamato (para revisão ver Paes-de-Carvalho, 2002); e o sistema glutamatérgico que descreveremos com maiores detalhes posteriormente. Além destes, outras substâncias foram identificadas como neuroativas: glicina, serotonina e alguns peptídeos, como substância P, encefalina, somatostatina, neurotensina, neuropeptídeo Y, VIP, colecistocinina e glucagon (Dowling, 1978; Kelly, 1993).

1.1.1 Desenvolvimento da retina.

O desenvolvimento do embrião de galinha até o nascimento é bastante rápido, em torno de 21 dias (Hamburger & Hamilton, 1951). Dentro deste curto espaço de tempo são formadas as diversas camadas que compõem a retina: camada dos fotorreceptores (cones e bastonetes), camada plexiforme externa (prolongamentos das células da camada nuclear interna), camada nuclear

interna (bipolares, amácrinas e horizontais), plexiforme interna (prolongamentos neuronais), camada de células ganglionares (Fig. 1).

A primeira camada a se formar é a que fica mais próxima ao vítreo. Há um intenso prolongamento dos axônios das células ganglionares (Kahn, 1973; Adler, 1993, Snow & Robson, 1994) que surgem entre os dias embrionários 3 e 5 (E3 e E5) e formarão o nervo óptico posteriormente (Coulombre, 1955; Adler, 1993). Em concomitância surgem as células de Müller (entre E3 e E7) e, logo após, as amácrinas, horizontais, fotorreceptores e, por fim, as bipolares (Kahn, 1973; Snow & Robson, 1994). As conexões sinápticas começam a se formar na camada plexiforme interna em E14 e posteriormente na plexiforme externa em E15 (Coulombre, 1955; Sheffield & Fischman, 1970; Hughes & La Velle, 1974).

1.2 Glutamato, seus receptores e Funções.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC (Mayer & Westbrook, 1987a). Em 1986, Miller e Slaughter verificaram altas concentrações de glutamato em fotorreceptores e células bipolares. Posteriormente foi descrita a presença de receptores glutamatérgicos na retina de vertebrados (Watkins, 1989).

Seus receptores estão divididos em duas principais classes: metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos possuem sete domínios transmembrana, são de ação lenta e mobilizam vias de segundo-mensageiros, o que se deve à ligação a enzimas de membrana (Monaghan *et al.*, 1989; Schoepp *et al.*, 1990; Watkins, 1990). A tabela 1 mostra os grupos aos quais os subtipos de receptores metabotrópicos pertencem, seus agonistas seletivos e a via de sinalização intracelular a que estão acoplados. Os receptores ionotrópicos são responsáveis pelo componente de ação rápida do SNC (Monaghan *et al.*, 1989; Schoepp *et al.*, 1990; Watkins *et al.*, 1990). Entre os receptores do tipo ionotrópico (canais iônicos), são descritos três subtipos: receptores AMPA (α amino-5-metil-4-isoxalona propionato) e kainato (ditos não-NMDA) e NMDA (N-Metil-D-Aspartato).

Tabela 1. Divisão dos subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato (adaptado de Pin & Acher, 2002).

Subtipos	Grupos	Agonista Seletivo	Via Transducional
mGluR1 mGluR5	I	DHPG	Ativação da Fosfolipase C
mGluR2 mGluR3	II	DCG-IV	Inibição da Adenilato Ciclase
mGluR4 mGluR6 mGluR7 mGluR8	III	L-AP4	Inibição da Adenilato Ciclase

1.2.1 Receptores AMPA e kainato.

Estes receptores possuem arranjos multiméricos de quatro subunidades e quatro domínios transmembrana. Os receptores AMPA são compostos por subunidades do tipo *GluR1*, *GluR2*, *GluR3*, *GluR4* (Nakanishi, 1992) e os receptores kainato são formados por arranjos das subunidades *GluR5*, *GluR6*, *GluR7*, *KA1* e *KA2* (Hollmann *et al.*, 1994). Ambos são descritos como receptores que, quando ativados, promovem a despolarização da célula, pois na maioria das conformações, permitem a entrada de íons Na^+ (Pláteník *et al.*, 2000). O Receptor AMPA pode conduzir íons divalentes como o cálcio (Ca^{2+}) quando a subunidade *GluR2* está ausente, pois esta possui um resíduo de arginina carregado positivamente que reduz a permeabilidade ao cálcio (Hume *et al.*, 1991).

1.2.2 Receptores NMDA.

O receptor NMDA é descrito em quase todos os neurônios e desde os períodos mais iniciais do desenvolvimento. Nesta fase é responsável pela sinalização da sobrevivência ou morte das células neuronais (Ikonomidou *et al.*,

1999), além dos processos de diferenciação (Yun *et al.*, 1999). O receptor NMDA pode ser formado com as seguintes subunidades na forma de um tetrâmero: NR1 (Sugihara *et al.*, 1992; Nakanishi & Masu, 1994), NR2A, NR2B, NR2C, NR2D (Konishi *et al.*, 1991; Moriyoshi *et al.*, 1991; Monyer *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1993), NR3A e NR3B, sendo que as subunidades NR1 e NR2 são as mais encontradas e as mais importantes, pois são sítios para a glicina (co-agonista) e o glutamato, respectivamente (Fig. 2). Diferentes combinações geram receptores funcionalmente e farmacologicamente diferentes, principalmente no que concerne à subunidade NR2 (Moriyoshi *et al.*, 1991, Kutsuwada *et al.*, 1992; Meguro *et al.*, 1992; Buller *et al.*, 1994). Algumas das mudanças relacionam-se ao tempo de abertura do canal e também à sua condutância (Gibb & Colquhoun, 1992). Normalmente, para que o receptor seja funcional é necessário a co-expressão de uma subunidade NR1 e uma ou duas subunidades NR2.

Para ser ativado, o receptor NMDA necessita que ocorram dois fenômenos simultâneos. Primeiro deve ocorrer uma despolarização da célula, pois este canal é bloqueado pelo íon magnésio de maneira voltagem-dependente. Esta despolarização é gerada pela ativação prévia dos receptores AMPA/Kainato através do glutamato permitindo a entrada de íons sódio na célula e a saída do

magnésio do canal por diferença de potencial. Concomitante a isso é necessária a ligação da glicina e do glutamato para a ativação do receptor.

Após a saída do íon magnésio e a mudança conformacional gerada pela ligação dos agonistas, há um elevado influxo de cálcio pelo receptor (MacDermott *et al.*, 1986), além da entrada de sódio e saída de potássio em menor proporção (Fig. 2). Este aumento nos níveis intracelulares de cálcio leva a inúmeros eventos na célula; permite, entre outras ações, remodelagem do citoesqueleto (Forsher, 1989), a ativação de proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} e aumenta a liberação de neurotransmissores, estando por isso relacionado com a potenciação de longa duração (LTP), aprendizado e plasticidade neural (Collingridge & Bliss, 1987; Olney, 1989; Wood *et al.*, 1990; Scatton, 1993). Promove também aumento na síntese de óxido nítrico (NO), visto que a enzima que o produz - óxido nítrico sintase (NOS) - é dependente de Ca^{2+} /calmodulina (Gally *et al.*, 1990).

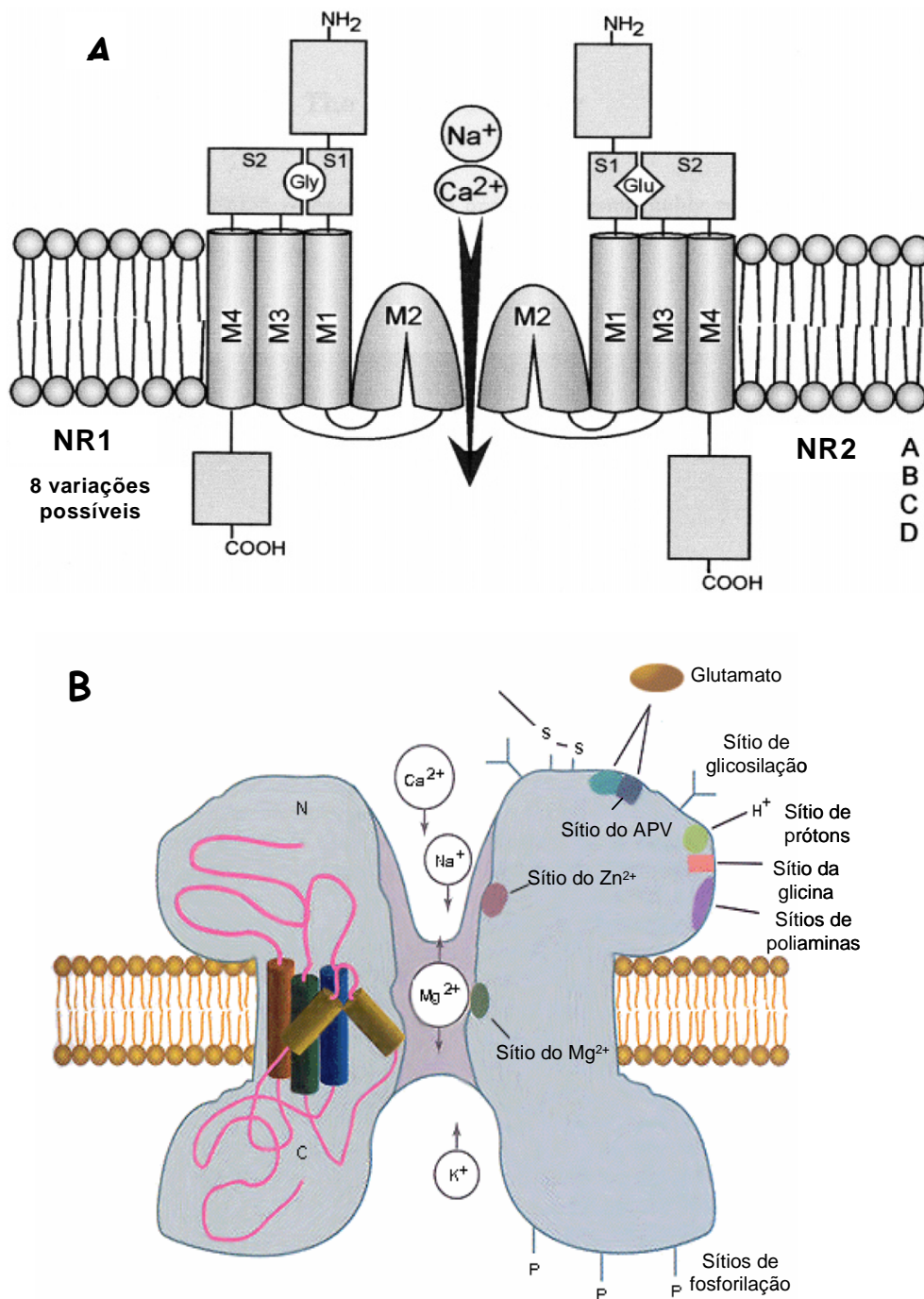


Figura 2: Visão esquemática do receptor NMDA. (A) Representação das subunidades com seus domínios intra e extracelular, domínios trans-membrana, sítios de ligação dos agonistas e permeabilidade iônica. Adaptado de Pláteník et al. (2000). (B) Representação dos sítios de ligação de agonistas e antagonistas e sua permeabilidade iônica (http://www.uc.cl/sw_educ/neurociencias/html/084.html).

Embora consideremos habitualmente a glicina como o co-agonista do receptor, Schell e colaboradores em 1995 mostraram que a D-serina possui alta afinidade pelo sítio da glicina. Além de ser predominantemente encontrada no cérebro (Hashimoto *et al.*, 1993), está presente em altas concentrações no prosencéfalo, córtex cerebral e hipocampo e em baixas concentrações no diencéfalo, mesencéfalo e cerebelo (Hashimoto *et al.*, 1993; Nishikawa, 2005). As mudanças que ocorrem na sua distribuição durante o desenvolvimento pós-natal são similares as que ocorrem com a distribuição da subunidade NR2B (Watanabe *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1995). Isto sugeriu que a D-serina fosse um co-agonista endógeno do receptor NMDA (Nishikawa, 2005).

Além do íon magnésio que bloqueia o canal impedindo o fluxo iônico, o receptor NMDA também pode ter sua atividade bloqueada pelo zinco (Fig. 2). No entanto, este bloqueio é parcial e depende de quais subunidades compõem o receptor. O zinco tem 50 vezes mais afinidade por receptores formados por NR1/NR2A do que pelos formados com NR1/NR2B e, mesmo assim, é capaz de promover um bloqueio da corrente que varia de 40% a 80% (Chen *et al.*, 1997; Paoletti *et al.*, 1997; Low *et al.*, 2000; Herin & Aizenman, 2004). Estudos têm revelado que a inibição do zinco está relacionada a uma rápida dessensibilização

de receptores compostos por subunidades NR1/NR2A (Chen *et al.*, 1997; Krupp *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2001; Herin & Aizenman, 2004).

Estudos recentes demonstraram também que receptores NMDA do córtex motor formados pelas subunidades NR1/NR3 podem ser completamente ativados apenas com a ligação da glicina sem depender do glutamato ou NMDA e ser inibidos por D-serina. Aliás, tanto glutamato quanto NMDA eram incapazes de produzir qualquer efeito ou o produziam em escala muito reduzida (Chatterton *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2005).

Além da possibilidade de ativação e inibição do receptor, este também pode ter sua atividade modulada de maneira positiva ou negativa. As poliaminas se enquadram nos dois casos, pois em baixas concentrações modulam positivamente a resposta ao glutamato, enquanto que em altas concentrações fazem o efeito oposto (para revisão ver Igarashi & Kashiwagi, 2000). As poliaminas endógenas são: espermina, espermidina e putrescina e derivam do metabolismo da ornitina.

Outra forma de se modular a atividade do receptor é através da fosforilação/defosforilação dos seus resíduos. A PKC (Gerber *et al.*, 1989; Chen & Huang, 1992), PKA (Raman *et al.*, 1996) e CaMKII (Omkumar *et al.*, 1996) são exemplos de cinases que fosforilam o NMDAR e aumentam sua

atividade. Em contraposição, as fosfatases dos tipos 1 e 2A defosforilam o mesmo e diminuem sua atividade (Wang *et al.*, 1994).

A modulação do receptor NMDA se torna extremamente importante a partir do momento que a presença em excesso de neurotransmissores excitatórios no meio extracelular ativam os receptores de maneira persistente, levando a um aumento exacerbado nos níveis intracelulares de Ca^{2+} gerando um processo chamado excitotoxicidade (Choi, 1988). O Ca^{2+} desencadeia uma série de fenômenos na célula que a levam à morte, tais como: a ativação de lipases e proteases citoplasmáticas e despolarização da membrana mitocondrial (Dessi *et al.*, 1993), a inibição da síntese de ATP pela mitocôndria e o aumento da formação de radicais livres (Nicholls, 1985; Dykens, 1994; Gunter *et al.*, 1994; Dugan *et al.*, 1995; Reynolds e Hastings, 1995; Bindokas *et al.*, 1996).

1.3 A L-Arginina.

A L-Arginina (L-Arg) é requerida para síntese de várias substâncias tais como a creatina e agmatina, síntese de proteínas e óxido nítrico. Todas estas reações dependem da concentração intracelular de L-Arg e para isto duas vias

podem ser descritas: 1) síntese de L-Arg a partir de outros substratos e ou; 2) transporte de L-Arg do meio extracelular para compartimentos intracelulares. As principais vias nas quais a L-Arg está envolvida são descritas na figura 3.

No SNC, as enzimas do ciclo de Krebs carbamoilfosfato sintetase e ornitina transcarbamilase não são expressas e, portanto, a síntese de L-Arginina é dependente da reciclagem da L-Citrulina (L-Cit), da via da agmatina e da regulação da síntese de proteínas. Aliás, não há um órgão que possua todas as enzimas participantes do metabolismo da arginina demonstradas na figura 3 (Wiesinger, 2001).

Os estudos sobre a L-arginina se intensificaram com a descoberta que ela seria o precursor para a síntese de nitritos e nitratos (Hibbs *et al.*, 1987) e, posteriormente, observaram que este aminoácido era também precursor da produção do óxido nítrico (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1988). A L-Arg é convertida a L-Cit e NO de forma estequiométrica, por ação catalítica de um grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (Förstermann *et al.*, 1991; Griffith & Stuehr, 1995), sendo esta a única via fisiológica de produção de óxido nítrico (Fig. 3).

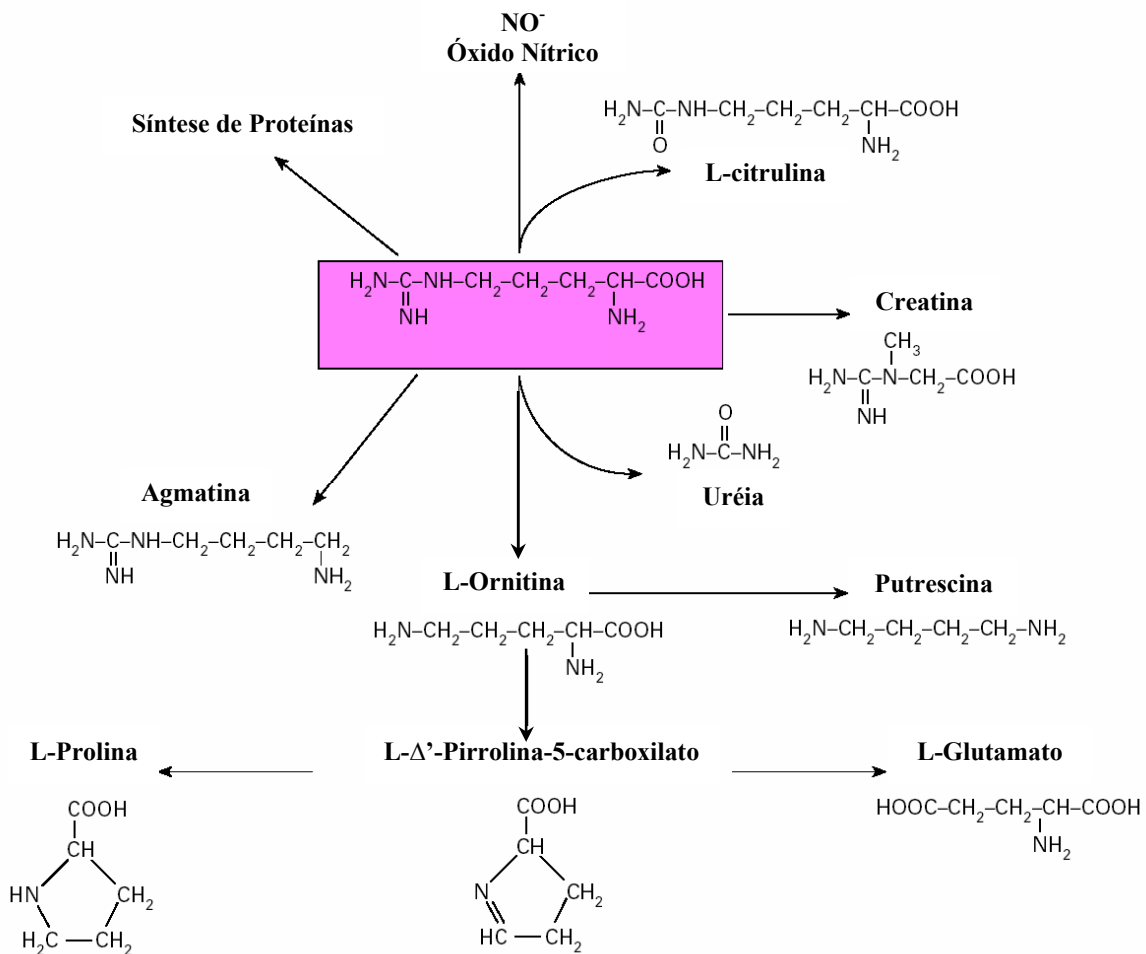


Figura 3: Metabolismo da L-arginina em células de mamíferos (Adaptado de Wu & Morris, 1998).

1.4 Óxido Nítrico.

O surgimento do óxido nítrico como um agente da sinalização celular é uma das mais importantes descobertas da fisiologia humana nos últimos anos. Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que vasodilatadores endógenos

como a acetilcolina não agem diretamente sobre o músculo liso vascular, mas sobre as células endoteliais promovendo a liberação de um fator extremamente lábil que se difunde sobre o músculo liso; este fator seria o óxido nítrico. O NO é um radical livre de natureza gasosa capaz de se difundir livremente através da membrana plasmática, é altamente reativo e é sintetizado e utilizado por uma enorme variedade de células (Marletta, 1993; McGeer *et al.*, 1993; Feelisch *et al.*, 1994; Hobbs & Ignarro, 1996; MacMicking *et al.*, 1997). No sistema circulatório o NO é produzido pela NOS endotelial e funciona como vasodilatador (Hobbs & Ignarro, 1996), fator de angiogênese (Kiefer *et al.*, 2002), e fator de sobrevivência das células endoteliais (Dimmeler & Zeiher, 1999). Uma outra isoforma, a NOS induzível, está permanentemente ativa quando expressa, ou seja, é independente da Ca^{2+} /calmodulina. O NO por ela produzido é liberado em altas concentrações e é o elemento citotóxico chave para eliminação de bactérias (Hibbs *et al.*, 1988; Marletta, 1993; MacMicking *et al.*, 1997). Já no SNC o óxido nítrico é produzido pela NOS neuronal e usado como neurotransmissor (Bredt *et al.*, 1991; Brenman & Bredt, 1996), participando particularmente da LTP que é essencial para os processos de aprendizado e memória (O'Dell *et al.*, 1994; Brenman & Bredt, 1996; Son *et al.*, 1996). A LTP é inibida por bloqueadores da NOS, comprovando o papel do NO

neste processo (O'Dell *et al.*, 1994; Brenman & Bredt, 1996; Son *et al.*, 1996). Muitos têm sido os papéis atribuídos ao óxido nítrico e, muitas vezes esses papéis são controversos. O NO já foi descrito como fator de diferenciação (Peunova & Enikolopov, 1995; Nakaya *et al.*, 2000; Packer *et al.*, 2003), mas após dano no cérebro, a produção de NO pode induzir neurogênese (Estrada & Murillo-Carretero, 2005). Recentes trabalhos de nosso laboratório demonstraram alguns dos papéis desempenhados pelo óxido nítrico na retina. Entre eles mostramos que o NO é capaz de modular a expressão de subunidades do receptor NMDA (Martins Ferreira & Paes-de-Carvalho, em preparação) e participar na sobrevivência de neurônios que morriam após a troca do meio de cultura. Neste último caso foi demonstrado que o NO atua sobre uma extensa via de sinalização que inclui o sistema GCs/GMPc/PKG e as proteínas cinases PI3K, CaMKII e ERK (Mejía-García & Paes-de-Carvalho, submetido). Em outro trabalho demonstramos que o NO era capaz de diminuir a proliferação de células gliais da retina sem a participação da via do GMPc (Magalhães *et al.*, 2006). Da mesma forma, assim como pequenas quantidades de NO são benéficas participando na manutenção da pressão sanguínea e sobrevivência celular (Contestabile & Ciani, 2004), altas concentrações ou a combinação deste com espécies reativas de oxigênio produz efeitos deletérios

como processos degenerativos, isquemia, inflamação ou morte celular (Estrada & Murillo-Carretero, 2005). No entanto, outros fatores além da concentração, como a taxa de fluxo e o ambiente intracelular em que é liberado, podem determinar se o NO será benéfico ou prejudicial à célula (Bishop & Anderson, 2005).

O NO é um radical livre porque tem um de seus elétrons não emparelhados e, portanto, reage com moléculas com esta mesma característica. Um dos seus alvos é o Fe^{2+} que está presente nos grupamentos heme de muitas proteínas, incluindo a NOS, inibindo sua atividade de forma reversível (Rogers & Ignarro, 1992). No entanto, o NO pode assumir diferentes características de acordo com seu número de oxidação. A molécula que comumente chamamos de NO é representada por $NO\bullet$ e tem número de oxidação +2. Porém, se for +1 é representado por NO^- e, se o número de oxidação for +3, é descrito como NO^+ e chamado de cátion nitrosônio (para revisão ver Pagliaro, 2003). Como mencionado acima, o NO pode ter diferentes efeitos de acordo com o ambiente celular e também do seu estado de oxidação. O NO pode nitrosilar grupamentos SH presentes nas proteínas que são chamados grupos tióis (Stamler *et al.*, 1992; Montague *et al.*, 1994) com precisão espacial e temporal (para revisão ver Boehning & Snyder, 2003). Um exemplo é o próprio receptor

NMDA que quando nitrosilado torna-se dessensibilizado (Lei *et al.* 1992). Porém, pode nitrosilar também canais, bombas, enzimas metabólicas e respiratórias, fatores de transcrição e elementos do citoesqueleto (Stamler *et al.*, 2001).

Há também a reação de nitração que, quando ocorre, pode levar a modificações na estrutura e conformação das proteínas, acarretando mudanças na sua atividade e na suscetibilidade à degradação (Castro *et al.*, 1994) e levando a interrupções das cascatas de sinalização. Até pouco tempo este fenômeno era considerado irreversível, mas Kamisaki e colaboradores em 1998 mostraram evidências da existência de denitrases que teriam função semelhante à das fosfatases nos processos de fosforilação.

Por fim, um dos derivados mais reativos é o peroxinitrito (ONOO^-) que é formado pela reação entre o NO e o ânion superóxido (O_2^-) sendo considerado um dos principais efetores de morte celular induzida por NO (Dawson *et al.*, 1993).

1.5 Óxido Nítrico e Receptores NMDA.

Embora a sinalização pelo óxido nítrico possa parecer caótica por ser tão reativo, na realidade os níveis de NO em condições fisiológicas são controlados e localizados. A maior parte do NO produzido na célula ocorre através dos receptores NMDA (Bredt & Snyder, 1989; Garthwaite & Boulton, 1995) que estão presentes seletivamente na densidade pós-sináptica de sinapses excitatórias (Moriyoshi *et al.*, 1991). Embora existam várias vias de entrada distintas de cálcio na sinapse, somente o influxo proveniente do NMDAR é capaz de ativar eficientemente a NOS (Kiedrowski *et al.*, 1992). Isto se deve à associação física existente entre o receptor e a enzima através da proteína de densidade pós-sináptica de 95 KDa (PSD-95) (Brenman *et al.*, 1996a), que possui um conjunto de sítios de interação com outras proteínas, entre eles os domínios PDZ que medeiam a interação da NOS com os receptores NMDA de forma rápida e local (Christopherson *et al.*, 1999) (Fig. 4).

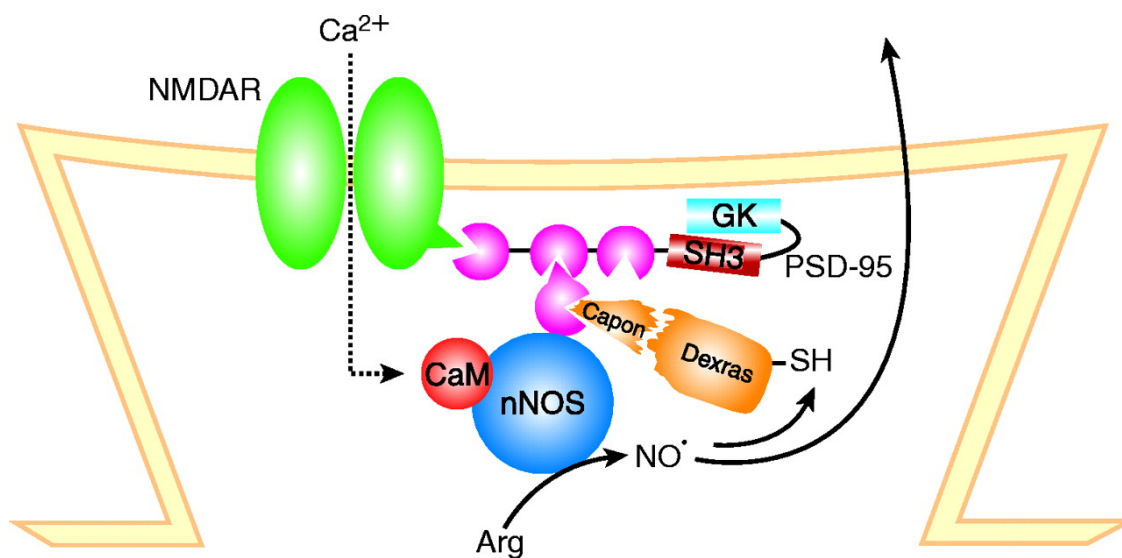


Figura 4: Interação entre NMDAR, PSD-95 e NOS regulando a sinalização do NO em sinapses neuronais (Bredt, 2003).

Esta interação no receptor NMDA se dá através da subunidade NR2B (Brenman *et al.*, 1996ab; Brenman & Bredt, 1997). Assim, imediatamente após a abertura do canal o cálcio promove a ativação da NOS. Classicamente, considerava-se que o NO formado agiria apenas sobre os receptores de membrana promovendo um *feedback* negativo da sua atividade ou ativando a guanilato ciclase solúvel e elevando os níveis intracelulares de GMPc (guanosina de monofosfatada cíclica) (Bredt, 2003) (Fig. 5). Porém, o pensamento atual a respeito da compartimentalização de sinais e da capacidade do NO modular a atividade das mais diversas proteínas levanta questões a respeito de qual é o limite de fenômenos desencadeados pelo NO nas células. Fenômenos como os

de nitrosilação e nitração pelo NO têm sido considerados como um novo tipo de fosforilação e já têm sido largamente demonstrado que o óxido nítrico ou seus derivados podem reagir com diversas moléculas da célula (Fig. 5). O ONOO^- , por exemplo, pode reagir com proteínas (Radi *et al.*, 1991a; Moreno & Pryor, 1992), lipídeos de membrana (Radi *et al.*, 1991b), açúcares (Beckman *et al.*, 1990) e DNA (para revisão ver Castro *et al.*, 1994). Então, quando pensarmos em sinalização por NO e no seu papel como mensageiro retrógrado, não devemos nos deter aos processos de morte ou sobrevivência desencadeados por ele, mas também a uma série de fenômenos ainda pouco explorados como a modulação das vias de sinalização. Hoje damos crédito quase que exclusivamente às fosforilações promovidas pelas proteínas cinases sem ater para as possíveis contribuições de moléculas lábeis, mas extremamente importantes, como o NO, o Sulfeto de Hidrogênio (H_2S) e o monóxido de carbono (CO). Este último também tem sido descrito como importante sinalizador celular na ativação da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio ativados por cálcio. Da mesma forma, o sulfeto de hidrogênio (H_2S) pode ativar canais de potássio e também, como mensageiro retrógrado, ativar a adenilil ciclase (para revisão ver Boehning & Snyder, 2003).

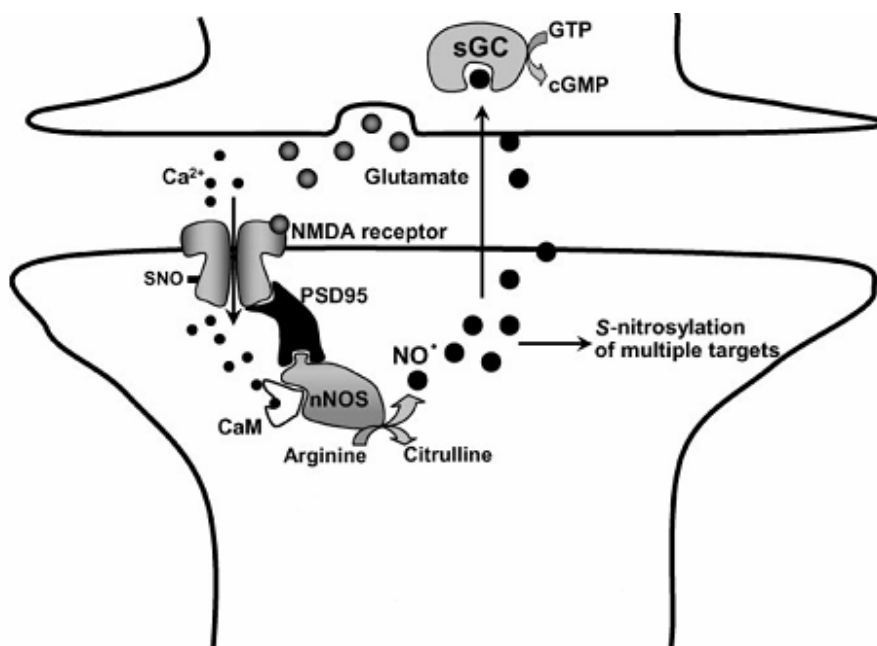


Figura 5: NO promovendo ativação da guanilil ciclase pré-sináptica e S-nitrosilações em alvos celulares (Modificado de Boehning & Snyder, 2003).

1.6 Do mRNA à Proteína.

Chega-se cada vez mais à conclusão de que a síntese de proteínas, com suas intrincadas e numerosas vias, coordena a vida da célula e que todas as ações e reações celulares em última instância dependem deste processo. As principais características do código genético foram estabelecidas há mais de 40 anos atrás, mas todos os detalhes da expressão gênica, que é dizer como a

informação contida no DNA é transformada em proteínas, não estão completamente elucidados (Inge-Vechtomov *et al.*, 2003).

Questões não resolvidas na biossíntese de proteínas das células eucarióticas incluem o posicionamento do códon de iniciação do mRNA no sítio P ribossomal, o mecanismo de formação da ligação peptídica e a translocação ribossomal durante o alongamento da cadeia crescente. Muitas dessas questões têm permanecido sem respostas porque o aparato de tradução eucariótico é uma complexa maquinaria através de ações combinadas de muitas chaves e fatores auxiliares.

Entender o processo de síntese depende de conhecermos as vias de sinalização como um todo, ou seja, desde o sinal extracelular proveniente de outra célula, passando pelas cascatas desencadeadas por este sinal (considerando aqui que não há participação de vias paralelas), os fatores de transcrição ativados, quais genes são ativados, a geração e o transporte de mRNAs para fora do núcleo, o endereçamento dos RNAs, além dos fatores que regulam sua estabilidade e acessibilidade para então chegarmos à parte mais complicada, a tradução. Também não estamos considerando ainda os sinais compartimentalizados e a tradução local independente do núcleo.

Vamos tentar primeiramente traçar um breve histórico do nosso conhecimento acerca da síntese de proteínas em neurônios. Uma das primeiras coisas que se acreditava era que a síntese proteica se realizava única e exclusivamente no corpo celular e, até então, parecia muito lógico pensar assim já que as técnicas de visualização do material celular mostravam toda a maquinaria necessária ao processo (ribossomos, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e o próprio núcleo) localizada no mesmo. Com o advento da microscopia eletrônica começou-se a observar que algumas dessas estruturas estavam presentes em dendritos também. Bodian em 1965 observou mRNAs e polirribossomos em dendritos proximais e levantou-se a idéia de que estes poderiam ser funcionais. Posteriormente, encontrou-se evidências de complexos de polirribossomos em sinapses em desenvolvimento (Palacios-Prü *et al.*, 1981; Steward & Levy, 1982) e o acúmulo de ribossomos em sinapses recém formadas durante a sinaptogênese (Steward & Falk, 1986). Já na década de 90, surgiram provas mais evidentes de que a síntese de proteínas poderia ser realizada localmente nos dendritos. Primeiro com a detecção do mRNA para CaMKII α em regiões dendríticas (Burgin *et al.*, 1990) e para CaMKII α e β no corpo e em processos dos neurônios da região CA1 do hipocampo (Martone *et al.*, 1996). Depois, quando foi observado uma série de componentes da

maquinaria traducional em neurônios hipocâmpais em cultura, tais como tRNA e fatores de tradução (Tiedge & Brosius, 1996) e também a presença de moléculas marcadoras do aparelho de Golgi em dendritos de neurônios da medula espinhal (Gardiol *et.al.*, 1999).

De qualquer forma, para que haja tradução local e distante do núcleo é necessário que os mRNAs estejam presentes e, portanto, estes devem ser transportados até os respectivos locais. É conhecido que as proteínas possuem seqüências que codificam onde devem ser localizadas e isto promove o endereçamento das mesmas para o local correto, mas e os RNAs? Estes também possuem regiões similares que são chamadas *zipcodes* (Singer, 1993), que serão tratados mais adiante. Outra pergunta que surge é por que os RNAs precisariam de endereçamento se as proteínas já o possuem e, portanto, chegariam ao local correto. A resposta a esta pergunta pode ser extraída de um exemplo, o da MBP (Proteína Básica de Mielina). A MBP é o principal componente da mielina no SNC (Barbarese *et al.*, 1999) e estudos verificaram que minutos após a tradução do mRNA da MBP, a proteína já se localizava no local de mielinização, ao passo que a incorporação de outras proteínas de mielina foi bastante retardada (Benjamins & Morell, 1978). Isto sugeria que sua síntese era local, hipótese esta comprovada nos anos subsequentes por

diferentes técnicas, incluindo hibridização *in situ* (Campagnoni *et al.*, 1980; Kristensson *et al.*, 1986; Verity & Campagnoni, 1988). Algumas hipóteses foram criadas para explicar este fenômeno e uma delas se refere ao fato de que a MBP é uma proteína com poderosas propriedades adesivas e pode ligar-se a várias membranas, potencialmente promovendo agregação indiscriminada de membranas de organelas no pericário (Barbarese *et al.*, 1999; Smith, 2004). Ou seja, estando o mRNA da MBP espacialmente restrito, o mesmo deve ocorrer com a proteína, concentrando-a onde é necessária e sendo ela inserida diretamente na membrana nascente e, ao mesmo tempo, mantendo-a longe de locais onde possa produzir efeitos deletérios quanto à agregação de membranas (Barbarese *et al.*, 1999; Smith, 2004).

1.6.1 RNAs - Transporte e Estabilidade.

Os RNAs são identificados para o transporte através de sua região terminal *cis-acting*, normalmente situada no terminal 3'. Esta região é reconhecida por uma proteína transportadora com uma região chamada *trans-acting* que exporta o mRNA para o citoplasma, onde eles são incorporados a grandes grânulos de transporte, e carregados até seu destino final (para revisão

veja Smith, 2004). Estes grânulos já foram observados em muitos tipos celulares e contêm ribossomos em grande quantidade, além de outras moléculas como tRNA sintetases, fatores de tradução, cinesina e dineína. Estes últimos fazem a locomoção dos grânulos ao longo dos microtúbulos (Barbarese *et.al.*, 1995). Estudos em oligodendrócitos demonstraram que estes RNAs não são traduzidos até que sejam ancorados em seu destino final nos processos distais destas células (para revisão veja Smith, 2004).

Mais de 20 mRNAs diferentes já foram descritos em regiões dendríticas, tais como: GAP-43, MAP2, CaMKII α , BDNF, subunidade γ da proteína G, subunidade NR1 do NMDAR e calmodulina (Steward & Schuman, 2003). Estes RNAs sofrem um fino controle espacial e temporal; eles podem ter diferentes distribuições dentro da árvore dendrítica e os níveis de cada um podem variar de acordo com o tipo celular, estágio do desenvolvimento, estado fisiológico e grau de estimulação sináptica (para revisão veja Smith, 2004). Trabalhos já demonstraram que freqüentemente eles estão co-localizados com ribossomos nas espículas dendríticas ou próximos a elas (Steward & Schuman, 2001; 2003; Tang & Schuman, 2002) e, segundo alguns autores, isto seria um mecanismo para prover rápida síntese de proteínas facilitando processos como a LTP (Frey & Morris, 1997; Steward, 2002).

Existem diferentes tipos de elementos *cis* e *trans-acting*, mas o mais estudado e, portanto, o mais conhecido é a interação entre *zipcode* e ZBP (proteína ligante de *zipcode*). Já foi observado que este complexo sofre influência de estímulos despolarizantes. Tiruchinapalli e colaboradores (2003) demonstraram que despolarização com KCl levava a um aumento no número de grânulos contendo mRNA para actina ligado à ZBP1 (um tipo de ZBP).

Contudo, nosso conhecimento acerca desses elementos ainda é muito pobre. Precisamos entender como cada mRNA é reconhecido por seu fator *trans-acting*; como o complexo proteína-RNA é recrutado para os grânulos, transportado, ancorado, traduzido, e liberado; quão relevante é o efeito da atividade sináptica nestes processos; e o que regula sua estabilidade. Ou seja, um longo caminho a ser percorrido.

Embora haja da ordem de 30.000 a 40.000 genes no genoma dos mamíferos, o número de proteínas excede muito além deste. O *splicing* alternativo de mRNAs e as modificações pós-traducionais criam uma diversidade de proteínas que tem recebido apenas uma modesta atenção. Existem proteínas, por exemplo, que possuem ao menos quatro isoformas através do *splicing* alternativo, cada uma das quais podendo ser acetiladas no N-terminal, fosforiladas, e metiladas. Isto demonstra que isoformas pós-

traducionalmente modificadas podem ter posições e funções diferentes (para revisão veja Smith, 2004).

Outra questão importante é a estabilidade dos mRNAs, ou seja, quanto tempo eles estão disponíveis para tradução antes de serem degradados. Ao contrário das organelas que normalmente são substituídas obedecendo a um padrão temporal - as mais velhas são degradadas - os mRNAs, assim como as proteínas, sofrem um tipo de regulação que não é somente temporal. Os marcadores de estabilidade estão localizados nos elementos *cis-acting* que normalmente são regiões não traduzidas dos mRNAs e a taxa de degradação é dada pelos elementos *cis-acting* e pelos *trans-acting* que ligam a eles (Guhaniyogi & Brewer, 2001). Cada mRNA terá uma estabilidade diferente de acordo com a proteína codificada por ele (Ross, 1995); por exemplo, mRNAs que codificam proteínas de estresse ou citocinas são instáveis e isto mantém os níveis dessas proteínas baixos. A instabilidade conferida a estes mRNAs protege a célula, impedindo a transcrição, por exemplo, de mRNAs de proteínas de estresse e sua tradução devido a um sinal de estresse qualquer.

Os mRNAs estáveis permitem uma janela de tempo de tradução maior para genes que são expressos em grande quantidade tais como a β -globina (Russell *et al.*, 1997), ou como em casos quando a tradução é retardada, tais

como mRNAs maternos, que são mantidos estocados até que ocorra a fertilização do oócito (Spirin, 1994).

O balanço entre a estabilidade e a degradação dos mRNAs é dado pelo grau e tipo de ativação da célula (Ming *et.al.*, 2001) e pelas interações entre os componentes estruturais do RNA e dos fatores *trans-acting*. Os componentes estruturais incluem a região 5'-cap, a região 5'-UTR (região não-traduzida), a própria região codificante, a 3'-cap e a região 3'-poliadenilato (também conhecida como cauda de poli-A) (Guhaniyogi & Brewer, 2001). Abaixo verificamos um pouco do papel de alguns desses fatores, no qual (E) significa fator Estabilizante e (D) fator Desestabilizante (para revisão veja Guhaniyogi & Brewer, 2001):

- Cauda de Poli-A (E) - A deânulação é o primeiro passo para a degradação dos RNAs. Quando o PABP (proteína ligante da cauda de Poli-A) está ligado à cauda Poli-A, o RNA fica protegido. Quanto maior a cauda, maior a estabilidade e maior a probabilidade do RNA ser traduzido.
- CAP 5' (E) - Estabiliza o RNA quando está ligado ao eIF4E. O *decapping* (retirada da região cap) ocorre em seqüência à deânulação. É reconhecido pela maioria dos fatores de tradução.

- Regiões ricas em Polipirimidinas; Regiões ricas em A + U (ARE) (D); Elemento responsivo ao Ferro (E).
- Fosfoproteínas como PI3K, p38, JNK, ERK interferem com a estabilização de RNAs, pois fosforilam as proteínas ligantes de RNA (E) ou (D).

Atualmente se considera que o controle da estabilidade do mRNA é a principal via de regulação da tradução (Guhaniyogi & Brewer, 2001).

1.6.2 Síntese de Proteínas e sua Regulação.

Didaticamente podemos dividir a tradução em três fases: iniciação, alongamento e terminação (Fig. 6). Cada uma delas é composta por diferentes fatores que possuem papéis específicos, altamente regulados e coordenados. Os fatores de iniciação são em maior número e, nos eucariotos, recebem a denominação genérica de fatores de iniciação eucarióticos (eIF) (Fig. 6). Muitos deles formam verdadeiros complexos e participam desde a montagem do ribossomo até o transporte e acoplamento dos mRNAs ao ribossomo. O ribossomo montado possui três sítios de ligação: sítio aminoacil (A), sítio peptidil (P) e sítio de saída (E).

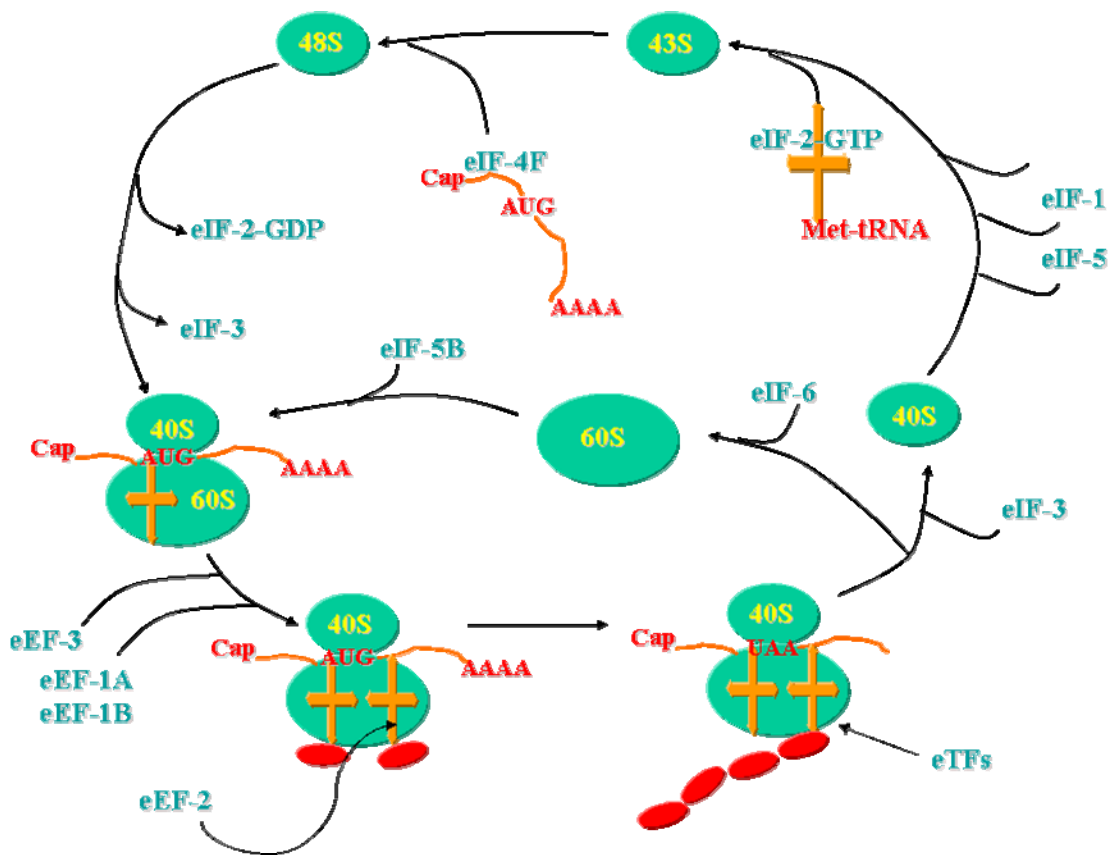


Figura 6: Esquema exemplificando a montagem dos ribossomos. A figura ilustra o transporte das subunidades ribossomais pelos fatores de iniciação (eIFs) e montagem das mesmas sobre a fita de mRNA. Também é mostrado o papel dos fatores no transporte e acoplamento do tRNA e do mRNA. Após a montagem há a participação dos fatores de alongamento (eEFs) que fazem o translocamento dos aminoácidos do sítio A para o sítio P. Após a chegada do códon de terminação, entra em ação os fatores de terminação (eTFs) que determinam a parada da síntese e o desmonte dos ribossomos.

A fase de iniciação também pode ser dividida em três partes: (1) Ligação do Met-tRNA_i (tRNA iniciador ligado à metionina) à subunidade menor do ribossomo; (2) Ligação da subunidade menor ao mRNA e reconhecimento do códon de iniciação AUG; (3) Junção da subunidade maior contendo o sítio ativo

da peptidil-transferase (enzima que promove a ligação de um aminoácido ao outro) ao complexo já formado (Dever, 2002) (Fig. 6). Em procariotos são necessários apenas três fatores de iniciação; em contraste, eucariotos requerem pelo menos onze fatores de iniciação (Dever, 2002). Isso nos mostra o quanto este processo é complexo e também possibilita que a síntese proteica possa ser regulada em múltiplos pontos. Vários desses fatores podem ser fosforilados por uma série de enzimas ou podem ser inibidos por proteínas ligantes específicas que também respondem a fosforilações. Os considerados mais importantes são o eIF2 α e o eIF4E que carregam o Met-tRNA e o cap-mRNA, respectivamente (Gingras *et al.*, 1999) (Fig. 6).

Ao que parece, existem diferentes fatores que exercem a mesma função e também que muitos formem complexos para que uma dada função seja realizada; como exemplo podemos citar um dos passos iniciais da síntese: para que a subunidade ribossomal menor (40S) seja recrutada, é necessária a atuação dos fatores eIF3 e eIF4A. Outro exemplo é o eIF4F que recruta o cap-mRNA (Fig. 6); este fator é formado pela junção de três fatores distintos da família eIF4 (eIF4A, eIF4E e eIF4G) (Gingras *et al.*, 1999). Estes são apenas alguns desses fatores e não os descreveremos em maiores detalhes daqui pra frente (para revisão veja Dever, 2002; Marintchev & Wagner, 2004).

A fase seguinte, que ocorre após o recrutamento das subunidades do ribossomo, do cap-mRNA e do Met-tRNA_i, é a fase de alongamento das cadeias polipeptídicas, na qual os aminoácidos que chegam transportados por tRNA são ligados uns aos outros. Nos eucariotos, estes fatores também recebem uma denominação genérica de Fatores de Alongamento eucariótico (eEF). Estes existem em número muito inferior aos de iniciação e até hoje conhece-se apenas o eEF1 (com os subtipos eEF1A e eEF1B), eEF2 e eEF3 (Fig. 6). Destes sabe-se tão pouco quanto os primeiros, ou talvez menos, pois nos últimos anos têm-se dado extrema atenção na literatura aos fatores de iniciação em detrimento dos de alongamento, apesar da fase de alongamento ser na verdade a principal fase da síntese de proteínas e também a mais custosa em termos de energia. A fase de alongamento consome uma grande parte da energia metabólica, sendo pelo menos quatro ligações de alta energia consumidas para cada aminoácido adicionado à cadeia nascente - duas para formar o aminoacil-tRNA provenientes do ATP que é hidrolisado a AMP, e duas moléculas de GTP que são quebradas em GDP (Browne & Proud, 2002). Tentaremos neste trabalho, elucidar um pouco sobre os mecanismos envolvidos nesta fase e como ela é regulada. É conhecido que o eEF1A é o responsável pelo transporte do aminoacil-tRNA (ou aa-tRNA, que é o tRNA carreando um aminoácido) para o

sítio A do ribossomo. Este fator possui afinidade pela maioria dos aa-tRNA menos, por exemplo, pelo Met-tRNA que é carregado pelo eIF2 (Francklyn *et al.*, 2002; Marintchev & Wagner, 2004). O Met-tRNAⁱ é o único que liga-se ao ribossomo diretamente no sítio P, sendo todos os demais levados pelo eEF1A para o sítio A (Marintchev & Wagner, 2004). Este fator forma o complexo ternário eEF1A.GTP.aa-tRNA que vai ligar-se ao ribossomo se o tRNA contiver a seqüência complementar ao códon do rRNA (RNA ribossomal). Se isto ocorrer, o eEF1A hidrolisa o GTP e é liberado, pois com o GDP ligado ele tem baixa afinidade pelo tRNA (Marintchev & Wagner, 2004). A literatura recente tem mostrado que este fator de alongamento possui outras funções além das desempenhadas na síntese de proteínas. Em 1997, Stapulionis e colaboradores demonstraram que para que houvesse uma eficiente síntese de proteínas, era necessário que o citoesqueleto estivesse intacto. Desde então, tem sido observado que numerosos componentes do sistema de tradução estão associados à actina (Gross & Kinz, 2005). É estimado que aproximadamente 60% do eEF1A esteja associado com a actina do citoesqueleto (Edmonds *et al.*, 1995). Experimentos com a levedura *S. cerevisiae* mostraram que a actina não era requerida para a síntese de proteínas, mas o eEF1A era essencial para a integridade do citoesqueleto e, por conseqüência, para a manutenção da

morfologia da célula (Gross & Kinz, 2005). Um outro trabalho demonstrou que o eEF1A é capaz de interagir com as cadeias polipeptídicas nascentes recém saídas dos ribossomos, porém, não se liga às proteínas que foram corretamente dobradas, somente àquelas que são incapazes de se dobrar corretamente (Hotokezaka *et al.*, 2002). Ou seja, parece ter uma atividade semelhante à de uma chaperona. Isto parece ser verdade, já que foi demonstrado que o eEF1A interage com proteínas ubiquitinadas e proteassomos, sendo também detectado nos mesmos (Chuang *et al.*, 2005). O eEF1B tem sido descrito como um fator que é responsável pela troca do GDP pelo GTP no eEF1A recuperando a atividade deste (Browne & Proud, 2002).

O eEF3 é um fator ainda bastante desconhecido no que concerne à sua função e, até agora, foi descrito apenas em fungos e procariotos (Anand, 2003). Algumas evidências apontam para um papel no sítio E auxiliando na remoção do tRNA e facilitando a entrada do complexo eEF1A.GTP.aa-tRNA no sítio A (Anand, 2003) (Fig. 6). Já foi demonstrado que estes dois fatores são capazes de se ligar *in vitro*, embora não se saiba que conseqüências isto possa gerar no alongamento ou na função do eEF1A (Kovalchuk, 1998).

O fator de alongamento considerado mais importante é chamado eEF2 e sua função é a de uma translocase, ou seja, ele é responsável por mover o

mRNA e o peptidil-tRNA após a formação da ligação peptídica (Anand, 2003) (Fig. 6). É uma proteína monomérica de aproximadamente 100KDa e está ativa quando ligada ao GTP que é hidrolisado no processo de translocação (Browne & Proud, 2002). No entanto, diferente do eEF1A, aqui não é necessária a participação de uma GEF (Fator trocador do nucleotídeo guanina), pois o eEF2 tem afinidade muito baixa pelo GDP que é prontamente liberado, sendo substituído por um GTP (Browne & Proud, 2002). Sua região N-terminal possui um resíduo de Treonina na posição 56 (Thr 56) que, quando fosforilado, inibe a sua atividade. A primeira via de fosforilação do eEF2 foi caracterizada por Ryazanov em 1987, que demonstrou que o fator era fosforilado de maneira dependente de cálcio. No mesmo ano, Nairn e Palfrey identificaram o eEF2 como o substrato da então chamada cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina III (CaMKIII) e, por ser este o único substrato descrito desta enzima, ela ficou conhecida posteriormente como eEF2K (cinase do fator de alongamento 2) (Browne & Proud, 2002). Em seguida, foi mostrado que estímulos que elevavam os níveis de cálcio intracelular promoviam aumento na fosforilação do eEF2 (Mackie *et al.*, 1989; Hinke & Nairn, 1992).

A eEF2K é uma enzima que possui vários sítios de fosforilação que podem tanto ativá-la quando inibi-la. A primeira evidência de um mecanismo de

ativação da eEF2K adicionalmente à sua ativação por Ca^{2+} /calmodulina foi dada pela observação de que a enzima pode ser fosforilada pela PKA (Proteína cinase dependente de AMPc) na Ser 500 (Mitsui *et al.*, 1993; Redpath & Proud, 1993). Percebeu-se que esta fosforilação tornava a eEF2K parcialmente independente de cálcio, isto é, eram necessários apenas baixos níveis deste íon para que a enzima fosse ativada (Redpath & Proud, 1993; Diggle *et al.*, 2001). Portanto, a ativação de receptores β -adrenérgicos ou qualquer via que aumente AMPc (tratamento com estimuladores da adenilil ciclase ou análogos de AMPc) podem levar a um aumento na atividade da eEF2K e diminuição da síntese de proteínas (Diggle *et al.*, 1998; Hovland *et al.*, 1999; McLeod *et al.*, 2001).

Em contrapartida, os demais sítios de fosforilação presentes na eEF2K promovem inibição de sua atividade. Hoje conhecemos três serinas que são fosforiladas por diferentes vias de sinalização: Ser 359, Ser 366 e Ser 377. Mas que tipo de estímulo levaria à fosforilação destes resíduos? Redpath e colaboradores em 1996 superexpressaram receptores de insulina em células CHO (células de ovário de hamster) e verificaram que a insulina reduzia fortemente os níveis de fosforilação do eEF2, efeito que era bloqueado por rapamicina. Isto indica a participação da enzima mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) (para revisão veja Proud, 2002). No entanto, a participação da

mTOR ocorre de forma indireta, pois esta fosforila e ativa uma enzima chamada p70S6K (ou S6K1) após estímulos com insulina e a S6K1 inativa a eEF2K na Ser 366, o que ativaria a fase de alongamento (Wang, *et al.*, 2001). Esta serina é também fosforilada pela proteína p90^{RSK1}, uma cinase que participa da via das MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) estando logo abaixo da ERK nesta via que é ativada por uma enorme gama de estímulos, tais como: mitógenos, fatores de crescimento, forbol éster, e alguns agonistas de receptores acoplados à proteína G (Browne & Proud, 2002). Muitas referências da literatura mostram que a ativação da via das MAPKs e, por consequência, a ativação da ERK, promove uma diminuição da fosforilação do eEF2 e induz aumento na síntese de proteínas. Já a Ser 359 parece estar relacionada a estímulos de estresse, pois é substrato de proteínas ativadas por estresse (SAPKs - exemplo: SAPK4/p38 δ , SAPK2/p38 α/β), mas não por qualquer tipo de estresse. Trabalhos recentes mostraram que o estresse oxidativo aumenta a fosforilação do eEF2 e o estresse osmótico diminui (Patel *et al.*, 2002). Mais estudos são necessários para elucidar estes mecanismos.

Como mencionado acima, a síntese de proteínas consome grandes quantidades de energia e pode ser inibida quando os níveis energéticos da célula estão baixos. Uma das formas de isto acontecer é através da AMPK

(cinase dependente de AMP), um importante sensor do status de energia celular (Hardie, *et al.*, 1998). Os níveis de AMP estão altos na célula quando muito ATP está sendo consumido e isto ativa a AMPK que, por sua vez, inativa proteínas relacionadas com o consumo de energia e ativa outras que podem aumentar a produção de energia na célula (Browne & Proud, 2002). Contudo, podemos nos perguntar, qual o motivo da existência de tantas vias de sinalização sobre um fator de alongamento se já existem tantas que regulam os fatores de iniciação? A resposta é bem simples e a AMPK tem importante papel neste processo. Inibindo a síntese na fase de alongamento economiza-se mais energia, pois toda a maquinaria permanece montada, como os polirribossomos, além de os tRNAs já terem sido transportados e estarem acoplados aos ribossomos, entre outras coisas. Deste modo, a síntese de proteínas pode recomeçar rapidamente assim que o metabolismo energético for recuperado (Browne & Proud, 2002).

Não se sabe ao certo como a AMPK aumenta a fosforilação do eEF2, pois ele não é capaz de fosforilar a Thr 56. Então, ou ela é capaz de modular a eEF2K ou atua sobre a fosfatase do fator de alongamento (Browne & Proud, 2002). Das fosfatases conhecidas, a única que foi capaz de defosforilar o eEF2 foi a PP2A (proteína fosfatase 2A). Isto foi primeiramente verificado

por Gschwendt e colaboradores em 1989 através da utilização de ácido ocadaico em concentrações seletivas para PP2A. Em estudos da cinética da eEF2K também se verificou que a PP2A era a única a defosforilar o fator de alongamento (Riis & Nygard, 1997). Posteriormente sugeriu-se que a PP2B (também conhecida como calcineurina) teria alguma participação na regulação do eEF2 ou da sua cinase, pois ela também é dependente de Ca^{2+} /calmodulina como a eEF2K. Estudos recentes em ácidos pancreáticos mostraram que a administração de colecistocinina diminuía a fosforilação do eEF2 e que este efeito era revertido quando se adicionava um inibidor da calcineurina embora a reversão não tenha sido completa (Sans & Williams, 2004). Como é improvável que a calcineurina tenha qualquer efeito sobre a eEF2K, duas hipóteses poderiam ser então levantadas: 1) a calcineurina tem o eEF2 como substrato; 2) De alguma forma a calcineurina é requerida para a ativação da PP2A. A primeira hipótese já havia sido descartada por Buss e colaboradores em 1994 em estudos no rim, e então a possibilidade de alguma interação entre a PP2A e a calcineurina é, por enquanto, a hipótese a ser considerada.

2. Objetivos.

- Verificar se o receptor NMDA promove inibição de síntese de proteínas em culturas de retina de pinto.
- Verificar se aumento de óxido nítrico decorrente da maior disponibilidade de L-Arginina intracelular está regulando, de alguma forma, a síntese proteica.
- Verificar qual via de inibição de síntese proteica está envolvida com o receptor NMDA.
- Verificar que vias de sinalização modulam a atividade do fator de alongamento 2.

3. Métodos.

3.1 Culturas.

Retinas de embrião de pinto da raça White Leghorn de 8 dias de desenvolvimento foram dissecadas em solução salina livre de cálcio e magnésio (CMF) e suas células dissociadas quimicamente em tripsina 2% a 37°C. Após 20 min, recolheu-se o sobrenadante e dissociou-se o tecido mecanicamente com pipeta Pasteur em Meio Essencial Mínimo (MEM) (GIBCO) suplementado com 3% de soro fetal bovino, além de 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2mM glutamina. As células foram então acondicionadas em placas de 12 poços, em uma densidade de 8×10^6 células/poço (culturas densas) contendo neurônios e células gliais e cultivadas por 6 dias. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% CO₂/95% ar e o meio trocado a cada 48 horas.

3.2 Incorporação de [³H]L-arginina/[³⁵S]Metionina.

Para estudos de captação, as células foram lavadas três vezes em solução de Hank's. Após a terceira lavagem, as células foram incubadas em salina (Hank's) ou com antagonistas por 10 minutos. Após este tempo as células foram incubadas em solução de Hank's contendo [³H]L-arginina (5 μ Ci/mL) (Amersham - Life Science) ou [³⁵S]-metionina (0,5 μ Ci/mL) a 37°C. Após a incubação as células foram lavadas, lisadas com TCA 5% e a radioatividade intracelular determinada por cintilação líquida. Todos os outros experimentos de captação foram realizados em 15 minutos na ausência ou na presença das seguintes condições: NMDA (1mM), NMDA+MK-801 (1mM+100 μ M), L-NARG (L-NA) c/ ou s/ Mg²⁺ (500 μ M), L-NA+NMDA (500 μ M+1mM), L-NA+NMDA+MK-801 (500 μ M+1mM+100 μ M) todos da Sigma Chem. Co. Todas as situações onde NMDA ou MK-801 estiveram presentes, a solução salina tinha baixas concentrações de magnésio.

3.3 Incorporação de [³H]L-arginina/[³⁵S]Metionina - Curva de Tempo.

Nos ensaios temporais, após a lavagem com salina, todos os poços foram incubados em solução de Hank's contendo [³H]L-arginina (5 μ Ci/mL) ou [³⁵S]-metionina (0,5 μ Ci/mL) na ausência (controle) ou presença de NMDA. Os tempos de incubação foram: 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. Após a incubação as células foram lavadas e lisadas com TCA 5%.

3.4 Medida de incorporação de [³H]L-arginina/[³⁵S]Metionina nas proteínas intracelulares.

Após os ensaios de captação, o lisado foi raspado das placas. O material foi centrifugado a 15000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado para medida dos derivados de [³H]L-arginina livre, o precipitado lavado em TCA e ressuspenso em 200 μ L de NaOH 1N. Após a solubilização completa das proteínas, o volume inteiro é adicionado em filtro para cintilação que era seco à temperatura ambiente durante a noite. Ao mesmo tempo, o "quenching" da NaOH foi determinado separadamente para correção. O cálculo foi realizado

como uma relação percentual da radioatividade incorporada à proteína pela radioatividade intracelular.

Alternativamente, foi adicionado tampão de lise (SDS 0,6%, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Tris 50mM) e o material raspado da placa e acondicionado em tubos no gelo contendo TCA 20% por 10 minutos. Todo o conteúdo foi filtrado a vácuo e a radioatividade determinada por cintilação líquida.

3.5 Dosagem de Proteína, Eletroforese e Análise de Western Blot.

A dosagem da proteína das culturas recolhidas em 100 μ L de tampão de amostra [SDS (0,3g), glicerol (1mL), 2-mercaptoetanol (0,1mL), tris (0,5M, pH 6,8-1,25mL) e H₂O (10mL)] foi realizada de acordo com o método de Bradford. Foram colocados 2 μ L das amostras em tubos de vidros e em seguida foram acrescentados 3mL de reagente de Bradford. Para realização da curva padrão, foram adicionados nos tubos de vidro 0 (zero), 2 (dois), 4 (quatro), 8 (oito) e 10 (dez) μ g de BSA (1mg/mL). Em seguida, foram adicionados 2 μ L do tampão de amostra SDS (usado nos experimentos) e ainda 3mL de reagente de Bradford. Posteriormente, as misturas foram agitadas em vórtex e a leitura da

absorbância realizada em filtro de 595nm. O espectrofotômetro foi zerado com água. Em seguida, o branco (apenas o reagente de Bradford) foi lido.

3.5.1 Eletroforese e western blot

Para as análises de western blot realizamos o mesmo protocolo de tempo, lavagens e período de incubação dos estudos de captação, porém, sem a adição dos aminoácidos marcados. Para a lise das células uma solução tampão SDS-PAGE foi adicionada a cada poço (100 μ L). As células foram lisadas por esta solução, raspadas da placa, fervidas por 5 minutos a 100°C e estocadas a -20°C, a fim de solubilizar e desnaturar todas as proteínas celulares.

Posteriormente, foi aplicado no topo do gel de poliacrilamida-SDS a 8% volume de amostra equivalente a 20 μ g de proteína. O procedimento para a eletroforese em gel de poliacrilamida foi baseado na técnica descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado para um volume de 9 mL e uma concentração final de acrilamida de 8 g%. O gel de concentração foi preparado para um volume de 3 mL e uma concentração final de acrilamida de 4,5 g%. O tampão de corrida utilizado tinha em sua composição Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1 g%). Durante a corrida a amperagem foi mantida

constante em 12 mA por 2,5 horas. O gel foi retirado da placa onde ocorreu a polimerização e, em seguida, foi posto em contato com uma membrana de PVDF para onde as proteínas eram transferidas. A transferência das proteínas para as membranas de PVDF foi baseada na técnica descrita por Towbin *et al.* (1979). Imediatamente após a corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência junto com a membrana por 30 minutos (Hybond-p, Amersham), depois desta ter sido hidratada por 1 minuto em metanol a 100%. Cinco folhas de papel de filtro, nas dimensões do gel a ser transferido, foram também incubadas em tampão de transferência (solução contendo Tris, 25 mM; glicina, 192 mM; metanol, 10% (V/V)). Em seguida, o sistema de transferência foi montado de acordo com as instruções do fabricante. Sobre a grade do aparelho foram colocados, nesta ordem: 2 esponjas, 1 folha de papel de filtro, gel, membrana de PVDF, 1 folha de papel de filtro, 1 esponja, 2 folhas de papel de filtro, e 1 esponja. A transferência foi realizada a 4°C durante 1 hora em voltagem constante de 40 V. Após a transferência, as membranas foram colocadas em solução corante de 0,2g% Rouge Ponceau em 3%TCA, lavadas em água e visualizadas. Após selecionarmos a região a ser utilizada, a membrana foi colocada em tampão de transferência para descorar, lavadas novamente em

água e mantidas em TBS (Tris, 50mM; NaCl, 150mM) até a incubação com anticorpos específicos.

A membrana de PVDF foi incubada inicialmente em solução tampão TBS + 0,1% Tween 20 (TBS-T) contendo leite em pó desnatado, 5 g%, durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação suave. Com este procedimento era prevenida a ligação dos anticorpos a sítios não específicos na membrana de PVDF. Após este período, a membrana foi lavada uma vez por cinco minutos com tampão TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada por pelo menos 12 horas a 4°C com o anticorpo primário anti P-eEF2 (1:1500) (Cell Signaling) ou anti β -actina (1:200) (Santa Cruz). Todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão TBS-T contendo leite em pó desnatado, 5g%.

Após a incubação com o anticorpo primário a membrana foi lavada em solução TBS-T três vezes por 10 minutos e então incubada com o anticorpo secundário anti-coelho (1:3000) conjugados à peroxidase, em solução TBS-T contendo leite em pó desnatado 5g% por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas sofriram 3 lavagens com TBS-T por 10 minutos e por último uma lavagem com TBS por mais 10 minutos.

A imunodeteção foi promovida pela reação quimioluminescente do sistema ECL para western blotting (Amersham-Pharmacia). Após a incubação

da membrana com uma mistura de soluções de detecção por 2 minutos à temperatura ambiente, a membrana era recolhida, envolvida em filme de PVC e exposta imediatamente a filme Kodak X-Omat K ou Hyperfilm (Amersham) por intervalos de tempo de 2 e 5 minutos, que era então revelado.

As imagens foram escaneadas e quantificadas utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation).

3.6 Análise Estatística.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism III, no qual utilizamos os seguintes testes: análise de variância (ANOVA), teste t de Student e teste de comparação múltipla de Bonferroni.

4. Resultados.

4.1 Inibição da Síntese de Proteínas por Estimulação de Receptores do Tipo NMDA.

Marin e colaboradores (1997) mostraram que a ativação de receptores ionotrópicos do tipo NMDA em neurônios corticais promovia uma inibição global, mas não total, na síntese de proteínas e que isto era decorrente da fosforilação do eEF2. Scheetz e colaboradores (1997; 2000) demonstraram efeito similar em sinaptossomos de neurônios da mesma região, indicando que este efeito é local. Nosso laboratório descreveu há alguns anos um sistema de alta afinidade para captação de L-arginina nas células de retina em cultura (Cossenza *et al.*, 2000). Sendo a L-arginina o precursor do óxido nítrico e sendo o NMDA um importante receptor durante o desenvolvimento embrionário, verificamos a possibilidade do NMDAR estar também inibindo a síntese proteica em nossas células e se este poderia ser um mecanismo para maior produção de óxido nítrico.

Para isto, utilizamos culturas mistas (neurônios + glia) obtidas de embriões de galinha de oito dias e cultivadas por seis dias (E8C6), pois uma

cultura desta idade tem as características da retina de um embrião de quatorze dias, ou seja, um período em que não há mais ocorrência de proliferação e morte celular programada. Primeiramente, para analisar o efeito da ativação do receptor NMDA sobre a síntese proteica, fizemos uma curva de concentração de NMDA. As concentrações usadas foram: 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M e 1mM. Observamos um efeito significativo já na concentração de 50 μ M, mas o efeito máximo obtido se deu quando utilizamos 1mM de NMDA (Fig. 7).

A partir de então, passamos a utilizar a concentração que promovia o efeito máximo na inibição da incorporação de aminoácidos. Verificamos então se a incorporação de [³⁵S]-metionina ([³⁵S]-Met) era modificada também na presença de NMDA (1mM). Utilizamos metionina por ser este o aminoácido de iniciação de todas as proteínas, constituindo um ótimo marcador para mensuração da síntese de proteínas. Podemos observar que a incorporação da [³⁵S]-Met era reduzida entre 35-45% em relação ao controle e esta diminuição ocorria desde tempos muito iniciais (5 minutos) (Fig. 8A). Como metade do efeito máximo era obtido em 15 minutos, passamos a utilizar este tempo em nossos experimentos subsequentes. A simples retirada do Mg²⁺ do meio extracelular foi capaz de reduzir a incorporação da metionina em 35,4 \pm 8,1% e

atribuímos este efeito ao glutamato endógeno, principalmente porque a administração de MK-801 (100 μ M) - um antagonista específico do NMDAR - foi suficiente para bloquear tanto o efeito da retirada do Mg²⁺ quanto do NMDA. Isto também nos mostra que o efeito observado por nós é promovido pelo receptor NMDA, pois se houvesse a participação de receptores AMPA ou kainato, a inibição na incorporação não seria totalmente bloqueada pelo MK-801 (Fig. 8B).

Uma vez que a incorporação da metionina nas proteínas foi comprometida após o tratamento com NMDA, a incorporação de L-Arg provavelmente estaria sofrendo o mesmo comprometimento. De fato, a incorporação de arginina marcada com trítio ([³H]L-Arg) foi diminuída em pelo menos 50% em presença de 1mM de NMDA e este efeito também ocorria em tempos curtos como 2 minutos (Fig. 9A). Da mesma forma como ocorreu com a metionina, MK-801 bloqueou totalmente o efeito da retirada do magnésio (que reduziu a incorporação em 78,12 \pm 10,38% do controle) e do NMDA (Fig. 9B).

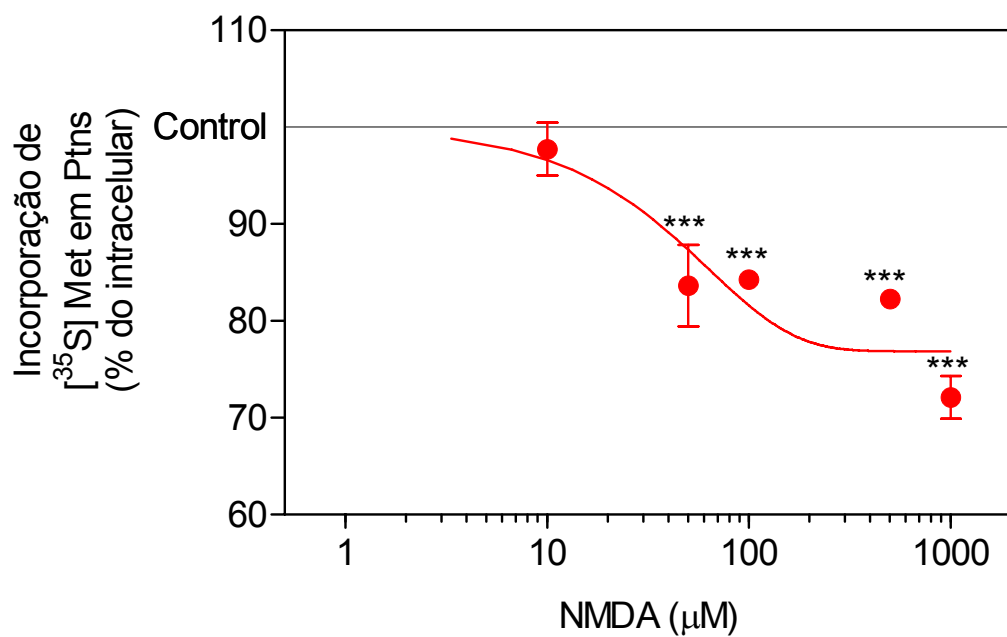


Figura 7: Efeito de concentrações crescentes de NMDA na síntese de proteínas nas culturas de retina de embrião de galinha durante 15 minutos. O IC50 foi de aproximadamente 50µM e o efeito máximo em 1mM. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de três experimentos diferentes. Os asteriscos mostram significância estatística (**p<0.01; ***p<0.001).

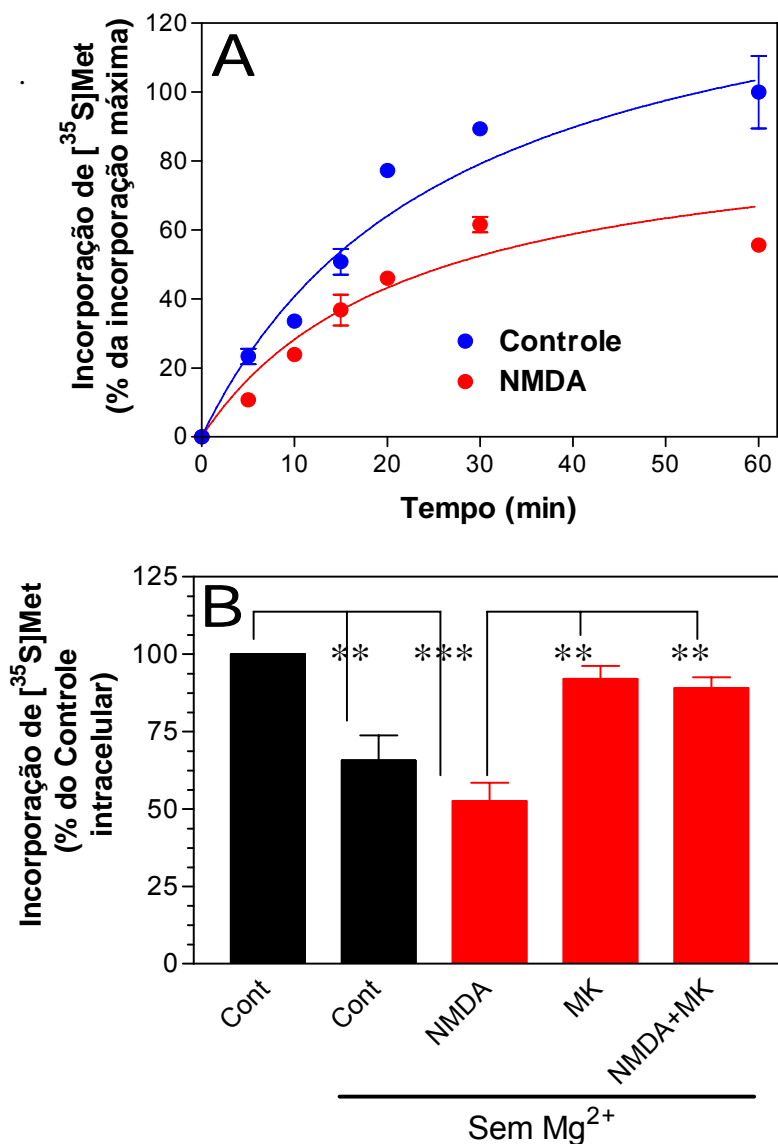


Figura 8: Efeito do NMDA na incorporação de metionina. As células foram submetidas à incorporação de [³⁵S]Met com posterior precipitação das proteínas. O cálculo desta incorporação foi realizado como uma relação percentual da radioatividade incorporada às proteínas pela radioatividade intracelular. (A) Incorporação em função do tempo com ou sem estimulação por NMDA (1mM). (B) Relação da incorporação de [³⁵S]Met com a retirada do íon Mg²⁺, NMDA e a adição do antagonista MK-801 (100µM) em 15 minutos. Os resultados foram representados como média de três experimentos ± E.P.M. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste de Student para (A) mostrando todos os pontos vermelhos significativamente diferentes dos azuis (p<0,05) e ANOVA seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni para (B) (**p<0,01; ***p<0,001).

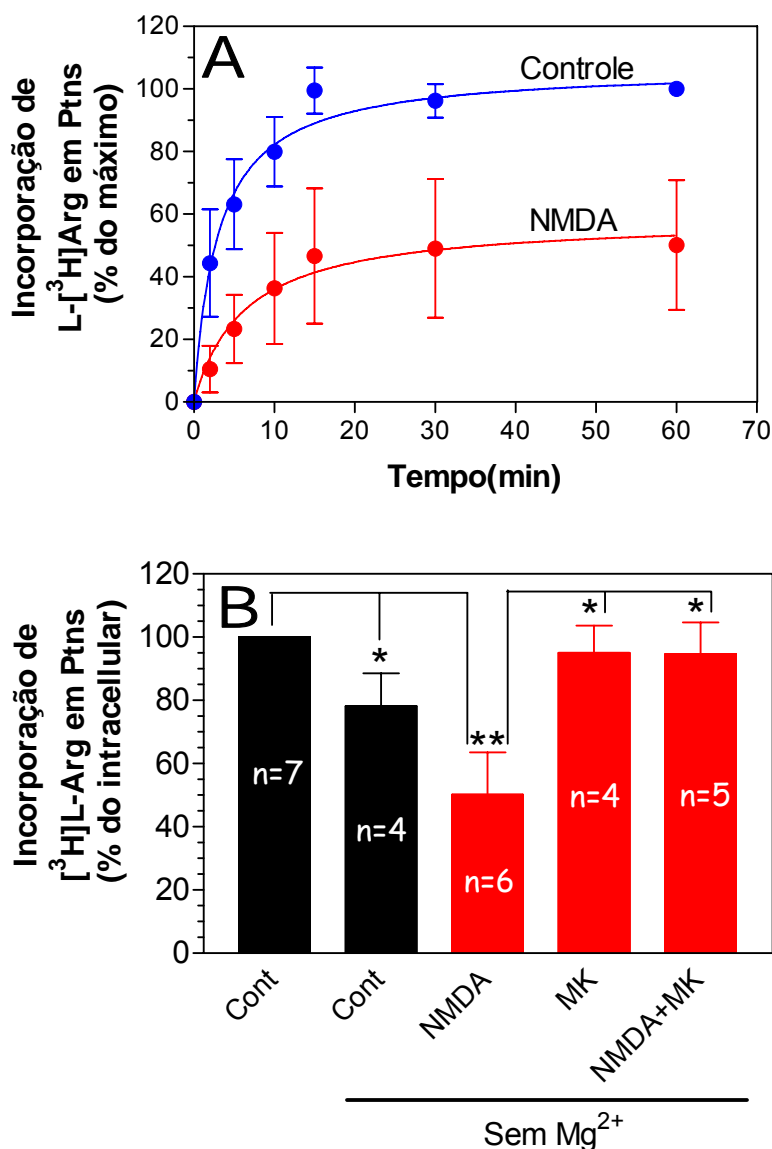


Figura 9: Efeito do NMDA na incorporação de L-Arginina. As células foram submetidas à incorporação de L-[³H]Arg com posterior precipitação das proteínas. O cálculo da incorporação foi realizado como uma relação percentual da radioatividade incorporada às proteínas pela radioatividade intracelular. (A) Incorporação em função do tempo com ou sem estimulação por NMDA (1mM). (B) Relação da incorporação de L-[³H]Arg com a retirada do íon Mg²⁺, NMDA e a adição do antagonista MK-801 (100µM) em 15 minutos. Os resultados foram representados como média de três ou mais experimentos ± E.P.M. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste de Student para (A) mostrando que todos os pontos do NMDA foram significativamente diferentes do controle, p<0,05, e para (B) ANOVA seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni (*p<0,05; **p<0,01).

4.2 Participação do Óxido Nítrico na Síntese de Proteínas.

Dados do laboratório mostraram que o tratamento de nossas culturas com NMDA (1mM) gera um aumento nos níveis de L-Arginina, L-citrulina e NO no interior da célula (Cossenza *et al.*, 2006). Como mencionado anteriormente, a L-citrulina é proveniente da conversão de L-Arginina e que, em neurônios, esta é a única via para sua produção. Ou seja, se a administração de NMDA aumenta a concentração de L-citrulina, é muito provável que isto ocorra devido à alta concentração de L-Arginina na célula. Podemos concluir com isso que o tratamento com NMDA promove um aumento nos níveis intracelulares de L-Arginina e, dessa forma, este aminoácido torna-se disponível para ser metabolizado em outras vias, como a da produção de óxido nítrico. Além do aumento da produção de NO e L-citrulina induzida pelo aumento da concentração do substrato L-Arginina, a NOS também é estimulada pela ativação do receptor NMDA que permite um grande influxo de cálcio na célula favorecendo a ativação da NOS, que é uma enzima dependente de cálcio/calmodulina.

Sendo o NO extremamente reativo e capaz de alterar a funcionalidade de proteínas, poderia ele de forma direta ou indireta modular a síntese

proteica? Para tentar responder esta questão, tratamos nossas culturas com L-Nitro-Arginina (L-NA) (500 μ M), um inibidor da NOS. Embora não seja um efeito estatisticamente significativo, percebe-se uma tendência de aumento na incorporação de aminoácidos quando tratamos as culturas com L-NA (Fig. 10). Isto fica mais evidente quando nos detemos à condição L-NA na ausência de magnésio. Como observado nos resultados anteriores, a simples retirada do magnésio promovia forte redução na incorporação dos aminoácidos nas proteínas e isto foi bloqueado pela adição de L-NA (Fig. 8 e 9). Além disso, podemos observar que o efeito do NMDA torna-se quase nulo na presença de L-NA (Fig. 10). Estes resultados não nos permitem dizer que o NO inibe a síntese de proteínas, mas mostra-nos pelo menos que sua ausência aumenta a incorporação de aminoácidos ou simplesmente não interfere na síntese de proteínas. Outra abordagem foi feita utilizando o doador de óxido nítrico SNAP (100 μ M). Já que a inibição da NOS parece promover um aumento na incorporação de aminoácidos às proteínas (Fig. 10), será que a administração de NO poderia promover o efeito inverso? Realizamos apenas um experimento e aparentemente não houve efeito (dados não mostrados). Porém, mais experimentos são necessários. O SNAP é conhecido por ser um doador lento de óxido nítrico e o tempo utilizado por nós talvez seja muito curto para

observarmos algum efeito. Nosso laboratório obteve resultados na sobrevivência celular de neurônios utilizando SNAP após 12 horas com a droga em cultura (Mejía-García & Paes-de-Carvalho, submetido). Então, exposições mais longas podem evidenciar algum efeito não observado em 15 minutos.

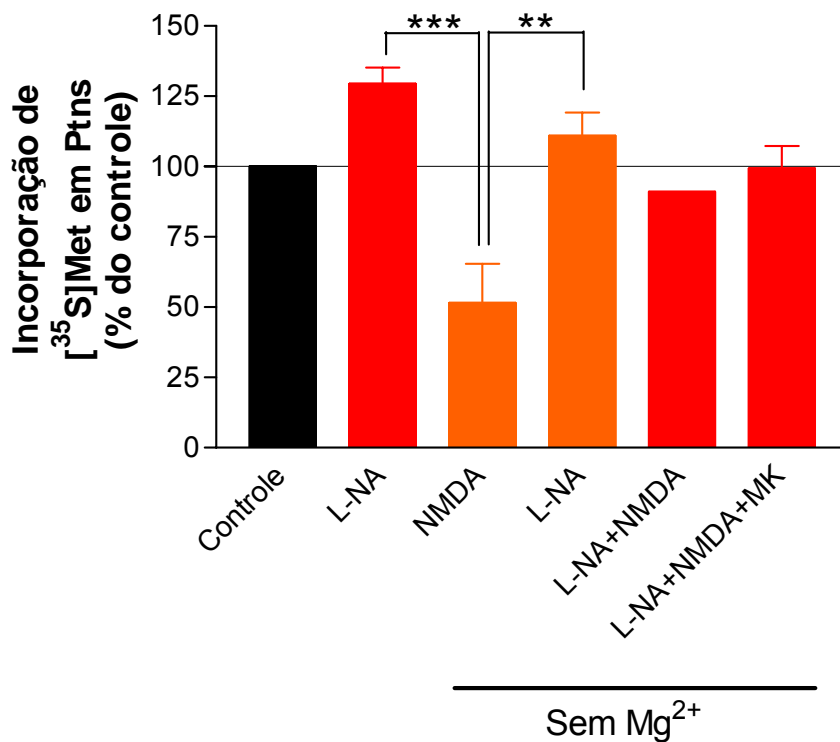


Figura 10: Efeito do L-NA sobre a inibição da incorporação de $[^{35}\text{S}]\text{Met}$. As células foram submetidas à incorporação de $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ com posterior precipitação das proteínas. O cálculo desta incorporação foi realizado como uma relação percentual da radioatividade incorporada às proteínas pela radioatividade intracelular. Relação da incorporação de $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ com NMDA, L-NA ($500\mu\text{M}$) com ou sem Mg^{2+} e a adição do antagonista MK-801 em 15 minutos. Os resultados foram representados como média de três experimentos \pm E.P.M. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste ANOVA seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni ($***p < 0,001$).

4.3 Efeito da Retirada do Mg^{2+} e do NMDA na Fosforilação do eEF2.

Os resultados até aqui apresentados mostram que a ativação do receptor NMDA em nosso modelo promove uma inibição na síntese de proteínas, mas não indica o seu mecanismo. A literatura sugeria que o efeito ocorreria através do fator de alongamento 2 (Marin *et al.*, 1997; Scheetz *et al.*, 1997; 2000), embora existam outras evidências mostrando que a ativação do NMDAR influencia também os fatores de iniciação (Banko *et al.*, 2004). Nosso próximo passo, portanto, foi verificar se o eEF2 estaria participando desta via de inibição da síntese. Analisamos primeiramente os níveis de fosforilação do fator nas seguintes situações: retirada do Mg^{2+} , NMDA (1mM), MK-801 (100 μ M) e NMDA+MK. O primeiro ponto que nos chamou a atenção foi o fato de que a retirada do magnésio reduziu a fosforilação do eEF2 diferente da condição com NMDA (Fig. 11). Como mostrado nas figuras 8 e 9, a retirada do magnésio promovia um efeito muito similar ao do NMDA e atribuímos isso ao glutamato liberado pelas próprias células da cultura. Então, sendo comprovada a participação do fator de alongamento no efeito do NMDA, esperávamos que tanto a retirada do Mg^{2+} quanto o tratamento com NMDA promovesse um

aumento nos níveis de P-eEF2, mas ocorreu justamente o inverso. Provavelmente, o magnésio está exercendo algum efeito paralelo a este no fator de alongamento.

Não observamos uma diferença significativa entre o controle com magnésio e a situação com NMDA, embora isso possa estar relacionado à alta densidade celular e confluência de nossas culturas. Os nossos resultados mostram claramente que o NMDA aumenta a fosforilação do fator em relação ao seu controle direto que é a situação sem magnésio. Isto comprova que o NMDA realmente está alterando os níveis de fosforilação do eEF2 e, portanto, inibindo a síntese de proteínas através desta via (Fig. 11).

Realizamos também dois experimentos utilizando antagonistas de outras cinases que poderiam estar envolvidas neste processo desencadeado pelo NMDA pelo fato de já terem sido descritas modulando a síntese de proteínas ou porque sejam cinases ativadas pelo influxo de cálcio através do receptor NMDA. Nestes experimentos utilizamos antagonistas para PI3K (wortmanina - 50nM) e para CAMKII (KN93 - 10 μ M). Os resultados são ainda muito preliminares, mas parece que estas enzimas não participam deste processo em nosso sistema, pelo menos não em tempos curtos como os utilizados em nossos experimentos (Dados não mostrados).

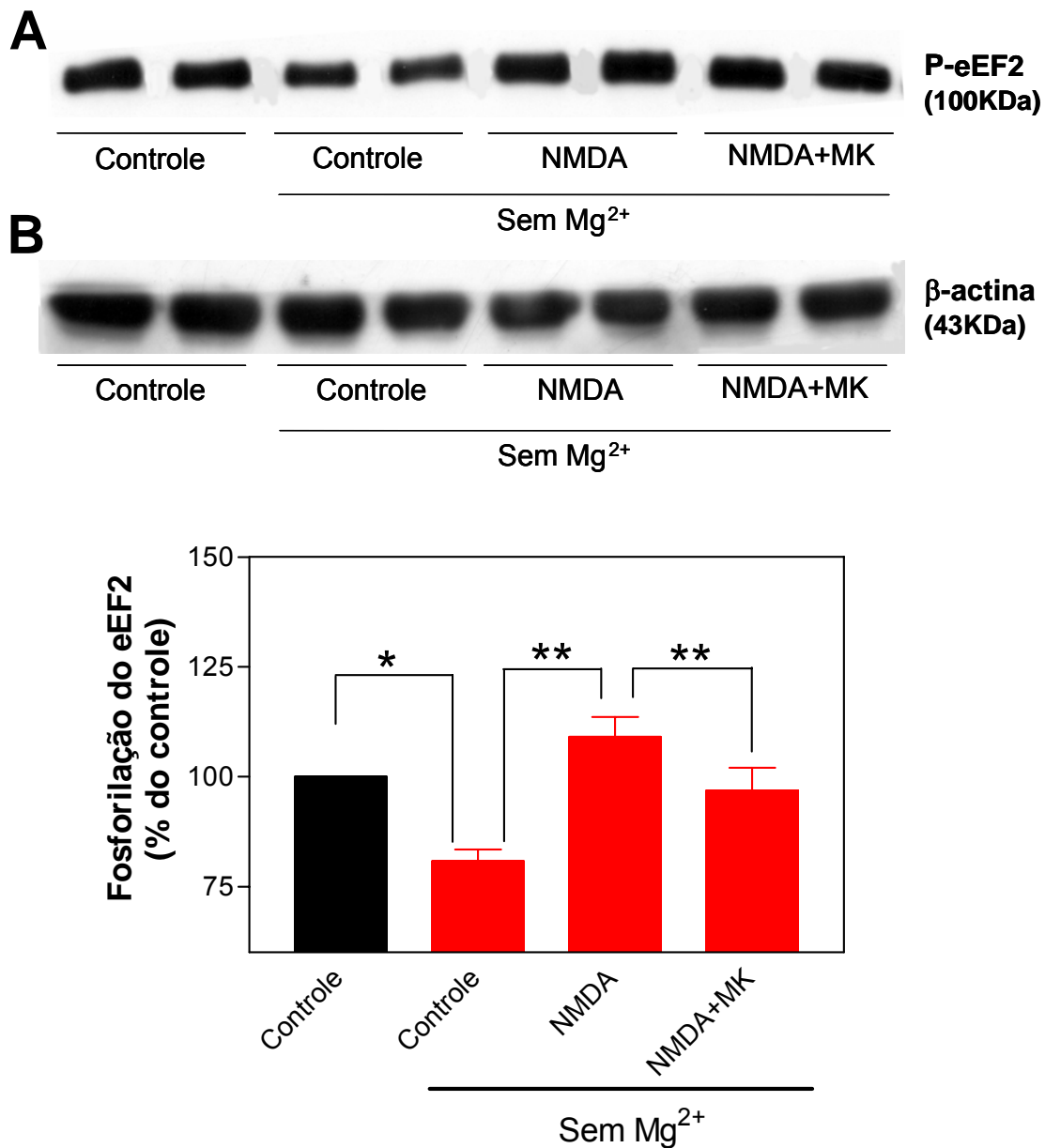


Figura 11: Efeito do NMDA na fosforilação do eEF2. Culturas foram tratadas na ausência ou presença de MK-801 por 10 minutos e, posteriormente com NMDA por 15 minutos antes da extração, eletroforese e western blot. (A) Blot representativo para P-eEF2 e controle com β -actina. (B) Análise quantitativa dos resultados. Os dados foram normalizados em porcento do controle e são a média \pm E.P.M. de cinco experimentos diferentes. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste ANOVA seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.4 Participação da ERK na fosforilação do eEF2.

Alguns trabalhos mostram a participação da via das MAPKs na síntese de proteínas e não poderia ser diferente já que esta é uma via ativada por fatores mitogênicos. As MAPKs atuam tanto sobre fatores de iniciação como sobre os de alongamento. Entretanto, os trabalhos que descreviam a regulação do eEF2 pelas MAPKs mostravam que a inibição da ERK aumentava a fosforilação deste fator e diminuía a síntese de proteínas. Então nos perguntamos se um tratamento concomitante com NMDA e um inibidor da via das MAPKs iria aumentar os níveis de fosforilação do eEF2. Utilizamos um inibidor (PD98059 - 25 μ M) da proteína MEK que é a cinase que classicamente ativa a ERK em ensaios de incorporação de aminoácidos marcados. Observamos que tanto o tratamento com NMDA quanto com PD diminuíram a incorporação de metionina e a administração simultânea não apresenta efeito aditivo sugerindo que o NMDA isoladamente era capaz de promover o efeito máximo (Fig. 12).

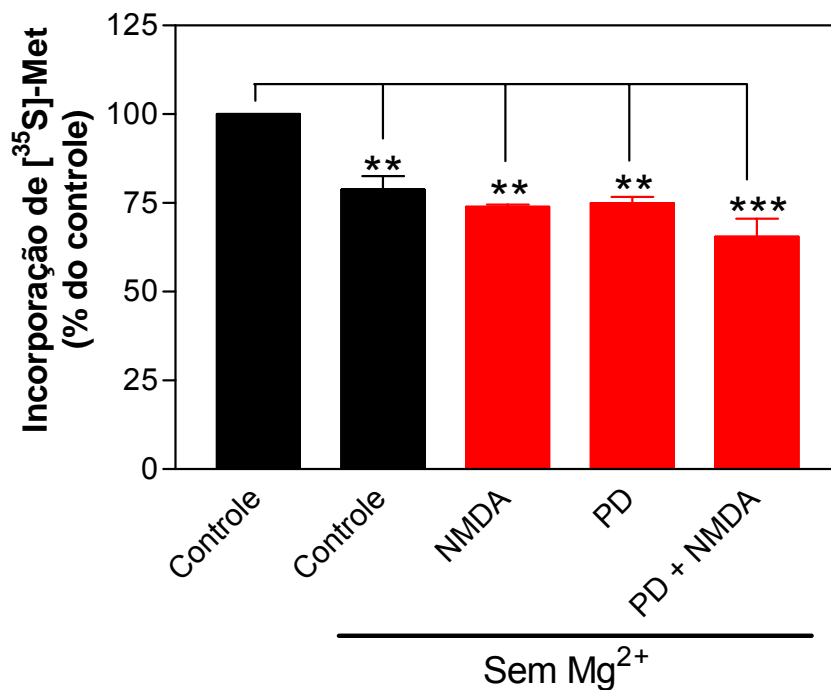


Figura 12: Medida Efeito da inibição da via das MAPKs na incorporação de metionina. As células foram submetidas à captação de [³⁵S]Met com posterior precipitação das proteínas. O cálculo desta incorporação foi realizado como uma relação percentual da radioatividade incorporada às proteínas pela radioatividade intracelular. Relação da incorporação de [³⁵S]Met com NMDA, PD98059 (25μM) com ou sem Mg²⁺ por 15 minutos. Os resultados foram representados como média de três experimentos ± E.P.M. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste ANOVA seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni (**p<0,01; ***p<0,001).

Até então, nossos resultados confirmavam os dados da literatura. Partimos então para a análise por western blot, pois este efeito do PD poderia se dar sobre fatores de iniciação. A literatura descreve que a ERK ativa uma proteína chamada p90^{RSK} e esta fosforila a eEF2K na Ser 366 inibindo-a (Browne & Proud, 2002). Isto torna o fator de alongamento menos fosforilado e mais ativo. Os mesmo trabalhos demonstram que a adição de PD (25µM) inibe a via das MAPKs e, portanto, aumenta a fosforilação do fator. Surpreendentemente, o tratamento com PD reduziu fortemente a fosforilação do eEF2 contrariando a literatura. Além disso, o tratamento com NMDA + PD gerava uma fosforilação parcial (Fig. 13).

Porém, isto trouxe outro resultado controverso, pois os dados de incorporação usando o PD98059 mostram menor incorporação da metionina, ou seja, inibição da síntese proteica (Fig. 12). Parecia ainda, não interferir no efeito desempenhado pelo NMDA sugerindo que poderiam fazer parte de uma mesma via. Entretanto, os dados de western blot deixam claro que o mesmo tratamento reduz a fosforilação do eEF2 a níveis muito abaixo dos níveis controle e é capaz de reverter parcialmente o efeito do NMDA (Fig. 13).

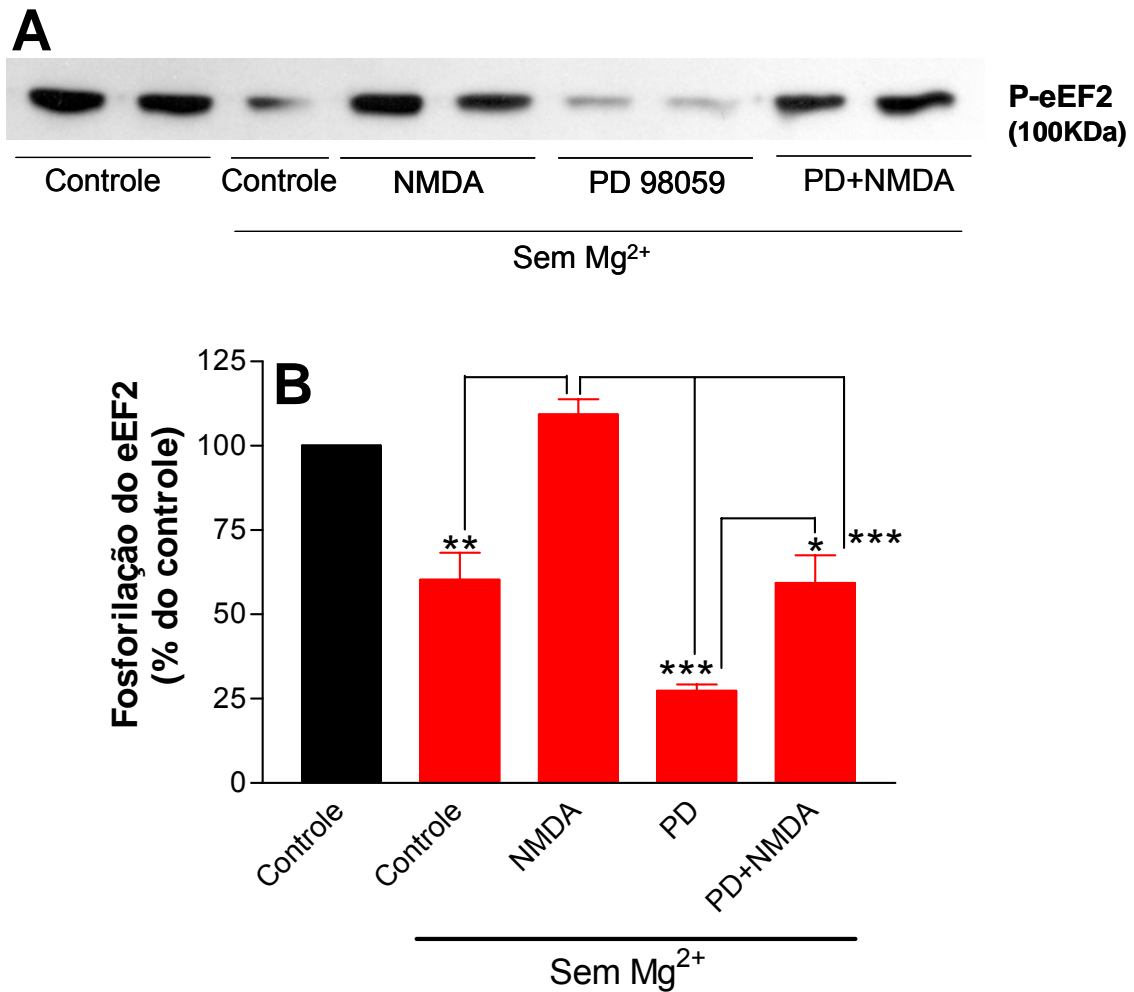


Figura 13: Efeito do NMDA e do PD98059 na fosforilação do eEF2. Culturas foram mantidas na ausência ou presença de Mg²⁺ por 10 minutos e, posteriormente, com NMDA e/ou PD98059 (25µM) por 15 minutos antes da extração, eletroforese e western blot. (A) Blot representativo para P-eEF2. (B) Análise quantitativa dos resultados. Os dados foram normalizados em por cento do controle e são a média ± E.P.M. de três experimentos diferentes. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste ANOVA seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5. Discussão.

No fim do século dezenove tinha-se a visão de que axônios e dendritos originavam-se do corpo celular e dependiam deste para sobreviverem. Isto levou Ramon y Cajal a concluir que o corpo celular era o “centro trófico do neurônio”. Evidências posteriores reforçaram esta idéia, pois revelaram a presença de uma maquinaria para síntese de macromoléculas e processamento pós-traducional nos corpos celulares dos neurônios, além de um mecanismo seletivo de transporte para os dendritos e axônios, ou seja, tudo era proveniente do corpo celular. Mas na segunda metade do século vinte, esta visão começou a mudar. A microscopia eletrônica permitiu que passássemos a observar as células em maiores detalhes e, em 1965, Bodian detectou polirribossomos e mRNAs em dendritos proximais. A partir da década de 80 estas pesquisas se intensificaram mais e uma série de mRNAs foram identificados na árvore dendrítica dos neurônios (Tiedge & Brosius, 1996; Gardiol *et.al.*, 1999). Iniciava-se então, uma nova era de concepções acerca da síntese de proteínas, na qual a idéia de compartimentalização tornou-se o elemento chave para o entendimento de uma série de fenômenos até então sem explicação.

A fase de desenvolvimento embrionário reúne em uma curta janela temporal uma enorme gama de fenômenos e sinalizações que são responsáveis por formar estruturas e órgãos de alta complexidade. O homem tenta entender como todas estas reações ocorrem e são reguladas de forma a resolver problemas que o afligem. Acredita-se que a resposta para a cura de muitas doenças está na fase das primeiras divisões celulares. No caso do sistema nervoso existem fenômenos que acontecem abundantemente na fase embrionária e praticamente desaparecem na fase adulta. Modelos embrionários têm sido exaustivamente estudados com o intuito de melhor compreendermos como funciona o nosso organismo.

É conhecido que a manutenção das mudanças sinápticas de longa duração, como a LTP, requer síntese de proteínas (Stanton & Sarvey, 1984; Montarolo *et al.*, 1986; Frey *et al.*, 1988). De acordo com a visão clássica, sinapses ativadas enviam sinais para o corpo celular que resulta em aumento da tradução de certas proteínas que são então enviadas para estas sinapses ativadas. Isto realmente pode ocorrer, mas por outro lado, muitos trabalhos recentes têm mostrado que fenômenos envolvendo plasticidade de longa duração normalmente fazem uso de proteínas que são independentes do corpo celular. Kang e Schuman em 1996, usando cortes de hipocampo com microlesões,

separaram os corpos celulares dos dendritos na região CA1. Mesmo após este procedimento, os cortes com lesão continuaram a apresentar potenciação sináptica de longa duração induzida por BDNF que foi bloqueada por inibidores de síntese de proteínas. Em 2000, Raymond e colaboradores demonstraram que a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato contribuía para a LTP e que uma nova síntese de proteínas era necessária e ocorria nas sinapses ativadas.

Não só a LTP necessita de nova síntese proteica, mas também a LTD (Depressão de Longa Duração). Huber e colaboradores também em 2000 demonstraram que o estímulo de receptores metabotrópicos de glutamato induziu LTD e esta foi bloqueada por inibidores de síntese proteica, indicando a necessidade de novas proteínas para a LTD ocorrer.

Não queremos com isso negar a participação do corpo celular na produção de proteínas para as sinapses. No entanto, as proteínas produzidas no soma estão relacionadas a uma fase mais tardia da LTP. A chegada do estímulo externo que vem a induzir a LTP ou LTD promove dois tipos principais de sinais que modulam a síntese proteica: 1) um que é local e rápido, no qual as proteínas produzidas se originam de mRNAs já presentes na sinapse; 2) e outro que vai até o corpo celular, sendo dependente de transcrição gênica e formação de

novos mRNAs. No segundo caso, será necessário o transporte desses mRNAs que exercerão seu papel mais tardiamente.

Estudos já demonstraram que os mRNAs presentes nos dendritos têm relação direta com a função sináptica e com fenômenos como a LTP. Já foram identificados mRNAs para: calmodulina, subunidades do NMDAR e CaMKII α , por exemplo (Steward, 1997; Steward & Schuman, 2003). A CaMKII torna-se autofosforilada após a ativação dada pelo complexo Ca²⁺/calmodulina e permanece ativa mesmo na ausência de altas concentrações de cálcio até que seja defosforilada por fosfatases (Miller & Kennedy, 1986; Miller *et al.*, 1988; Hanson *et al.*, 1989). É conhecido que a CaMKII tem sua síntese aumentada nos dendritos após estímulo tetânico e que este efeito é bloqueado por APV (antagonista do receptor NMDA) (Ouyang *et al.*, 1999). No entanto, além de haver uma maior síntese da enzima promovida pela LTP, a CaMKII, por sua vez, pode atuar na manutenção do fenômeno (Chen, *et al.*, 2001) através do aumento da condutância do receptor AMPA, por exemplo (Benke *et al.*, 1998; Derkach *et al.*, 1999).

O receptor NMDA tem sido implicado em muitas formas de plasticidade sináptica e, muitas vezes, nesses processos é necessário que haja síntese de proteínas, possivelmente para manter este estado alterado da função sináptica

(Scheetz *et al.*, 1997). Durante o desenvolvimento de muitas vias no SNC, os receptores NMDA medeiam a competição e estabilização sináptica (Scheetz & Constantine-Paton, 1994). Scheetz e Constantine-Paton (1996) demonstraram em tectum óptico de girinos que uma série de proteínas eram fosforiladas após a ativação do receptor NMDA e uma destas proteínas era a eEF2 que, quando fosforilada cessa a translocação do mRNA nos ribossomos, ou seja, promove uma inibição na síntese proteica (Scheetz *et al.*, 1997). Scheetz *et al.* (2000) também demonstraram que a estimulação de receptores NMDA reduz a síntese global das proteínas, mas aumenta rapidamente a tradução de CaMKII α . Esta regulação na síntese foi temporalmente relacionada com a fosforilação do eEF2. Estes resultados sugerem que a fosforilação do eEF2 representa um mecanismo rápido, local e seletivo que aumenta a síntese de CaMKII α em resposta a ativação do receptor NMDA no desenvolvimento das sinapses. No entanto, não podemos restringir a função do eEF2 somente à regulação da síntese da CaMKII, pois esta é apenas uma evidência do fino controle que esses múltiplos fatores de tradução estão sujeitos. Assim, a pergunta que imediatamente surge em nossas mentes é de como é feita essa seleção minuciosa de quais proteínas serão sintetizadas. A princípio este dado descrito por Scheetz em 2000 parece contraditório, pois descreve a inibição do

principal fator de alongamento com o aumento da síntese de uma dada proteína.

Como pode haver síntese se este fator encontra-se inibido?

Para responder esta pergunta temos que pensar em compartimentalização e ter em mente que embora uma espícula dendrítica pareça algo infinitesimal, esta é na verdade, um imenso universo dividido em compartimentos que separam componentes e protegem-os de responder a todo sinal proveniente do meio externo. Embora a compartimentalização seja uma forma de potencializar um sinal de forma a responder rapidamente, tem o objetivo também de evitar que certas proteínas sejam ativadas mesmo que próximas ao local estimulado.

A PSD-95 é uma proteína que participa ativamente da compartimentalização de sinal da célula pós-sináptica. Já foram descritas 98 diferentes proteínas que podem se ancorar à PSD-95 que, por sua vez, se fixa à subunidade NR2B do NMDAR através de seu domínio PDZ (Brenman *et al.*, 1996ab; Brenman & Brecht, 1997). Desta forma, as proteínas dependentes de cálcio podem ser ativadas tão logo o receptor seja estimulado. Entre estas proteínas estão a NOS e a CaMKII.

Então, para que a síntese local seja eficiente são necessários vários componentes da maquinaria traducional e estes componentes não se restringem

somente a mRNAs e fatores de tradução. Organelas como ribossomos (Palacios-Prü *et al.*, 1981; Steward & Levy, 1982; Steward & Falk, 1986) e o próprio aparelho de Golgi já foram descritos em dendritos (Gardiol *et al.*, 1999). Isto só reforça a idéia de que a síntese local pode ser independente do soma.

Como mencionado na introdução, há um número de sofisticados mecanismos que regulam a iniciação da tradução, na qual formam-se complexos proteicos de fatores de iniciação que acoplam as subunidades ribossomais. No entanto, a inibição da síntese na fase de alongamento é para a célula a melhor opção por dois motivos:

1. Quando a síntese de proteínas é ativada por insulina ou fatores de crescimento, a iniciação da tradução é estimulada e o acoplamento de ribossomos em mRNAs é aumentada. Em conjunto, para que não haja limitações na tradução, é necessário que o passo de alongamento também seja intensificado. Contudo, quando a síntese de proteínas tem suas taxas diminuídas, se a regulação é feita na fase de alongamento, isto assegura que os poliribossomas permaneçam unidos, mesmo se a iniciação for também inibida posteriormente. Isto permitirá que a tradução seja rapidamente reassumida quando requerida.

2. Outro ponto importante é que, como mencionado anteriormente, a síntese de proteínas consome uma alta proporção de energia celular e a maior parte dela é usada no alongamento. Portanto, sob condições de demanda de energia temporariamente aumentada ou diminuído suprimento de energia, seria vantajoso para a célula reduzir a taxa de síntese de proteínas para permitir que a energia seja direcionada para outros processos, tais como manter o potencial de membrana e gradiente iônico. Novamente, a inibição do alongamento assegurará que os poliribossomas permaneçam unidos, mantendo a estabilidade do mRNA e permitindo a retomada da tradução assim que houver disponibilidade de energia (Browne & Proud, 2002).

Dessa forma, assumindo o sistema de alta afinidade da captação de arginina do meio extracelular pelas culturas de retina de pinto (Cossenza & Paes-de-Carvalho, 2000) e os efeitos mediados pelo NMDAR na inibição da síntese de proteínas, é provável que a arginina captada esteja indo preferencialmente para produção de NO. Como foi mostrado por Wu e Morris em 1998, a arginina participa de inúmeras vias intracelulares como o ciclo da uréia, a síntese de poliaminas, síntese de proteínas e conversão em L-citrulina e NO. Portanto, a arginina livre poderia ser direcionada para qualquer uma destas vias entre outras não citadas. No entanto, existe um fenômeno chamado

"paradoxo da L-Arginina" que determina que a produção de NO pode ser aumentada por adição de L-Arg extracelular, apesar de sua concentração intracelular ser muito acima do K_m enzimático. Sugere-se que a L-Arg disponível no meio intracelular seria compartimentalizada em diferentes "pools" para distintas vias. A NOS teria pouco acesso a esse "pool" e usaria a L-Arg proveniente do meio extracelular para produzir NO (Kurz & Harrison, 1997). Nossos resultados mostram que 70% da L-Arg captada vai para proteínas (Fig. 9) e acreditamos que a síntese de proteínas e a produção de NO sejam as principais vias da L-Arg captada do meio extracelular (Fig. 14).

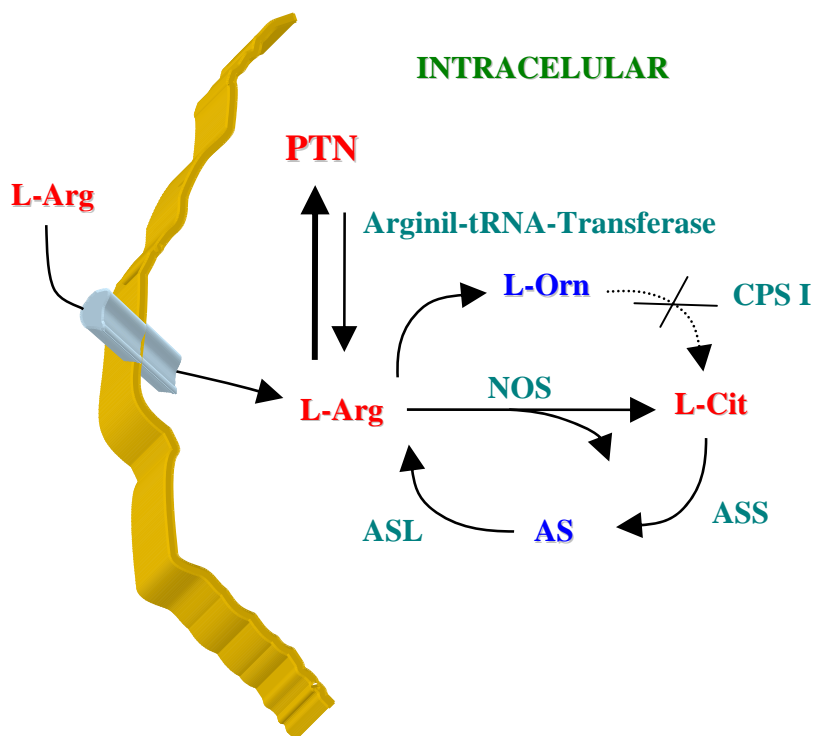


Figura 14 - Vias do metabolismo da arginina no SNC.

Nossos primeiros resultados mostraram que com apenas 2 a 5 minutos tanto a incorporação de [³⁵S]Met quando de [³H]L-Arg foram bastante reduzidas e que este efeito se manteve por pelo menos 60 minutos (Fig. 8 e 9). Este rápido efeito já nos sugere que a inibição pelo receptor NMDA é durante a fase de alongamento. Para evitar a estimulação e participação de prováveis transportadores operando no sentido do efluxo e retirando os aminoácidos, a relação dos radionuclídeos incorporados em proteínas foi realizada em função apenas da radiatividade intracelular.

Observamos que a simples retirada do magnésio do meio extracelular foi capaz de produzir redução na incorporação dos aminoácidos. Creditamos este efeito ao glutamato liberado pelas próprias células da cultura, principalmente porque este efeito era bloqueado pelo MK-801. No entanto, quando analisamos o efeito dos mesmos tratamentos na fosforilação do eEF2 percebemos que a retirada do magnésio promovia defosforilação do fator (Fig. 11). Esperávamos que a retirada do magnésio e o NMDA promovessem um aumento na fosforilação do eEF2 já que ambos reduziam a incorporação de aminoácidos.

Além do efeito contraditório do magnésio, também não observamos um efeito significativo do NMDA em relação ao controle, mas fica evidente que a ativação do NMDAR promove aumento da P-eEF2, pois os níveis de fosforilação

do fator na situação com NMDA são muito superiores aos encontrados na situação sem magnésio que é o seu controle direto.

Patel e colaboradores em 2002 mostraram que a densidade e confluência das células alteravam fortemente os níveis de fosforilação do eEF2 e também de uma proteína ribossomal importante no processo de iniciação chamada proteína S6. Em altas densidades os níveis de fosforilação do fator eram muito altos e o contrário ocorria em baixas densidades. Portanto, a alta densidade das nossas culturas poderia ser o fator determinante dos altos níveis de P-eEF2 basais encontrados, dificultando a observação do efeito do NMDA.

Não sabemos explicar porque o magnésio diminui a fosforilação do eEF2, mas a inibição de síntese promovida por ele pode ser devido a uma parada de funcionamento dos ribossomos, pois estes dependem de magnésio para serem funcionais (Revel & Hiatt, 1965). No entanto, isto não seria muito lógico. Porque a ausência de magnésio reduziria a fosforilação de eEF2 - e por consequência aumentar a síntese de proteínas - se isto também provoca a parada dos ribossomos?

Rubin (2005), em um trabalho de revisão, fala do papel do magnésio na regulação da proliferação celular, na qual íons Mg^{2+} ficariam ancorados à membrana no lado intracelular e depois de determinados sinais poderiam se

desprender e associar-se a moléculas de ATP. Este complexo funcionaria como catalisador de reações enzimáticas e uma delas seria através da mTOR. O efeito final é aumento da síntese proteica através dos fatores de iniciação e proliferação celular. Contudo, este é um processo muito longo e nosso efeito é obtido em tempos muito curtos, de apenas alguns minutos. Mais estudos são necessários para averiguar o real papel do magnésio na síntese proteica.

Outro resultado intrigante foi o que obtivemos com o PD. Esperávamos que a inibição da via das ERKs promovesse um aumento ainda maior na fosforilação do eEF2, pois a literatura descreve que a utilização de PD aumenta a fosforilação do fator de alongamento porque impede que a ERK inative a eEF2K (Wang & Proud, 2002). Primeiramente observamos que o PD foi capaz de reduzir a incorporação de aminoácidos da mesma forma que o NMDA e a administração de ambos não promoveu efeito aditivo (Fig. 12). Isso nos sugeriu que a ERK estaria participando da via do receptor NMDA que quando ativado seria capaz de produzir o efeito máximo. Contudo, novamente o blot apresentou um efeito contraditório. Quando analisamos a fosforilação do eEF2, observamos que o PD reduziu fortemente a fosforilação do mesmo e reverteu parcialmente o efeito do NMDA (Fig. 13).

Uma possível explicação é que a ERK esteja modulando vias de iniciação e de alongamento ao mesmo tempo e promovendo efeitos opostos. Ou seja, provavelmente, diminuindo a síntese na fase de iniciação e aumentando na fase de alongamento. A inibição na fase de iniciação seria maior do que a estimulação na fase de alongamento o que explicaria o efeito de menor incorporação de aminoácidos demonstrado na figura 12. Embora isto pareça estranho em um primeiro momento, é perfeitamente lógico. Como comentamos anteriormente, a síntese de proteínas é um processo passível de regulação por inúmeras vias e estímulos externos. Cada estímulo externo que promova mudanças na síntese de proteínas irá também provocar alterações no metabolismo da célula e causar mudanças fenotípicas. Sendo a síntese de proteínas extremamente custosa, para que a célula inicie a produção de uma ou um grupo de proteínas, é necessário que a síntese de outras pare. Se o estímulo determina uma mudança fenotípica, as proteínas responsáveis pelo fenótipo vigente devem ter sua produção diminuída ou cessada. Sheetz e colaboradores (2000) também mostraram o aumento da síntese da CAMKII em sinaptossomos de colículo superior de ratos jovens por estímulo de receptores NMDA, embora o mesmo estímulo reduza consideravelmente a síntese total de proteínas na sinapse.

Durante o desenvolvimento, há uma fase em que o refinamento topográfico é dependente de atividade espontânea (Debski *et al.*, 2002), ou seja, é necessário que os neurônios disparem potenciais ativamente e aqueles que conseguirem ser mais efetivos na ativação da célula pós-sináptica serão consolidados. Dessa forma, é possível que durante o desenvolvimento os receptores NMDA tenham um importante papel na regulação da síntese de proteínas através da fase de alongamento das cadeias polipeptídicas (Scheetz *et al.*, 1997; 2000) de forma a conservar energia em determinados momentos para otimizar outras vias. Em outras palavras, a síntese de certas proteínas é preterida em relação a outras como a CaMKII. Com isso, a célula concentra sua energia metabólica na produção de componentes que irão atuar no fortalecimento sináptico. Após o período crítico do desenvolvimento, há uma série de modificações na expressão de subunidades do NMDAR (Hofer & Constantine-Paton, 1994) e, com isso, se modifica também a sua função.

Outra alternativa é que talvez o receptor NMDA possa modular a síntese proteica em determinados momentos durante este período crítico e deslocar os aminoácidos para produção de neurotransmissores, pois a maioria destes ou são ou provêm de aminoácidos. Além disso, NO possui também importantes efeitos durante o desenvolvimento do SNC em eventos como

proliferação celular e sobrevivência (Peunova e Enikolopov, 1995) bem como na fisiologia das sinapses de neurônios maduros como, por exemplo, na regulação da liberação de neurotransmissores (Barcellos *et al.*, 2000; Blackshaw *et al.*, 2003; Stanton *et al.*, 2003). Nosso trabalho mais recente mostra que a ativação do NMDAR promove aumento da produção de L-citrulina que é uma maneira de medir NO (Cossenza *et al.*, 2006).

No hipocampo e no córtex, por exemplo, o receptor NMDA e o NO são importantes elementos nos processos de LTP, aprendizado e memória (Bliss & Collingridge, 1993; Scheetz & Constatine-Paton, 1994; Huerta *et al.*, 2000), que frequentemente requerem síntese de novas proteínas (Agnihotri *et al.*, 2004). Além disso, os fatores de alongamento estão presentes em todos os tipos celulares e são alvos de múltiplas vias de sinalização, incluindo as desencadeadas por receptores NMDA (Marin *et al.*, 1997). Embora não ocorra LTP na retina, esta é um importante modelo de estudo do SNC e é possível que os mecanismos regulatórios de síntese protéica envolvidos na formação das sinapses retinianas sejam comuns aqueles de outras regiões como hipocampo e córtex.

Inicialmente, a ativação do receptor NMDA promove a entrada de íons cálcio que acoplam-se à calmodulina (1). Este complexo é então capaz de ativar

duas proteínas: a eEF2K e a NOS (2). Quando a eEF2K está ativa ela é capaz de inibir o fator de alongamento 2 e assim parar a síntese de novas proteínas (3). Isso promove um aumento nos níveis de aminoácidos livres que podem ser direcionados para outras vias metabólicas. A L-Arg, por exemplo, vai em grande quantidade para a síntese de NO (4) (Cossenza *et al.*, 2006), pois a NOS está ativa. Os demais aminoácidos podem ser direcionados para a síntese de neurotransmissores, por exemplo. Por outro lado, a via das ERKs parece modular a síntese proteica de duas formas e isto pôde ser observado com o PD:

- 1) O PD bloqueia a ERK, inibindo a eEF2K e ativando a síntese na fase de alongamento (5);
- 2) A inibição da ERK pelo PD inibe algum fator de iniciação, reduzindo a síntese de outras proteínas (6).

Isto nos sugere que um sinal extracelular pode estimular não só a produção de uma determinada proteína, mas também de inibir a síntese de outras. Isto pode ser essencial em situações em que uma cinase, por exemplo, tenha que ser superexpressa e não possa sofrer interferência de sua fosfatase naquele momento. Então, o sinal estimularia a produção da cinase e inibiria a da fosfatase.

Através dos nossos resultados propomos um modelo do que esteja ocorrendo em nossas culturas (Ver figura 15).

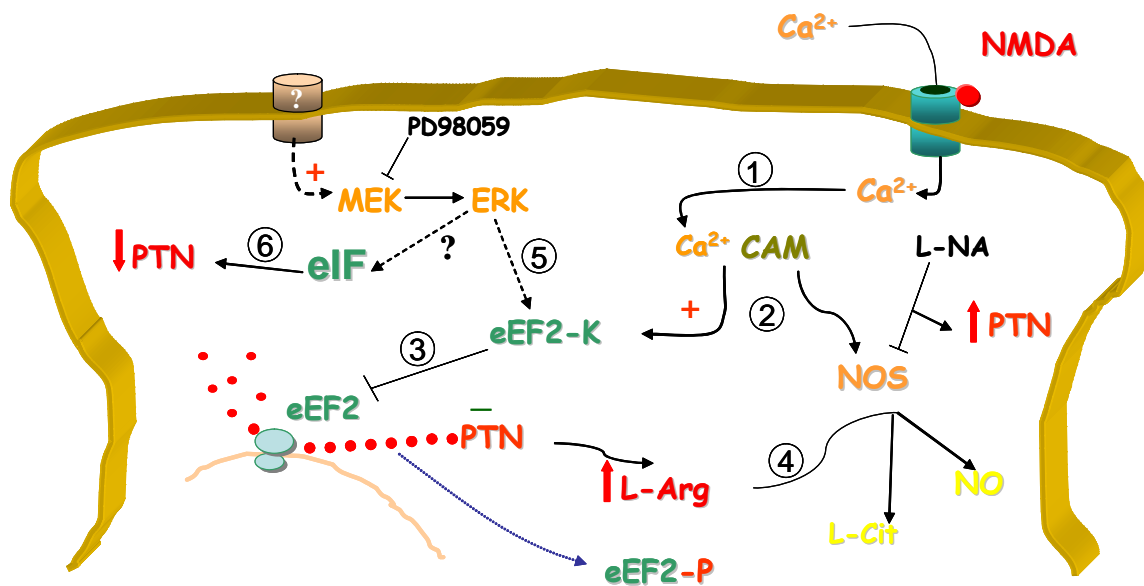


Figura 15 - Modelo proposto de relação entre a inibição de síntese proteica e produção de NO.

Talvez a principal pergunta seja quais proteínas estão sendo inibidas e quais estão sendo estimuladas. Mais estudos são necessários para elucidar estas intrincadas vias de sinalização e seus efeitos.

6. Conclusões.

- NMDA é capaz de inibir a síntese proteica em concentrações a partir de 50 μ M, sendo o efeito máximo obtido em 1mM;
- NMDA é capaz de inibir a síntese proteica a partir de 2 minutos e promove metade do efeito máximo em 15 minutos;
- Tanto a retirada do magnésio quanto o tratamento com NMDA diminuem a incorporação de [³⁵S]Met e [³H]L-Arg em proteínas;
- O bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NA bloqueia o efeito da retirada do magnésio e do NMDA aumentando a incorporação de aminoácidos nas proteínas;
- A ativação dos receptores NMDA promove um aumento na fosforilação do eEF2;
- A retirada de Mg²⁺ do meio extracelular diminui os níveis de fosforilação do eEF2;
- A inibição da via das ERKs tem efeito idêntico ao do NMDA na incorporação de aminoácidos em proteínas. A administração de PD98059 e NMDA não é aditiva;
- O bloqueio da via das ERKs diminui a fosforilação do eEF2.

➤ A regulação da síntese protéica através da via das ERKs pode estar sendo feita tanto na fase de iniciação quanto no alongamento das cadeias polipeptídicas.

Em conjunto, estes resultados sugerem que durante o desenvolvimento embrionário o receptor NMDA pode ser importante para que a célula priorize a síntese de certas proteínas indispensáveis nesta fase de estabilização de sinapses em detrimento da síntese global. Isto pode levar também a um aumento na produção de neurotransmissores e de importantes sinalizadores como o óxido nítrico. A atuação conjunta desses elementos pode ser essencial para decidir quais sinapses irão se estabilizar e quais irão degenerar.

6. Referências Bibliográficas.

ADLER, R. (1993). Determination of cellular types in the retina. *Invest. Opth. Vis. Sci.* **34**, 1677-1681.

AGNIHOTRI, N.T., HAWKINS, R.D., KANDEL, E.R., KENTROS, C. (2004). The long-term stability of new hippocampal place fields requires new protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**(10), 3656-61.

ANAND, M., CHAKRABURTTY, K., MARTON, M.J., HINNEBUSCH, A.G., KINZY, T.G. (2003). Functional interactions between yeast translation eukaryotic elongation factor (eEF) 1A and eEF3. *J. Biol. Chem.* **278**(9), 6985-91.

BARBARESE, E., KOPPEL, D.E., DEUTSCHER, M.P., SMITH, C.L., AINGER, K., MORGAN, F., CARSON, J.H. (1995). Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* **108**(Pt 8), 2781-90.

BARBARESE, E., BRUMWELL, C., KWON, S., CUI, H., CARSON, J.H. (1999). RNA on the road to myelin. *J. Neurocytol.* **28**(4-5), 263-70.

BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A., FREEMAN, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**(4), 1620-4.

BENJAMINS, J.A., MORELL, P. (1978). Proteins of myelin and their metabolism. *Neurochem. Res.* **3**(2), 137-74.

BENKE, T.A., LUTHI, A., ISAAC, J.T., COLLINGRIDGE, G.L. (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature.* **393**, 793-797.

BINDOKAS, V.P., JORDAN, J., LEE, C.C., MILLER, R.J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* **16**(4), 1324-36.

BISHOP, A., ANDERSON, J.E. (2005). NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*. **208**(2), 193-205.

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

BODIAN, D.A. (1965). Suggestive Relationship of Nerve Cell RNA with Specific Synaptic Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **53**, 418-25.

BOEHNING, D., SNYDER, S.H. (2003). Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci*. **26**, 105-31.

BREDT, D.S. (2003). Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem. *J. Cell Sci*. **116**(Pt 1), 9-15.

BREDT, D.S., SNYDER, S.H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **86**(22), 9030-3.

BREDT, D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E., LOWENSTEIN, C., REED, R.R., SNYDER, S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. **351**(6329), 714-8.

BRENMAN, J.E., BREDT, D.S. (1996). Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods Enzymol*. **269**, 119-29.

BRENMAN, J.E., CHAO, D.S., GEE, S.H., MCGEE, A.W., CRAVEN, S.E., SANTILLANO, D.R., WU, Z., HUANG, F., XIA, H., PETERS, M.F., FROEHNER, S.C., BREDT, D.S. (1996a). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. **84**(5), 757-67.

BRENMAN, J.E., CHRISTOPHERSON, K.S., CRAVEN, S.E., MCGEE, A.W., BREDT, D.S. (1996b). Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J. Neurosci*. **16**(23), 7407-15.

BRENMAN, J.E., BREDT, D.S. (1997). Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr. Opin. Neurobiol*. **7**, 374-378.

BROWNE, G.J., PROUD, C.G. (2002). Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur. J. biochem.* **269**, 5360-5368.

BULLER, A.L., LARSON, H.C., SCHENEIDER, B.E., BEATON, J.A., MORRISET, R.A., MONAGHAN, D.T. (1994). The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J. Neurosci.* **14**, 5471-5484.

BURGIN, K.E., WAXHAM, M.N., RICKLING, S., WESTGATE, S.A., MOBLEY, W.C., KELLY, P.T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**(6), 1788-98.

BUSS, W.C., STEPANEK, J., QUEEN, S.A. (1994). Association of tissue-specific changes in translation elongation after cyclosporin with changes in elongation factor 2 phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1459-1469.

CAMPAGNONI, A.T., CAREY, G.D., YU, Y.T. (1980). In vitro synthesis of the myelin basic proteins: subcellular site of synthesis. *J Neurochem.* **34**(3), 677-86.

CASTRO, L., RODRIGUEZ, M., RADI, R. (1994). Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**(47), 29409-15.

CHATTERTON, J.E., AWOBULUYI, M., PREMKUMAR, L.S., TAKAHASHI, H., TALANTOVA, M., SHIN, Y., CUI, J., TU, S., SEVARINO, K.A., NAKANISHI, N., TONG, G., LIPTON, S.A., ZHANG, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature.* **15**(6873), 793-8.

CHEN, L., HUANG, L. Y. (1992). Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* **356**, 521-523.

CHEN, N., MOSHAVER, A., RAYMOND, L.A. (1997). Differential sensitivity of recombinant N-methyl-d-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol. Pharmacol.* **51**, 1015- 1023.

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

CHRISTOPHERSON, K.S., HILLIER, B.J., LIM, W.A., BREDT, D.S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.* **274**(39), 27467-73.

CHUANG, S., CHEN, L., LAMBERTSON, D., ANAND, M., KINZY, T.G., MADURA, K. (2005). Proteasome-Mediated Degradation of Cotranslationally Damaged Proteins Involves Translation Elongation Factor 1A. *Mol. Cell Biol.* **25**(1), 403-413.

COLLINGRIDGE, G.L., BLISS, T.V. (1987). NMDA receptors: their role in long term potentiation. *Trends Neurosci.* **10**, 288-293.

COLOUMBRE, A.J. (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am. J. Anat.* **96**, 153-189.

CONTESTABILE, A., CIANI, E. (2004). Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem Int.* **45**(6), 903-14.

COSSENZA, M., PAES-DE-CARVALHO, R. (2000). L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular localization in relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* **74**(5), 1885-94.

COSSENZA, M., CADILHE, D.V., COUTINHO, R.N., PAES-DE-CARVALHO, R. (2006). Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production. *J Neurochem.* Apr 10; [Epub ahead of print].

DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., UHL, G.R., SNYDER, S.H. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**(8), 3256-9.

DEBSKI, E.A., CLINE, H.T. (2002). Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**(1), 93-9.

DE MELLO, F. G., BACHRACH, U., NIREMBERG, M. W. (1976). Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina. *J. Neurochem.* **27**, 847-851.

DE MELLO, F. G. (1978). The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate in the chick retina. *J. Neurochem.* **31**, 1049-1053.

DE MELLO, M.C., VENTURA, A.L., PAES-DE-CARVALHO, R., KLEIN, W.L., DE MELLO, F.G. (1982). Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**(18), 5708-5712.

DERKACH, V., BARRIA, A., SODERLING, T.R. (1999). Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3269-3274.

DESSI, F., CHARRIAUT-MARLANGUE, C., KHRESTCHATISKY, M., BEN-ARI, Y. (1993). Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J Neurochem.* **60**(5), 1953-5.

DEVER, T.E. (2002). Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell.* **108**, 545-556.

DIGGLE, T.A., REDPATH, N.T., HEESOM, K.J. & DENTON, R.M. (1998). Regulation of protein synthesis elongation factor-2 kinase by cAMP in adipocytes. *Biochem. J.* **336**, 525-529.

DIGGLE, T.A., SUBKHANKULOVA, T., LILLEY, K.S., SHIKOTRA, N., WILLIS, A.E., REDPATH, N.T. (2001). Phosphorylation of elongation factor-2 kinase on serine 499 by cAMP-dependent protein kinase induces Ca²⁺/calmodulin-independent activity. *Biochem. J.* **353**, 621-626.

DIMMELER, S., ZEIHNER, A.M. (1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* **6**(10), 964-8.

DYKENS, J.A. (1994). Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA^{2+} and Na^+ : implications for neurodegeneration. *J Neurochem.* **63**(2), 584-91.

DOWLING, J. E. (1978). How the retina "sees." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**, 832-4.

DUGAN, L.L., SENSI, S.L., CANZONIERO, L.M., HANDRAN, S.D., ROTHMAN, S.M., LIN, T.S., GOLDBERG, M.P., CHOI, D.W. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci.* **15**(10), 6377-88.

EDMONDS, B.T., MURRAY, J., CONDEELIS, J. (1995). pH regulation of the F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1 alpha. *J. Biol. Chem.* **270**(25), 15222-30.

EHINGER, B., FALCK, B. (1969). Adrenergic retinal neurons of some new world monkeys. *Z. Zellforsch. Microsc. Anat.* **100**, 364-375.

ESTRADA, C., MURILLO-CARRETERO, M. (2005). Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist.* **11**(4), 294-307.

FEELISCH, M., TE POEL, M., ZAMORA, R., DEUSSEN, A., MONCADA, S. (1994). Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature.* **368**(6466), 62-5.

FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H. H. W., POLLOCK, J. S., SHENG, H., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D., NAKANE, M., MURAD, F. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase-characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **42**,1849-1857.

FRANCKLYN, C., PERONA, J.J., PUETZ, J., HOU, Y.M. (2002). Aminoacyl-tRNA synthetases: versatile players in the changing theater of translation. *RNA.* **8**(11), 1363-72.

FREY, U., MORRIS, R.G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature.* **385**(6616), 533-6.

FUCHS, S.A., BERGER, R., KLOMP, L.W., DE KONING, T.J. (2005). D-amino acids in the central nervous system in health and disease. *Mol Genet Metab.* **85**(3), 168-80.

FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**(5789), 373-6.

GALLY, J.A., MONTAGUE, P.R., REEKE jr., G.N. EDELMAN, G. M. (1990). The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3547-3551.

GARDIOL, A., RACCA, C., TRILLER, A. (1999). Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J. Neurosci.* **19**(1), 168-79.

GARTHWAITE, J., BOULTON, C.L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 683-706.

GERBER, G., KANGRGA, I., RYU, P. D., LAREW, J. S., RANDIC, M. (1989). Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.* **9**, 3606-3617. 1989.

GINGRAS, A.C., RAUGHT, B., SONENBERG, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913-63.

GIBB, A. J., COLQUHOUN, D. (1992). Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus. *J. Physiol.* **456**, 143-79.

GRIFFITH, O. W., STUEHR, D. J. (1995). Nitric oxides synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 707-736.

GROSS, S.R., KINZY, T.G. (2005). Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**(9), 772-8.

GSCHWENDT, M. KITTSTEIN, W., MIESKES, G., MARKS, F. (1989). A type 2A protein phosphatase dephosphorylates the elongation factor 2 and is stimulated by the phorbol ester TPA in mouse epidermis in vivo. *FEBS Lett.* **257**(2), 357-60.

GUHANIYOGI, J., BREWER, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene.* **265**, 11-23.

GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., SHEU, S.S., GAVIN, C.E. (1994). Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* **267**(2 Pt1), C313-39.

HAGGENDAL, J., MALFORMS, T. (1965). Identification and cellular localization of the catecholamines in the retina and the choroid of the rabbit. *Acta Physiol. Scand.* **64**, 58-66.

HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92.

HANSON, P.I., KAPILOFF, M.S., LOU, L.L., ROSENFELD, M.G., SCHULMAN, H. (1989). Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. *Neuron.* **3**(1), 59-70.

HARDIE, D.G., CARLING, D. & CARLSON, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 821-855.

HASHIMOTO, A., NISHIKAWA, T., OKA, T., TAKAHASHI, K. (1993). Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J. Neurochem.* **60**(2), 783-6.

HASHIMOTO, A., OKA, T., NISHIKAWA, T. (1995). Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur. J. Neurosci.* **7**(8), 1657-63.

HERIN, G.A., AIZENMAN, E. (2004). Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur. J. Pharmacol.* **500**(1-3), 101-11.

HIBBS, J.B. JR, TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z. (1987). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. **235**(4787), 473-6.

HIBBS, J.B. JR, TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z., RACHLIN, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**(1), 87-94.

HOBBS, A.J., IGNARRO, L.J. (1996). Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol.* **269**, 134-48.

HOFER, M., CONSTANTINE-PATON, M. (1994). Regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function during the rearrangement of developing neuronal connections. *Prog. Brain Res.* **102**, 277-85.

HOLLMANN, M., BOULTER, J., MARON, C., HEINEMANN, S. (1994). Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Rev. Physiol. Biochem.* **17**, 182-3.

HOTOKEZAKA, Y., TOBBEN, U., HOTOKEZAKA, H., VAN LEYEN, K., BEATRIX, B., SMITH, D.H., NAKAMURA, T., WIEDMANN, M. (2002). Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides. *J. Biol. Chem.* **277**(21), 18545-51.

HOVLAND, R., EIKHOM, T.S., PROUD, C.G., CRESSEY, L.I., LANOTTE, M., DOSKELAND, S.O. & HOUGE, G. (1999). cAMP inhibits translation by inducing Ca²⁺/calmodulin-independent elongation factor 2 kinase activity in IPC-81 cells. *FEBS Lett.* **444**, 97-101.

HUERTA, P.T., SUN, L.D., WILSON, M.A., TONEGAWA, S. (2000). Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron*. **25**, 473-480.

HUGHES, W. F., LA VELLE, A. (1974). An synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat. Rec.* **17**, 297-302.

HUME, R. I., DINGLEDINE, R., HEINEMANN, S. F. (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*. **253**, 1028-31.

IGARASHI, K., KASHIWAGI, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**(3), 559-64.

IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E., CHAUDHURI, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**(24), 9265-9.

IKONOMIDOU, C., BOSCH, F., MIKSA, M., BITTIGAU, P., VOCKLER, J., DIKRANIAN, K., TENKOVA, T. I., STEFOVSKA, V., TURSKI, L., OLNEY, J. W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. **283**, 70-4.

INGE-VECHTOMOV, S., ZHOURAVLEVA, G., PHILIPPE, M. (2003). Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biology of the Cell.* **95**, 195-209.

ISHII, T., MORIYOSHI, K., SUGIHARA, H., SAKURADA, K., KADOTANI, H., YOKOI, M., AKAZAWA, C., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., MASU, M., NAKANISHI, S. (1993). Molecular characterization of the family of the N-Methyl-D-Aspartate receptor subunit. *J. Biol. Chem.* **268**, 2836-2843.

KAHN, A.J. (1973). An autoradiographic analysis in the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev. Biol.* **38**, 30-40.

KAMISAKI, Y., WADA, K., BIAN, K., BALABANLI, B., DAVIS, K., MARTIN, E., BEHBOD, F., LEE, Y.C., MURAD, F. (1998). An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (95): 11584-11589.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M. Essentials of neural science and behavior. East Norwalk, Connecticut. Prentice Hall international, Inc. 1995.

KANG, H., SCHUMAN, E.M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*. **273**(5280), 1402-6.

KELLY, R.B. (1993). Storage and release of neurotransmitters. *Cell*. **72** Suppl, 43-53.

KIEDROWSKI, L., COSTA, E., WROBLEWSKI, J.T. (1992). Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **58**(1), 335-41.

KONISHI, M., HOLLINGWORTH, S., HARKINS, A.B., BAYLOR, S.M. (1991). Myoplasmic calcium transients in intact frog skeletal muscle fibers monitored with the fluorescent indicator fura2. *J. Gen. Physiol.* **97**, 271-301.

KOVALCHUK, O., KAMBAMPATI, R., PLADIES, E., CHAKRABURTTY, K. (1998). Competition and cooperation amongst yeast elongation factors. *Eur. J. Biochem.* **258**(3), 986-93.

KRISTENSSON, K., HOLMES, K.V., DUCHALA, C.S., ZELLER, N.K., LAZZARINI, R.A., DUBOIS-DALCQ, M. (1986). Increased levels of myelin basic protein transcripts in virus-induced demyelination. *Nature*. **322**(6079), 544-7.

KRUPP, J.J., VISSSEL, B., HEINEMANN, S.F., WESTBROOK, G.L. (1998). N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron*. **20**, 317- 327.

KUTSUWADA, T., KASHIWABUCHI, N., MORI, H., SAKIMURA, K., KUSHIYA, E., ARAKI, K., MEGURO, H., MASAKI, H., KUMANISHI, T., ARAKAWA, M., MISHINA, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*. **358**, 36-41.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(5259), 680-5.

LEI, S.Z., PAN, Z.H., AGGARWAL, S.K., CHEN, H.S.V., HARTMAN, J., SUCHER, N.J., LIPTON, S.A. (1992). Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron*. **8**, 1087-1099.

LOLLEY, R. N. (1969). Metabolic and anatomical specialization within the retina. In A. Lajtha (Ed), Handbook of neurochemistry vol. II. New York-London: Plenum Press.

LOW, C.M., ZHENG, F., LYUBOSLAVSKY, P., TRAYNELIS, S.F. (2000). Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-daspartate NR1/NR2A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11062-11067.

MAcDERMOTT, A.B., MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L, SMITH, S.J., BARKER J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmatic calcium concentration in cultured spinal cords neurones. *Nature.* **321**, 519-522.

MAcMICKING, J., XIE, Q.W., NATHAN, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev.Immunol.* **15**, 323-50.

MAGALHÃES, C.R., SOCODATO, R.E., PAES-DE-CARVALHO, R. (2006). Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. *Int. J. Dev. Neurosci.* **24**(1), 53-60.

MACKIE, K.P., NAIRN, A.C., HAMPEL, G., LAM, G. & JAFFE, E.A. (1989). Thrombin and histamine stimulate the phosphorylation of elongation factor 2 in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 1748-1753.

MARINTCHEV, A., WAGNER, G. (2004). Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Quarterly Reviews of Biophysics.* **37**, 3/4, 197-284.

MARLETTA, M.A. (1993). Nitric oxide synthase: function and mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **338**, 281-4.

MARTONE, M.E., POLLOCK, J.A., JONES, Y.Z., ELLISMAN, M.H. (1996). Ultrastructural localization of dendritic messenger RNA in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **16**(23), 7437-46.

MAYER, M., WESTBROOK, G.L. (1987). (A) The physiology of excitatory aminoacids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **28**, 197-276.

McGEER, P.L., KAWAMATA, T., WALKER, D.G., AKIYAMA, H., TOOYAMA, I., MCGEER, E.G. (1993). Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*. **7**(1), 84-92.

MCLEOD, L.E., WANG, L. & PROUD, C.G. (2001). β -Adrenergic agonists increase phosphorylation of elongation factor 2 in cardiomyocytes without eliciting calcium-independent eEF2 kinase activity. *FEBS Lett.* **489**, 225-228.

MEGURO, H., MORI, H., ARAKI, K., KUSHIYA, E., KUTSUWADA, T., YAMAZAKI, M., KUMANISHI, T., ARAKAWA, M., SAKIMURA, K., MISHINA, M. (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*. **357**, 70-74.

MILLER, R.F., SLAUGHTER, M. (1986). Excitatory amino acid receptors of the retina: diversity of subtypes and conductance mechanisms. *Trends Neurosci.* **9**, 211-218.

MILLER, S.G., KENNEDY, M.B. (1986). Regulation of brain type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca^{2+} -triggered molecular switch. *Cell*. **44**(6), 861-70.

MILLER, S.G., PATTON, B.L., KENNEDY, M.B. (1988). Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca^{2+} -independent activity. *Neuron*. **1**(7), 593-604.

MING, X.F., STOECKLIN, G., LU, M., LOOSER, R., MORONI, C. (2001). Parallel and independent regulation of interleukin-3 mRNA turnover by phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **21**(17), 5778-89.

MITSUI, K., BRADY, M., PALFREY, H.C. & NAIRN, A.C. (1993). Purification and characterization of calmodulin-dependent protein kinase III from rabbit reticulocytes and rat pancreas. *J. Biol. Chem.* **268**, 13422-13433.

MONAGHAN, D. T., BRIDGES, R. J. & COTMAN, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 365-402.

MONCADA, S., RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M. (1988). Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* **37**(13), 2495-501.

MONTAGUE, P.R., GANCAYCO, C.D., WINN, M.J., MARCHASE, R.B., FRIEDLANDER, M.J. (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science.* **263**, 973-977.

MONYER, H., SPRENGEL, R., SCHOEPFER, R., HERB, A., HIGUCHI, M., LOMELI, H., BURNASHEV, N., SAKMANN, B., SEEBURG, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* **256**, 1217-1221.

MORENO, J.J., PRYOR, W.A. (1992). Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **5**(3), 425-31.

MORIYOSHI, K., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., NAKANISHI, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* **354**, 31-37.

NAGATA, Y., HORIIKE, K., MAEDA, T. (1994). Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Res.* **634**(2), 291-5.

NAIRN, A.C., PALFREY, H.C. (1987). Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J. Biol. Chem.* **262**, 17299-17303.

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

NAKANISHI, S., MASU, M. (1994). Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Ann. Ver. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 319-348.

NAKAYA, N., LOWE, S.W., TAYA, Y., CHENCHIK, A., ENIKOLOPOV, G. (2000). Specific pattern of p53 phosphorylation during nitric oxide-induced cell cycle arrest. *Oncogene.* **19**(54), 6369-75.

NICHOLLS, D.G. (1985). A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog. Brain Res.* **63**, 97-106.

NISHIKAWA, T. (2005). Metabolism and functional roles of endogenous D-serine in mammalian brains. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(9), 1561-5.

O'DELL, T.J., HUANG, P.L., DAWSON, T.M., DINERMAN, J.L., SNYDER, S.H., KANDEL, E.R., FISHMAN, M.C. (1994). Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science.* **265**(5171), 542-6.

OLNEY, J.W. (1989). Excitotoxicity and N-Methyl-D-Aspartate receptors. *Drug Dev. Res.* **17**, 299-319.

OMKUMAR, R. V., KIELY, M. J., ROSENSTEIN, A. J., MIN, K. T., KENNEDY, M. B. (1996). Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR_{2B} subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 31670-8.

OUYANG, Y., ROSENSTEIN, A., KREIMAN, G., SCHUMAN, E.M., KENNEDY, M.B. (1999). Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca⁽²⁺⁾/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**(18), 7823-33.

PACKER, M.A., STASIV, Y., BENRAISS, A., CHMIELNICKI, E., GRINBERG, A., WESTPHAL, H., GOLDMAN, S.A., ENIKOLOPOV, G. (2003). Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(16), 9566-71.

PAES-DE-CARVALHO, R. (1990). Development of A₁ adenosine receptors in the chick embryo retina. *J. Neurosci. Res.* **25**, 236-242.

PAES-DE-CARVALHO, R. (2002) Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. *An. Acad. Bras. Cienc.* **74**, 437-51.

PAES-DE-CARVALHO, R., DE MELLO, F.G. (1985). Expression of A₁ adenosine receptors modulating dopamine-dependent cyclic AMP accumulation in the chick embryo retina. *J. Neurochem.* **44**, 845-851.

PAES-DE-CARVALHO, R., BRAAS, K. M., SNYDER, S. H., ADLER, R. (1990). Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake, and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. *J. Neurochem.* **55**, 1603-1611.

PAES-DE-CARVALHO, R., BRAAS, K. M., SNYDER, S. H., ADLER, R. (1992). Developmental regulation of adenosine A₁ receptors, uptake sites and endogenous adenosine in the chick retina. *Dev. Brain Res.* **70**, 87-95.

PAGLIARO, P. (2003). Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sciences* **73**, 2137-2149.

PALACIOS-PRU, E.L., PALACIOS, L., MENDOZA, R.V. (1981). Synaptogenetic mechanisms during chick cerebellar cortex development. *J. Submicrosc. Cytol.* **13**(2), 145-67.

PATEL, J., MCLEOD, L.E., VRIES, R.G., FLYNN, A., WANG, X. & PROUD, C.G. (2002). Cellular stresses profoundly inhibit protein synthesis and modulate the states of phosphorylation of multiple translation factors. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3076-3085.

PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* **327**(6122), 524-6.

PAOLETTI, P., ASCHER, P., NEYTON, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR₁-NR_{2A} receptors. *J. Neurosci.* **17**, 5711-5725.

PEUNOVA, N., ENIKOLOPOV, G. (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature.* **375**(6526), 68-73.

PLÁTENÍK, J., KURAMOTO, N., YONEDA, Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* **67**, 335-64.

PROUD, C.G. (2002). Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5338-5349.

RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. (1991a). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**(7), 4244-50.

RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. (1991b). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**(2), 481-7.

RAMAN, I. M., TONG, G., JAHR, C. E. (1996). Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron.* **16**, 415-421.

REDPATH, N.T., PROUD, C.G. (1993). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates rabbit reticulocyte elongation factor 2 kinase and induces calcium-independent activity. *Biochem. J.* **293**, 31-34.

REDPATH, N.T., FOULSTONE, E.J. & PROUD, C.G. (1996). Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycinsensitive signalling pathway. *EMBO J.* **15**, 2291-2297.

REVEL, M., HIATT, H.H. (1965). Magnesium requirement for the formation of an active messenger RNA-ribosome-S-RNA complex. *J. Mol. Biol.* **11**, 467-475.

REYNOLDS, I.J., HASTINGS, T.G. (1995). Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* **15**(5 Pt 1), 3318-27.

RIIS, B., NYGARD, O. (1997). Kinetics of calcium and calmodulin-dependent protein kinase III from embryonic chicken leg muscle cells. *FEBS Letters.* **407**, 21-24.

ROGERS, N., IGNARRO, L.J. (1992). Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 242-249.

ROSS, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* **59**(3), 423-50.

RUBIN, H. (2005). Magnesium: the missing element in molecular views of cell proliferation control. *Bioessays.* **27**(3), 311-20.

RUSSELL, J.E., MORALES, J., LIEBHABER, S.A. (1997). The role of mRNA stability in the control of globin gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **57**, 249-87.

RYAZANOV, A.G. (1987). Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of elongation factor 2. *FEBS Lett.* **214**, 331-334.

SANS, M.D., WILLIAMS, J.A. (2004). Calcineurin is required for translational control of protein synthesis in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C310-C319.

SCATTON, B. (1993). The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **7**, 389-400.

SCHEETZ, A.J., CONSTANTINE-PATON, M. (1994). Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* **8**(10), 745-52.

SCHEETZ, A.J., CONSTANTINE-PATON, M. (1996). NMDA receptor activation-responsive phosphoproteins in the developing optic tectum. *J. Neurosci.* **16**(4), 1460-9.

SCHEETZ, A.J., NAIRN, A.C., CONSTANTINE-PATON, M. (1997). N-methyl-D-aspartate receptor activation and visual activity induce elongation factor-2 phosphorylation in amphibian tecta: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in controlling protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**(26), 14770-5.

SCHEETZ, A.J., NAIRN, A.C., CONSTANTINE-PATON, M. (2000). NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. *Nat. Neurosci.* **3**(3), 211-6.

SCHELL, M. J., MOLLIVER, M. E., SNYDER, S. H. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**, 3948-52.

SCHOEPP, D.D., BOCKAERT, J., SLADCEK, F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acids receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 508-515.

SHEFFIELD, J.B. e FISCHMAN, D.A. (1970). Intercellular junctions in the developing neural retina of the chick embryo. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. V.* **104**, 405-418.

SINGER, R.H. (1993). RNA zipcodes for cytoplasmic addresses. *Curr. Biol.* **3**(10), 719-21.

SMITH, R. (2004). Moving molecules: mRNA trafficking in Mammalian oligodendrocytes and neurons. *Neuroscientist.* **10**(6), 495-500.

SNOW, R. L., ROBSON, J. A. (1994). Analogue interactions with the brain receptor labeled by [³H]kainic acid. *Brain Res.* **58**, 399-409.

SON, H., HAWKINS, R.D., MARTIN, K., KIEBLER, M., HUANG, P.L., FISHMAN, M.C., KANDEL, E.R. (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell.* **87**(6), 1015-23.

SPIRIN, A.S. (1997). Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? *Mol. Reprod. Dev.* **38**(1), 107-17.

STAMLER, J.S., SINGEL, D.J., LOSCALZO, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* **258**(5090), 1898-902.

STAMLER, J.S., LAMAS, S., FANG, F.C. (2001). Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. **106**(6), 675-83.

STAPULIONIS, R., KOLLI, S., DEUTSCHER, M.P. (1997). Efficient mammalian protein synthesis requires an intact F-actin system. *J. Biol. Chem.* **272**(40), 24980-6.

STEWARD, O. (1997). mRNA Localization in Neurons: A Multipurpose Mechanism? *Neuron*. **18**, 9-12.

STEWARD, O. (2002). mRNA at synapses, synaptic plasticity, and memory consolidation. *Neuron*. **36**(3), 338-40.

STEWARD, O., LEVY, W.B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **2**(3), 284-91.

STEWARD, O., FALK, P.M. (1986). Protein-synthetic machinery at postsynaptic sites during synaptogenesis: a quantitative study of the association between polyribosomes and developing synapses. *J. Neurosci.* **6**(2), 412-23.

STEWARD, O., SCHUMAN, E.M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 299-325.

STEWARD, O., SCHUMAN, E.M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*. **40**, 347-359.

SUGIHARA, H., MORIYOSHI, K., ISHII, T., MASU, M., NAKANISHI, S. (1992). Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generate by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 826-832.

SUGIYAMA, H., DANIELS, M. P., NIRENBERG, M. W. (1977). Muscarinic acetylcholine receptors of the developing retina. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **74**, 5524-5528.

TANG, S.J., SCHUMAN, E.M. (2002). Protein synthesis in the dendrite. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**(1420), 521-9.

TIEDGE, H., BROSIUS, J. (1996). Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **16**(22), 7171-81.

TIRUCHINAPALLI, D.M., OLEYNIKOV, Y., KELIC, S., SHENOY, S.M., HARTLEY, A., STANTON, P.K., SINGER, R.H., BASSELL, G.J. (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **23**(8), 3251-61.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**(9), 4350-4.

VERITY, A.N., CAMPAGNONI, A.T. (1988). Regional expression of myelin protein genes in the developing mouse brain: in situ hybridization studies. *J. Neurosci. Res.* **21**(2-4), 238-48.

VOGEL, Z., NIRENBERG, M. W. (1976). Localization of acetylcholine receptors during synaptogenesis in retina. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **73**, 1806-1810.

WANG, L.Y., ORSER, B.A., BRAUTIGAN, D.L., MACDONALD, J.F. (1994). Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A. *Nature.* **369**(6477), 230-2.

WANG, L., PROUD, C.G. (2002). Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* **91**(9), 821-9.

WANG, X., LI, W., WILLIAMS, M., TERADA, N., ALESSI, D.R. & PROUD, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70, S6 kinase. *EMBO J.* **20**, 4370-4379.

WATANABE, M., INOUE, Y., SAKIMURA, K., MISHINA, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport.* **3**(12), 1138-40.

WATKINS, J.C. (1989). The NMDA concept: origins and development. *In the NMDA Receptor* (Watkins J. C. and Collingridge G. L., Eds). IRL Press, Oxford. p. 1-17.

WATKINS, J.C., KROGSSGAARD-LARSEN, P., HONORÉ, T. (1990). Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 25-33.

WIESINGER, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **64**(4), 365-91.

WOOD, P.L., RAO, T.S., IYENGAR, S., LANTHORN, T., MONAHAN, J., CORDI, A., SUN, E., VAZQUEZ, M., GRAY, N., CONTRERAS, P. (1990). A review of the in vitro and in vivo neurochemical characterization of the NMDA/PCP/glycine/ion channel receptor macrocomplex. *Neurochem. Res. V.* **15**, 217-230.

WU, G., MORRIS JR, S.M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336**, 1-17.

YUN, H., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. (1999). Glutamate-stimulated calcium activation of Ras/Erk pathway mediated by nitric oxide, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **45**, 113-115.

ZHENG, F., ERREGER, K., LOW, C.M., BANKE, T., LEE, C.J., CONN, P.J., TRAYNELIS, S.F. (2001). Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR_{2A}. *Nat. Neurosci.* **4**, 894- 901.

ANEXO

Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production

Marcelo Cossenza, Daniel V. Cadilhe, Rodrigo N. Coutinho and Roberto Paes-de-Carvalho

Program of Neuroimmunology, Institute of Biology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ, Brazil

Abstract

The synthesis of nitric oxide (NO) is limited by the intracellular availability of L-arginine. Here we show that stimulation of NMDA receptors promotes an increase of intracellular L-arginine which supports an increase in the production of NO. Although L-[³H]arginine uptake measured in cultured chick retina cells incubated in the presence of cycloheximide (CHX, a protein synthesis inhibitor) was inhibited approximately 75% at equilibrium, quantitative thin-layer chromatography analysis showed that free intracellular L-[³H]arginine was six times higher in CHX-treated than in control cultures. Extracellular L-[³H]citrulline levels increased threefold in CHX-treated groups, an effect blocked by N^G-nitro-L-arginine, a NO synthase (NOS) inhibitor. NMDA promoted a 40% increase of free intracellular L-[³H]arginine in control cultures, an effect blocked by the NMDA antagonist 2-amino 5-phosphonovaleric acid. In parallel, NMDA promoted a reduction of 40–50% in the incorporation of ³⁵[S]methionine or L-[³H]arginine into

proteins. Western blot analysis revealed that NMDA stimulates the phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2, a factor involved in protein translation), an effect inhibited by (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK801). In conclusion, we have shown that the stimulation of NMDA receptors promotes an inhibition of protein synthesis and a consequent increase of an intracellular L-arginine pool available for the synthesis of NO. This effect seems to be mediated by activation of eEF2 kinase, a calcium/calmodulin-dependent enzyme which specifically phosphorylates and blocks eEF2. The results raise the possibility that NMDA receptor activation stimulates two different calmodulin-dependent enzymes (eEF2 kinase and NOS) reinforcing local NO production by increasing precursor availability together with NOS catalytic activity.

Keywords: glutamate receptor, intracellular pools, L-arginine, L-citrulline, metabolism, retina.

J. Neurochem. (2006) 10.1111/j.1471-4159.2006.03843.x

In the last few years the biochemistry and metabolism of L-arginine (L-Arg) have been refocused due to the great importance attached to nitric oxide (NO) physiology (Wiesinger 2001). L-Arg is required for the synthesis of several molecules including polyamines, creatine, agmatine and NO and is a major constituent of proteins, and the metabolic overlapping of these reactions remains to be explored. In all cases the production of these compounds depends on the intracellular concentration of L-Arg. Two pathways have been described: (i) synthesis of L-Arg from different substrates and/or (ii) transport of L-Arg to intracellular compartments.

The transport of cationic amino acids across cell membranes is mediated by a group of well-described transport systems (y^+ , y^+L , $b^{0,+}$ and $B^{0,+}$) that take up L-Arg with different properties (sodium dependence, affinity and capacity). The transport is mediated predominantly by the

ubiquitous y^+ system, which promotes high-affinity L-Arg uptake in a sodium-independent manner (MacLeod and Kakuda 1996; Palacín *et al.* 1998; Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000; Pow 2001; Wiesinger 2001). Recently, the

Received October 24, 2005; revised manuscript received January 25, 2006; accepted January 25, 2006.

Address correspondence and reprint requests to Roberto Paes-de-Carvalho, Program of Neuroimmunology, Institute of Biology, Federal Fluminense University, Caixa Postal 100180, Niterói, RJ 24001-970, Brazil. E-mail: robpaes@vm.uff.br

Abbreviations used: APV, 2-amino-5-phosphonovaleric acid; CAMKIII, calcium/calmodulin-dependent kinase type III; CAT, cationic amino acid transporter; CHX, cycloheximide; eEF2, eukaryotic elongation factor 2; eEF2K, eukaryotic elongation factor 2 kinase; IS, incubation saline; L-Arg, L-arginine; L-Cit, L-citrulline; LDH, lactate dehydrogenase; L-NA, N^G-nitro-L-arginine; MK801, (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; TLC, thin-layer chromatography.

proteins that mimic γ^+ activity were discovered and called cationic amino acid transporters (CATs) (Kakuda and MacLeod 1994; MacLeod *et al.* 1994; MacLeod and Kakuda 1996; Palacín *et al.* 1998). The γ^+L and $b^{0,+}$ systems also mediate L-Arg transport in a sodium-independent manner and two glycoproteins, rBAT and 4F2hc, were associated with these activities (Kakuda and MacLeod 1994; MacLeod *et al.* 1994; MacLeod and Kakuda 1996). Finally, the only sodium-dependent system for L-Arg uptake, $B^{0,+}$, as yet has no protein described to be associated with its activity, although apparently it has been found in some preparations (Hosoya *et al.* 1997; Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000).

In the CNS the urea cycle enzymes carbamoylphosphate synthetase and ornithine transcarbamylase are not expressed, and intracellular L-Arg synthesis is dependent on the synthesis of L-citrulline (L-Cit) by NO synthase (NOS) and its recycling by argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase (Wiesinger 2001). However, L-Arg levels do not depend only on the L-Arg/NO/L-Cit pathway. Other reactions where L-Arg is consumed, such as synthesis of agmatine, catalysed by L-Arg decarboxylase, and protein synthesis, may contribute to the regulation of intracellular L-Arg pools.

Marin *et al.* (1997) and Scheetz *et al.* (1997, 2000) showed a decrease in neuronal protein synthesis after NMDA receptor activation. This effect is mediated by phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) by eEF2 kinase (eEF2K), a calcium/calmodulin-dependent enzyme (also described as CAMKIII) (Ryazanov 2002). Phosphorylation of eEF2 has been implicated in the inhibition of protein polypeptide elongation (Palfrey and Nairn 1995; Proud 2002). The role of local protein synthesis in neurons seems to be important in events such as synapse formation, plasticity and neuronal cell death (Marin *et al.* 1997; Scheetz *et al.* 1997, 2000; Kandel 2001; Steward and Schuman 2001, 2003; Mendez and Wells 2002; Richter and Lorenz 2002; Tang and Schuman 2002).

Nitric oxide has been involved in physiological functions in the CNS such as learning and memory, long-term potentiation, neurotransmitter release (Bredt and Snyder 1992; Kantor *et al.* 1996; Kendrick *et al.* 1997; Wells and Fallon 2000; Blackshaw *et al.* 2003; Bon and Garthwaite 2003; Stanton *et al.* 2003; Williams *et al.* 2003) and in several events during development such as regulation of cell survival, proliferation and differentiation (Peunova and Enikolopov 1995; Yoshioka *et al.* 2003; Chen *et al.* 2004). NMDA receptors are involved in many of these events, participating in the generation of NO after activation of the calcium/calmodulin pathway. The relationship between NMDA receptors and NO synthesis has been discussed in the literature (Boehning and Snyder 2003).

The relationship between NO and protein synthesis has not been well studied. As L-Arg is an important structural amino acid and is present in almost all proteins, we decided to refocus the regulation of cytoplasmic L-Arg supply. Our

previous work showed the presence of a high affinity and capacity L-Arg uptake in avian retina cultures (Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000). In the present study we found a high L-Arg incorporation into proteins. As L-Arg is a key element for several intracellular reactions, we decided to investigate whether protein synthesis could be related to the pathway of NO synthesis after stimulation of NMDA receptors. We found that activation of NMDA receptors promotes inhibition of protein synthesis and L-Arg incorporation in proteins, increasing the availability of this amino acid for the synthesis of NO. Hence we propose that the rate of protein synthesis arises as a new mechanism for the control of intracellular L-Arg availability and its regulation by membrane receptors such as NMDA receptors, and could participate in several events involving neurotransmission or neuromodulation.

Experimental procedures

Preparation of cultures

Cultures were performed as described by de Mello (1978). Briefly, retinas from 8-day-old chick embryos were dissected from surrounding tissues and treated with 0.1% trypsin in calcium- and magnesium-free saline solution (NaCl, 131 mM; KCl, 4.09 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.92 mM; KH_2PO_4 , 0.45 mM; glucose. H_2O , 12.2 mM; NaHCO_3 , 9.4 mM) for 20 min at 37°C. Cells were suspended in basal medium of Eagle supplemented with 5% fetal calf serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μM), mechanically dissociated and plated at a density of 2×10^4 cells/ mm^2 . Cells were maintained at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO_2 and 95% air and were used after 6 days in culture. The medium was replaced every other day. Under these conditions, cultures consist of a mixed population of neurons growing over a layer of flat glial cells (Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000).

L-[^3H]Arginine uptake

For uptake studies, cells were incubated with L-[^3H]Arg (5.8 Ci/mmol, 5 $\mu\text{Ci/mL}$; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) in incubation saline (IS; NaCl, 140 mM; KCl, 5 mM; HEPES, 20 mM; glucose, 4 mM; MgCl_2 , 1 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 mM) at 37°C several times in the absence or presence of 355.4 μM (0.1 mg/mL) cycloheximide (CHX; Sigma, St Louis, MO, USA). Cells were washed three times with IS, lysed with water and frozen overnight at -20°C . After thawing, the radioactivity was determined by scintillation counting. For determination of free intracellular amino acids, proteins were precipitated with 5% trichloroacetic acid, centrifuged and the supernatant neutralized with NaOH was analysed by thin-layer chromatography (TLC).

Measurement of intracellular and released L-[^3H]amino acids

Cultures were incubated for 10 min in IS in the absence or presence of CHX (355.4 μM) and L-[^3H]Arg (10 $\mu\text{Ci/mL}$) was added and cultures further incubated for 30 min. Cells were then washed four times with IS (3 min each) and further incubated for 15 min in the absence or presence of different drugs. After this time, IS was removed and cells lysed with water. Intracellular and extracellular radioactivity were determined by scintillation counting. For separ-

ation and measurement of intracellular and released amino acids, the procedure was the same as described above.

Experiments on L-[³H]arginine availability

After previous incubation in the presence or absence of CHX for 10 min, and L-[³H]Arg uptake for 30 min, cells were washed four times with IS and stimulated for 15 min with NMDA (1 mM) or NMDA + 2-amino-5-phosphonovaleric acid (100 μM, added in the two previous washing periods and together with NMDA). All solutions containing NMDA were magnesium-free. To evaluate the time course of the effect of CHX, cultures were incubated with this inhibitor during the 15-min period of stimulation or several times in control or NMDA-treated cultures. Cells were then lysed, proteins precipitated and supernatants analysed by TLC.

Measurement of L-[³H]citrulline formation

Nitric oxide synthase activity was measured by conversion of L-[³H]Arg to L-[³H]Cit. Cells were loaded with L-[³H]Arg in the absence or presence of CHX during all periods of treatment. In some cases, N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 500 μM; Sigma) was added during the washing period after loading with L-[³H]Arg to avoid any effect on the uptake process, as previously described (Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000). Stimulation was performed in a period of 15 min after washing and in the absence or presence of CHX. Intracellular and extracellular L-[³H]Cit were measured by TLC after protein precipitation.

Thin-layer chromatography analysis

Aliquots from IS and cell lysates previously centrifuged to eliminate proteins were added to silica gel plates (60 F₂₅₄; Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) together with a standard solution containing L-Arg, L-ornithine and L-Cit (5 mM). The eluent was a mixture of chloroform, methanol and ammonium hydroxide (2 : 3 : 2, v/v/v). After staining with ninhydrin (0.1% ethanol/acetic acid, 5 : 1, v/v), retention factors (R_fs) were determined (L-Arg, 0.20; L-ornithine, 0.40; L-Cit, 0.69), amino acids removed from plates and radioactivity determined.

Measurement of L-[³H]arginine or [³⁵S]methionine incorporation

Cultures were washed three times and incubated for 10 min in IS with or without 355.4 μM CHX. L-[³H]Arg (5 μCi/mL) or [³⁵S]Met (1000 Ci/mmol, 0.5 μCi/mL; Amersham Biosciences) was then added and cultures further incubated for different periods of time at 37°C. When NMDA or (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohept-5,10-imine maleate (MK801) (Sigma) was used, the IS was magnesium-free. After incubation, cells were washed, lysed with 5% trichloroacetic acid and intracellular radioactivity determined. Cells were then removed from dishes and centrifuged at 30 000 g for 20 min at 4°C. The pellet was washed, resuspended in 1 N NaOH and the radioactivity determined. Results were then expressed as percentage of radioactivity incorporated in proteins in relation to total radioactivity taken up by cells.

Western blot analysis

For detection of eEF2 phosphorylation, cultures were pre-incubated for 10 min, treated for 15 min with different agents, washed, cells scraped off the dishes in sample buffer and the material boiled for

6 min. Samples containing 20 μg protein were submitted to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and proteins transferred to polyvinylidene difluoride membranes which were incubated overnight with an antibody that specifically recognizes eEF2 phosphorylated at Thr56 (1 : 1500 dilution; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) or anti-β-actin (1 : 200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), washed, incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody anti-rabbit (1 : 3000; Amersham Biosciences) and revealed by enhanced chemiluminescence (ECL). The total amount of protein in each sample was determined using the Bradford reagent, with bovine serum albumin as standard. Quantitative analysis of blots was performed by scanning images and using the computer program SCION IMAGE (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Lactate dehydrogenase measurement

Cell survival in cultures after exposure to CHX was assessed by determining the intracellular lactate dehydrogenase (LDH) activity after cell lysis with 1% Triton X-100 for 60 min, and measured by spectrophotometric assays using the cytotoxicity detection kit CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by ANOVA, Student's *t*-test or the post-test of Bonferroni using the program GRAPH PAD PRISM III.

Results

Relation between L-[³H]Arg uptake and release with protein synthesis

Our previous work showed a high-affinity L-[³H]Arg uptake in avian retinal cells in culture. Autoradiographic studies showed the presence of grains over glial cells as well as neurons (Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000). As L-Arg is a structural amino acid present in almost all proteins, it is possible that inhibition of protein synthesis is able to interfere with L-[³H]Arg uptake. Indeed, addition of the protein synthesis inhibitor CHX (355.4 μM) dramatically reduced this uptake by around 60% (2118.4 ± 175.0–856.6 ± 168.6 fmol/mg protein) after 15 min and 73% (4203.0 ± 315.1–1136.0 ± 171.5 fmol/mg protein) at equilibrium (Fig. 1a). This effect of CHX was concentration-dependent, attaining maximal inhibition at concentrations around 70 μM (Fig. 1b). In subsequent experiments we used a concentration of 355.4 μM (0.1 mg/mL) and this concentration of CHX did not show any effect on cell viability as determined by LDH measurements (Fig. 1d). The radioactivity resident in the protein fraction after trichloroacetic acid precipitation was 1664.5 ± 138.0 fmol/mg protein (60% of total uptake after 15 min). Incubation with CHX decreased the incorporation to 13.9 ± 2.6 fmol/mg protein (1.6% of total uptake after 15 min in the presence of CHX), representing a decrease of 92% in L-[³H]Arg incorporation after 15 min of incubation (Fig. 1c).

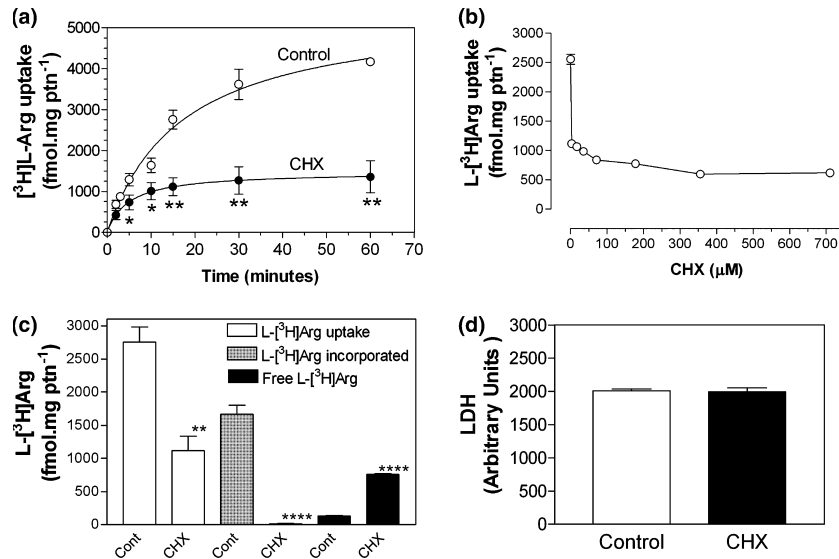


Fig. 1 (a) Time course of L-[³H]arginine (L-[³H]Arg) uptake in the absence or presence of cycloheximide (CHX). Cultures were washed and incubated for different times in incubation saline containing L-[³H]Arg in the absence or presence of CHX (355.4 μM) and then processed for measurement of intracellular radioactivity. ○, uptake in control cultures; ●, uptake in the presence of CHX (355.4 μM). Addition of CHX promoted a 60% reduction in uptake after 15 min and 73% at equilibrium. Maximal uptake levels (100%) were 4203.0 ± 315.1 fmol/mg protein. (b) Effect of increasing concentrations of CHX on the total uptake of L-[³H]Arg. (c) Comparison of CHX effects on L-[³H]Arg total uptake, incorporation in proteins and free intracellular concentrations. Cultures were incubated for 15 min with L-[³H]Arg in the presence or absence of CHX (355.4 μM) and the intracellular levels of

the amino acid were measured. In control conditions, the radioactivity resident in the protein fraction was 1664.5 ± 138.0 fmol/mg protein (60% of total uptake after 15 min). The incubation with CHX decreased the incorporation to 13.9 ± 2.6 fmol/mg protein (1.6% of total uptake in the presence of CHX), representing a decrease of 92% in L-[³H]Arg incorporation after 15 min of incubation. A large increase of intracellular free L-[³H]Arg (approximately 600%) (130.0 ± 7.0–756.3 ± 12.1 fmol/mg protein) was observed after CHX treatment. (d) Measurement of intracellular lactate dehydrogenase (LDH) after incubation of cultures for 30 min with 355.4 μM CHX. The points represent the mean of three (a and b) or four (c and d) experiments ± SEM. The bars in (b) were smaller than the symbol size. The asterisks denote statistical significance (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; *****p* < 0.0001).

The decrease of L-[³H]Arg uptake and weak incorporation after inhibition of protein synthesis indicate that this process is an important driving force in the recruitment of amino acids. To determine the variations in free L-Arg concentrations, we decided to quantify free L-[³H]Arg in cell lysates. Interestingly, we found, despite the decrease of L-[³H]Arg uptake, an increase of intracellular free L-[³H]Arg of around 600% (130.0 ± 7.0–756.3 ± 12.1 fmol/mg protein) after CHX treatment (Fig. 1c).

L-[³H]citrulline formation after L-[³H]arginine loading when protein synthesis is blocked

In another series of experiments, we compared the concentrations of free intracellular L-Arg in cultures incubated in the absence or presence of CHX. Cultures were pre-treated with IS in the absence or presence of CHX for 10 min, and then L-[³H]Arg was added. After 30 min, cells were washed four times and incubated again in IS in the absence or presence of CHX for 15 min. Intracellular and extracellular solutions were then both analysed by TLC. As shown in Fig. 2(a), both intracellular and extracellular levels of free L-[³H]Arg increased when cultures were treated with CHX

(460.0 ± 42.2–1014.6 ± 36.5 fmol/mg protein, representing 233.5% of intracellular control and 131.8 ± 7.2–505.3 ± 23.2 fmol/mg protein, representing 375% of extracellular control, respectively).

The presence and function of NOS have been described in chick embryo retina cultures (de Faria *et al.* 1995; Paes-de-Carvalho and Mattos 1996; Paes-de-Carvalho *et al.* 1996; Ientile *et al.* 1999; Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000). We decided to verify whether NO production could be modified by increasing the intracellular concentrations of L-Arg when protein synthesis was inhibited before loading with L-[³H]Arg. When L-[³H]Cit formation was measured in both intracellular and extracellular compartments, we verified that production of L-[³H]Cit increased in both salines (89.6 ± 2.4–250.9 ± 9.4 fmol/mg protein, an increase of around 280% for the extracellular compartment and 337.8 ± 19.1–675.7 ± 111.8 fmol/mg protein, an increase of around 200% for the intracellular compartment) when treated with CHX (Figs 2b and c). This effect was partially blocked by the NOS inhibitor L-NA (89.6 ± 2.4–170.2 ± 13.2 fmol/mg protein for the extracellular compartment and 337.8 ± 19.1–434.6 ± 1.2 fmol/mg protein for the

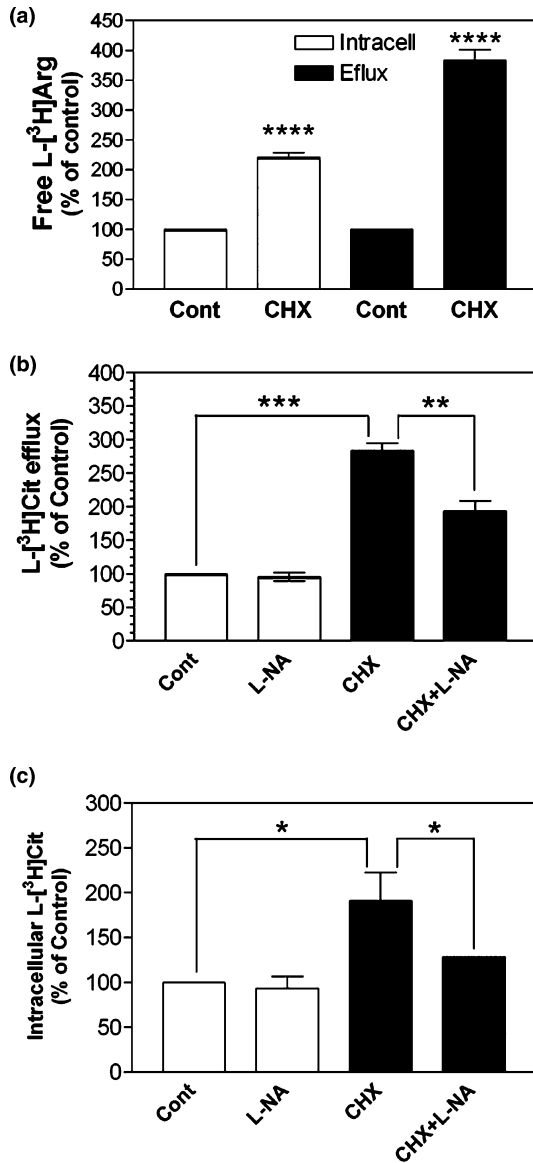


Fig. 2 Effect of cycloheximide (CHX) on the intracellular and extracellular levels of L-[³H]arginine (L-[³H]Arg) and L-[³H]citrulline (L-[³H]Cit). Cultures were pre-loaded with L-[³H]Arg and incubated for 15 min in the presence or absence of CHX (355.4 μ M) and/or N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 500 μ M). The extracellular effluents and intracellular material were then analysed. (a) Increases of free L-[³H]Arg levels were detected when cultures were treated with CHX. Control values (100%) were 460.0 \pm 42.2 fmol/mg protein (intracellular) and 131.8 \pm 7.2 fmol/mg protein (extracellular). (b and c) Efflux and intracellular levels of L-[³H]Cit. Control L-[³H]Cit levels were 89.6 \pm 2.4 and 337.8 \pm 19.0 fmol/mg protein, respectively. The production of L-[³H]Cit increased 2.8-fold in the efflux saline and 1.9-fold in intracellular compartments when cultures were treated with CHX. This effect was partially blocked by the nitric oxide synthase inhibitor L-NA. The SEM in the CHX + L-NA condition was too small to be shown. Results are expressed as the mean \pm SEM of four (a) or three (b and c) separate experiments and asterisks denote statistical significance (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001).

intracellular compartment). This partial blockade could perhaps be explained by the fact that the addition of L-NA was performed 30 min after L-[³H]Arg loading. However, no significant effect of L-NA was observed in control cultures (Figs 2b and c).

These results raised the possibility that the increased intracellular concentrations of L-Arg observed after inhibition of protein synthesis are available as substrate for the synthesis of NO.

Inhibition of protein synthesis by stimulation of NMDA receptors

Marin *et al.* (1997) and Scheetz *et al.* (1997, 2000) showed that stimulation of NMDA receptors promotes inhibition of protein synthesis by activation of eEF2K, also called calcium/calmodulin-dependent kinase type III (CAMKIII), that promotes phosphorylation of eEF2, interrupting the ribosome translocation through the mRNA chain. Using the [³⁵S]Met incorporation technique, we verified a 40% reduction in the incorporation of this amino acid into protein when cultures were treated with NMDA (Fig. 3a). The inhibitory effect was observed as early as 15 min after treatment onset and also at 30 or 60 min of incubation when the steady state was attained (10 990.1 \pm 1169.0 fmol/mg protein for control and 7093.2 \pm 1055.1 fmol/mg protein for NMDA treatment) (Fig. 3a). The effect of NMDA was concentration-dependent with an IC₅₀ of approximately 50 μ M (Fig. 3e). Interestingly, a simple removal of Mg²⁺ did promote a decrease to 66% of control (2196.8 \pm 12.0–1443.1 \pm 180.0 fmol/mg protein) in [³⁵S]Met incorporation (Fig. 3b), probably reflecting an activation of glutamate receptors by endogenous glutamate. Addition of MK801 (100 μ M) was able to block both the effect of NMDA and Mg²⁺ removal (Fig. 3b). As stimulation with NMDA was efficient in reducing protein synthesis, incorporation of L-[³H]Arg into protein must be compromised in this situation. To evaluate this hypothesis, we performed the same experimental sequences using L-[³H]Arg as a tracer. Unpublished data from our laboratory show that L-[³H]Arg could be released upon NMDA stimulation. To confirm that the decrease in L-[³H]Arg and [³⁵S]Met signal present in proteins is due to an inhibition of incorporation and not by release of amino acids, experiments were performed to measure the radioactivity of radiolabeled amino acids incorporated in proteins and relating to the total intracellular radioactivity. Results were expressed as incorporation of radiolabeled amino acids in percentage of intracellular radioactivity. Addition of NMDA was able to inhibit 50% of the L-[³H]Arg incorporation with a maximal effect observed after 15 min, in a way very similar to that observed with [³⁵S]Met (1952.9 \pm 150.8 for control to 1073.4 \pm 341.2 fmol/mg protein for NMDA treatment at the equilibrium state) (Fig. 3c). Removal of Mg²⁺ was able to inhibit L-[³H]Arg incorporation to around 80% of control (1537.8 \pm 14.2–1202.2 \pm 160.3 fmol/mg protein) and the

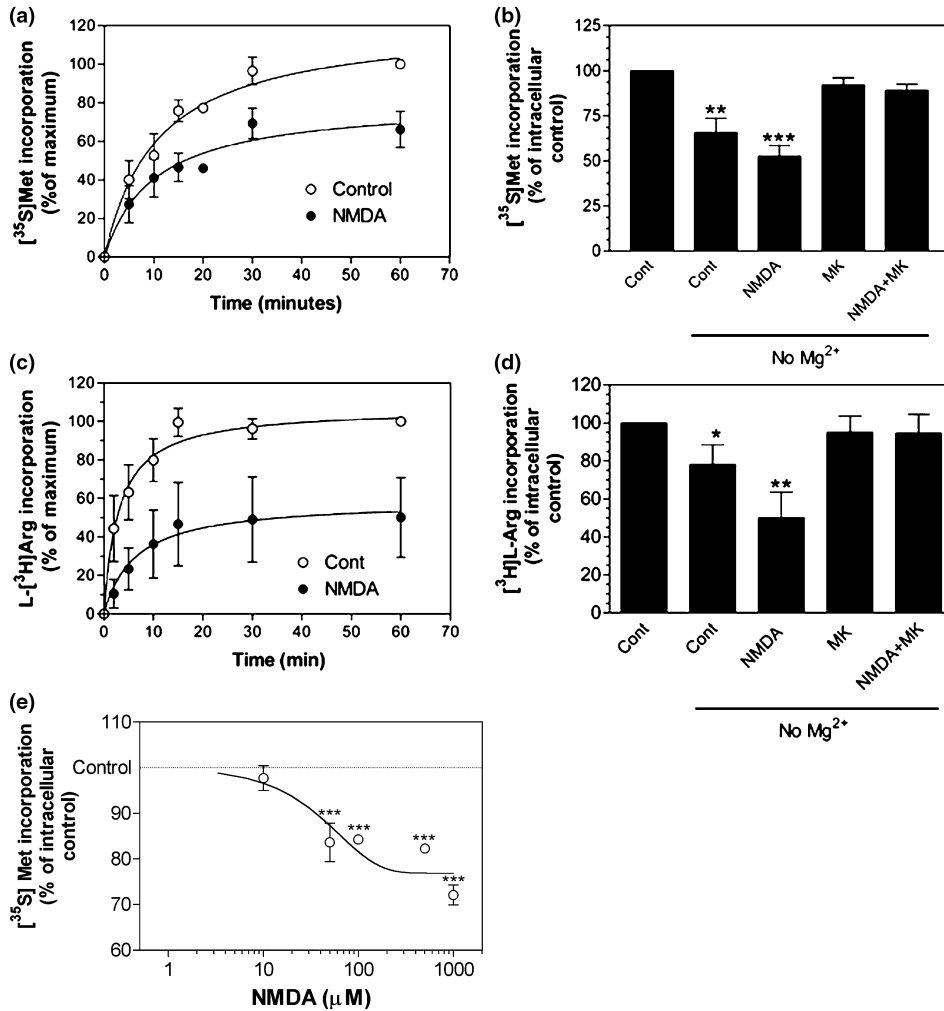


Fig. 3 Effect of NMDA on [³⁵S]methionine ([³⁵S]Met) and L-[³H]arginine (L-[³H]Arg) incorporation into proteins. Cultures were incubated for different times with incubation saline containing [³⁵S]Met or L-[³H]Arg and the proteins were precipitated using 5% trichloroacetic acid. Time course of [³⁵S]Met (a) or L-[³H]Arg (c) incorporation in the absence (○) or presence (●) of NMDA (1 mM). Maximal incorporation levels (100%) for [³⁵S]Met and L-[³H]Arg were 10 990.1 ± 1169.0 and 1952.9 ± 150.8 fmol/mg protein, respectively. Maximal inhibition by NMDA was approximately 35% for [³⁵S]Met and 55% for L-[³H]Arg. Effect of magnesium removal, NMDA (1 mM) and MK801 (MK)

(100 μM) on [³⁵S]Met (b) and L-[³H]Arg (d) incorporation. Control incorporation levels correspond to 2196.8 ± 12.0 and 1537.8 ± 14.2 fmol/mg protein, respectively. (e) Effect of increasing concentrations of NMDA on [³⁵S]Met incorporation in proteins. IC₅₀ value was approximately 50 μM. Results are expressed as the mean ± SEM of three (a, b and e) or four (c and d) separate experiments. In (a) and (c) the difference between each ○ and ● was significant (*p* < 0.05). In (b), (d) and (e) the asterisks denote statistical significance (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 as compared with control).

effects of NMDA and Mg²⁺ removal were blocked by MK801(Fig. 3d).

Intracellular L-[³H]arginine availability after NMDA receptor activation

As shown in Figs 1(c) and 2(a), incubation with CHX promotes an increase in free L-[³H]Arg concentration during uptake and efflux assays. In accordance with the data showing NMDA-induced inhibition of protein synthesis and inhibition of L-[³H]Arg incorporation, we decided to evaluate

whether activation of NMDA receptors is also able to increase L-[³H]Arg intracellular pools. Cells were then loaded for 30 min with L-[³H]Arg, washed and incubated for increasing periods of time with 1 mM NMDA. We found that NMDA raised the concentrations of free intracellular L-[³H]Arg by approximately 40% (Fig. 4). The effect was observed as early as 5 min after addition of NMDA and remained approximately constant up to 30 min (Fig. 4a). The effect of NMDA was concentration-dependent with maximal stimulation obtained with a concentration of 500 μM and

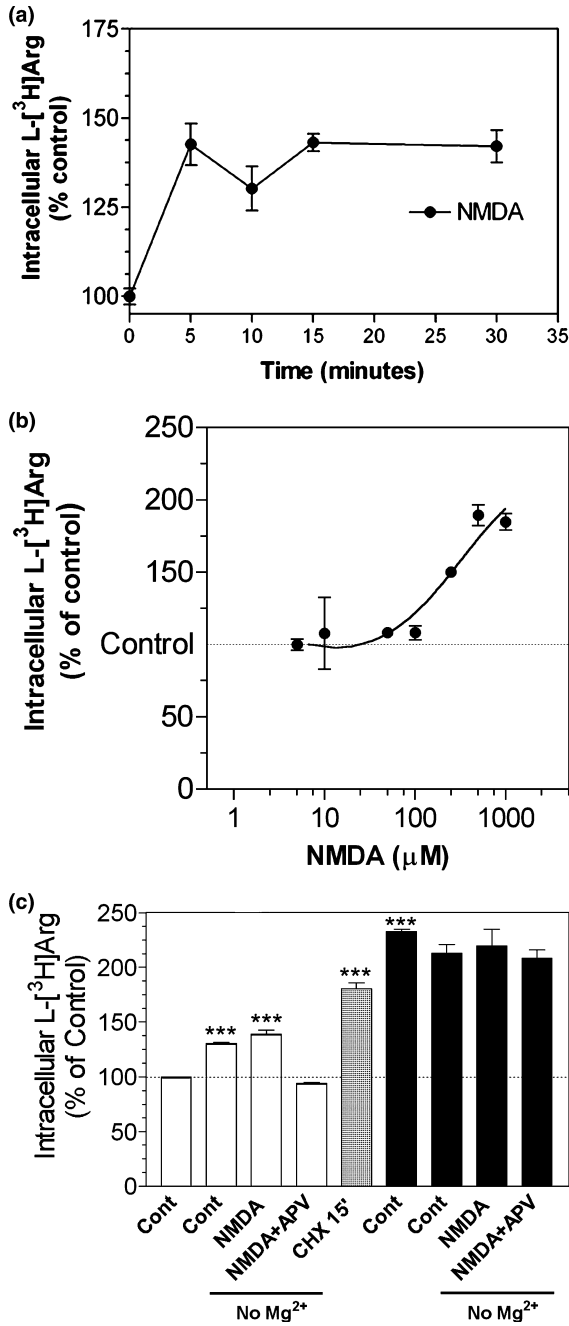


Fig. 4 Assay of intracellular L-[³H]arginine (L-[³H]Arg) after stimulation with NMDA or cycloheximide (CHX). (a) Cultures were incubated several times with L-[³H]Arg and then incubated for different times in Mg²⁺-free incubation saline in the absence or presence of NMDA (1 mM). Control intracellular L-[³H]Arg levels were 183.1 ± 8.9 fmol/mg protein. (b) Effect of increasing concentrations of NMDA on intracellular free L-[³H]Arg. The EC₅₀ was approximately 250 μM. (c) Effect of absence of magnesium, NMDA (1 mM) and NMDA + (APV) (100 μM) (□), 15 min of incubation with CHX (355.4 μM) (▨) or cultures being incubated with CHX since 10 min before pre-loading with L-[³H]Arg and during the whole experiment (■). Control intracellular L-[³H]Arg levels (absence of CHX) were 460.0 ± 42.2 fmol/mg protein. Results are expressed as the mean ± SEM of three (a) or four (c) separate experiments. The results in (b) are from one experiment performed in duplicate. In (a) the difference between each time point with NMDA and control was significant (*p* < 0.05). The asterisks denote statistical significance (***) as compared with control. No significant difference was observed between control and other conditions in cultures incubated with CHX (■).

was performed in the presence of CHX during the complete incubation period. As expected, the presence of CHX raised intracellular L-[³H]Arg concentrations by approximately 120% at all treatment conditions but no additional increase by NMDA was observed (Fig. 4c). It was clearly observed that the effect of NMDA was not present when the protein synthesis machinery was inhibited.

Relationship between L-[³H]citrulline formation and L-[³H]arginine availability

The activation of NOS by NMDA has been described in the literature for several systems (Southam and Garthwaite 1991; Schuman and Madison 1994; Snyder and Ferris 2000; Stanton *et al.* 2003). In this study, using chick embryo retinal cultures, we found an increase of around 50% in extracellular and intracellular L-[³H]Cit production when these cultures were previously loaded with L-[³H]Arg and then stimulated for 15 min with NMDA (89.6 ± 2.4–131.8 ± 7.2 fmol/mg protein for the extracellular and 337.8 ± 19.0–505.3 ± 23.1 fmol/mg protein for the intracellular production). Mg²⁺ removal was also capable of raising L-[³H]Cit production by 18% for extracellular (Fig. 5) and 30% for intracellular production (Fig. 6). In all cases, the NOS inhibitor L-NA completely blocked these effects and the NMDA antagonist APV promoted a partial inhibitory effect. When cells were incubated with CHX only during the 15-min period of stimulation after L-[³H]Arg loading, we observed an increase of around 50% in extracellular (Fig. 5, gray bars) and 30% in intracellular (Fig. 6, gray bars) L-[³H]Cit formation that could also be completely blocked by L-NA, strongly suggesting a relationship between inhibition of protein synthesis and NO production. When experiments were performed in the presence of CHX during the whole incubation period, including the period of L-[³H]Arg loading, we found the expected increase of L-[³H]Cit of

EC₅₀ around 250 μM (Fig. 4b). The next experiments were then performed using an incubation time of 15 min. As shown in Fig. 4(c), CHX (gray bar) and Mg²⁺ removal were also able to produce the effect (approximately 80 and 30%, respectively). The presence of the NMDA antagonist 2-amino-5-phosphonovaleric acid (ADV; 100 μM) abolished the effect of both NMDA and Mg²⁺ removal, decreasing intracellular L-[³H]Arg concentrations to control levels. To ensure that inhibition of protein synthesis is responsible for the increase of intracellular L-[³H]Arg, the same experiment

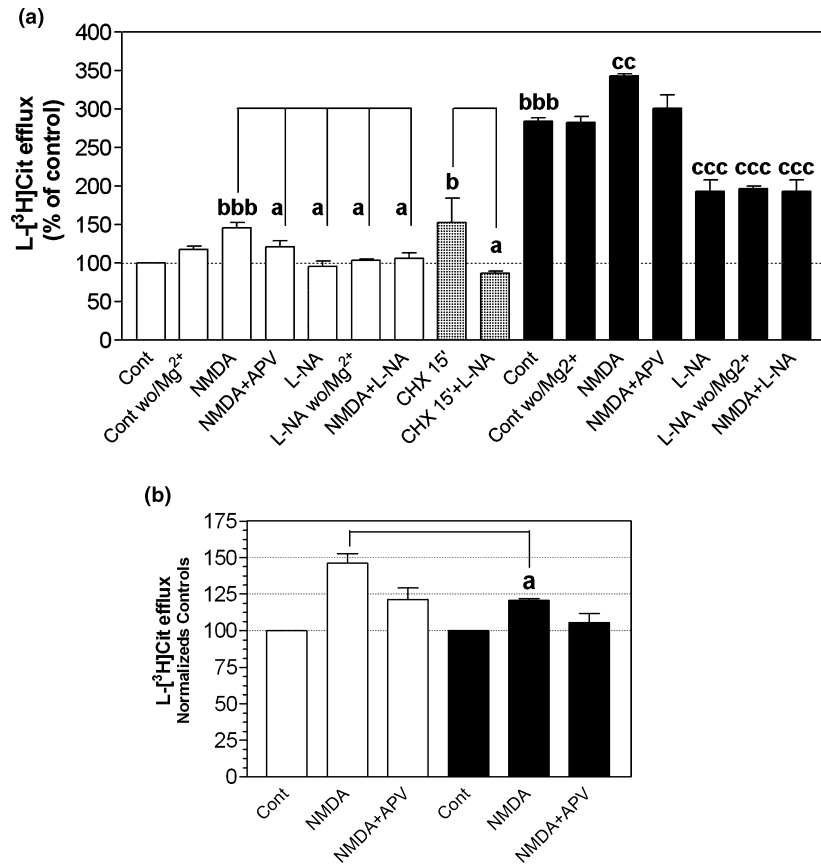


Fig. 5 Assay of extracellular L-[³H]citrulline (L-[³H]Cit) in different conditions. (a) Cultures were incubated for 30 min with L-[³H]arginine (L-[³H]Arg) in the presence or absence of cycloheximide (CHX) (355.4 μ M) and further incubated for an additional period of 15 min in the absence of CHX (\square and \blacksquare) and stimulated for 15 min with CHX or CHX plus N^G-nitro-L-arginine (L-NA) (500 μ M) (\blacksquare) or NMDA (1 mM), L-NA (500 μ M), NMDA + APV (100 μ M) or NMDA + L-NA (\square). Other cultures (\blacksquare) were incubated for 30 min with L-[³H]Arg in the presence of CHX and stimulated for 15 min with NMDA and/or APV or L-NA still

in the presence of CHX. (b) Results in (a) were normalized by their respective controls. Control uptake levels were 89.6 ± 2.4 and 250.8 ± 9.4 fmol/mg protein, respectively, in the absence or presence of CHX. Incubation saline did not contain magnesium in all conditions in which NMDA was used. Results are expressed as the mean \pm SEM of three separate experiments. The letters denote statistical significance (b as compared with control without CHX; c as compared with control with CHX; a as compared with the indicated pairs) (one letter, $p < 0.05$; two letters, $p < 0.01$; three letters, $p < 0.001$).

approximately three times for extracellular and two times for intracellular production (Figs 5a and 6a, black bars). However, under these conditions, the stimulation of L-[³H]Cit production by NMDA was only about 20% for extracellular (Fig. 5a) and intracellular (Fig. 6a) production. Figures 5(b) and 6(b) clearly show this decreased stimulation by NMDA when controls in the absence (white bars) or presence (black bars) of CHX were normalized to 100%.

Eukaryotic elongation factor 2 phosphorylation by NMDA

To test the hypothesis that the effect of NMDA must involve a decrease of protein synthesis by coupling with activation of the eEF2K pathway, we performed experiments to stimulate cultures with NMDA in the presence or absence of MK801 and analyse the phosphorylation of eEF2 by western blotting

using an antibody against phospho-eEF2. As can be observed in Fig. 7, stimulation with NMDA did promote an increase of approximately 30% in the amount of phospho-eEF2, an effect inhibited by MK801.

Discussion

The regulation of NO synthesis is of pivotal importance in CNS physiology. One limiting point is the control of availability of the NO precursor L-Arg. Cytoplasmic L-Arg levels are classically regulated in two ways: (i) synthesis of L-Arg through a complex coupled enzymatic machinery and/or (ii) L-Arg uptake through different transport systems. In the present work we propose a third mechanism for enhancement of L-Arg availability, which depends on the regulation of protein synthesis.

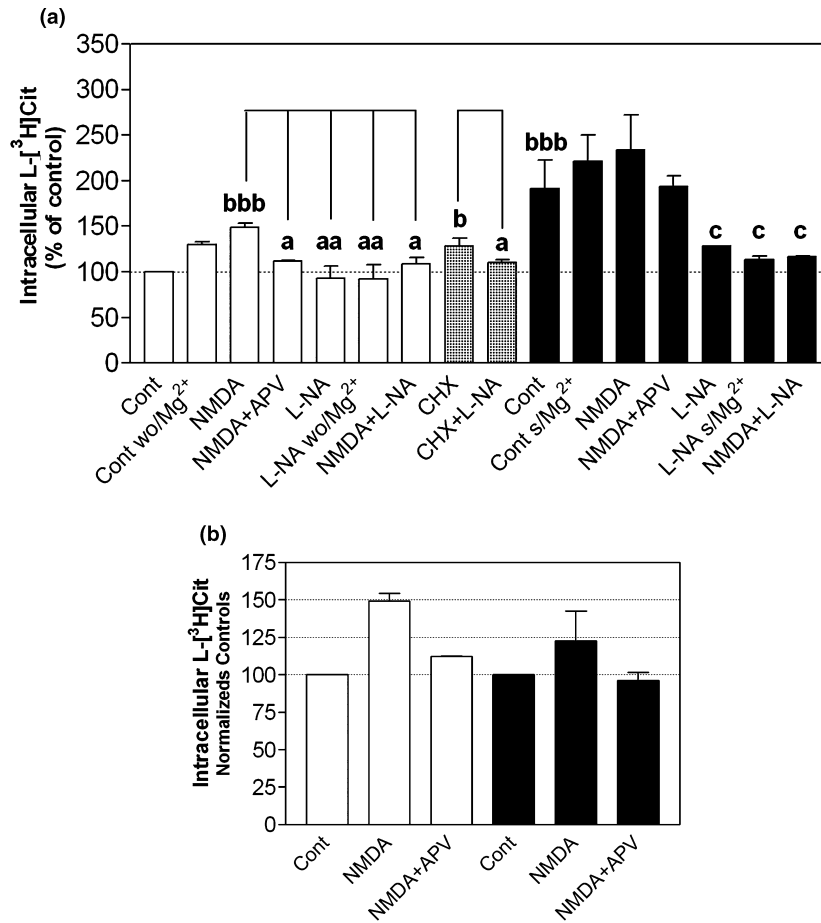


Fig. 6 Assay of intracellular L-[³H]citrulline (L-[³H]Cit) in different conditions. (a) Cultures were incubated for 30 min with L-[³H]arginine (L-[³H]Arg) in the presence or absence of cycloheximide (CHX) (355.4 μ M) and further incubated for an additional period of 15 min in the absence of CHX (\square and \blacksquare) and stimulated for 15 min with CHX or CHX plus N^G-nitro-L-arginine (L-NA) (500 μ M) (\blacksquare) or NMDA (1 mM), L-NA (500 μ M), NMDA + APV (100 μ M) or NMDA + L-NA (\square). Other cultures (\blacksquare) were incubated for 30 min with L-[³H]Arg in the presence of CHX and stimulated for 15 min with NMDA and/or APV or L-NA still

in the presence of CHX. (b) Results in (a) were normalized by their respective controls. Control uptake levels were 337.8 ± 19.0 and 675.7 ± 111.8 fmol/mg protein, respectively, in the absence or presence of CHX. Incubation saline did not contain magnesium in all conditions in which NMDA was used. Results are expressed as the mean \pm SEM of three separate experiments. The letters denote statistical significance (b as compared with control without CHX; c as compared with control with CHX; a as compared with the indicated pairs) (one letter, $p < 0.05$; two letters, $p < 0.01$; three letters, $p < 0.001$).

Relation between protein synthesis and L-arginine biochemistry

Several studies have proposed a direct relationship between L-Arg transport and NO production (Wiesinger 2001), such as a fine tuning between constitutive transporters, inducible expression under special conditions and a photic regulation in the retina (Kakuda *et al.* 1998; Nicholson *et al.* 2001; Sáenz *et al.* 2002). Many authors searched for a good explanation for the 'arginine paradox' which states that the production of NO is increased by extracellular L-Arg even when intracellular L-Arg concentrations are high. Kurz and Harrison (1997) suggested that intracellular L-Arg could be sequestered in one or more pools that are poorly accessible to NOS, whereas extracellular L-Arg transported into cells is preferentially delivered to NO biosynthesis. It was demon-

strated that L-Arg derived from cells that usually do not express NOS, like glial cells, can be recruited after glutamatergic stimulation or depolarization and gives support to NO production in neurons (Grima *et al.* 1997, 1998; Vega-Agapito *et al.* 1999, 2002; Cossenza and Paes-de-Carvalho 2000). However, the question of how L-Arg pools are regulated is still obscure. McDonald *et al.* (1997) elegantly demonstrated the important role of caveolas on the compartmentalization of CAT-1 (a constitutive transporter for L-Arg) and the membrane-bound endothelial NOS (or NOS-III), providing direct evidence for a physical coupling between L-Arg influx and synthesis of NO. Lee *et al.* (2003) showed that a decreased availability of L-Arg blocks the induction of inducible NOS (or NOS-II) in cytokine-stimulated astrocytes. Inhibition of inducible NOS protein expression was due to

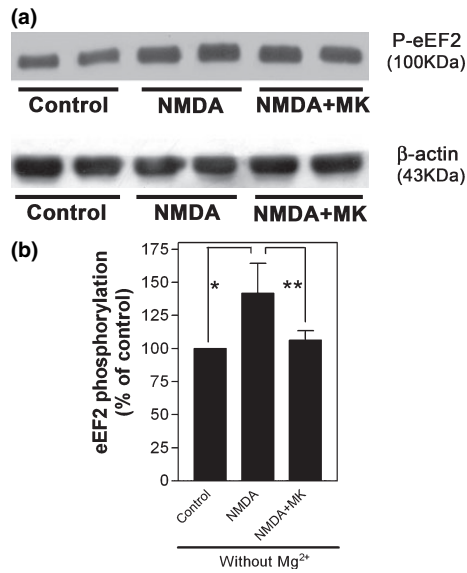


Fig. 7 Effect of NMDA on the phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2). Cultures were treated in the absence or presence of MK801 (MK) for 10 min and further incubated with NMDA (1 mM) for an additional 15 min before extraction and preparation for sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting. (a) Representative blot for phospho-eEF2 (P-eEF2) and corresponding control blotting with an antibody against β -actin. (b) Quantitative analysis of the results. Data were normalized to percentage of control and are the mean \pm SEM of five separate experiments. Asterisks denote statistical significance: * $p < 0.05$ compared with control and ** $p < 0.01$ compared with NMDA.

inhibition of translation of inducible NOS mRNA and the uptake of L-Arg negatively regulates the phosphorylation status of the eukaryotic initiation factor 2 alpha, suggesting an explanation for the 'arginine paradox'.

In the present study we demonstrated that protein synthesis represents an important driving force for L-Arg uptake. More than 70% of intracellular L-Arg is incorporated in proteins and when this incorporation is blocked by CHX the pools of intracellular free L-Arg increase. The availability of these pools was confirmed when a considerable increase of L-Cit production and release was detected in efflux experiments (Figs 2, 5 and 6). Hence, according to our results, proteins could play an active role in the compartmentalization of L-Arg pools working in the storage of this amino acid. Therefore, protein synthesis may arise as an intermediate step between L-Arg influx and the control of its intracellular pools available for the synthesis of signaling molecules in cellular compartments.

Regulation of protein synthesis and L-arginine availability by NMDA receptors

Several translation factors participate in the process of protein synthesis at the initiation, elongation and ending phases. Phosphorylation of the eEF2 results in its inactivation and may therefore represent an inhibition of protein

synthesis at the elongation stage (Ryazanov 2002). This phosphorylation is catalysed by a very specific eEF2K, a calcium/calmodulin-dependent enzyme (also called CAMKIII). It was suggested that intracellular calcium regulates the rate of protein synthesis by eEF2 inactivation. Recently, it was discovered that activation of ionotropic glutamate receptors promotes inhibition of protein synthesis through the influx of calcium and stimulation of eEF2K (Marin *et al.* 1997; Scheetz *et al.* 1997, 2000). In this study we found an inhibition of protein synthesis by NMDA, either using a [³⁵S]Met or an L-[³H]Arg incorporation assay (Fig. 3), probably mediated by calcium influx and activation of eEF2K. As evidence that this mechanism is present in our system we also showed that stimulation with NMDA increases phospho-eEF2 levels, an effect blocked by MK801 (Fig. 7). Curiously, together with this effect, NMDA also increases intracellular L-Arg concentration (Fig. 4). We also observed a large increase of intracellular L-Arg when protein synthesis was inhibited by CHX and no further increase by NMDA was detected under this condition (Fig. 4b), strongly suggesting that the increase of intracellular L-Arg mediated by NMDA is dependent on the inhibition of protein synthesis.

L-Arginine availability mediated by NMDA receptors and L-citrulline production

As discussed above, protein synthesis appears to be related to the regulation of free L-Arg intracellular pools. Therefore, it is possible that increases in such pools may serve for NOS to support the synthesis of NO. This hypothesis was confirmed when incubation with CHX promoted the formation of L-Cit, in a process which was completely blocked by L-NA (Fig. 5). We have also shown that intracellular pools of L-Arg could be mobilized by glutamate signaling, probably through an inhibition of protein synthesis. Hence, we propose that NMDA that classically promotes NOS activation through calcium–calmodulin complex formation also promotes NOS stimulation by increasing its substrate availability. This hypothesis was strengthened by the finding that the increase of L-Cit production by NMDA was smaller when cultures were incubated with CHX (Figs 5b and 6b). This could be explained by the existence of two different mechanisms: (i) mobilization of substrate for NOS through inhibition of protein synthesis mediated by NMDA receptors and (ii) activation of NOS by NMDA receptors after calcium influx and formation of calcium/calmodulin complex. In CHX-treated cultures we did not observe an NMDA-stimulated increase of L-Arg concentration as protein synthesis was not occurring and levels of free L-Arg were maximal.

L-Arginine levels and the regulation of nitric oxide synthase activity

Our present results indicate that an increase of intracellular L-Arg levels is able to promote an increase in the production

of L-Cit. We believe that the increase of L-Arg promoted by CHX or NMDA increases the maximal velocity (V_{\max}) of NOS. This is possible because the L-Arg concentration is far below the K_m and the enzyme kinetics are in the linear phase. Any increase of L-Arg would then promote an increase in V_{\max} . In a different way, activation of NMDA receptors, influx of calcium, formation of calcium/calmodulin complex and binding of this complex to the enzyme are able to activate the enzyme by lowering the K_m , i.e. increasing the affinity of L-Arg to its binding site in the enzyme. As a consequence, lower concentrations of L-Arg would be able to increase enzyme maximal velocities.

We were unable to measure control and stimulated levels of NO in our cultures by the Griess method, suggesting that these levels are low as shown in other areas of the CNS. On the other hand, TLC was shown to be a very reliable method of measuring the production of L-Cit in our cultures. Ientile *et al.* (1999) have shown that NMDA produces an increase of cGMP levels in the same cultures but their methods were unable to detect variations of intracellular and extracellular L-Arg and L-Cit concentrations as shown in the present study. Moreover, the relatively low levels of L-Cit observed in the present study could reflect levels of NO able to stimulate soluble guanylyl-cyclase and to produce large amounts of cGMP. Indeed, recent results from our laboratory (Mejía-García, Cossenza and Paes-de-Carvalho, unpublished observations) showed that the NO donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP), as well as exogenously added L-Arg or 3(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole (YC-1), a soluble guanylyl-cyclase stimulator, increased the phosphorylation of 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (AKT), a phenomenon mimicked by inhibition of protein synthesis by CHX. These results reinforce the idea that inhibition of protein synthesis and the consequent increase of intracellular L-Arg levels are able to produce increased NO levels which can promote biologically relevant responses such as accumulation of intracellular cGMP and activation of AKT.

Localization in retinal neurons

One important question concerning the mechanism proposed in this study is its localization in neurons or glial cells. Preliminary experiments using purified cultures of retinal neurons grown in the absence of glial cells showed that incubation with CHX promotes increases of 70% of extracellular L-Arg and around 30% of extracellular L-Cit. NMDA also promoted an increase of approximately 40% of extracellular L-Cit. These results strongly suggest that the mechanism of increase of NO production regulated by inhibition of protein synthesis induced by NMDA and increase of L-Arg availability is present in retinal neurons. However, more experiments are necessary to exclude the participation of glial cells in this process.

Local protein synthesis and nitric oxide production

Several lines of evidence indicate that many important proteins are synthesized locally in synaptic regions. Some of these proteins, such as CAMKII, are involved in phenomena such as long-term potentiation, long-term depression and synapse formation (Ouyang *et al.* 1999; Scheetz *et al.* 2000; Aakalu *et al.* 2001; Steward and Schuman 2001; Mendez and Wells 2002; Richter and Lorenz 2002; Steward and Worley 2002; Tang and Schuman 2002; Murray *et al.* 2003). Indeed, regulation of local protein synthesis by NMDA receptors could have important consequences during embryonic development. NO also has important effects during CNS development on events of cell proliferation and survival (Peunova and Enikolopov 1995) and also on the synaptic physiology of mature neurons as, for example, in the regulation of neurotransmitter release (Barcellos *et al.* 2000; Blackshaw *et al.* 2003; Stanton *et al.* 2003). Our present findings could have important consequences in these phenomena, establishing a new relationship between local regulation of protein synthesis and NO production.

Acknowledgements

We acknowledge Dr Jamil Assreuy for his critical review of the manuscript, and Ms Elaine C.B. Coelho and Ms Luzeli R. de Assis for technical assistance. This work was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPERJ and PRONEX/MCT. MC was the recipient of a graduate student fellowship from CNPq/Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ, DVC from CAPES and RNC an undergraduate fellowship from CNPq. RPDc is a Research fellow from CNPq.

References

- Aakalu G., Smith W. B., Nguyen N., Jiang C. and Schuman E. M. (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* **30**, 489–502.
- Barcellos C. K., Bradley P. M., Burns B. D. and Webb A. C. (2000) Effects of nitric oxide release in an area of the chick forebrain which is essential for early learning. *Dev. Brain Res.* **121**, 79–87.
- Blackshaw S., Eliasson M. J., Sawa A., Watkins C. C., Krug D., Gupta A., Arai T., Ferrante R. J. and Snyder S. H. (2003) Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience* **119**, 979–990.
- Boehning D. and Snyder S. H. (2003) Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 105–131.
- Bon C. L. and Garthwaite J. (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* **23**, 1941–1948.
- Bredt D. S. and Snyder S. H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3–11.
- Chen J., Tu Y., Moon C., Matarazzo V., Palmer A. M. and Ronnett G. V. (2004) The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev. Biol.* **269**, 165–182.
- Cossenza M. and Paes-de-Carvalho R. (2000) L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular

- localization in relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* **74**, 1885–1894.
- de Faria M. H., do Nascimento J. L. M. and Paes-de-Carvalho R. (1995) Biochemical characterization of NADPH-diaphorase in the chick embryo retina: stimulation by calcium ions and inhibition by arginine analogs. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**, 252–255.
- Grima G., Benz B. and Do K. Q. (1997) Glutamate-induced release of the nitric oxide precursor, arginine, from glial cells. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2248–2258.
- Grima G., Cuénod M., Pfeiffer S., Mayer B. and Do K. Q. (1998) Arginine availability controls the N-methyl-D-aspartate-induced nitric oxide synthesis: involvement of a glial-neuronal arginine transfer. *J. Neurochem.* **71**, 2139–2144.
- Hosoya K., Horibe Y., Kwang-Jim K. and Lee V. H. (1997) Na⁺-Dependent L-arginine transport in the rabbit conjunctiva. *Exp. Eye Res.* **65**, 547–553.
- Ientile R., Pedale S., Ginoprelli T., Cannavò L. and Macaione S. (1999) Intracellular polyamine levels are involved in NMDA-evoked nitric oxide production in chick retina cells. *J. Neurochem.* **72**, 1744–1749.
- Kakuda D. K. and MacLeod C. L. (1994) Na⁺-Independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. *J. Exp. Biol.* **196**, 93–108.
- Kakuda D. K., Finley K. D., Maruyama M. and MacLeod C. L. (1998) Stress differentially induces cationic amino acid transporter gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 75–84.
- Kandel E. R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030–1038.
- Kantor D. B., Lanzrein M., Stary S. J., Sandoval G. M., Smith W. B., Sullivan B. M., Davidson N. and Schuman E. M. (1996) A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science* **274**, 1744–1748.
- Kendrick K. M., Guevara-Guzman R., Zorrilla J., Hinton M. R., Broad K. D., Mimmack M. and Ohkura S. (1997) Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* **388**, 670–674.
- Kurz S. and Harrison D. G. (1997) Insulin and the arginine paradox. *J. Clin. Invest.* **99**, 369–370.
- Lee J., Ryu H., Ferrante R. J., Morris S. M. Jr and Ratan R. R. (2003) Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 4843–4848.
- MacLeod C. L. and Kakuda D. K. (1996) Regulation of CAT: Cationic Amino Acid Transporter gene expression. *Amino Acids* **11**, 171–191.
- MacLeod L. C., Finley K. D. and Kakuda D. K. (1994) y⁺-type cationic amino acid transport: expression and regulation of the mCat genes. *J. Exp. Biol.* **196**, 109–121.
- Marin P., Nastiuk K. L., Daniel N., Girault J. A., Czernik A. J., Glowinski J., Nairn A. C. and Premont J. (1997) Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3445–3454.
- McDonald K. K., Zharikov S., Block E. R. and Kilberg M. S. (1997) A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the 'arginine paradox'. *J. Biol. Chem.* **272**, 31 213–31 216.
- de Mello F. G. (1978) The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the chick retina. *J. Neurochem.* **31**, 1049–1053.
- Mendez R. and Wells D. (2002) Location, location, location: translational control in development and neurobiology. *Trends Cell Biol.* **12**, 407–409.
- Murray K. D., Isackson P. J. and Jones E. G. (2003) N-methyl-D-aspartate receptor dependent transcriptional regulation of two calcium/calmodulin-dependent protein kinase type ii isoforms in rodent cerebral cortex. *Neuroscience* **122**, 407–420.
- Nicholson B., Manner C. K., Kleeman J. and MacLeod C. L. (2001) Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J. Biol. Chem.* **276**, 15 881–15 885.
- Ouyang Y., Rosenstein A., Kreiman G., Schuman E. M. and Kennedy M. B. (1999) Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**, 7823–7833.
- Paes-de-Carvalho R. and Mattos J. C. (1996) Development of nitric oxide synthase in the avian retina. *Rev. Bras. Biol.* **56**, 145–152.
- Paes-de-Carvalho R., De Faria M. H., Do Nascimento J. L. M. and Hokoç J. N. (1996) Development of NADPH-diaphorase in the avian retina: regulation by calcium ions and relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* **67**, 1063–1071.
- Palacín M., Estevez R., Bertran J. and Zorzano A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* **78**, 969–1054.
- Palfrey H. C. and Nairn A. C. (1995) Calcium-dependent regulation of protein synthesis. *Adv. Sec. Mes. Phosphoprot. Res.* **30**, 191–223.
- Peunova N. and Enikolopov G. (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* **375**, 68–72.
- Pow D. V. (2001) Amino acids and their transporters in the retina. *Neurochem. Int.* **38**, 463–484.
- Proud C. G. (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5338–5349.
- Richter J. D. and Lorenz L. J. (2002) Selective translation of mRNAs at synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 300–304.
- Ryazanov A. G. (2002) Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives. *FEBS Lett.* **6**, 26–29.
- Sáenz D. A., Cymeryng C. B., De Nichilo A., Sacca G. B., Keller Sarmiento M. I. and Rosenstein R. E. (2002) Photic regulation of L-arginine uptake in the golden hamster retina. *J. Neurochem.* **80**, 512–519.
- Scheetz A. J., Nairn A. C. and Constantine-Paton M. (1997) N-methyl-D-aspartate receptor activation and visual activity induce elongation factor-2 phosphorylation in amphibian tecta: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in controlling protein synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 14 770–14 775.
- Scheetz A. J., Nairn A. C. and Constantine-Paton M. (2000) NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. *Nat. Neurosci.* **3**, 211–216.
- Schuman E. M. and Madison E. (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.* **17**, 153–183.
- Snyder S. H. and Ferris C. D. (2000) Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am. J. Psychiatry.* **157**, 1738–1751.
- Southam E. and Garthwaite J. (1991) Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. *Neuroreport* **2**, 658–660.
- Stanton P. K., Winterer J., Bailey C. P., Kyrozis A., Raginov I., Laube G., Veh R. W., Nguyen C. Q. and Muller W. (2003) Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *J. Neurosci.* **23**, 5936–5944.
- Steward O. and Worley D. (2002) Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol. Learn. Mem.* **78**, 508–527.
- Steward O. and Schuman E. M. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 299–325.
- Steward O. and Schuman E. M. (2003) Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* **40**, 347–359.
- Tang S. J. and Schuman E. M. (2002) Protein synthesis in the dendrite. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **357**, 521–529.

- Vega-Agapito V., Almeida A., Heales S. J., Medina J. M. and Bolanos J. P. (1999) Peroxynitrite anion stimulates arginine release from cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **73**, 1446–1452.
- Vega-Agapito V., Almeida A., Hatzoglou M. and Bolanos J. P. (2002) Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system $\gamma(+)$ in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J. Biol. Chem.* **277**, 29 753–29 759.
- Wells D. G. and Fallon J. R. (2000) In search of molecular memory: experience-driven protein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1335–1339.
- Wiesinger H. (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **64**, 365–391.
- Williams J. M., Guevremont D., Kennard J. T., Mason-Parker S. E., Tate W. P. and Abraham W. C. (2003) Long-term regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits and associated synaptic proteins following hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* **118**, 1003–1013.
- Yoshioka Y., Yamamuro A. and Maeda S. (2003) Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death via cGMP signaling pathway. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 28–34.

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](#)