

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

**OCTAVIA MALTA CAVERSAN**

***REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES  
DO RECEPTOR NMDA EM CULTURAS DE RETINA***

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

**Orientador: Roberto Paes de Carvalho**

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

OCTAVIA MALTA CAVERSAN

***REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES  
DO RECEPTOR NMDA EM CULTURAS DE RETINA***

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 parcial para obtenção de grau  
de Mestre em Neuroimunologia.

Orientador: Roberto Paes de Carvalho

Niterói  
2008

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).

“Enquanto eu tiver perguntas e não houver respostas... continuarei a  
escrever”  
(Clarice Lispector)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me conduziu a essa vitória, dando-me força para enfrentar todas as dificuldades para poder chegar até aqui, concluindo esta pós-graduação. Obrigada por todas minhas conquistas, sem a tua presença em minha vida nada disso seria possível!

Aos meus pais, Jucelino e Grace, pelo grande incentivo, amor e dedicação. A determinação de vocês me proporcionou essa vontade de lutar e vencer na vida! Sem vocês nada disso seria possível! Amo muito vocês! Obrigada por tudo e pela confiança que sempre depositaram em mim!

A minha querida irmã, Ramayanna, que mesmo com esse seu jeitinho tímido sempre esteve na torcida pelo meu sucesso. Amo muito você!

Aos meus familiares, pelo apoio dado nas horas difíceis. Obrigada pelo carinho sempre oferecido por vocês!

Um agradecimento especial à Jajá. Valeu por todo aprendizado que sempre compartilhou comigo. Pode acreditar, eu aprendi muita coisa com você! Obrigada pela paciência em me aturar, até mesmo ai de longe, sei que essa tarefa não foi nada fácil! Te adoro!

Ao meu orientador Roberto Paes-de-Carvalho, pela confiança e paciência oferecida durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pela oportunidade e pela ajuda!

A minha querida amiga Mariana, pela ajuda nos momentos difíceis, sua amizade foi muito importante para a conclusão deste lindo trabalho! Obrigada Diego, um amigo generoso, pela ajuda e por compartilhar o computador de vocês comigo! Sei que perturbei muito vocês!risos.

A Joszi, Poliana por todos os momentos que vivemos juntas nesses sete anos. Foi muito bom conhecer vocês, espero que nossa amizade perdure por muito tempo. Gosto muito de vocês! Não poderia esquecer da Samar, obrigada pelo carinho!

Aos amigos do laboratório: Alexandre, Cristiane, Rafael, Eliza, Elisa, Vivian, Renato, Camila, Raquel, Ana e Sarah pela paciência e incentivo que sempre me ofereceram quando às vezes ou melhor, quase sempre, eu parecia estar um “pouquinho estressada” quando ia realizar qualquer atividade no laboratório! E ao Pablo e Daniel que não são do nosso Laboratório mas sempre me apoiaram, foi maravilhoso poder contar com a ajuda de vocês! Obrigada pelo carinho!

A minha amiga Priscilla, obrigada pelo apoio e carinho que sempre me ofereceu.

A minha amiga “fisioterapeuta” Mariana, pelo carinho e incentivo!

A todos os outros que por ventura não foram citados. Muito obrigado!

A Deus, pela proteção e força presente  
nessa minha trajetória em todos os momentos de  
minha vida.

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio  
incondicional, amor e dedicação. Amo muito  
vocês!!



## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	ix
Abstract	xi
1- Introdução	1
1.1- Modelo Experimental	1
1.1.1- A Retina	1
1.2- O Glutamato como Neurotransmissor no SNC	4
1.3- Receptores Glutamatérgicos	5
1.3.1- Receptores Metabotrópicos	5
1.3.2- Receptores Ionotrópicos	7
1.3.2.1- Receptores Ionotrópicos do tipo Não-NMDA	7
1.3.2.2- Receptor de NMDA	8
1.3.2.2.1- Estrutura do Receptor de NMDA	9
1.3.2.2.2- Sítios Regulatórios	16
1.3.2.2.3- Excitotoxicidade por Glutamato	21
1.4- Adenosina	25
1.4.1- Os Receptores de Adenosina	26
2- Objetivos	29
3- Materiais e Métodos	31
3.1- Materiais	31

3.2- Culturas	32
3.2.1- Culturas em Monocamada	32
3.2.2- Culturas purificadas de Neurônios	33
3.3- Tratamento com Drogas	35
3.4- Dosagem de Proteína pelo Método de Bradford	34
3.5- Eletroforese e Análises de Western Blot	35
3.6- Captação de $^{45}\text{Ca}^{+2}$	38
3.7- Técnica de Ligação ao Receptor de NMDA	39
3.8- Determinação do Teor de Radioatividade	40
3.9- Ensaio de Excitotoxicidade	40
4- Resultados	42
4.1- Efeito da Incubação Crônica com DPMA e ZM na Expressão da Subunidade NR2B	42
4.2- Efeito dos Tratamentos Agudo e Crônico com Ifenprodil na Ligação de $(^3\text{H})$ MK-801 ao Receptor de NMDA	46
4.3- Efeito dos Tratamentos crônico e agudo com Ifenprodil no Influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ pelo Receptor de NMDA	49
4.4- Efeito do Tratamento Crônico com Ifenprodil e DPMA na Expressão das Subunidades NR2A E NR1	52
4.5- Efeito do Tratamento Crônico com MK-801 e Ifenprodil na Expressão da Subunidade NR1	53
4.6- Efeito da Incubação Crônica e Aguda com Ifenprodil na Prevenção da Morte Induzida pelo Glutamato em Culturas Purificadas de Neurônios	57

5- Discussão	60
6- Considerações Finais	71
7- Perspectivas	73
8- Referências Bibliográficas	75

## RESUMO

O receptor NMDA (NMDAR) tem papel fundamental no desenvolvimento e fisiologia do Sistema Nervoso Central. O arranjo das subunidades NR1, NR2 e NR3 (sNR1, sNR2 e sNR3, respectivamente) formam o canal receptor. A sNR2 regula a atividade do receptor e o estudo de sua expressão é importante para o entendimento da função do receptor. Neste trabalho estudamos a expressão da sNR2B em culturas de retina e sua regulação por ativação crônica de receptores  $A_{2a}$  de adenosina ( $A_{2a}R$ ). Estudamos também o efeito do bloqueio crônico da sNR2B na expressão das sNR1 e sNR2A. Culturas mistas de células da retina de embrião de galinha foram incubadas com ( $^3H$ )MK-801, um ligante de canal do NMDAR, para avaliar a presença destes receptores na membrana. A exposição aguda de culturas ao ifenprodil ( $10\mu M$ ), um antagonista da sNR2B, promoveu um bloqueio quase total na ligação (para  $7,8 \pm 2,6\%$  do controle). No entanto, o tratamento crônico (72 horas) com este composto promoveu um aumento de  $19,7 \pm 2,2\%$  na ligação. O influxo de  $^{45}Ca^{+2}$  estimulado por NMDA + glicina ( $1mM$ ) foi também usado para medir a atividade do NMDAR. O tratamento agudo por 10 minutos com ifenprodil ( $10\mu M$ ) promoveu queda no influxo estimulado, que passou de  $317,5 \pm 6,1\%$  para  $168,3 \pm 4,4\%$  do controle. O tratamento por 72 horas com ifenprodil ( $100nM$ ) promoveu um aumento de 87% na estimulação. De modo interessante, análises de western blot mostraram uma diminuição de  $16,9 \pm 5,2\%$  na expressão da sNR2A, um aumento de  $7,9 \pm 3,1\%$  da sNR1 e  $150,0 \pm 7,3\%$  da sNR2B. Nossos trabalhos prévios mostraram que o tratamento crônico com DPMA, agonista de  $A_{2a}R$ , promoveu uma diminuição na expressão das sNR1. Neste trabalho, mostramos um aumento de  $189,8 \pm 17,6\%$  na expressão da sNR2B sob a mesma condição. Os resultados indicam que: 1) sNR2A e sNR2B estão presentes formando o canal do NMDAR nas culturas; 2) a expressão de diferentes subunidades do receptor é regulada pela ativação de  $A_{2a}R$  e pelo bloqueio crônico das sNR2B. Os resultados sugerem que o bloqueio das sNR2B promove um retardo na composição de receptores contendo sNR2A, modificando a expressão NMDAR durante o desenvolvimento.

## ABSTRACT

The NMDA receptor (NMDAR) has a fundamental role during development and in the physiology of the central nervous system. It is formed by co-assembly of NR1, NR2 and NR3 subunits (sNR1, sNR2 and sNR3, respectively). The sNR2 regulates receptor activity and the study of mechanisms involved in its expression is of great importance for understanding receptor function. In this work we studied the expression of sNR2B in retina cultures and its regulation by chronic activation of A2a adenosine receptors (A2aR). We also studied the effect of chronic blockade of this subunit in the expression of sNR1 and sNR2A. Mixed cultures of chick embryo retinal cells were incubated with (<sup>3</sup>H)MK-801, a ligand of the NMDAR channel, in order to evaluate the presence of NMDARs. Acute exposure of cultures to ifenprodil (10 μM), an sNR2B antagonist, did promote an almost total blockade in the binding to  $7.8 \pm 2.6\%$  of control. However, the chronic treatment (72 hours) with this compound promoted an increase of  $19.7 \pm 2.2\%$  in the binding. <sup>45</sup>Ca<sup>+2</sup> influx stimulated by NMDA + glycine (1mM) was also used to measure NMDAR activity. Acute treatment of cells with ifenprodil (10μM) inhibited from  $317.5 \pm 6.1\%$  to  $168.3 \pm 4.4\%$  the stimulation of influx. When cultures were treated for 72 hours with ifenprodil (100nM), an increase of 87% in the stimulation was observed. Interestingly, western blot analysis of these cultures showed a decrease of  $16.9 \pm 5.2\%$  in sNR2A expression, an increase of  $7.9 \pm 3.1\%$  of sNR1 and  $150.0 \pm 7.3\%$  of sNR2B. Our previous work showed that the chronic treatment of cultures with the A2aR agonist DPMA promotes a decrease in the expression of sNR1. However, we show here an increase of  $189.8 \pm 17.6\%$  in sNR2B expression under the same conditions. These results indicate that i) sNR2A and sNR2B are present forming the NMDAR channel in the cultures; ii) the expression of different receptor subunits are under regulation by activation of A2aRs or the chronic blockade of sNR2B. The results suggest that sNR2B blockade promotes a delay in the sNR2A appearance in the NMDAR composition during development.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$A_{1/2/3}$ :	receptor de adenosina do tipo 1, 2, 3.
$A_{2a/b}$ :	receptor de adenosina do tipo 2 A, B.
AMPA:	alfa amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato.
AMP:	adenosina 3'-5' monofosfato.
AMPC:	adenosina 3'-5' monofosfato cíclico.
APV:	ácido 2-amino-5-fosfovalérico.
ATP:	adenosina 5'-trifosfato.
BME:	meio básico de Eagle.
BSA:	albumina sérica bovina.
$Ca^{+2}$ :	íon cálcio.
$^{45}Ca^{+2}$ :	íon de cálcio radioativo.
CAMKII:	Proteína cinase II dependente de cálcio e calmodulina
cDNAs:	ácido desoxirribonucleico complementar.
C1/4/8:	primeiro, quarto ou oitavo dia de cultura.
CHA:	ciclohexiladenosina.
CMF:	salina sem cálcio e magnésio.
CO <sub>2</sub> :	gás carbônico.
cpm:	cintilação por minuto.
DCG-IV:	(2S, 1R, 2R, 3R)-2-(dicarboxiciclopropil) glicina.
DHPG:	3,5-dihidroxifenilglicina.
DNQX:	6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-diona.
DPMA:	N <sup>6</sup> -[2-(3,5--Dimetoxifenil)-]-2-(metilfenil)etil]adenosina

ECL:	quimioluminescência aumentada
E8:	oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário.
E.P.M.:	erro padrão da média.
ERK :	proteína cinase ativada por sinais extracelulares.
GABA:	ácido gama amino butírico.
GluR:	subunidade do receptor ionotrópico de glutamato do tipo não-NMDA.
Gi:	proteína G inibitória da adenilil- ciclase.
G0:	proteína G sem ação sobre a enzima adenilil- ciclase.
Gs:	proteína G estimulatória adenilil- ciclase.
Hepes:	ácido (n[2-hidrxietil] piperazina N'-[2-etanosulfônico]).
( <sup>3</sup> H) MK-801:	5R,2S)-(+)-5-Metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imine hidrogênio maleato radioativo.
Kainato:	Ácido 2-carboxi-4-(1-metiletetil)-3-pirrolidinacético.
KA <sub>1/2</sub> :	subunidade do receptor ionotrópico de glutamato do tipo não-NMDA (Kainato) do tipo n ( n= 1, 2).
L-AP4:	ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico.
LTP:	potenciação de longo termo/ longa duração.
MEM:	Meio essencial mínimo.
MgluRs:	receptores metabotrópicos de glutamato
MgluR:	receptor metabotrópico de glutamato.

MK801:	(5R,2S)-(+)-5-Metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imine hidrogênio maleato.
NMDA:	N-metil-D-aspartato.
NMDAR:	Receptor N-metil-D-aspartato.
NR:	subunidade do receptor ionotrópico de glutamato do tipo NMDA.
NR1:	subunidade NR1 do receptor de glutamato do tipo NMDA.
NR2:	subunidade NR2 do receptor de glutamato do tipo NMDA.
PPO:	2,5 difeniloxazol.
PKA :	proteína cinase dependente de AMPc.
PKC :	proteína cinase dependente de Ca <sup>+2</sup> .
PSD-95:	proteína de densidade pós-sináptica de peso 95 kDa.
PVDF:	difluoreto de polivinilideno.
S.E.M.:	desvio padrão da média.
SFB :	soro fetal bovino.
SDS:	dodecil sulfato de sódio.
SNC:	Sistema Nervoso Central.
sNR1:	Subunidade NR1 do NMDAR.
sNR2:	Subunidade NR2 do NMDAR.
sNR3:	Subunidade NR3 do NMDAR.
TBS:	salina tamponada por tris.
TBS-T:	salina tamponada de tris acrescido de tween.
Tris:	[hidroximetil]amino-metano.



# **1- INTRODUÇÃO**

## **1.1-MODELO EXPERIMENTAL**

### **1.1.1- A Retina**

A retina de embrião de galinha é um bom modelo experimental, devido à presença de células que reproduzem atividades dos sistemas bioquímicos encontrados no encéfalo, estando organizada de forma a receber e modular estímulos luminosos externos que atuam sobre os fotorreceptores na forma de fótons, como mostrado na figura 1.

O conhecimento da histologia da retina, bem como a acessibilidade em diferentes etapas do desenvolvimento, diminui a probabilidade de contaminação com tecidos adjacentes. A presença de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, assim como a descrição de receptores glutamatérgicos na retina de vertebrados (Watkins, 1989) (figura 2), conferem à retina o status de um modelo experimental em potencial para o estudo de mecanismos de origem excitatória que constantemente ocorrem no SNC, podem levar à instalação de um quadro patológico. E ainda, a existência de um mecanismo de acúmulo de AMPc dependente de adenosina já evidenciado em cultura mista de neurônios e células

da glia (de Mello *et al.*, 1982), confirma a existência do sistema purinérgico nesse modelo experimental.

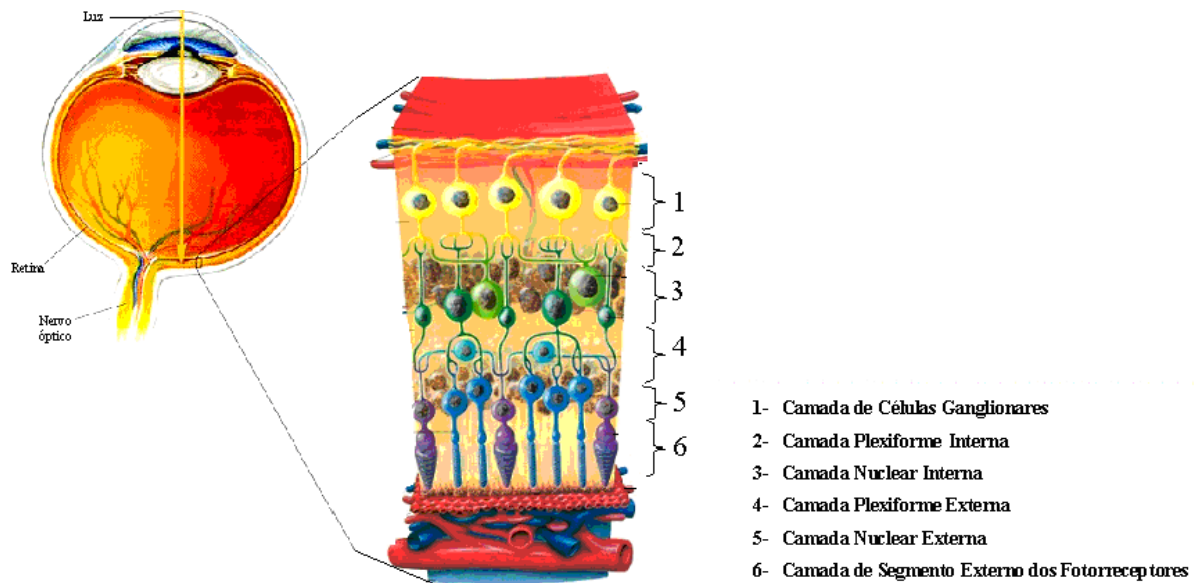


Fig.1. Diagrama das camadas das células retinianas. A disposição das células da retina em camadas é decorrente da laminação que ocorre durante o desenvolvimento embrionário. A glia de Muller atravessa todas as camadas com exceção à camada de células fotorreceptoras. (Modificado de Bear *et al.*, 2002).

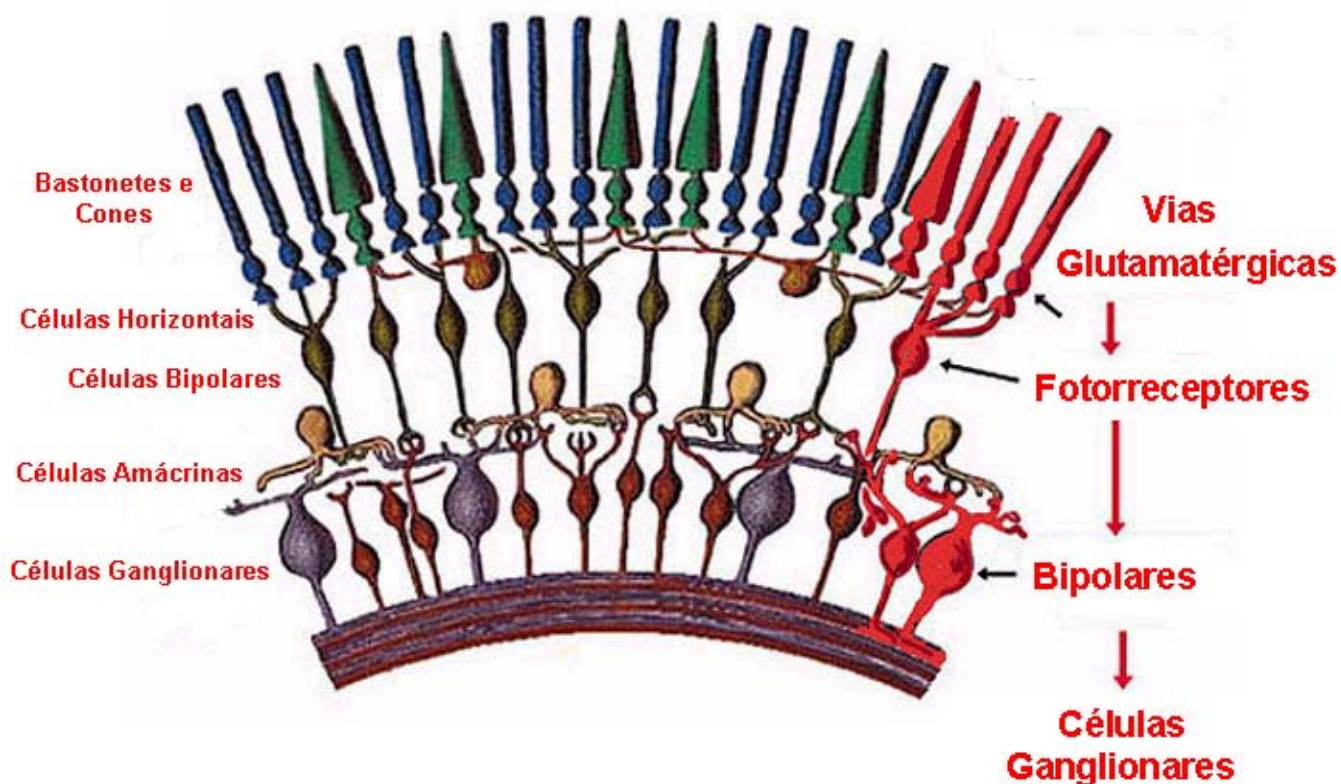


Fig.2. Representação do diagrama das células retinianas: bastonetes; cones; células horizontais; células bipolares; células amácrinas; células ganglionares. A via glutamatérgica se estende desde fotorreceptores passando por células bipolares até as ganglionares. (Modificado de <http://webvision.med.utah.edu/imageswv/GLU13.jpeg>).

Uma das vantagens adicionais deste modelo experimental é a possibilidade das retinas serem dissecadas e dissociadas e as células poderem ser mantidas em cultura por vários dias. Estas células mantêm muitas propriedades neuroquímicas do tecido *in vivo* (de Mello *et al.*, 1982; Paes-de-Carvalho e de Mello, 1985; Paes-de-Carvalho, 1990). Estas características são determinantes para estudos bioquímicos e biológicos de neurônios em desenvolvimento

(Coloumbre, 1955). A retina pode então ser utilizada para obtenção de culturas, sejam elas purificadas de neurônios/glias ou mistas.

## **1.2-O GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISSOR NO SNC**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) (Mayer e Westbrook, 1987). 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). Existem ainda outras moléculas como o cisteínato, homocisteínato e quinolato que são indicados como neurotransmissores excitatórios (Robson e Coyle, 1987).

O L-glutamato, em estágios precoces do desenvolvimento, parece estar envolvido na determinação de morte ou sobrevivência de neurônios enquanto na fase adulta, dentre outras funções, está envolvido em mecanismos de formação da memória, aprendizado e plasticidade sináptica. O excesso de glutamato no meio extracelular promove ativação constante de receptores, principalmente do subtipo NMDA, desencadeando um processo de neurotoxicidade que ocorre durante os períodos de hipoglicemia e isquemia (Choi e Rothman, 1990).

### **1.3- RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS**

Os receptores de glutamato são divididos em duas classes principais: metabotrópicos e ionotrópicos. Estes últimos podem ainda ser divididos em NMDA e não-NMDA. Os receptores não-NMDA por sua vez são subdivididos em AMPA e kainato.

#### **1.3.1- RECEPTORES METABOTRÓPICOS**

Os receptores metabotrópicos, de ação lenta, mobilizam vias de segundo-mensageiros, o que se deve à ligação a enzimas de membrana (Monaghan *et al.*, 1989; Schoepp *et al.*, 1990; Watkins *et al.*, 1990). Sendo assim, a ligação do agonista ao receptor é o sinal dado à célula e a amplificação deste sinal ocorre por ativação da cascata de segundo mensageiros. A ação observada por ativação do receptor permanece ainda por algum tempo após o retorno do nível do segundo mensageiro ao basal. Os sistemas nervosos central e periférico parecem exibir a maior variedade e quantidade destes receptores. O quadro 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.

O grupo de receptores metabotrópicos do tipo III ativados por L-AP4, regula a produção de AMPc em retina de embrião de pinto, assim como em retina de pintos pós-eclosão (Sampaio e Paes-de-Carvalho, 1998).

Subtipos	Grupos	Agonista seletivo	Via transducional
MgluR1 MgluR5	I	DHPG	Ativa a fosfolipase C
MgluR2 MgluR3	II	DCG-iV	Inibição da adenilil ciclase
MgluR4 MgluR6 MgluR7 MgluR8	III	L-AP4	Inibição da adenilil ciclase

Quadro 1. Divisão dos subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato em grupos por afinidade de ligação a agonistas seletivos e via intracelular mobilizada (Hammond, 1996).

### **1.3.2-RECEPTORES IONOTRÓPICOS**

Os receptores ionotrópicos são responsáveis pelo componente de ação rápida do SNC (Monaghan et al., 1989; Schoepp et al., 1990; Watkins et al., 1990). A ligação do neurotransmissor ao seu receptor provoca uma alteração da permeabilidade e no potencial de membrana gerando efeitos rápidos e transitórios no SNC. Entre os receptores do tipo ionotrópico (canais iônicos), são descritos três subtipos: receptores AMPA, Kainato e NMDA.

#### **1.3.2.1- RECEPTORES IONOTRÓPICOS DO TIPO NÃO-NMDA**

A classificação dos receptores não-NMDA em AMPA e kainato se deve a moléculas pelas quais estes apresentam grande afinidade. Estes receptores possuem arranjos multiméricos de quatro subunidades. A clonagem molecular identificou em cérebros de ratos e camundongos os cDNAs que codificam para quatro subunidades que compõem a estrutura dos receptores AMPA. Este passo tornou viável a identificação destas subunidades: GluR-1 a GluR-4 ou GluR-A a GluR-D (Nakanishi, 1992).

Em relação ao receptor kainato, foram clonadas subunidades classificadas em GluR-5 a GluR-7 e KA-1 e KA-2, sendo que a homologia entre estas subunidades e as próprias de receptores AMPA sugere tratar-se de uma mesma família de receptores (Nakanishi, 1992).

Existem restrições na formação dos receptores de kainato, é conhecido que homômeros formados pelas subunidades KA1 e KA2 não são funcionais, entretanto quando estas subunidades formam heterômeros com as subunidades GluR5, GluR6 e GluR7, receptores funcionais são formados (Werner *et al.*, 1991; Herb *et al.*, 1992). Por outro lado, as subunidades GluR5-GluR7 formam canais iônicos homoméricos funcionais (Sommer *et al.*, 1992; Egebjerg e Heinemann, 1993; Schiffer *et al.*, 1997).

Receptores do tipo AMPA não apresentam permeabilidade a íons divalentes na maioria das vezes, este fato se deve a presença constante da subunidade GluR2 na formação dos receptores AMPA, além de sua independência de voltagem para inserção na membrana (Hume *et al.*, 1991), bem como a existência de um sítio Q/R que está fortemente envolvido no controle da condutância e seletividade iônica (Verdoon *et al.*, 1991; Burnashev *et al.*, 1992).

### **1.3.2.2- RECEPTOR NMDA**



O receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) é uma glicoproteína composta por diferentes subunidades sendo essas NR1(1-8), NR2(A-D) e NR3(A-B) (Schuler *et al.*, 2007). Além disso, apresentam ampla distribuição no SNC, sendo este receptor especialmente ativo durante o desenvolvimento. Encontrado desde estágios muito precoces do embrião, o receptor NMDA exerce papel determinante na sinalização de sobrevivência ou morte dos neurônios, além de crescimento e diferenciação celular (Ikonomidou *et al.*, 1999). Na vida adulta, a ativação do receptor está associada à formação de memória, fenômeno de potenciação de longa duração (LTP), assim como plasticidade neural (Collingridge e Bliss, 1987; Olney, 1989; Wood *et al.*, 1990; Scatton, 1993). Em episódios patológicos como os de acidentes vasculares, sejam eles de origem isquêmica ou hemorrágica, uma grande quantidade de glutamato e ao mesmo tempo adenosina são liberados para o meio extracelular, naturalmente ocorrendo a ativação constante dos receptores de glutamato e ao mesmo tempo de receptores de adenosina (Fatokun *et al.*, 2007; Hoehn e White, 1990).

#### **1.3.2.2.1- ESTRUTURA DO RECEPTOR NMDA**

Os receptores NMDA constituem a principal classe de canais abertos por glutamato no Sistema Nervoso Central (SNC). A disposição espacial das subunidades que compõem o receptor forma o canal iônico que apresenta alta

seletividade para o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sendo também permeável para o sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). Além de ser um canal iônico dependente de ligante, é também dependente de voltagem devido à presença de um íon magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) que tem como função exercer o bloqueio do canal deste receptor. Sendo assim, a ativação do receptor NMDA depende diretamente da despolarização da membrana por ativação de receptores AMPA e Kainato, bem como a ligação de seu agonista (Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004)

O receptor é constituído de subunidades heteroméricas classificadas em NR1, NR2 e NR3, sendo a NR3 recentemente descrita (Bliss e Collingridge, 1993; Seeburg, 1993; Mori e Mishina, 1995; Ciabarra *et al.*, 1995; Nishi *et al.*, 2001; Schuler, 2007;). A subunidade NR1 é codificada por um único gen e apresenta o sítio de ligação para a glicina, o seu co-agonista (Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004). No entanto, esta subunidade apresenta variantes que são geradas por "splicing" alternativo (Sugihara *et al.*, 1992) e, desta forma, a subunidade NR1 é subdividida em 8 diferentes tipos (NR1a - NR1h). Esta subunidade é expressa em muitos neurônios em todo SNC, está presente em todos os estágios do desenvolvimento, sendo ainda passível de inibição pelo  $\text{Zn}^{2+}$  e possui permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Moriyoshi *et al.*, 1991; Nakanishi, 1992). Existe ainda na cauda C-terminal da subunidade NR1 a sinalização que determina a liberação ou a retenção no retículo endoplasmático, sendo por isso sua presença obrigatória aonde existir receptor NMDA funcional (Carroll e

Zukin, 2002; Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004). Existe ainda a necessidade da co-expressão das subunidades NR1, NR2 e/ou NR3 para a formação do arranjo de receptor NMDA funcional, embora tendo sido recentemente mostrado (Chatterton *et al.*, 2002) que o arranjo das subunidades NR1 e NR3 formam um novo receptor controlado pela glicina (Papadakis *et al.*, 2004). Além disso, os “splices” variantes de NR1 podem influenciar fortemente as propriedades dos receptores NMDA. Por exemplo, a sensibilidade dos receptores NMDA ao pH é determinada pela presença do exon 5 localizado na região amino terminal da subunidade NR1. Em pH fisiológico, subunidades NR1 que possuem o exon 5 são completamente ativadas, devido à menor susceptibilidade à inibição do receptor NMDA por prótons (Cull-Candy *et al.*, 2001).

A subunidade NR2 é codificada por 4 diferentes genes apresentando subunidades NR2A-NR2D que são expressas de maneira específica em tipos celulares, apresentando distribuição bem caracterizada no SNC. Além disso, a subunidade NR2 apresenta o sítio de ligação para o glutamato, o seu agonista, e ainda é considerada a subunidade regulatória da atividade do receptor NMDA (Cull-Candy *et al.*, 2001). A presença de diferentes subunidades NR2 na formação do receptor NMDA confere distintas características nas propriedades do bloqueio ao íon magnésio, na cinética de dessensibilização, na afinidade aos agonistas e antagonistas, na endocitose e nos efeitos de fosforilação (Nagy *et al.*, 2004; Kutsuwada *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1992).

Existe na cauda C-terminal das subunidades NR2 a sinalização que determina a localização sináptica e o processo de internalização dos receptores NMDA. A expressão da subunidade NR2B é predominante no início do desenvolvimento, formando receptores NMDA localizados preferencialmente em regiões extrasinápticas (Cull-Candy *et al.*, 2001). Por outro lado, a subunidade NR2A é mais expressa em estágios tardios do desenvolvimento com uma localização mais restrita a regiões sinápticas, embora também seja expressa em regiões extrasinápticas (Cull-Candy *et al.*, 2001; Tovar e Westbrook, 1999; Liu *et al.*, 2004). O nível de expressão das subunidades NR2 difere de acordo com o local. A subunidade NR2A é mais expressa no córtex e cerebelo, enquanto a subunidade NR2B é mais predominante no prosencéfalo (Stephenson, 2001). A expressão da subunidade NR2C está restrita principalmente ao cerebelo maduro, enquanto que a subunidade NR2D é mais abundante no tálamo jovem (Cull-Candy *et al.*, 2001).

Cada subunidade apresenta particularidades que caracterizam a funcionalidade do receptor NMDA. Foi demonstrado que receptores NMDA formados pelo arranjo de subunidades NR1, NR2A e NR2B apresentam alta condutância ao cálcio e ainda uma alta sensibilidade ao bloqueio extracelular pelo íon  $Mg^{2+}$ , sendo expressos na grande parte da região cerebral, bem como em regiões CA1 do hipocampo e prosencéfalo (Cull-Candy *et al.*, 2001; Stephenson, 2001). A co-expressão das subunidades NR1, NR2C e NR2D

conferem ao receptor uma menor condutância e sensibilidade ao cálcio e ao íon  $Mg^{2+}$  respectivamente.

A expressão da subunidade NR3 é codificada por dois gens (Cull-Candy *et al.*, 2001) e, desta forma, ela é subdividida em 2 tipos diferentes (NR3A – NR3B). A subunidade NR3A apresenta um variante que é gerado por "splicing" alternativo (Stephenson, 2001). Além disso, os receptores NMDA compostos de subunidades NR1 e NR3 exercem funções como receptores excitatórios, porém são ativados exclusivamente pela glicina (Chatterton *et al.*, 2002; Madry *et al.*, 2007). Durante o desenvolvimento, a subunidade NR3B é expressa principalmente nas regiões do hipocampo, amígdala e cerebelo (Sun *et al.*, 1998). Já nos estágios tardios ocorre uma maior detecção em neurônios motores e uma menor expressão nas regiões do hipocampo e cerebelo (Niemann *et al.*, 2007).

A natureza heteromérica dos receptores NMDA foi evidenciada através da demonstração de que receptores são funcionais somente quando ambas as subunidades NR1 e NR2 são introduzidas em culturas de oócitos de *Xenopus* (Meguro *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1992). Trabalhos recentes mostraram que a co-expressão das subunidades NR1 e NR3 em oócitos também apresentam receptores NMDA funcionais mesmo exibindo apenas o sítio de ligação da glicina (Chatterton *et al.*, 2002; Smothers e Woodward, 2003). No entanto, foi mostrado que transfecção das subunidades NR1/NR3 em mamíferos não produz

receptor NMDA funcional (Nishi *et al.*, 2001; Matsuda *et al.*, 2002, Smothers e Woodward, 2003). Assim como a subunidade NR1, a subunidade NR3 não forma receptor NMDA funcional quando é expressa individualmente. Embora as subunidades NR3 também possuam o sítio de ligação para glicina assim como a subunidade NR1, foi mostrado que nenhuma corrente é ativada pela glicina ou glutamato quando a subunidade NR3 é expressa com qualquer subunidade NR2 (Smothers e Woodward, 2007). Conclui-se que seja necessária a expressão da subunidade NR3 em combinação com as subunidades NR1 e NR2 para originar receptores NMDA funcionais (Perez-Otano *et al.*, 2001; Smothers e Woodward, 2007). Além disso, foi demonstrado que a co-expressão de subunidades NR3A ou NR3B com NR1 e NR2 em sistemas de expressão recombinante diminui a corrente via receptor NMDA (Chatteron *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2007) e reduz a permeabilidade ao cálcio (Matsuda *et al.*, 2002).

A maturação pós-natal de sinapses excitatórias envolve mudanças na composição e funcionalidade dos receptores glutamatérgicos. A subunidade NR2B é expressa em estágio embrionário tardio, assim como em estágio inicial do desenvolvimento pós-natal de roedores. Coincidente com este período é descrito uma rápida sinaptogênese no córtex e baixa razão de expressão sináptica AMPA/NMDA (Hall *et al.*, 2007). Como citado anteriormente, a associação das diferentes subunidades NR2 confere cinética de correntes características do receptor. Além disso, através de seus domínios

citoplasmáticos são capazes de ativar diferentes vias intracelulares (Monyer *et al.*, 1992; Vicini *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2002; Barria e Malinow, 2005; Kim *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005). Hall *et al.*, (2007) mostraram que a baixa razão sináptica AMPA/NMDA, descrita exatamente no período em que os receptores NMDA no córtex expressam NR2B como a subunidade NR2 predominante, está associada à limitação da expressão das TARPS, proteínas necessárias para o tráfego e inserção dos receptores AMPA na membrana pós sináptica. No entanto, a via intracelular ativada pelo receptor NMDA contendo NR2B não está definida. Neste trabalho fica claro que o bloqueio da expressão da subunidade NR2B por “knockdown” usando RNA de interferência aumenta a corrente mediada por receptores AMPA.

Receptores NMDA compostos pelas subunidades NR2A e NR2B parecem ter importantes papéis em doenças neurodegenerativas associadas com a excitotoxicidade (Kemp e McKernan, 2002; Lynch e Guttman, 2001). A ativação de subtipos compostos por NR2B é importante para a degeneração neuronal seletiva observada na doença de Huntington (Zeron *et al.*, 2002), enquanto camundongos “knockout” para NR2A são menos sensíveis a injúria após uma isquemia cerebral (Morikawa *et al.*, 1998).

O estudo da regulação da atividade do receptor NMDA pela subunidade NR2B é de grande importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos na funcionalidade deste receptor. Dessa maneira, o esclarecimento da sua

participação nestes mecanismos poderia ser crucial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em doenças neurodegenerativas.

#### **1.3.2.2.2- SÍTIOS REGULATÓRIOS**

As propriedades farmacológicas e fisiológicas dos receptores NMDA são parcialmente determinadas pelos tipos de subunidades NR2 presentes no complexo. O canal iônico do receptor NMDA apresenta pelo menos seis sítios distintos de interação com grupos moleculares diferentes que são responsáveis por uma intensa modulação sináptica, projetada em alteração ao fluxo de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ .

Glutamato e a glicina, considerados respectivamente, o agonista e co-agonista do receptor NMDA não competem pela mesma subunidade, em função do fato de ligar-se a sítios distintos. O glutamato liga-se especificamente na subunidade NR2, enquanto o sítio de ligação à glicina se encontra na subunidade NR1 (Schell *et al.*, 1997). Ambos, quando ligados ao receptor NMDA, modulam positivamente a sua atividade (Cull-Candy e Leszkewicz, 2004). A constatação de que a D-serina tem alta afinidade pelo sítio da glicina (Schell *et al.*, 1995) sugere que a D-serina seja um co-agonista endógeno deste sítio. Além disso, devido a sua presença ser abundante no SNC, principalmente no prosencéfalo e



cerebelo (Schell, 2004), a D-serina seria considerada o ligante endógeno para o sítio de glicina do receptor NMDA (Mothet *et al.*, 2000).

O zinco bloqueia seletivamente correntes mediadas pelos receptores NMDA, sendo considerado um antagonista não-competitivo. Foi demonstrado em culturas neuronais que o  $Zn^{+}$  em baixas concentrações consegue inibir correntes mediadas pelo receptor NMDA de maneira independente de voltagem. Isto se deve ao fato do seu sítio de alta afinidade estar presente na face externa do receptor. A ação do  $Zn^{+}$  inibe a ligação de compostos de canal aberto como o MK801 pela diminuição tanto da taxa de associação e dissociação destes ligantes como pela diminuição da ligação da glicina (Yeh *et al.*, 1990; Christine *et al.*, 1990; Monahan e Michel, 1987; Reynolds e Miller, 1988).

O receptor NMDA ainda pode sofrer regulação por fosforilação e ativação de receptores acoplados à proteína G, além da participação de proteínas cinases como a PKC que fosforila um sítio específico na face interna do canal e com isso modula sua atividade (Gogas, 2006; Carroll e Zukin, 2002).

O sítio das poliaminas está localizado na região extracelular da subunidade NR2B que quando ligado à espermidina ou espermina facilita a transmissão mediada pelo receptor NMDA (Ransom e Stec, 1988). Estudos de eletrofisiologia mostraram que as poliaminas aumentam as correntes que passam pelo canal, assim como a frequência de abertura do canal e a afinidade da glicina pelo seu sítio (Rock e Macdonald, 1992; Sacaan e Jonhson, 1989).

Em condições de acidificação do meio extracelular, existe uma inibição seletiva do receptor, devido à protonização dos seus sítios externos, resultando em variação na frequência de ativação do canal (Mott *et al.*, 1998). Em situações de lesão celular, como na isquemia, existe uma acidificação considerável do espaço extracelular pelo acúmulo de prótons. Por isso, durante a toxicidade em meio acidificado a contribuição dos receptores NMDA é reduzida.

O ifenprodil, um antagonista não competitivo do receptor NMDA, vem sendo descrito como um ligante seletivo ao domínio N-terminal da subunidade NR2B, independente de voltagem e seus efeitos ainda estão sendo discutidos. A potência de sua inibição depende fortemente do pH extracelular, e quando se liga especificamente na subunidade NR2B diminui a ativação dos receptores NMDA por aumentar sua sensibilidade à inibição por prótons, que atuam como moduladores endógenos negativos. Além disso, o ifenprodil estabiliza o estado de dessensibilização do receptor, por bloquear o sítio de ligação da espermina, além de inibir a ligação da glicina e ainda promover transições para um estado de não condutância do canal (Cull-Candy *et al.*, 2001; Mott *et al.*, 1998).

O MK-801 também é capaz de antagonizar seletivamente o receptor NMDA, sendo considerado um ligante não-competitivo e de alta afinidade do canal. Seu sítio está localizado na luz do canal e por isso a ligação deste composto ocorre apenas quando o receptor NMDA encontra-se aberto pela presença do agonista, caracterizando-o assim como um ligante de canal aberto

(Kornhuber e Weller, 1997). Existem ainda antagonistas competitivos como, por exemplo, o APV uma droga que bloqueia seletivamente a atividade do receptor NMDA pela competição do sítio de ligação do agonista, o glutamato.

Em condições fisiológicas normais, o canal do receptor NMDA está fechado, o que se deve ao bloqueio exercido pelo  $Mg^{2+}$  em condições de hiperpolarização da membrana, fortalecendo a dependência de voltagem. Em resumo para ser ativado, o receptor NMDA necessita que ocorram dois fenômenos simultâneos: 1) primeiro deve ocorrer uma despolarização da célula, pois este canal é bloqueado pelo íon magnésio de maneira voltagem-dependente; 2) esta despolarização pode ser gerada pela ativação prévia dos receptores de 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 do glutamato e da glicina para que o receptor NMDA se torne fisiologicamente ativado (Kornhuber e Weller, 1997). Os sítios regulatórios de ligantes endógenos e exógenos do receptor NMDA são mostrados na figura 3.

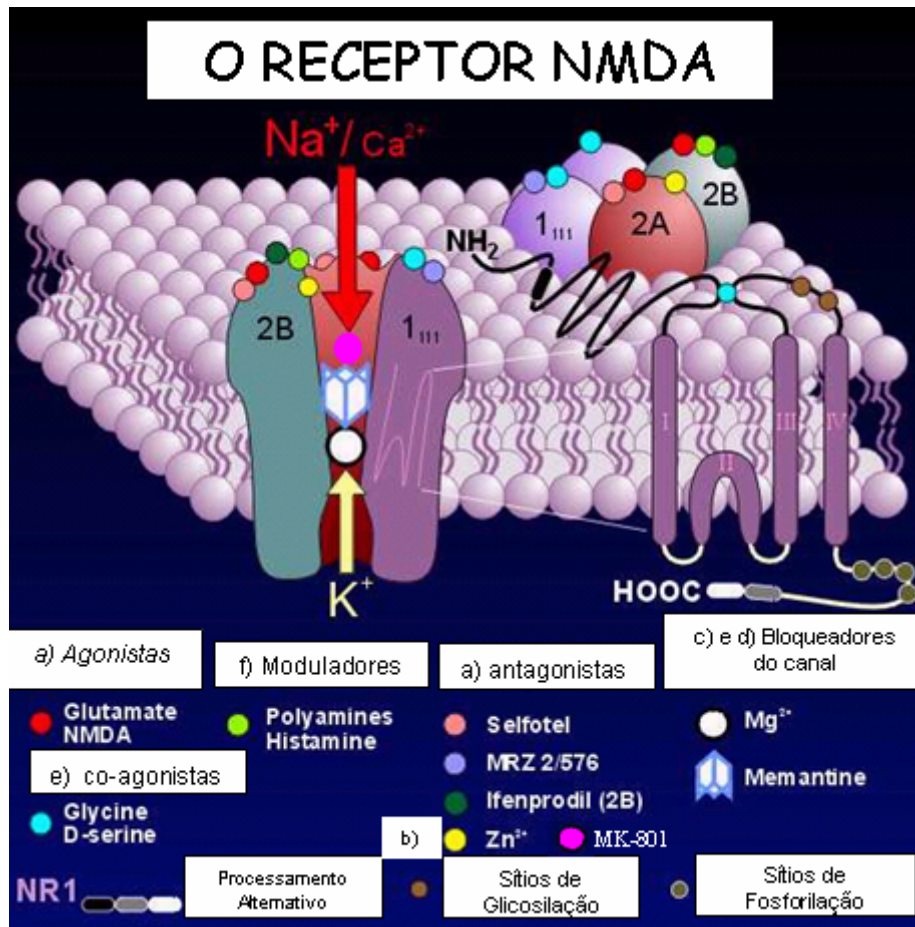


Figura 3. Figura representando os sítios de ligação do receptor NMDA. Modificada de figura disponível na página: <http://www.chris-parsons.onlinehome.de/nmda.htm>. (a) Sítio de ligação de agonistas e antagonistas. (b) Sítio de interação com íons divalentes localizado na superfície externa do receptor onde o zinco bloqueia de maneira independente de voltagem (Mayer *et al.*, 1989). (c e d) Sítio de interação com íons divalentes na face interna do canal iônico, onde o Mg<sup>2+</sup> interage com a subunidade da molécula receptora exercendo bloqueio sobre o canal na ausência de estímulos despolarizantes (Nowack *et al.*, 1984). (e) Sítio de ligação à D-serina, sensível à espermidina e insensível à estriquinina, modulando positivamente a atividade do canal, aumentando a resposta NMDA (Johnson e Ascher, 1987). (f) Sítio regulatório para ligação das poliaminas, onde a espermina ou espermidina quando ligada facilita a transmissão mediada pelo receptor NMDA (Ransom e Stec, 1988).

### 1.3.2.2.3- EXCITOTOXICIDADE POR GLUTAMATO

O envolvimento de receptores NMDA em processos de morte celular nas doenças degenerativas do SNC como Alzheimer, Parkinson, além de hipóxia e hipoglicemia tem sido descrito freqüentemente (Choi e Rothman, 1990; Meldrum e Garthwaite, 1990; Dawson *et al.*, 1991). Existe ainda a explicação de que esta variedade de processos desencadeados pela ativação do receptor NMDA dependa crucialmente da composição das subunidades (Moriyoshi *et al.*, 1991; Kutsuwada *et al.*, 1992; Sugihara *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1992; Hollmann, 1999).

O NMDA é o principal receptor envolvido em excitotoxicidade, de forma que os antagonistas destes receptores bloqueiam este fenômeno. O excesso de glutamato no meio extracelular promove ativação constante de receptores, principalmente do subtipo NMDA, desencadeando este processo (Chalmers *et al.*, 1990; Cowburn *et al.*, 1990) (Figura 4). A entrada de  $Ca^{2+}$  é uma etapa necessária no processo de excitotoxicidade (Eirmerl e Schramm, 1994; Hartley *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1989). O aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  citoplasmático, sustentada por duradoura abertura do canal NMDA, deflagra o processo excitotóxico através de diferentes vias intracelulares, sejam elas: ativação de proteases e lipases intracelulares, despolarização da membrana da mitocôndria (Dessi *et al.*, 1993; Louzada *et al.*, 1992), inibição da síntese de

ATP pela mitocôndria, e ainda aumento da geração de radicais livres (Bindokas *et al.*, 1996; Dugan *et al.*, 1995; Dykens., 1994; Gunter *et al.*, 1994; Nicholls, 1985; Reynolds e Hastings, 1995).

A subunidade NR2B é encontrada interagindo com PSD-95 (figura 5), proteína encontrada na região de densidade pós-sináptica, que quando ligada a NR2B bloqueia a ligação desta subunidade com a CaMKII (cinase dependente de cálcio calmodulina do tipo II), e dessa forma a ativação da subunidade NR2B é bloqueada (Kornau *et al.*, 1995).

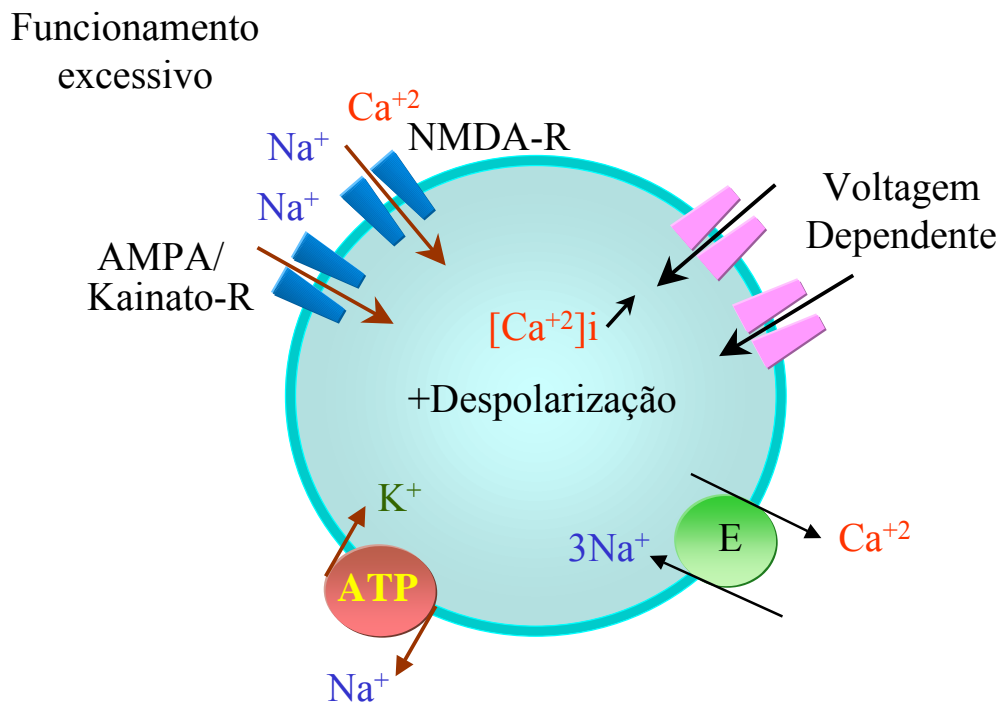


Fig.4. Esquema de mecanismo excitotóxico desencadeado por ativação constante de receptores de glutamato e tentativas da célula de reestabelecer o funcionamento normal. (Adaptado de Rang *et al.*, 2001).

## Receptor NMDA

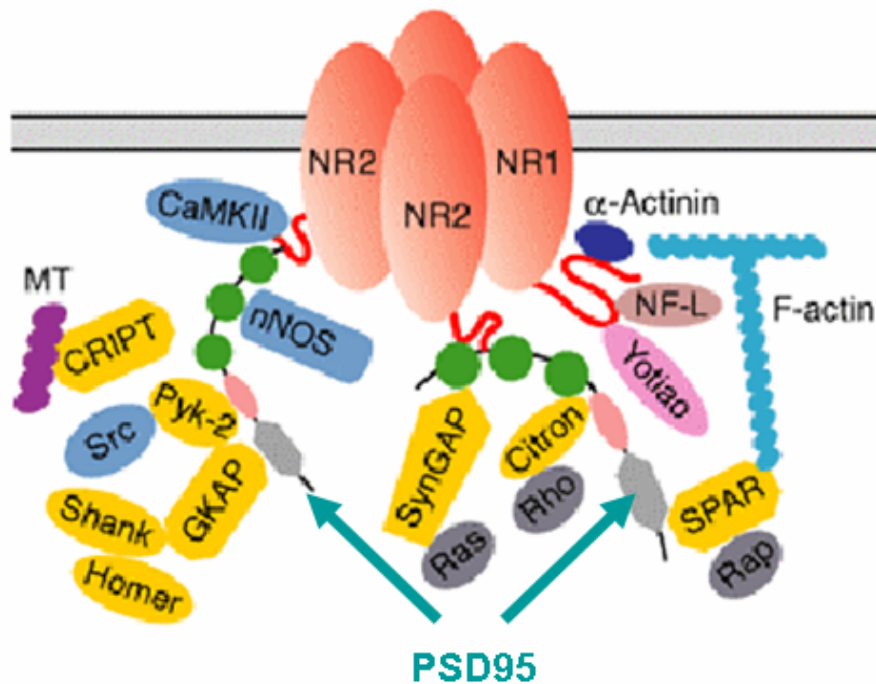


Figura 5: Interação do receptor NMDA com a Proteína de Densidade Pós-sináptica de peso 95 Kda (PSD-95). (Adaptado de Expert Reviews in Molecular Medicine @2003 Cambridge University Press). Disponível na página: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03007105h.htm>.

Dentre as características do evento neurotóxico, o aumento da associação da CaMKII à subunidade NR2 é importante, uma vez que esta associação torna o receptor ativado por mais tempo (Gardoni *et al.*, 2002). Desta forma, a deficiência da PSD-95 aumenta a ligação da cinase à subunidade NR2B do receptor NMDA. Este evento molecular está associado ao aumento da morte de células neuronais (Gardoni *et al.*, 2002). A proximidade de receptores AMPA nos sítios pós-sinápticos e sua presença em grandes quantidades na membrana

das células, além da já descrita atividade aumentada por ação da CaMKII durante os processos de potencialização de longo termo (Leonard *et al.*, 1999), poderiam então atuar em conjunto com o receptor NMDA no aumento do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$ .

In vitro, a autofosforilação da CaMKII aumenta a afinidade de ligação para a subunidade NR2B (Strack *et al.*, 1998) sugerindo fortemente que é a subunidade NR2B, e não NR2A ou NR1, a responsável pela autofosforilação dependente da translocação de CaMKII (Meng e Zhang, 2002).

Ao mesmo tempo em que ocorrem os eventos neurotóxicos, a célula exhibe mecanismos de defesa em resposta a estes eventos. Estudos realizados no nosso laboratório mostraram que a aplicação de glutamato em culturas purificadas de neurônios de retina reduziu em 80% a quantidade de células, e que esta morte pode ser inibida por aplicação de um antagonista do canal iônico formado pelas subunidades componentes do receptor, o MK801, elevando a sobrevivência das células para 100%, ou seja, bloqueando totalmente o efeito disparado pelo glutamato (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001). Uma vez que há variabilidade na presença das subunidades NR2 compondo o receptor e que a expressão destas confere diferentes características farmacológicas e fisiológicas, é interessante identificar o envolvimento de uma subunidade específica no disparo da morte induzida por glutamato.



Como apontado anteriormente, a CaMKII fosforila a subunidade NR2B, promovendo a ativação sustentada do receptor, e assim o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é aumentado e mantido pelo tempo de ativação do receptor. Dessa forma, a possibilidade de causar neurotoxicidade aumenta consideravelmente.

#### **1.4- ADENOSINA**

A adenosina é um nucleosídeo purínico que atua em diversos sistemas orgânicos como cardiovascular, nervoso, urogenital, respiratório e digestivo (Ralevic e Burnstock, 1998; Roman e Fitz, 1999; van Belle *et al.*, 1997). No sistema nervoso central, age como um neurotransmissor/neuromodulador alcançando altas concentrações no meio extracelular durante episódios de isquemia e hipóxia (Phillis e Wo, 1981). Está envolvida, também, em processos de sobrevivência e morte celular (Zhou *et al.*, 1994; Sebastião e Ribeiro, 1992; Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001). A adenosina é transportada de forma tanto dependente como independente de  $\text{Na}^+$ . Em algumas situações, o ATP é hidrolisado e forma adenosina no meio extracelular (Jarvis e Yong, 1986). Esta é transportada para o interior da célula e metabolizada em inosina pela adenosina deaminase. Além disso, a adenosina ainda pode sofrer ação da adenosina cinase levando à produção de AMP.

Durante o processo neurotóxico existe uma grande liberação de adenosina para o meio extracelular. A adenosina exerce efeito protetor da excitabilidade excessiva por glutamato. Esta proteção por adenosina inicialmente está associada à ativação dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina (Ribeiro, 1989). No entanto, a ativação crônica dos receptores A<sub>2a</sub> de adenosina parece exercer efeito protetor sobre as células em cultura purificada de neurônios (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001). Além disso, a expressão do receptor NMDA é diminuída quando o receptor A<sub>2a</sub> é ativado por longo tempo em culturas mistas de neurônio e glia (Ferreira e Paes-de-Carvalho, dados não publicados).

#### **1.4.1- OS RECEPTORES DE ADENOSINA**

Adenosina ativa quatro diferentes receptores: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (figura 6) sendo que todos eles estão acoplados à proteína G (Fredholm *et al.*, 2001). Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> acoplados à proteína G<sub>i</sub> e/ou G<sub>o</sub> inibem a adenilil ciclase e A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, acoplados à proteína G<sub>s</sub>, estimulam a adenilil ciclase (Van Calker *et al.*, 1979; Bruns *et al.*, 1980; Londos *et al.*, 1980). O receptor A<sub>1</sub> é amplamente distribuído por todo o SNC com grande concentração no hipocampo e córtex. Já o A<sub>2</sub> está presente no “striatum” e o receptor A<sub>3</sub> encontra-se em baixas concentrações no hipocampo e cerebelo (Fredholm, 2000). Os receptores A<sub>1</sub> também são expressos em regiões como glândula adrenal, fígado, rins, tecido

adiposo, músculo esquelético, dentre outras. Os receptores A3 encontram-se presentes nos mastócitos, pulmão, tireóide, glândula adrenal, fígado, rins, coração e intestino. Já os receptores A2a são encontrados no timo, em leucócitos e plaquetas, no coração e pulmão, enquanto que os receptores A2b estão em mastócitos, tecido adiposo, glândula adrenal, rins e fígado (Fredholm *et al.*, 2001).

Os receptores de adenosina estão envolvidos no bloqueio da liberação de neurotransmissores excitatórios produzindo um efeito neuroprotetor durante episódios de isquemia e hipóxia, atuando assim em processos de sobrevivência celular (Berne *et al.*, 1971; Radegran e Hellsten, 2000). Este achado fez crescer o interesse acerca do papel da adenosina e surgiram mais evidências de que esta seria uma possível molécula neurotransmissora/neuromoduladora.

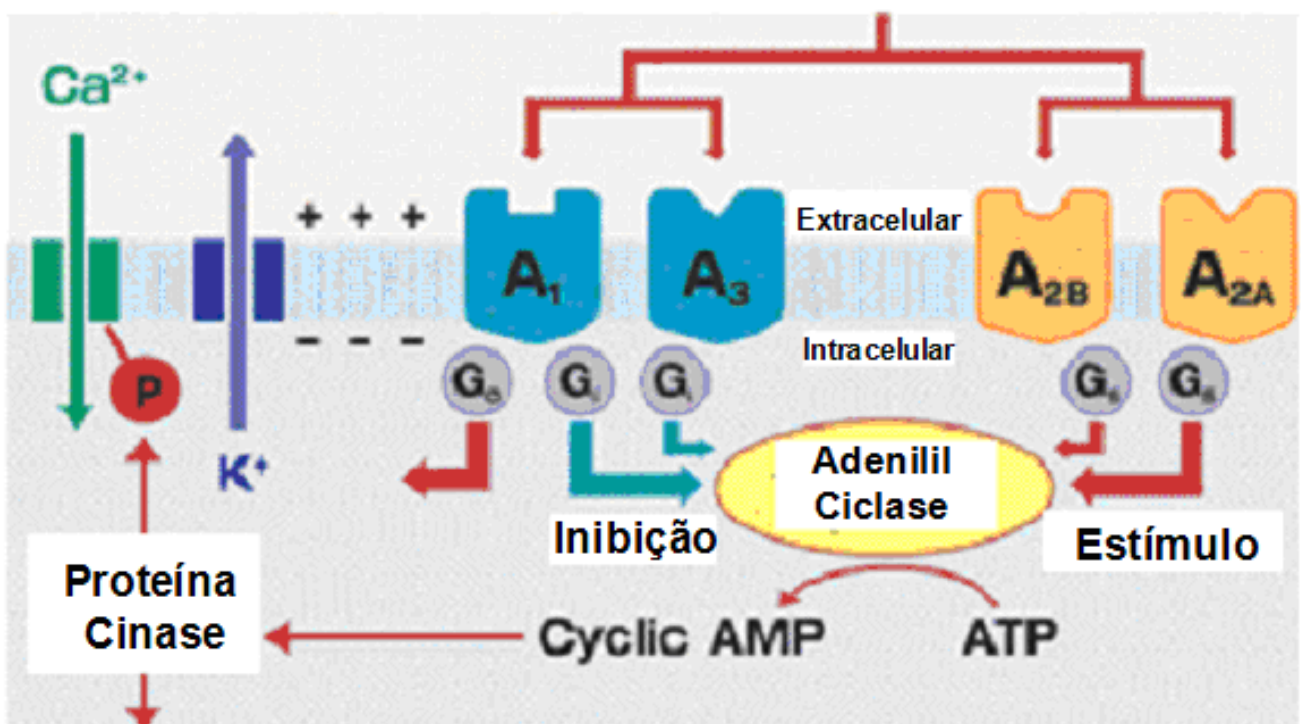


Figura 6: Receptores de adenosina. Os receptores  $\text{A}_1$  e  $\text{A}_3$  de adenosina estão acoplados às proteínas  $\text{G}_i/\text{G}_o$  e os receptores  $\text{A}_2$  de adenosina estão acoplados à proteína  $\text{G}_s$ . Disponível na página: (modificado de [http://www.aderis.com/img/art\\_adenosine.gif](http://www.aderis.com/img/art_adenosine.gif)).

## 2 – OBJETIVOS

Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que culturas purificadas de neurônios de retina de pinto mantidas em meio BME apresentavam morte quando incubadas com glutamato 1mM. No entanto, o uso de antagonistas deste receptor conferiu proteção de cerca de 80% das células desafiadas com 1mM de glutamato. Além disso, o pré-tratamento de culturas purificadas de neurônios com adenosina foi capaz de protegê-los da excitotoxicidade (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001). Foi demonstrado ainda que a ativação crônica do receptor A2a de adenosina reduziu a detecção da proteína da subunidade NR1 (Modulação purinérgica da expressão dos receptores NMDA em culturas de retina de aves, tese de doutorado, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2005).

A partir destes dados surgiu a hipótese de que o sistema purinérgico pudesse estar modulando o receptor NMDA. Assim, a próxima etapa do trabalho teve como objetivos:

- ◆ Estudar a regulação da expressão da subunidade NR2A, NR2B e NR1 em culturas de retina.
- ◆ Investigar o efeito do tratamento crônico com agonista dos receptores A2a de adenosina na expressão das subunidades NR2A e NR2B comparando com a NR1.
- ◆ Analisar o efeito do bloqueio da subunidade NR2B na prevenção da morte dos neurônios induzida pelo tratamento com glutamato em culturas purificadas de neurônios.
- ◆ Estudar o efeito do bloqueio da subunidade NR2B no controle da expressão das subunidades NR1 e NR2A.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1-MATERIAIS:

Ovos de galinha fertilizados da espécie White Leghorn eram obtidos de um aviário local e mantidos em incubadora a 38°C. O N<sup>6</sup>-[2-(3,5-dimetoxifenil)-2-(2-metilfenil)-etil] denosina (DPMA), DNQX-6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione, penicilina, estreptomicina, dimetil sulfóxido (DMSO) e poli L-ornitina foram obtidos da Sigma/RBI Chem.Co. (St. Louis). MK801-(5R,2S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate foi adquirido da DuPont (Boston, MA, EUA), <sup>45</sup>Ca<sup>+2</sup> foi adquirido de Amersham Biosciences – UK. O Glutaraldeído 25% da Fluka Chemie (Steinheim-Switzerland). Os anticorpos anti-NR1, anti-NR2A e anti-NR2B foram gentilmente cedidos pelo professor Richard Huganir do Departamento de Neurociências, Universidade Johns Hopkins, USA. O Tris, acrilamida PAGE, metilenobisacrilamida,

mercaptoetanol, hyperfilm, o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase e kit ECL foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire, Inglaterra). O anticorpo anti-Erk total foi obtido da Cell Signaling (Boston, Estados Unidos). O BME, MEM, tripsina, CMF e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da GIBCO (Nova York, Estados Unidos). A tripsina usada na cultura purificada foi obtida da Worthington. Os outros reagentes utilizados eram de pureza analítica.

### 3.2- CULTURAS:

#### 3.2.1-CULTURAS EM MONOCAMADA

As culturas foram realizadas de acordo com de Mello (1978). Retinas de embrião de pinto de 8 dias (E8) de desenvolvimento embrionário eram dissecadas dos outros tecidos para realização das culturas mistas. As retinas foram dissecadas em solução salina livre de cálcio e magnésio (CMF), NaCl 131mM, KCl 4,1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,45mM, glicose 12,2mM, NaHCO<sub>3</sub> 9,4mM, e transferidas para um tubo onde o tecido foi exposto à tripsina 0,1% por 15min a 37°C. As células foram suspensas em meio de cultura (MEM) suplementado com 3% de soro fetal bovino inativado, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100ug/mL) e dissociadas mecanicamente com



auxílio de uma pipeta de 5 mL. Em seguida, essa suspensão de células foi distribuída em placas de 40 mm de diâmetro a uma densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/mm<sup>2</sup>. Estas culturas eram compostas por neurônios e células gliais. As culturas de células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> e usadas após 3 dias em cultura. O meio das placas de cultura era trocado a cada dois dias.

### 3.2.2-CULTURAS PURIFICADAS DE NEURÔNIOS

As culturas purificadas de neurônios e fotorreceptores de retina de embrião de pinto de 8 dias eram preparadas de acordo com Adler e colaboradores em 1984. As retinas eram dissecadas em solução salina CMF e transferidas para um tubo onde o tecido foi exposto à tripsina 0,1% por 15min a 37°C. A dissociação das células era feita com pipeta Pasteur de ponta afilada, com 1 mL de meio. O meio de cultura utilizado foi o BME suplementado com 4% de soro fetal bovino, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100ug/mL). Ao fim da dissociação adicionava-se 5 mL de BME sem soro, e uma alíquota desta suspensão de células era recolhida e diluída 10 vezes, e, então, levada ao microscópio para contagem de células. A suspensão de células era diluída adequadamente em BME sem soro e plaqueadas em placas previamente tratadas com poli L-ornitina com o objetivo de manter a aderência dos neurônios e

bloquear o crescimento da glia (Sigma/RBI Chem. Co) contendo metade do volume final de BME com soro. A densidade final era de  $8,32 \times 10^2$  células/mm<sup>2</sup>. Em seguida, as culturas eram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>/95% ar, sem nenhuma troca de meio e usadas após 3 dias de cultura.

### 3.2.3- TRATAMENTO COM DROGAS

O tratamento crônico era realizado no primeiro dia de cultura (C1) e o agudo no terceiro dia de cultura (C3). Em C1, as células foram tratadas com DPMA (100nM), Ifenprodil (100nM), ZM-241385 (100nM), ZM-241385+ DPMA (100nM) e MK-801 (1μM). Para o tratamento agudo, foi usado somente Ifenprodil (10μM) em C3 ou C4 por, 10, 25 ou 30 minutos antes da adição do NMDA ou do glutamato. No ensaio de excitotoxicidade o tratamento com glutamato (1mM) era realizado em C3 por 8 horas.

### 3.2.4- DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

O teor de proteína das amostras era dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) recolhidas em 100μL de tampão de amostra [SDS (0,3g),

glicerol (1mL), 2-mercaptoetanol (0,1mL) tris (0,5M,pH 6,8-1,25mL) e H<sub>2</sub>O(10mL)]. Eram colocados em tubos de vidros, 2 $\mu$ L das amostras e em seguida eram acrescentados 3mL de reagente de Bradford[ Etanol 95% (50mL), Cromassie Brilliant Blue G-250 (100mg), Ácido Fosfórico 85% (100mL) e H<sub>2</sub>O(900mL)]. Para realização da curva padrão, eram adicionados nos tubos de vidro 2 (dois), 4 (quatro), 6 (seis) e 10 (dez)  $\mu$ g de BSA (1mg/mL). Um tubo era deixado como branco sem adição de proteína. Em seguida, eram adicionados 2 $\mu$ L do tampão de amostra SDS (usado nos experimentos) e ainda 3mL de reagente de Bradford. Posteriormente, as misturas eram agitadas em vortex e a leitura de absorbância era realizada em espectrofotômetro com filtro de 595nm. O espectrofotômetro era calibrado com água. Em seguida, o branco (apenas o reagente de Bradford) era lido. Durante as leituras, cada tubo era lavado com água milli-Q seguido de álcool 70% a fim de evitar misturas das amostras e assim garantir uma leitura fidedigna com as concentrações obtidas na dosagem das proteínas.

### 3.2.5- ELETROFORESE E ANÁLISES POR WESTERN BLOT

Em C3, o meio de cultura das células foi removido e as células lavadas com solução salina Hanks' duas vezes. Uma solução tampão SDS-PAGE era

adicionada a cada placa (100 µl). As células eram lisadas por esta solução, retiradas 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, era aplicado no topo do gel de poliacrilamida-SDS a 8% volume de amostra equivalente a 30µg de proteína. O procedimento para a eletroforese em gel de poliacrilamida era baseado na técnica descrita por Laemmli (1970). O gel de separação era preparado para um volume de 9 mL e uma concentração final de acrilamida de 9 %. O gel de concentração era preparado para um volume de 3 mL e uma concentração final de acrilamida de 4,5 %. O tampão de corrida utilizado (1000 mL) continha Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1 %). Durante a corrida a amperagem era mantida constante em 10 mA por 3 horas. O gel era retirado da placa onde ocorreu a polimerização e em seguida era posto em contato com uma membrana de PVDF para onde as proteínas eram transferidas. A transferência das proteínas para membranas PVDF era baseada na técnica descrita por Towbin e colaboradores em 1979. Imediatamente após a corrida, o gel era incubado em tampão de transferência junto com a membrana por 30 minutos (Hybond-p, Amersham), após esta ter sido hidratada por 10 segundos em metanol a 100%. Cinco folhas de papel de filtro, nas dimensões do gel a ser transferido, eram também incubadas em tampão de transferência (solução contendo Tris, 25 mM; glicina, 192 mM; metanol, 10% (V/V)). Em seguida, o sistema de transferência era montado de

acordo com as instruções do fabricante. Sobre a grade do aparelho eram colocados, nesta ordem: 2 folhas de papel de filtro, membrana de PVDF, gel, 2 folhas de papel de filtro. Durante a montagem, tinha-se o cuidado de remover todas as bolhas entre os componentes do sistema. A transferência era realizada a 4°C durante 1 hora em voltagem constante de 60 V. Após a transferência, as membranas eram mantidas a 4°C em TBS (Tris, 50mM; NaCl,150mM) até a incubação com anticorpos específicos.

A membrana de PVDF era incubada inicialmente em solução tampão TBS contendo leite em pó desnatado, 5 %, durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação suave. Com este procedimento era prevenida a ligação de anticorpos a sítios inespecíficos na membrana de PVDF. Após este período, a membrana era lavada uma vez por cinco minutos com tampão TBS-T (TBS contendo 0,1% de Tween 20). Em seguida, a membrana era incubada por pelo menos 12 horas a 4°C, com o anticorpo primário anti-NR2B (anticorpo policlonal anti-humano feito em coelho), diluído na proporção de 1:100 em solução tampão TBS-T contendo leite em pó desnatado, 5%. Outros anticorpos primários usados eram o anti-NR2A (anticorpo policlonal feito em coelho) diluído na proporção de 1:200, o anti-NR1 (anticorpo policlonal feito coelho) na diluição de 1:300 em TBS-T e o anti-Erk total (anticorpo policlonal feito em coelho) na diluição de 1:5000.

A membrana, previamente incubada com anticorpo primário para as subunidades do receptor NMDA, era lavada em solução TBS-T três vezes por 10 minutos e então incubada com o anticorpo secundário (anti-coelho diluído na proporção de 1:3000 em solução TBS-T, conjugados à peroxidase, contendo leite em pó desnatado, 5%) por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas eram lavadas da seguinte maneira: 2 lavagens com TBS-T por 10 minutos e por último uma lavagem com TBS apenas por mais 10 minutos.

A imunodeteccção das subunidades NR2B, NR2A, NR1 e da Erk total eram promovidas pela reacção quimioluminescente do sistema ECL para western blotting (Amersham-Pharmacia). Após a incubação da membrana com uma mistura de soluções de deteccção por 4 minutos à temperatura ambiente, o excesso do reagente era retirado com cuidado e a membrana era, então, envolvida em filme de PVC e exposta imediatamente ao filme Hyperfilme (Amersham Biosciences UK Ltd ), por curtos intervalos de tempo, que era revelado para obtenção de uma imagem auto-radiográfica adequada.

### 3.2.6- CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{+2}$

Nos estudos de captação, as células eram incubadas primeiramente com 0.5 -1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{45}\text{Ca}$  em solução de Hanks' sem  $\text{Mg}^{+2}$  (NaCl 140mM, KCl 5mM,

HEPES 20mM, Glicose 4mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM) na situação basal e na situação de estímulo, glicina (1mM) + NMDA (1mM) eram acrescentados a 37°C no tempo de 2 minutos. As células eram lavadas duas vezes com Hanks' sem Mg<sup>+2</sup>, lisadas com água e congeladas a -20°C por pelo menos 12 horas. Após o descongelamento a radioatividade era medida por cintilação líquida. Para os estudos de regulação da captação, as células eram pré-incubadas em Hanks' por 10 minutos na presença ou ausência de várias concentrações de diferentes substâncias. Em seguida à pré-incubação, era procedida a incubação como descrito acima.

### 3.2.7- TÉCNICA DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR NMDA

Em C3, os poços eram lavados 2 vezes com 250 µl de solução de Hank's sem Mg<sup>2+</sup> [cloreto de sódio (NaCl) 140mM, cloreto de potássio (KCl) 5mM, cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) 2mM, Hepes 20mM, dextrose 4mm]. Em seguida, as culturas eram pré-incubadas por 5 minutos com 200 µl de solução de Hank's sem Mg<sup>2+</sup> contendo glutamato (50 µM) + glicina (50 µM). Para determinação da ligação inespecífica, MK801 não-marcado era adicionado na concentração de 50 µM. Após este tempo, 2nM de [<sup>3</sup>H] MK801 em Hank's foram adicionados no volume de 50µl. O volume final era de 250 µl por poço, e

o tempo de incubação era fixado em 5 minutos, após a realização de uma curva de tempo. Dessa forma, as células eram incubadas por tempo determinado e a ligação interrompida com lavagens com Hank's sem  $Mg^{2+}$  e lise com 250  $\mu$ l de água.

### 3.2.8- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RADIOATIVIDADE

Após o experimento, as placas eram mantidas por 24 horas na temperatura de  $-20^{\circ}C$ . Após este tempo, os produtos da lise das células eram descongelados e recolhidos, uma alíquota de 200  $\mu$ l transferida para filtro GF/B que era levado a estufa a  $100^{\circ}C$  por 30 minutos. Após secos, os filtros eram colocados em 4mL de líquido de cintilação (tolueno + PPO) e armazenados em vials. Assim, a radioatividade era contada por cintilação líquida. O resultado em cintilações por minuto (cpm) era convertido para fentomoles/ mg de proteína.

A dosagem de proteína em cada situação foi realizada de acordo com o método de Lowry *et al.*, (1951).

### 3.2.9-ENSAIO DE EXCITOTOXICIDADE

O meio BME não possui glutamato em sua composição. Assim, culturas mantidas neste meio compõem um modelo experimental para o estudo da excitotoxicidade induzida por glutamato. Em C3 as culturas purificadas



plaqueadas com BME eram pré-incubadas com glutamato 1mM por 8 horas. O tratamento agudo com drogas específicas realizado em C3 precedia 30 minutos a pré-incubação de 8 horas com glutamato 1mM. Posteriormente, as culturas eram lavadas 2 vezes com Hank's e fixadas por 1 hora com 1 mL de glutaraldeído 2.5% (Fluka Chemie). Culturas de grupos controle (sem tratamento) eram feitas em paralelo na presença do mesmo fixador. Logo em seguida as placas eram lavadas 5 vezes com água milli-q deixando 1 mL na placa na última lavagem. As placas de cultura de neurônios eram ajustadas em microscópio de fase invertido e sete campos de 0,114 mm<sup>2</sup> eram aleatoriamente escolhidos dentro da placa para fazer-se a contagem do número de células em cada grupo experimental. Do número de células dos sete campos contados era tirada a média e desvio padrão da média (S.E.M.). As células foram consideradas vivas quando elas mostravam morfologia normal com ou sem processos. Os valores para cada dado eram posteriormente normalizados para o grupo controle de cada experimento.

## **4.0-RESULTADOS**

### **4.1- RECEPTOR A<sub>2A</sub> DE ADENOSINA MODULA A EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE NR2B**

Baseado em estudos prévios realizados no laboratório que revelaram a ocorrência da diminuição de cerca de 40% da ligação do <sup>3</sup>H MK-801, quando as culturas eram tratadas por 48 horas (desde C1) com adenosina (100μM), levantamos a hipótese de que a expressão da subunidade NR2B poderia também estar efetivamente sendo controlada pelo sistema purinérgico (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001).

De fato, os nossos resultados sugerem aumento da expressão da subunidade NR2B em culturas tratadas com DPMA, um agonista do receptor A<sub>2a</sub> de adenosina, quando as culturas são tratadas por longo tempo (figura 7). A quantificação e análise dos blots podem ser observadas na figura 7B. Além disso, é interessante observar que o tratamento crônico com ifenprodil, um ligante da subunidade NR2B, gerou também um aumento da detecção desta

subunidade (fig 7A e B). A ligação do ifenprodil à subunidade NR2B por 72 horas, provoca o aumento da expressão dessa proteína por um provável efeito de “up regulation” de receptores NMDA.

O aumento da expressão da subunidade NR2B induzido pelo DPMA ocorre via ativação do receptor  $A_{2a}$  de adenosina. A figura 8 mostra experimentos de western blot nos quais a detecção da subunidade NR2B foi diminuída quando as culturas eram tratadas com ZM-241385, um antagonista seletivo do receptor  $A_{2a}$  de adenosina. Esta inibição da expressão da subunidade NR2B com a incubação com ZM-241385 sugere que esteja sob controle da adenosina endógena liberada pelas células em cultura. Além disso, é possível observar que o tratamento crônico com ZM-241385 foi capaz de bloquear fortemente o efeito do DPMA no aumento da expressão da subunidade NR2B.

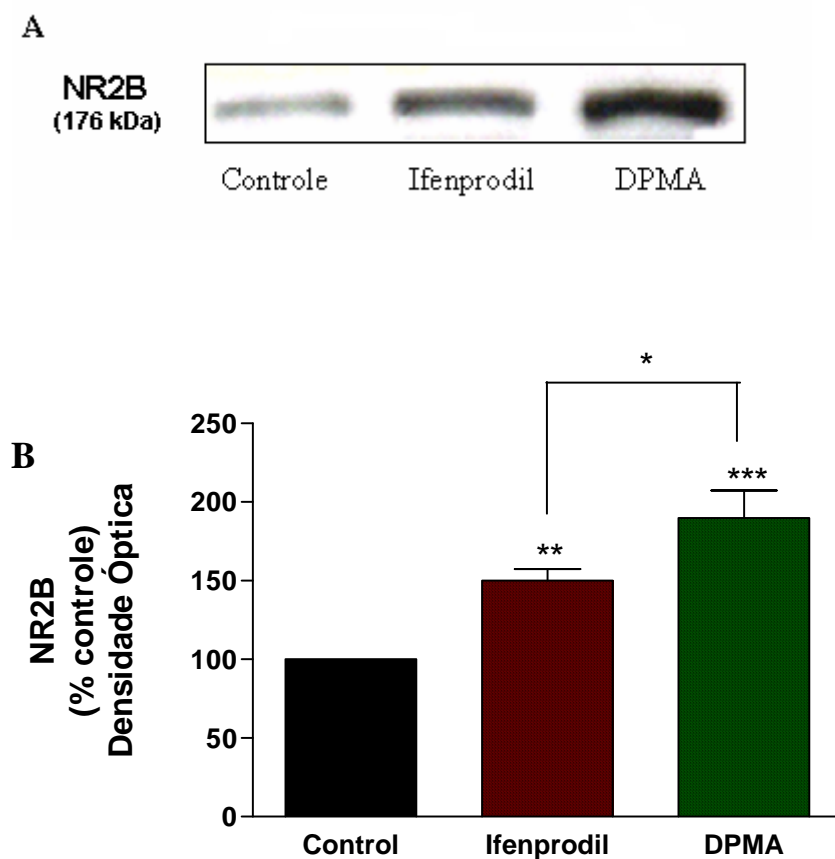


Figura 7. Efeito do DPMA e ifenprodil crônicos sobre a expressão das subunidades NR2B. (A) Figura representativa de imunoblot para a subunidade NR2B. As bandas representam o controle em C4 enquanto e culturas tratadas com ifenprodil (100nM) ou DPMA (100nM) por 72 horas, respectivamente. (B) Quantificação da densidade óptica das bandas correspondentes à proteína NR2B em culturas pré-tratadas com ifenprodil (100nM) e DPMA (100nM). O tratamento com DPMA nesta condição aumentou a expressão da subunidade NR2B para 189,8±17,6% do controle (n=10) e o ifenprodil aumentou para 150,0±7,3% do controle (n=4). As barras representam o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos (\*), (\*\*) e (\*\*\*) representam:  $p < 0.05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente.

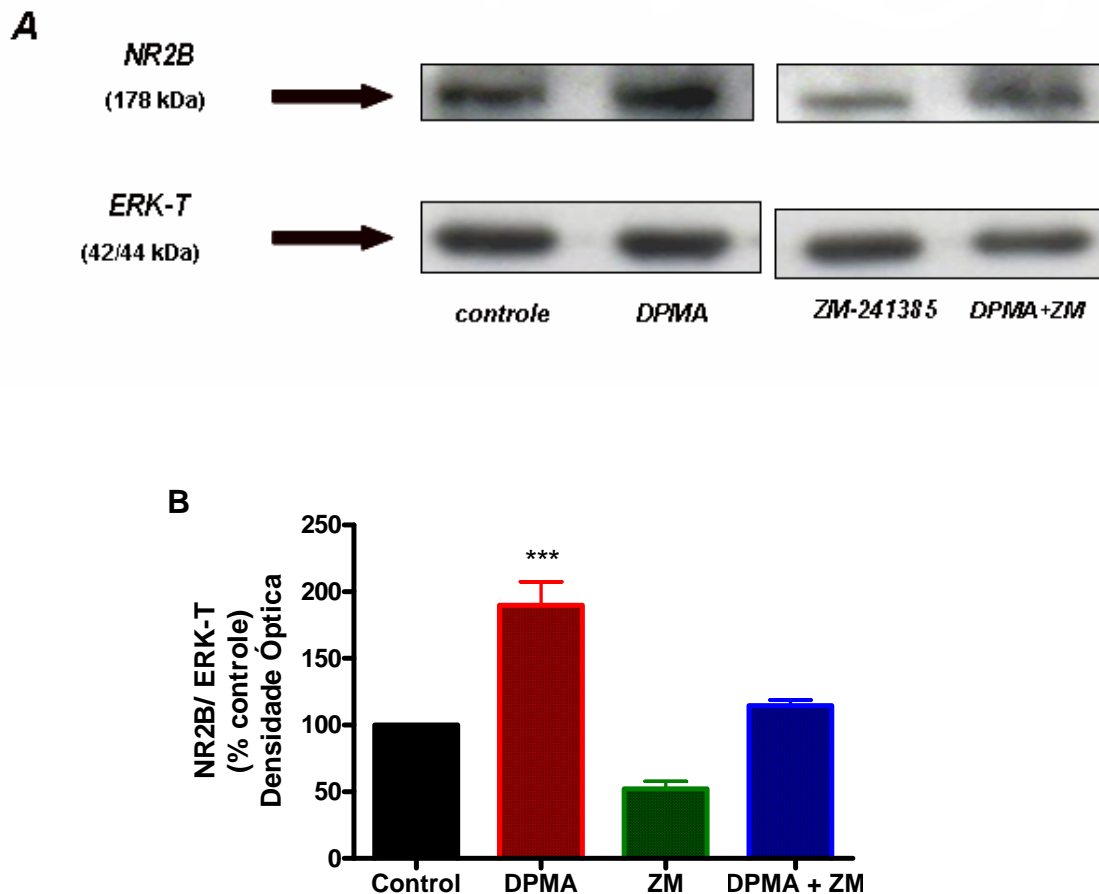


Figura 8. Efeito do DPMA e ZM-241385 crônicos sobre a expressão das subunidades NR2B. (A) Figura representativa de imunoblot para a subunidade NR2B e ERK-Total. As bandas representam o controle em C4, culturas tratadas com DPMA (100nM), ZM-241385 (100nM) e DPMA (100nM)+ ZM-241385 (100nM) por 72 horas, respectivamente. No tratamento com DPMA+ZM-241385 por 72 horas, ZM-241385 (100nM) foi adicionado na cultura uma hora antes de acrescentar o DPMA (100nM). (B) Quantificação da densidade óptica das bandas correspondentes à proteína NR2B em culturas pré-tratadas com DPMA (100nM), ZM-241385 (100nM) e DPMA (100nM)+ ZM-241385 (100nM). O tratamento com DPMA nesta condição aumentou a expressão da subunidade NR2B para  $189,8 \pm 17,6\%$  do controle ( $n=10$ ), o ZM-

241385 bloqueou para  $52,2 \pm 5,6\%$  do controle ( $n=2$ ) e o tratamento do DPMA (100nM)+ ZM-241385 (100nM) aumentou para  $114,6 \pm 4,3\%$  do controle ( $n=2$ ). As barras representam o EPM (DPMA) ou desvio da média (outras condições). Os asteriscos (\*\*\*) representam  $p < 0.001$ .

#### **4.2- EFEITO DOS TRATAMENTOS AGUDO E CRÔNICO COM IFENPRODIL NA LIGAÇÃO DE (<sup>3</sup>H) MK-801 AO RECEPTOR NMDA**

Inicialmente foram realizados experimentos de ligação do (<sup>3</sup>H) MK-801 ao complexo receptor NMDA em culturas mistas tratadas agudamente por 25 minutos com ifenprodil, um composto capaz de ligar-se às subunidades NR2B do receptor NMDA. Foi observada uma diminuição maior que 80% em relação ao controle, da ligação do (<sup>3</sup>H) MK-801 ao receptor NMDA (fig.9). Esse resultado sugere que pelo menos parte dos receptores NMDA presentes nas culturas contém a subunidade NR2B em sua composição.

Por outro lado, quando as culturas eram incubadas por pelo menos 48 horas com ifenprodil, observamos um aumento na ligação de (<sup>3</sup>H) MK-801 ao receptor NMDA (figura 10), sugerindo um aumento na expressão desses receptores induzida pelo bloqueio crônico da subunidade NR2B. Este resultado torna mais claro a participação desta subunidade no controle da expressão do receptor e a importância de sua participação nos processos envolvendo o receptor.

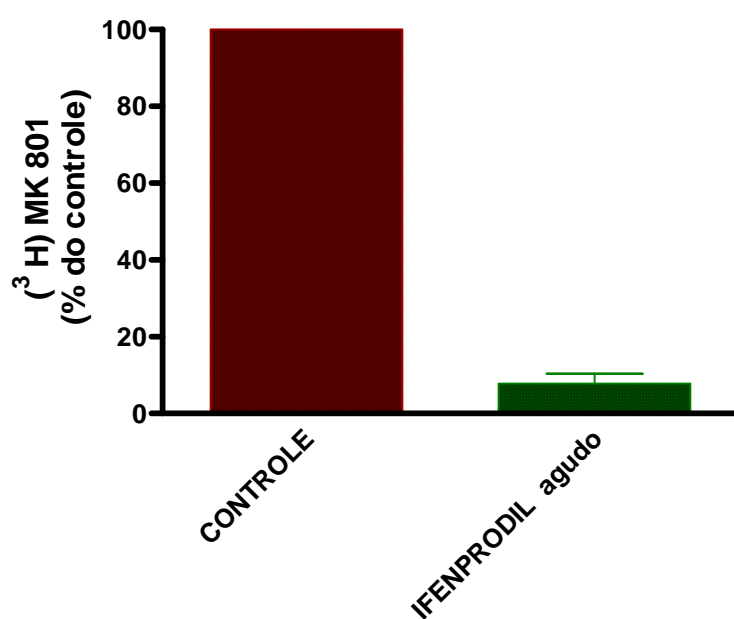


Figura 9: Experimento de ligação de (<sup>3</sup>H) MK-801 4nM a receptores NMDA em cultura mista (E8C3) incubada agudamente (25 minutos) com Ifenprodil 10µM. O tratamento com ifenprodil nesta condição diminuiu a ligação do (<sup>3</sup>H) MK-801 ao receptor NMDA para 7,8±2,6% do controle. Este gráfico se refere a dois experimentos realizados em duplicatas ± desvio da média.

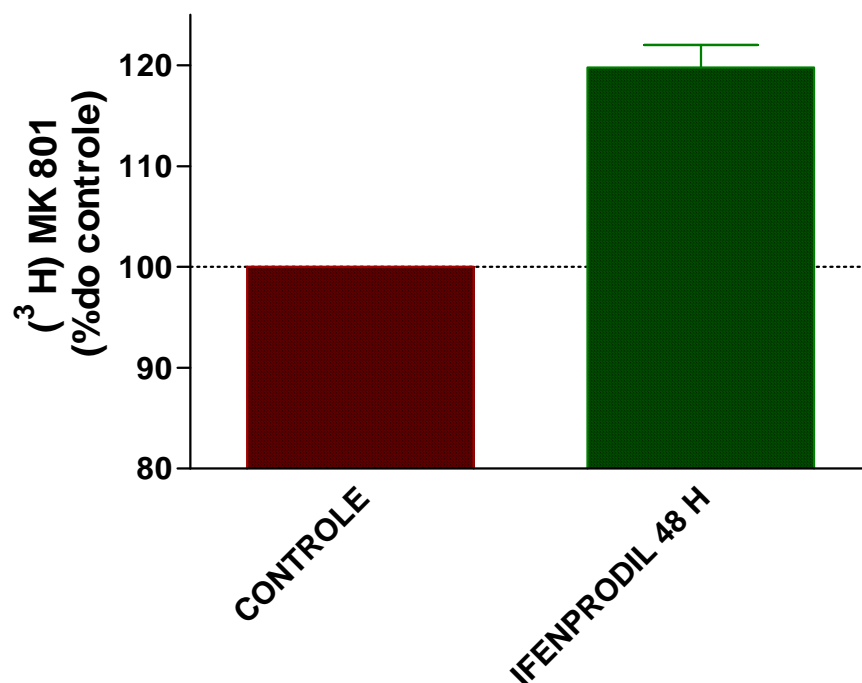


Figura 10: Experimento de ligação de (³H) MK-801 4nM a receptores NMDA em cultura mista (E8C3) tratada por 48 horas com Ifenprodil 100nM. O tratamento com ifenprodil nesta condição aumentou a ligação do (³H) MK-801 ao receptor NMDA para 119.7±2,2% do controle. Este gráfico se refere a dois experimentos realizados em duplicatas ± desvio da média.



### **4.3- EFEITO DOS TRATAMENTOS AGUDO E CRÔNICO COM IFENPRODIL NO INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{+2}$ PELO RECEPTOR NMDA**

O efeito agudo do bloqueio da subunidade NR2B no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  estimulado por NMDA+glicina nas culturas mistas de retina mostrou um bloqueio quase total quando 10 minutos antes de serem expostas ao NMDA + glicina as células eram incubadas com ifenprodil. O influxo diminuiu de  $317,5 \pm 6,1$  % do basal na situação controle para  $168,3 \pm 4,4$  % do basal na situação com ifenprodil (figura 11). Por outro lado, foi observado que, no quarto dia de cultura, após tratarmos as culturas de células com variadas concentrações de ifenprodil por 72 horas e estimularmos as culturas com NMDA (1mM) + glicina (1mM), o influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  aumentou consideravelmente nas células pré-tratadas com ifenprodil em relação ao controle, sugerindo aumento da quantidade de receptores NMDA localizados na superfície celular, um evento de “up regulation” em resposta à inibição crônica da subunidade NR2B, neste experimento as células foram lavadas duas vezes antes de serem expostas ao NMDA + glicina (figura 12).

Apesar do aumento no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  estimulado por receptores NMDA, a concentração que passamos a usar em nossos tratamentos crônicos (100nM) não causava qualquer efeito visível de toxicidade sobre as células (fig. 13).

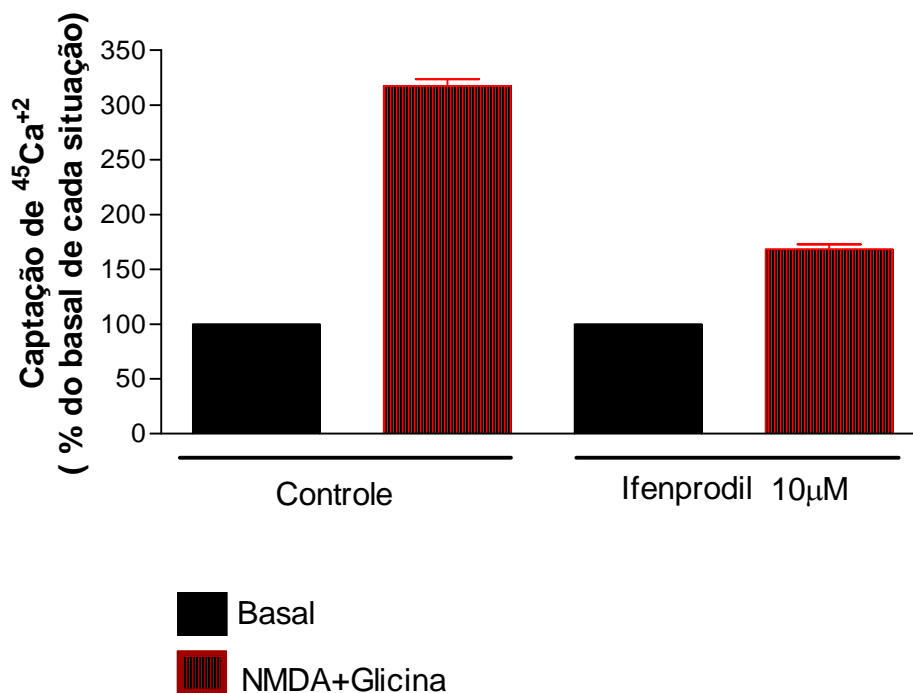


Figura 11: Efeito do tratamento agudo de culturas mistas com Ifenprodil (10 minutos) no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  por estimulação do receptor NMDA. NMDA (1mM) + glicina (1mM) foram aplicados às culturas por 2 minutos na presença de Hank's com  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  (1µci) para determinação do estímulo. O nível basal foi medido a partir da incubação de Hank's com

$^{45}\text{Ca}^{+2}$  ( $1\mu\text{ci}$ ) na ausência de NMDA + glicina. Os dados foram obtidos de dois experimentos representativos realizados em duplicata. As barras representam o desvio da média.

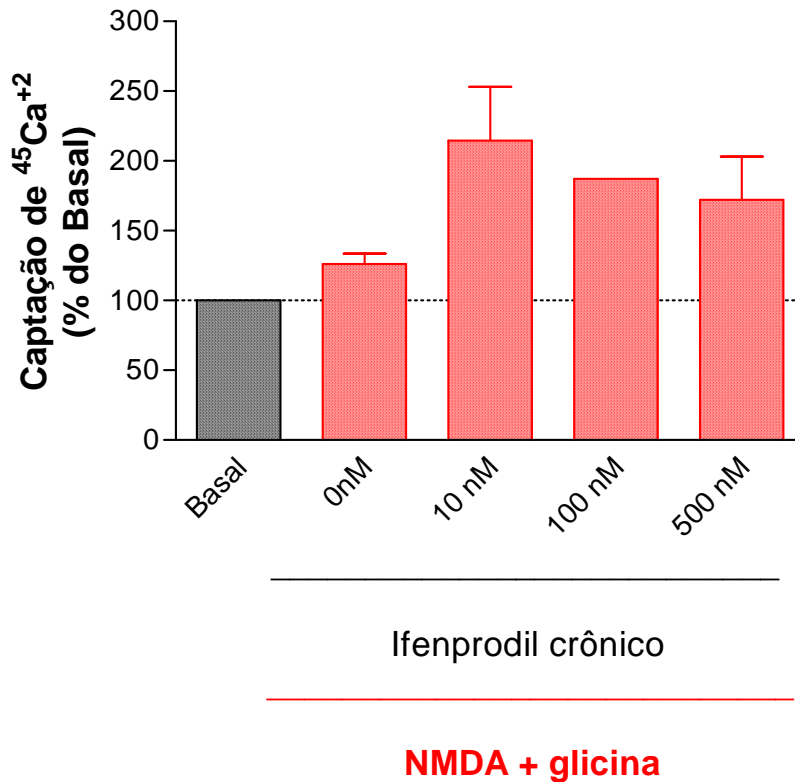


Figura 12. Efeito do tratamento crônico (72 horas) de culturas mistas com várias concentrações de ifenprodil no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  por estimulação do receptor NMDA. NMDA (1mM) + glicina (1mM) foram aplicados às culturas por 2 minutos na presença de Hank's com  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  ( $1\mu\text{ci}$ ) para determinação do estímulo. O nível basal foi medido a partir da incubação de Hank's com  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  ( $1\mu\text{ci}$ ) na ausência de NMDA + glicina. Os dados foram obtidos de dois experimentos realizados em duplicata. As barras representam o desvio da média. Os dados sem barra representam resultados únicos.

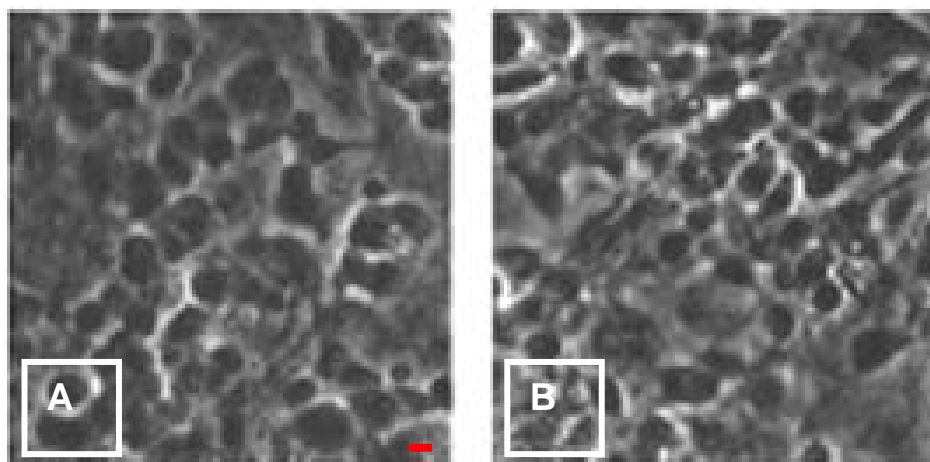


Figura 13: Cultura em monocamada no oitavo dia de cultivo. Em (A) controle e (B) tratamento crônico por 7 dias com ifenprodil (100nM). A escala da barra representa 10 micrômetros.

#### **4.4- EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM IFENPRODIL E DPMA NA EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES NR2A E NR1**

Quando a expressão da subunidade NR2A foi observada após pré-tratamento com ifenprodil por 72 horas, notamos uma diminuição na detecção da proteína de  $16.9 \pm 5.2\%$  do controle ( $n=3$ ) (fig.14A). A medida da densidade óptica é mostrada em forma de gráfico (figura 14B). No mesmo experimento podemos notar uma queda na detecção da subunidade NR2A de  $24.4 \pm 6,0\%$  do controle ( $n=6$ ) quando as células eram pré-tratadas com o antagonista do canal do receptor, MK-801. Além disso, ao contrário do efeito observado para subunidade NR2B (figuras 7 e 8), após o pré-tratamento com DPMA por 72

horas foi observada uma diminuição significativa na detecção da expressão das subunidades NR2A e NR1 (figura 15). A quantificação e análise das mesmas podem ser observadas na figura 15B onde o tratamento com DPMA promoveu diminuição da expressão da subunidade NR2A para  $62,7 \pm 0,4\%$  do controle (n=2) e a expressão da subunidade NR1 também teve uma inibição para  $70,3 \pm 7,0\%$  do controle (n=7).

É interessante notar que o bloqueio crônico da subunidade NR2B com o antagonista ifenprodil pode não só controlar a quantidade de novos receptores na membrana das células, como evidenciado pela ligação do ( $^3\text{H}$ ) MK-801, mas também é capaz de controlar a expressão de outras subunidades do receptor.

#### **4.5- EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM MK-801 E INFENPRODIL NA EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE NR1**

Quando os mesmos tratamentos foram usados na pesquisa da subunidade NR1 encontramos um efeito similar ao demonstrado para a subunidade NR2A (fig. 16A e 16B). O pré-tratamento com MK-801 promoveu uma queda na detecção da subunidade NR1 de  $26,9 \pm 10,1\%$  quando comparado com o controle (n=3). No entanto, o pré-tratamento com ifenprodil não produziu efeito significativo na expressão desta subunidade ( $7,9 \pm 3,1\%$  do controle, n=3). Como existe um aumento na ligação de ( $^3\text{H}$ ) MK-801 com o tratamento com ifenprodil,

o aumento das subunidades NR2B e a diminuição das NR2A comporiam junto com as subunidades NR1 obrigatórias, novos arranjos das subunidades do receptor.

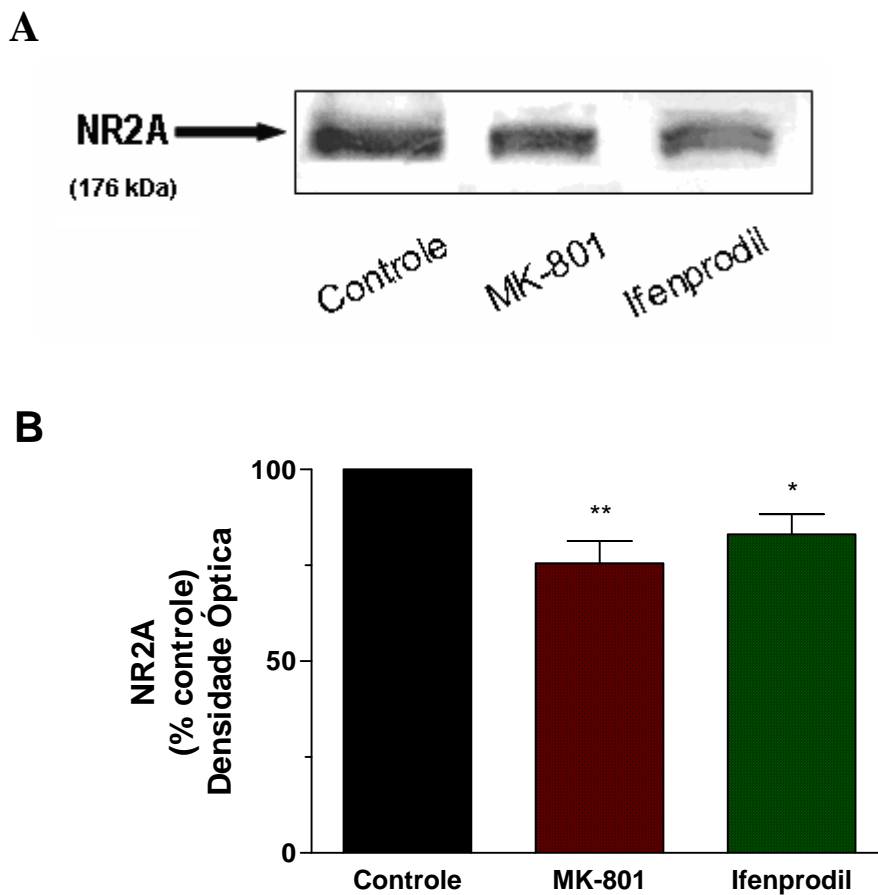


Figura 14. Efeito do MK-801 e Ifenprodil na expressão da subunidade NR2A. (A) imunoblot para a subunidade NR2A nas diversas condições. (B) quantificação da densidade óptica das bandas correspondentes à proteína NR2A. O tratamento com MK-8001 nesta condição diminuiu a expressão da subunidade NR2A para  $75,6 \pm 5,8\%$  do controle ( $n=6$ ) e o ifenprodil bloqueou para  $83,1 \pm 5,2\%$  do controle ( $n=3$ ). As barras representam o EPM. Todas as drogas

foram usadas por um período de 72 horas com MK-801 (1 $\mu$ M) e Ifenprodil (100nM). Os asteriscos (\*) e (\*\*) representam  $p < 0.05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

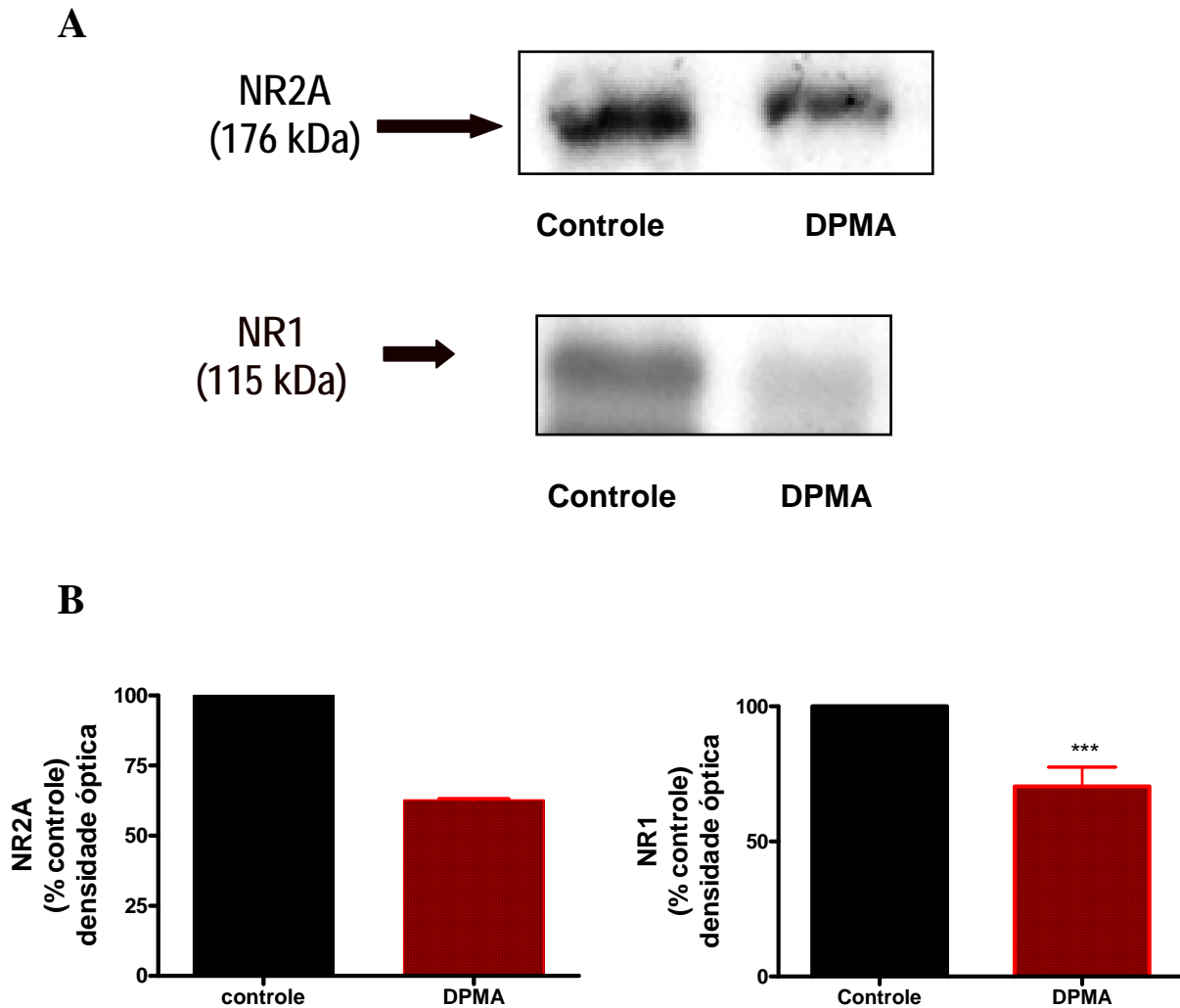


Figura 15. Efeito do DPMA na expressão das subunidades NR2A e NR1. (A) imunoblot para as subunidades NR2A e NR1 nas condições acima descritas. (B) quantificação da densidade óptica das bandas correspondentes às proteínas NR2A e NR1. O tratamento com DPMA nesta condição diminuiu a expressão da subunidade NR2A para 62,7 $\pm$ 0,4% do controle (n=2), e a expressão da subunidade NR1 também teve uma inibição para 70,3 $\pm$ 7,0% do controle (n=7). O tratamento com DPMA (100nM) foi feito por um período de 72 horas. As barras

representam o desvio da média (NR2A) e EPM (NR1). Os asteriscos (\*\*\*) representam:  $p < 0.001$ .

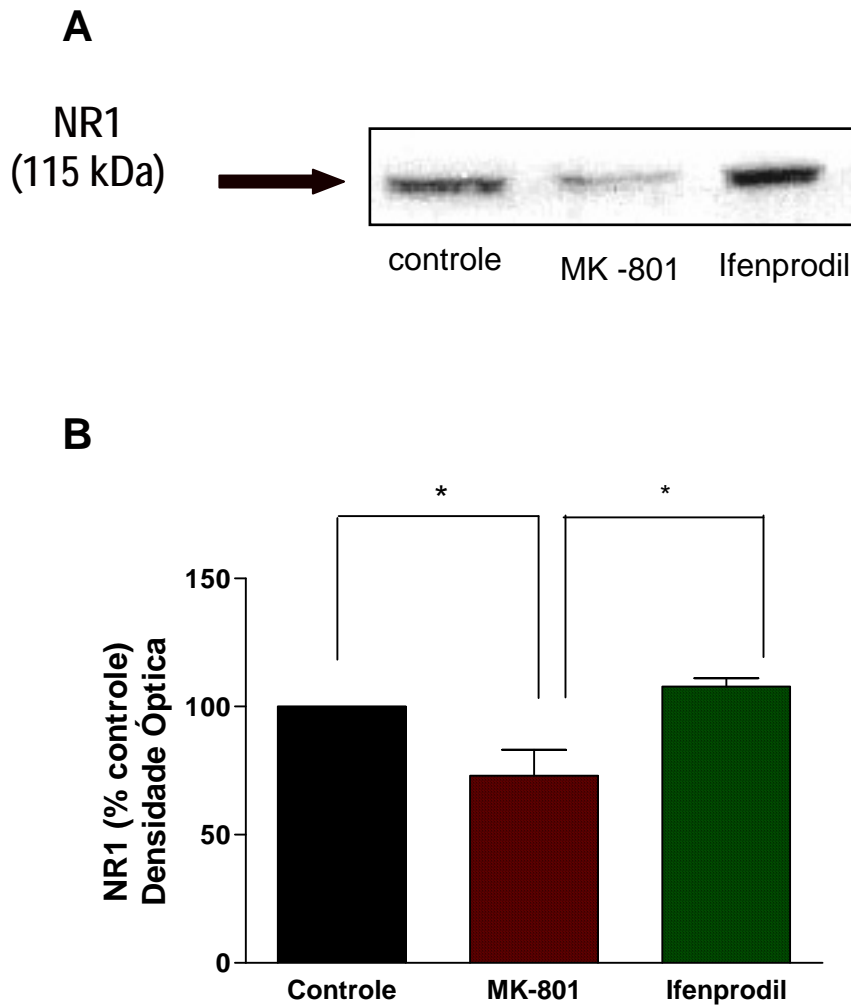


Figura 16. Efeito do MK-801 e Ifenprodil na expressão da subunidade NR1. (A) imunoblot para a subunidade NR1. (B) quantificação da densidade óptica das bandas correspondentes à proteína NR1. O pré-tratamento com MK-801 promoveu uma queda na detecção da subunidade NR1 de  $26,9 \pm 10.1\%$  do controle ( $n=3$ ), e o tratamento com ifenprodil provocou para um aumento não-significativo na expressão da subunidade de  $7,8 \pm 3.1\%$  do controle ( $n=3$ ). Todas as drogas foram usadas por um período de 72 horas e as concentrações foram



MK-801 (1 $\mu$ M) e Ifenprodil (100nM). As barras representam o EPM. O asterisco (\*) representa:  $p < 0.05$ .

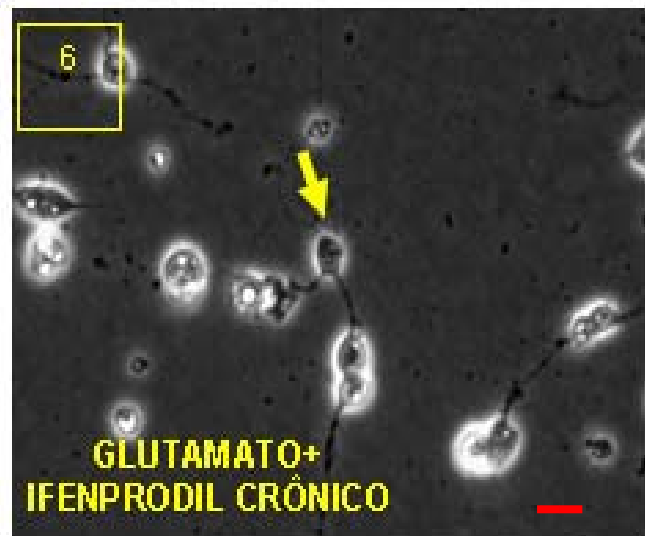
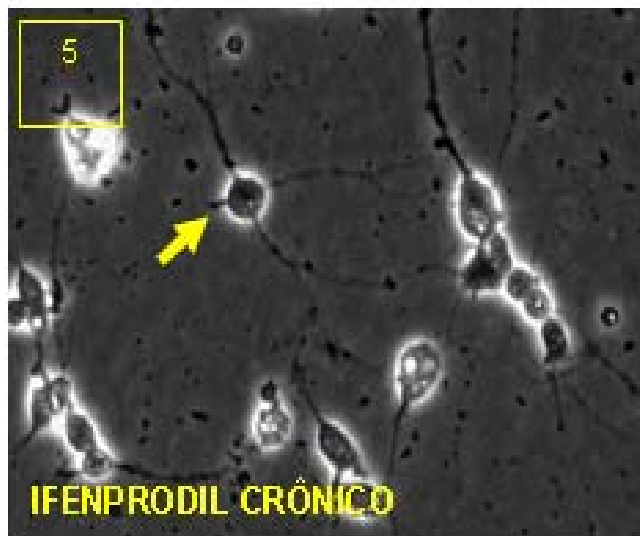
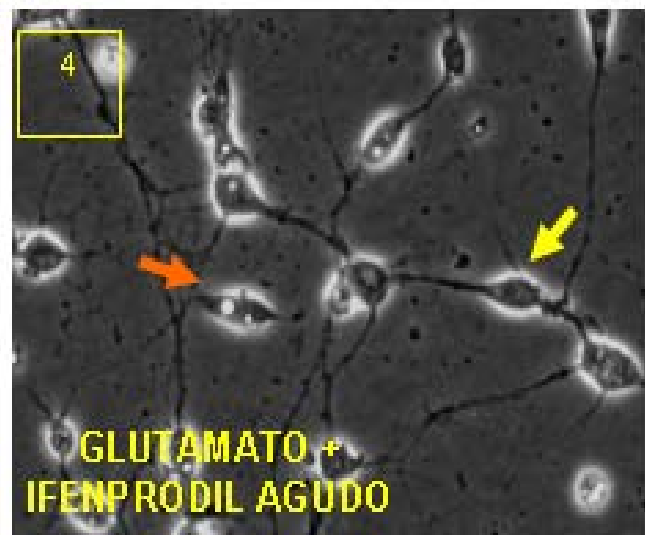
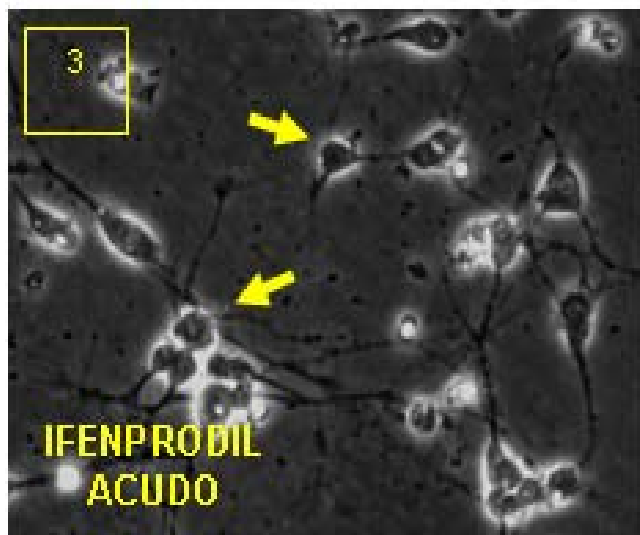
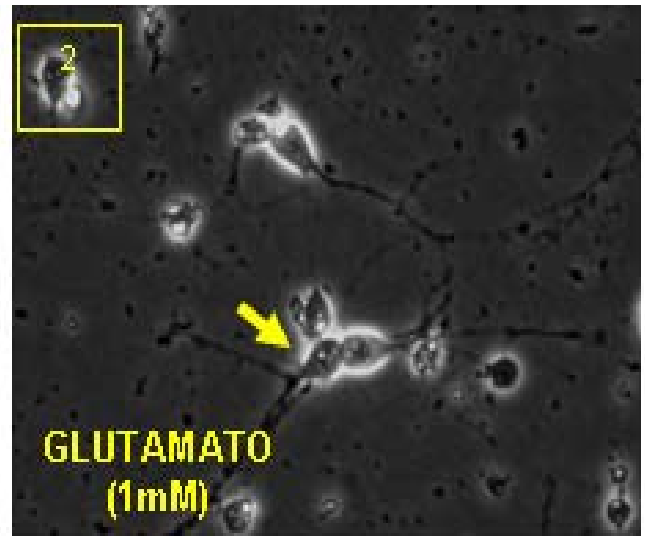
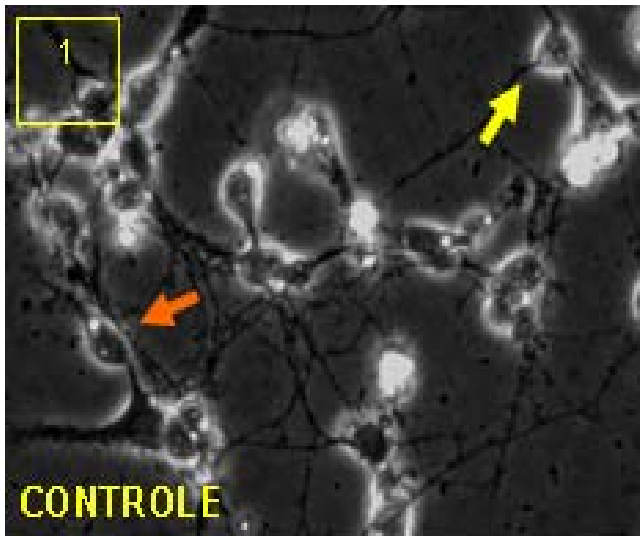
#### **4.6- EFEITO DA INCUBAÇÃO CRÔNICA E AGUDA COM IFENPRODIL NA PREVENÇÃO DA MORTE INDUZIDA PELO GLUTAMATO EM CULTURAS PURIFICADAS DE NEURÔNIOS**

Experimentos realizados em culturas purificadas de neurônios que foram submetidas ao tratamento crônico e agudo com ifenprodil interessantemente mostraram diferentes efeitos na prevenção da excitotoxicidade neuronal induzida pelo tratamento com glutamato (1mM) por 8 horas (figura 17A). Na figura 17B é possível observar que o tratamento com glutamato por 8 horas provocou uma morte de  $61,6 \pm 7,3\%$  do controle (n=5), enquanto que nas culturas pré-incubadas por 30 minutos com ifenprodil (10 $\mu$ M) ocorreu um bloqueio parcial da excitotoxicidade e a morte das células tratadas com glutamato passou para  $22,6 \pm 6,3\%$  do controle (n=5). Ao contrário, o pré-tratamento crônico por 72 horas com ifenprodil (100nM) (fig.17C) produziu uma morte celular de  $38,3 \pm 4,3\%$  do controle (n=3) e não foi capaz de prevenir o efeito excitotóxico provocado pelo glutamato, promovendo uma morte de  $53,0 \pm 10,1\%$  do controle (n=3). A proteção observada no tratamento agudo com ifenprodil corrobora a

importância da presença e atividade da subunidade NR2B na determinação dos processos de morte e sobrevivência das células neuronais.

]

A





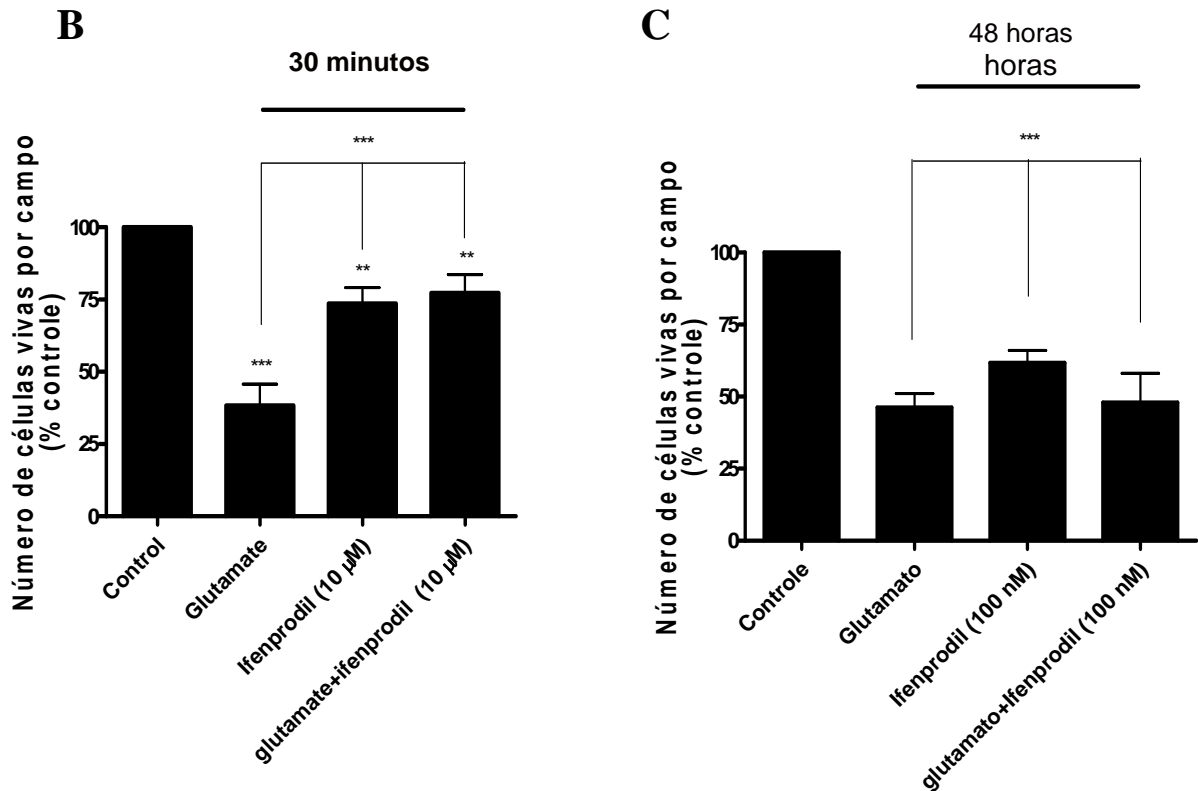


Figura 17. Efeito da incubação crônica e aguda com ifenprodil na prevenção da morte induzida pelo glutamato em culturas purificadas de neurônios. (A) Cultura purificada de neurônios no terceiro dia de cultivo. As setas amarelas apontam os neurônios e as laranjas os fotorreceptores. Em (1) controle, (2) tratamento com glutamato (1mM) por oito horas, (3) tratamento com ifenprodil (10μM) por 30 minutos, (4) cultura pré-tratada com ifenprodil (100nM) 30 minutos antes da incubação com glutamato (1mM), (5) tratamento com ifenprodil (100nM) por 48 horas, (6) pré-tratamento com ifenprodil (100nM) 48 horas antes da incubação com glutamato (1mM). Em (B) e (C) está mostrada a quantificação da contagem do número de células. As células foram consideradas vivas quando mostravam morfologia normal com ou sem processos. Todos os tratamentos com o glutamato (1mM) foram por 8 horas. A seta amarela representa um neurônio e a seta vermelha um fotorreceptor. As barras representam o EPM. Os asteriscos (\*), (\*\*) e (\*\*\*) representam  $p < 0.05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente. A escala da barra representa 20 micrômetros.

## 5- DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho usando culturas de células da retina de embrião de galinha confirmaram a presença de receptores do tipo NMDA em nosso modelo experimental. Dados anteriores demonstraram o efeito neuroprotetor da adenosina na toxicidade desencadeada por glutamato (1mM) oferecido às células. Foi observado que o tratamento crônico com DPMA (100nM) ou CGS21680 (100nM), agonistas seletivos de receptores  $A_{2A}$ , em culturas purificadas de neurônios, prevenia a morte induzida pelo glutamato via receptor NMDA. O tratamento com CHA (100nM), um agonista seletivo do receptor  $A_1$  de adenosina, não promoveu qualquer efeito neuroprotetor, demonstrando a importância da participação do receptor  $A_{2a}$  de adenosina na ativação direta da adenilil ciclase nesse fenômeno (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001). Em trabalho anterior, foi demonstrado que o tratamento crônico com agonistas de receptores  $A_{2A}$  promove um decréscimo na detecção da proteína correspondente à subunidade NR1 do receptor NMDA. Uma vez que esta proteína é obrigatória na composição de canais funcionais, sua diminuição sugere uma diminuição da expressão dos receptores NMDA. Entretanto, uma dúvida permanecia quanto à expressão das subunidades NR2. A ligação da subunidade NR2B à proteína PSD95 (Gardoni et al., 2002) é um fator que

contribui positivamente para os mecanismos de proteção contra a atividade sustentada do receptor NMDA, já que esta ligação inibe a fosforilação do receptor por proteínas cinases que o ativam (Gardoni et al., 2002). Desta forma, o resultado do aumento da expressão da subunidade NR2B quando as células eram tratadas por tempo crônico com o agonista de receptores  $A_{2A}$  sugere fortemente que o mecanismo de neuroproteção envolve além do já descrito decréscimo da expressão da subunidade NR1 (Ferreira, J.M. e Paes-de-Carvalho, R. em preparação), o controle positivo da expressão de subunidades NR2B e negativo de NR2A. Observamos ainda com o tratamento crônico com ZM-241385 (100nM), um antagonista seletivo de receptores  $A_{2A}$ , foi capaz de inibir o efeito anteriormente promovido pelo DPMA, o que confirma a especificidade do agonista do receptor  $A_{2A}$ . Além disso, outro resultado observado quando as células eram tratadas por longo tempo com DPMA (100nM) foi a diminuição da expressão da subunidade NR2A, o que corrobora com dados da literatura que caracterizam esta subunidade como a mais envolvida no processo de excitotoxicidade (Gardoni et al., 2002).

A expressão da subunidade NR2B é maior no início do desenvolvimento do sistema nervoso com gradual substituição pela subunidade NR2A (Cristóvão et al., 2002). Gardoni e colaboradores em 2002 demonstraram que o “knock-out” da proteína PSD-95 em culturas de células hipocâmpais com predominância da expressão da proteína NR2B não era capaz de desencadear

morte nestas células. Entretanto, com o envelhecimento destas culturas ocorre a resposta excitotóxica, justamente quando aumenta a expressão de subunidades NR2A. É interessante notar que, seguindo esta lógica, a permanência da expressão das subunidades NR2B é benéfica aos sistemas. O que esta permanência pode trazer de comprometimento das funções desempenhadas por estes sistemas, tanto no campo fisiológico quanto comportamental, ainda precisa ser mais bem descrito. Sabe-se, por exemplo, que em pacientes portadores de doença de Alzheimer a região intracelular da subunidade NR1 apresenta uma alteração. Esta falha na subunidade parece determinar também a diminuição da expressão das subunidades NR2, no hipocampo, região das mais afetadas na doença de Alzheimer, ocorrendo uma extensa diminuição da detecção do receptor NMDA formado por associação das subunidades NR1 e NR2B, alterações estas que podem estar associadas à degeneração de células neuronais observadas na patologia (Hynd et al., 2004). Além disso, a expressão das subunidades NR2 presentes no receptor NMDA pode determinar a sua localização no SNC. Tovar e Westbrook (1999) demonstraram em culturas de neurônios hipocámpais que os receptores NMDA sinápticos e extrasinápticos não apresentam a mesma sensibilidade ao bloqueio com o ifenprodil, um antagonista seletivo da subunidade NR2B. Esta diferença acontecia devido ao aumento da expressão de receptores NMDA contendo a subunidade NR2A na região sináptica sobrepondo à quantidade de subunidade NR2B em estágios



mais tardios do desenvolvimento. Dessa maneira, qualquer alteração nos mecanismos que regulam adequadamente os estímulos responsáveis pela escolha da subunidade expressa e a sua localização no SNC poderia gerar danos no funcionamento do receptor NMDA. Existem trabalhos que apontam diferenças no processo de endocitose e mobilidade lateral do receptor NMDA de acordo com a subunidade NR2 presente no canal (Carroll e Zukin., 2002; Lavezzari *et al.*, 2004). As implicações fisiológicas da existência de uma população de receptores nos neurônios em desenvolvimento ainda não são claras. A rápida dispersão destes receptores em sinapses inativas pode ser capaz de remover receptores não funcionais, levando em ordem de minutos ao fortalecimento sináptico. De acordo com o trabalho revisado por Carroll e Zukin (2002), em sinapses imaturas os receptores contendo as subunidades NR1 e NR2B são predominantes, apresentando alta mobilidade na membrana com uma maior inserção em sítios extrasinápticos, além de um rápido processo de internalização. Ao passo que, o complexo formado pelo arranjo com NR1 e NR2A é mais abundante nos sítios sinápticos em sinapses maduras. Ambas as subunidades NR2B e NR2A contém sítios específicos relacionados à proteína adaptadora endocítica (AP-2), responsável pelo processo de endocitose dependente de clatrina. Entretanto, a internalização da subunidade NR2B é mais regulada pela associação com a PSD-95, enquanto a defosforilação dos resíduos

tirosina da cauda C-terminal da subunidade NR2A é o que modula fortemente a sua associação com AP-2.

Os resultados obtidos neste trabalho em relação ao controle da expressão da subunidade NR2B associados aos dados da literatura foram interessantes. O próximo passo então foi testar se a manipulação da subunidade NR2B através da utilização de antagonistas promoveria algum efeito no funcionamento geral do receptor. Quando realizamos o experimento de ligação do ( $^3\text{H}$ ) MK-801 ao receptor NMDA em culturas pré-tratadas cronicamente por 48 horas com ifenprodil (100nM), foi possível observar um aumento na ligação de aproximadamente 19%. Algumas hipóteses surgem a partir deste dado, como por exemplo, um efeito de “up regulation”, um aumento da incorporação de receptores NMDA, podendo ser pelo aumento do recrutamento de receptores prontos para serem incorporados na membrana ou ainda o aumento da síntese protéica para formação intracelular de mais receptores que serão encaminhados à membrana. É ainda interessante observar que o tratamento agudo por 25 minutos com o ifenprodil (10 $\mu\text{M}$ ) decresce a ligação do ( $^3\text{H}$ ) MK-801 ao receptor NMDA para 7,8% do controle. Esse resultado sugere a importância da funcionalidade da subunidade NR2B no controle da atividade do receptor, já que seu bloqueio em condições distintas provoca efeitos importantes na atividade do canal.

Uma outra alternativa para explicar o caminho mais correto para o desenrolar desses eventos seria investigar como estaria o influxo de cálcio nessas culturas tratadas com ifenprodil. Observamos o aumento do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  em células submetidas à inibição da subunidade NR2B com ifenprodil por um longo tempo (72 horas), sugerindo que esta subunidade participe efetivamente no controle da expressão do receptor NMDA. Esse aumento do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  provocado pelo bloqueio crônico da subunidade NR2B depende da concentração do ifenprodil utilizado nos tratamentos. Entretanto, já na concentração de 100 nM de ifenprodil observamos o efeito máximo da droga.

Em contrapartida, o tratamento agudo com ifenprodil provocou diminuição do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  via receptor NMDA (fig 11). A diminuição do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  provocado pelo bloqueio agudo da subunidade NR2B sugere o possível envolvimento da sua atividade na regulação do funcionamento do complexo receptor NMDA nas nossas culturas. Além disso, é interessante observar que altas concentrações (10 $\mu\text{M}$ ) do ifenprodil causaram toxicidade às células em cultura quando este antagonista foi aplicado cronicamente (dado não mostrado), mas não agudamente. A concentração de ifenprodil que utilizamos em nossas culturas em tratamentos crônicos (100nM) não exerce efeito tóxico como observado anteriormente (fig. 13). O efeito observado em altas concentrações pode ser explicado por ligação inespecífica desta droga em sítios de outras subunidades e não apenas na subunidade NR2B. Na literatura existe

um número crescente de trabalhos que estudam como as propriedades farmacológicas e fisiológicas dos receptores NMDA se comportam de acordo com a composição de suas subunidades. Segundo Nagy e colaboradores em 2004, os arranjos formados pelas NR2 conferem distintas características nas propriedades do bloqueio ao íon magnésio, na cinética de dessensibilização, na afinidade aos agonistas e antagonistas, na endocitose e nos efeitos de fosforilação. De acordo com Cull-Candy e colaboradores em 2001, receptores NMDA contendo subunidades NR2A ou NR2B geram canais de alta condutância e com baixa sensibilidade ao bloqueio extracelular pelo  $Mg^{2+}$ , enquanto receptores contendo as subunidades NR2C e NR2D formam canais com baixa condutância e sensibilidade ao bloqueio extracelular pelo  $Mg^{2+}$ . Além disso, já foi demonstrado que a co-expressão de subunidades NR3A ou NR3B com NR1 e NR2 em sistemas de expressão recombinante reduz a permeabilidade ao cálcio e diminui a corrente via receptor NMDA (Ciabarra et al., 1995; Nishi et al., 2001; Chatteron *et al.*, 2002).

Quando analisamos a expressão da subunidade NR2B em relação às outras subunidades que compõem o receptor NMDA pela técnica de western blot, observamos que a detecção dos níveis de expressão destas proteínas foi alterada. O tratamento crônico com ifenprodil (100nM) por 72 horas promoveu uma diminuição na expressão da subunidade NR2A, não alterando os níveis da subunidade NR1. Além disso, foi capaz de aumentar a expressão da subunidade

NR2B, sugerindo o aumento da incorporação de receptores NMDA contendo a subunidade NR2B, não necessariamente pelo aumento da localização de receptores na membrana.

Sabe-se que o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  excessivo via receptor NMDA pode desencadear morte neuronal. Assim, o uso de antagonistas poderia bloquear o efeito de excitotoxicidade. Quando observamos o efeito neuroprotetor do DPMA na toxicidade desencadeada por glutamato em culturas purificadas de neurônios e no aumento da expressão da subunidade NR2B em culturas mistas, investigamos se estes efeitos estariam interligados. Zhang e colaboradores em 2000 demonstraram, em culturas purificadas de neurônios da retina de rato, que o tratamento agudo (10 minutos) com ifenprodil ( $10\mu\text{M}$ ) foi capaz de prevenir a toxicidade induzida pelo tratamento por 1 hora com glutamato (1mM). Em contrapartida, o mesmo tratamento com Ifenprodil não foi capaz de inibir a neurotoxicidade induzida pelo tratamento por 1 hora com Kainato (1mM), agonista de receptores AMPA/Kainato, indicando a seletividade do ifenprodil pela subunidade NR2B do receptor NMDA. No nosso modelo, o pré-tratamento crônico (48 horas) com 100 nM de ifenprodil (fig.17C) produziu uma morte celular similar à induzida pelo glutamato e não foi capaz de prevenir o efeito excitotóxico, enquanto que o tratamento agudo das culturas (30 minutos) com ifenprodil ( $10\mu\text{M}$ ) promoveu um bloqueio da excitotoxicidade por glutamato.

Assim, o bloqueio agudo da subunidade NR2B promoveu no tratamento com glutamato um menor dano celular quando comparado ao tratamento crônico. Acreditamos que o tempo de tratamento com ifenprodil possa influenciar no comportamento da expressão da subunidade NR2B e na formação dos receptores NMDA. O efeito na prevenção da excitotoxicidade observado no tratamento agudo com ifenprodil sugere que a atividade do receptor NMDA foi fortemente diminuída, o que corrobora com os nossos outros resultados onde demonstramos com o mesmo tratamento a diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  e o bloqueio da ligação do ( $^3\text{H}$ ) MK-801 ao receptor NMDA. A perda deste efeito neuroprotetor observado no tratamento crônico com ifenprodil propõe o aumento na expressão de novos receptores NMDA na membrana, relacionando-se com os efeitos do aumento do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  e da ligação do ( $^3\text{H}$ ) MK-801 ao receptor NMDA citados acima. Por conseguinte, é interessante ressaltar que a presença e a atividade da subunidade NR2B na determinação dos processos de morte e sobrevivência das células neuronais apresentam, de acordo com os nossos resultados, um maior destaque em relação às outras subunidades presentes no receptor NMDA, provavelmente devido a uma atividade regulatória, principalmente, da subunidade NR1.

O papel da subunidade NR2B na composição do receptor NMDA demonstra a presença fundamental desta subunidade na formação dos canais receptores NMDA, atribuindo a estas proteínas atividades de controle protetor

de atividade deste receptor, fundamental no desenvolvimento e manutenção de atividade do SNC. Uma vez que a adenosina tem papel regulatório sobre a atividade do receptor NMDA e demonstra ter um controle positivo da expressão das subunidades NR2B, já descrita como sendo fundamental em processos de neurotoxicidade, é possível que a adenosina tenha papel regulador da expressão de genes das subunidades do receptor NMDA.

A figura 18 mostra um esquema onde sugerimos, de acordo com os nossos resultados, como o bloqueio da subunidade NR2B estaria interferindo nos mecanismos que controlam a expressão e a funcionalidade do receptor NMDA. Em resumo, o bloqueio crônico da subunidade NR2B sinaliza para a célula a ausência de receptor NMDA funcional na membrana, pois a atividade do canal foi bloqueada pelo tratamento com ifenprodil (1), assim ocorre à liberação do retículo endoplasmático de novos arranjos contendo em maior proporção a subunidade NR2B (2), provocando um provável efeito de “up regulation” de receptores NMDA contendo a subunidade NR2B (3). O funcionamento excessivo (4) destes novos receptores NMDA promove o aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (5), deflagrando um processo de neurotoxicidade (6). No tratamento agudo com o ifenprodil, o rápido bloqueio da subunidade NR2B (1) promove a diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  o que conduz a prevenção da excitotoxicidade (2).

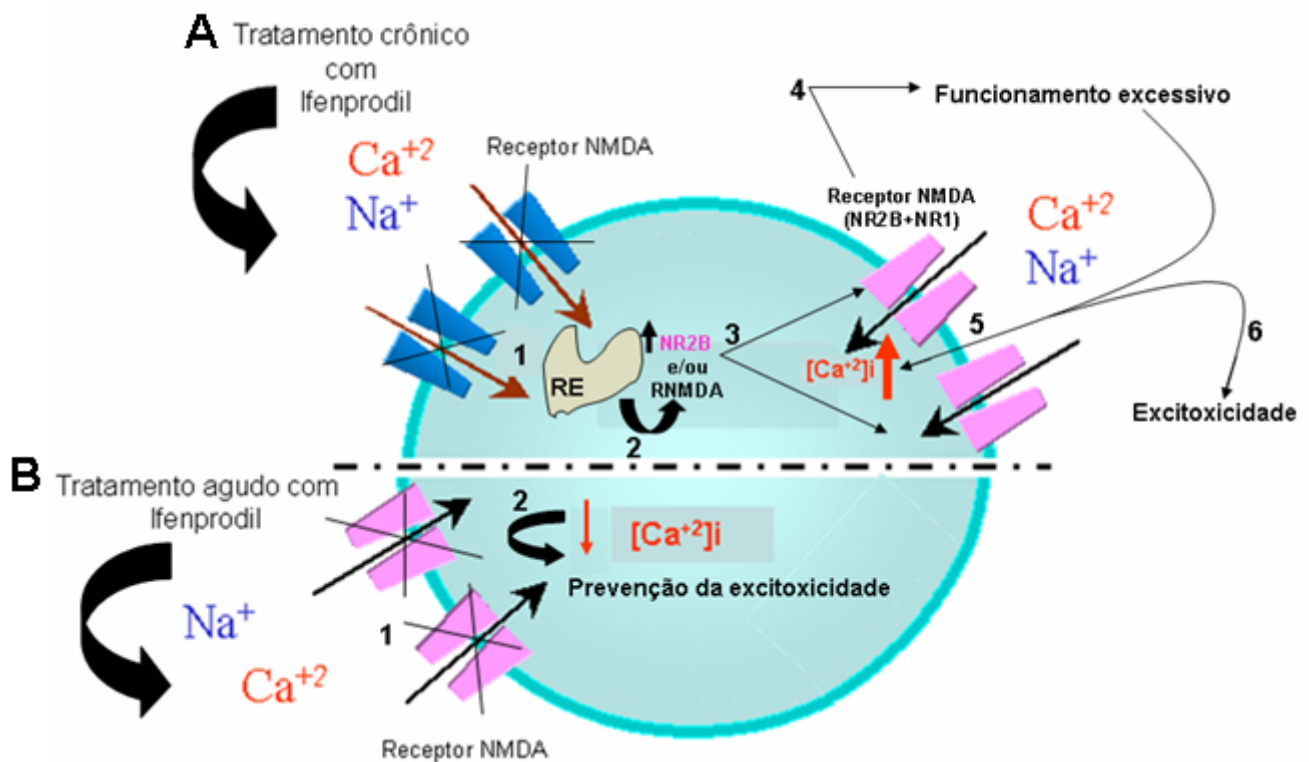


Fig. 18. Esquema de mecanismo excitotóxico e neuroprotetor desencadeado pelo tratamento com ifenprodil. (A) o tratamento crônico com ifenprodil aumenta os níveis de expressão (2, 3) e ativação de receptores NMDA (4) deflagrando o mecanismo excitotóxico (5 e 6). (B) o tratamento agudo com ifenprodil bloqueia brevemente a atividade dos receptores NMDA (1) diminuindo o influxo de  $Ca^{2+}$  prevenindo a excitotoxicidade (2).



## 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho os resultados obtidos sugerem fortemente que o bloqueio da subunidade NR2B promova alterações na funcionalidade do receptor NMDA de forma antagônica quando comparamos os tratamentos agudo e crônico com o ifenprodil. Este comportamento funcional do receptor reflete a presença da subunidade NR2B de forma significativa na composição dos receptores funcionais em nosso modelo experimental, fato que é corroborado pela detecção da proteína desta subunidade no western blot. Além disso, o bloqueio crônico da subunidade NR2B alterou a expressão das outras subunidades que compõem o canal. Os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não estão esclarecidos. Desta forma, a realização de mais experimentos é fundamental no sentido de descrever com maiores detalhes a proposta deste trabalho.

O aumento do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  observado quando da incubação crônica com ifenprodil sugere um aumento geral do número de receptores disponíveis na membrana, uma vez que ocorre um aumento da expressão das subunidades NR1 e NR2B, além do aumento na ligação do [ $^3\text{H}$ ] MK801 ao receptor NMDA.

É importante lembrar que resultados anteriormente obtidos no laboratório demonstraram a participação do sistema purinérgico no controle do receptor

NMDA, que contribui para a proteção da excitotoxicidade disparada pelo glutamato. O efeito da adenosina na sobrevivência das células foi desencadeado por ativação crônica dos receptores  $A_{2a}$  de adenosina. O aumento da expressão da subunidade NR2B em culturas submetidas a tratamento crônico (72 horas) com DPMA, um agonista de receptor  $A_{2a}$ , sugere o envolvimento do sistema purinérgico no controle da expressão da subunidade NR2B do receptor NMDA. Então, a partir destes dados, torna-se cada vez mais interessante o estudo da regulação da expressão do receptor NMDA e seu envolvimento no evento excitotóxico. Portanto, fatores que promovam alterações no funcionamento ou expressão destes receptores, como é o caso dos efeitos provocados pelo bloqueio da subunidade NR2B na atividade do receptor NMDA, representam subsídios que devem ser explorados em função do entendimento do efeito neuroprotetor ou neurotóxico que envolve o receptor glutamatérgico do tipo NMDA no SNC.

## 7 – PERSPECTIVAS

Como mostrado por Fukaya e colaboradores em 2003, o knockout para a subunidade NR1 bloqueia a inserção do complexo receptor NMDA na membrana, evidenciando a necessidade da co-expressão e associação das subunidades para saída do retículo endoplasmático e inserção nas sinapses. O controle da expressão da subunidade NR2B pelo sistema purinérgico pode então promover variações na expressão das subunidades NR1 e NR2A do receptor NMDA. Uma das possibilidades que surge do controle da expressão da subunidade NR2B pela ativação dos receptores  $A_{2a}$  de adenosina é a possível ocorrência de um atraso na maturação sináptica, uma vez que a expressão das subunidades NR2A é inibida. Com estas informações, a pesquisa do controle das subunidades formadoras do receptor NMDA, variando com a atividade do receptor ou com o bloqueio da subunidade NR2B, torna-se extremamente interessante e necessária para o melhor entendimento dos resultados obtidos. Assim, temos adiante muitas interrogações, algumas delas podendo ser respondidas a partir dos seguintes experimentos:

- Medida da atividade do receptor NMDA através do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  na presença do ifenprodil em diferentes estágios do desenvolvimento de células da retina em cultura.

- Avaliação de como a expressão protéica das subunidades NR1, NR2A e NR2B se apresenta em diferentes estágios do desenvolvimento das culturas de retina tratadas com ifenprodil ou DPMA.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, R., J. D. & Lindsey C. L. Elsner. Expression of cone-like properties by chick embryo neural retina cells in glial-free monolayer cultures. *J Cell Biol*, v.99, n.3, Sep, p.1173-8. 1984.

Barria, A. & R. Malinow. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron*, v.48, n.2, Oct 20, p.289-301. 2005.

Bear, M.F., Connors, B.W. & Paradiso M.A. Neuroscience: Exploring the Brain. 2ª edição. Baltimore - Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore. 2002.

Berne, R. M., R. Rubio, J. G. Dobson, Jr. & R. R. Curnish. Adenosine and adenine nucleotides as possible mediators of cardiac and skeletal muscle blood flow regulation. *Circ Res*, v.28, Jan, p.Suppl 1:115+. 1971.

Bindokas, V. P., J. Jordan, C. C. Lee & R. J. Miller. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci*, v.16, n.4, Feb 15, p.1324-36. 1996.

Bliss, T. V. & G. L. Collingridge. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v.361, n.6407, Jan 7, p.31-9. 1993.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Burnashev, N., H. Monyer, P. H. Seeburg e B. Sakmann. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, v.8, n.1, Jan, p.189-98. 1992.

Bruns, R. F., J. W. Daly & S. H. Snyder. Adenosine receptors in brain membranes: binding of N6-cyclohexyl[3H]adenosine and 1,3-diethyl-8-[3H]phenylxanthine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.77, n.9, Sep, p.5547-51. 1980.

Carroll, R. C. & R. S. Zukin. NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci*, v.25, n.11, Nov, p.571-7. 2002.

Chalmers, D. T., D. Dewar, D. I. Graham, D. N. Brooks & J. McCulloch. Differential alterations of cortical glutamatergic binding sites in senile dementia of the Alzheimer type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87, n.4, Feb, p.1352-6. 1990.

Chatterton, J. E., M. Awobuluyi, L. S. Premkumar, H. Takahashi, M. Talantova, Y. Shin, J. Cui, S. Tu, K. A. Sevarino, N. Nakanishi, G. Tong, S. A. Lipton & D. Zhang. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, v.415, n.6873, Feb 14, p.793-8. 2002.

Choi, D. W. & S. M. Rothman. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, v.13, p.171-82. 1990.

Christine, C. W. & D. W. Choi. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci*, v.10, n.1, Jan, p.108-16. 1990.

Ciabarra, A. M., J. M. Sullivan, L. G. Gahn, G. Pecht, S. Heinemann & K. A. Sevarino. Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci*, v.15, n.10, Oct, p.6498-508. 1995.

Collingridge, G. L. & Bliss T. V. NMDA receptors: their role in long term potentiation. *Trends Neurosci.*, V. 10, p. 288-293, 1987.

Coulombre, A. J. Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am J Anat*, v.96, n.1, Jan, p.153-89. 1955.

Cowburn, R. F., J. A. Hardy & P. J. Roberts. Glutamatergic neurotransmission in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*, v.18, n.3, Jun, p.390-2. 1990.

Cristovao, A. J., C. R. Oliveira & C. M. Carvalho. Expression of functional N-methyl-D-aspartate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Brain Res Mol Brain Res*, v.99, n.2, Mar 28, p.125-33. 2002.

Cull-Candy, S., S. Brickley & M. Farrant. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, v.11, n.3, Jun, p.327-35. 2001.

Cull-Candy, S. G. & D. N. Leszkiewicz. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, v.2004, n.255, Oct 19, p.re16. 2004.



Dawson, V. L., T. M. Dawson, E. D. London, D. S. Bredt & S. H. Snyder. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.88, n.14, Jul 15, p.6368-71. 1991.

De Mello, F. G. The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the chick retina. *J Neurochem*, v.31, n.4, Oct, p.1049-53. 1978.

De Mello, M. C., A. L. Ventura, R. Paes De Carvalho, W. L. Klein & F. G. De Mello. Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.79, n.18, Sep, p.5708-12. 1982.

Dessi, F., C. Charriaut-Marlangue, M. Khrestchatisky & Y. Ben-Ari. Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J Neurochem*, v.60, n.5, May, p.1953-5. 1993.

Dugan, L. L., S. L. Sensi, L. M. Canzoniero, S. D. Handran, S. M. Rothman, T. S. Lin, M. P. Goldberg & D. W. Choi. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci*, v.15, n.10, Oct, p.6377-88. 1995.

Dykens, J.A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$ : implications for neurodegeneration. *J. Neurochem.* 63: 584-591. 1994.

Egebjerg, J. e S. F. Heinemann.  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.2, Jan 15, p.755-9. 1993.

Eirmel, S. E Schramm M.. The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J. Neurochem.*, V. 62, 1223-1226, 1994.

Fatokun, A. A., T. W. Stone, et al. Adenosine receptor ligands protect against a combination of apoptotic and necrotic cell death in cerebellar granule neurons. *Exp Brain Res*, Nov 27. 2007.

Ferreira, J. M. e R. Paes-De-Carvalho. Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res*, v.900, n.2, May 11, p.169-76. 2001.

Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G. & Wasserman, W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 364-374.2000.

Fredholm, B. B., I. J. Ap, K. A. Jacobson, K. N. Klotz & J. Linden. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, v.53, n.4, Dec, p.527-52. 2001.

Gardoni, F., C. Bellone, B. Viviani, M. Marinovich, E. Meli, D. E. Pellegrini-Giampietro, F. Cattabeni & M. Di Luca. Lack of PSD-95 drives hippocampal neuronal cell death through activation of an alpha CaMKII transduction pathway. *Eur J Neurosci*, v.16, n.5, Sep, p.777-86. 2002.

Gogas, K. R. Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol*, v.6, n.1, Feb, p.68-74. 2006.

Gunter, T. E., K. K. Gunter, S. S. Sheu & C. E. Gavin. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol*, v.267, n.2 Pt 1, Aug, p.C313-39. 1994.

Guo, W., F. Wei, S. Zou, M. T. Robbins, S. Sugiyo, T. Ikeda, J. C. Tu, P. F. Worley, R. Dubner & K. Ren. Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA

receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci*, v.24, n.41, Oct 13, p.9161-73. 2004.

Hall, B. J., B. Ripley & A. Ghosh. NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *J Neurosci*, v.27, n.49, Dec 5, p.13446-56. 2007.

Hollmann, M. Structure of ionotropic glutamate receptors. In: Ionotropic glutamate receptors in the CNS ( Jonas P., Monyer H., eds). p 1-98. Berlin: Springer, 1999.

Hammond, C. Cellular and molecular neurobiology. *Editor Academic Press*, 1<sup>a</sup> ed. California, 1996.

Hartley, D. M., M. C. Kurth, L. Bjerkness, J. H. Weiss & D. W. Choi. Glutamate receptor-induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci*, v.13, n.5, May, p.1993-2000. 1993.

Herb, A., N. Burnashev, P. Werner, B. Sakmann, W. Wisden & P. H. Seeburg. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits.

*Neuron*, v.8, n.4, Apr, p.775-85. 1992.

Hoehn, K. & T. D. White. Role of excitatory amino acid receptors in K<sup>+</sup>- and glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. *J Neurochem*, v.54, n.1, Jan, p.256-65. 1990.

Hume, R. I., R. Dingledine & S. F. Heinemann. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*, v.253, n.5023, Aug 30, p.1028-31. 1991.

Hynd, M. R., H. L. Scott & P. R. Dodd. Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, v.90, n.4, Aug, p.913-9. 2004.

Ikonomidou, C., F. Bosch, M. Miksa, P. Bittigau, J. Vockler, K. Dikranian, T. I. Tenkova, V. Stefovskaja, L. Turski & J. W. Olney. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, v.283, n.5398, Jan 1, p.70-4. 1999.

Jarvis, S. M. & J. D. Young. Nucleoside transport in rat erythrocytes: two components with differences in sensitivity to inhibition by

nitrobenzylthioinosine and p-chloromercuriphenyl sulfonate. *J Membr Biol*, v.93, n.1, p.1-10. 1986.

Johnson, J. W. & P. Ascher. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, v.325, n.6104, Feb 5-11, p.529-31. 1987.

Kemp, J. A. & R. M. Mckernan. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci*, v.5 Suppl, Nov, p.1039-42. 2002.

Kim, M. J., A. W. Dunah, Y. T. Wang & M. Sheng. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*, v.46, n.5, Jun 2, p.745-60. 2005.

Kornau, H. C., L. T. Schenker, M. B. Kennedy & P. H. Seeburg. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, v.269, n.5231, Sep 22, p.1737-40. 1995.

Kornhuber, J. & M. Weller. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol Psychiatry*, v.41, n.2, Jan 15, p.135-44. 1997.

Kutsuwada, T., N. Kashiwabuchi, H. Mori, K. Sakimura, E. Kushiya, K. Araki,

H. Meguro, H. Masaki, T. Kumanishi, M. Arakawa & Et Al. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, v.358, n.6381, Jul 2, p.36-41. 1992.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Lavezzari, G., J. Mccallum, C. M. Dewey & K. W. Roche. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J Neurosci*, v.24, n.28, Jul 14, p.6383-91. 2004.

Liu, L., T. P. Wong, M. F. Pozza, K. Lingenhoechl, Y. Wang, M. Sheng, Y. P. Auberson & Y. T. Wang. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, v.304, n.5673, May 14, p.1021-4. 2004.

Lynch, D. R. & R. P. Guttman. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets*, v.2, n.3, Sep, p.215-31. 2001.

Leonard, A. S., I. A. Lim, D. E. Hemsworth, M. C. Horne & J. W. Hell. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.6, Mar 16, p.3239-44. 1999.

Londos, C., D. M. Cooper & J. Wolff. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.77, n.5, May, p.2551-4. 1980.

Louzada-Junior, P., J. J. Dias, W. F. Santos, J. J. Lachat, H. F. Bradford & J. Coutinho-Netto. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. *J Neurochem*, v.59, n.1, Jul, p.358-63. 1992.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

Lynch, D. R. & R. P. Guttman. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets*, v.2, n.3, Sep, p.215-31. 2001.

Madry, C., I. Mesic, I. Bartholomaeus, A. Nicke, H. Betz & B. Laube. Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun*, v.354, n.1, Mar 2, p.102-8. 2007.



Matsuda, K., Y. Kamiya, S. Matsuda & M. Yuzaki. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res*, v.100, n.1-2, Apr 30, p.43-52. 2002.

Mayer, M. L. & G. L. Westbrook. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol*, v.28, n.3, p.197-276. 1987.

Mayer, M. L., Viklicky L. Jr. & Sernegor, E. A physiologist's view of the N-Methyl-D-Aspartate receptor: an allosteric ion channel with multiple regulatory sites. *Drug Dev. Res.* V.17, p.263-280. 1989.

Meguro, H., H. Mori, K. Araki, E. Kushiya, T. Kutsuwada, M. Yamazaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, K. Sakimura & M. Mishina. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*, v.357, n.6373, May 7, p.70-4. 1992.

Meldrum, B. & J. Garthwaite. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, v.11, n.9, Sep, p.379-87. 1990.

Meng, F. & G. Zhang. Autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha induced by cerebral ischemia immediately targets and phosphorylates N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B (NR2B) in hippocampus of rats. *Neurosci Lett*, v.333, n.1, Nov 15, p.59-63. 2002.

Miller, R. F. & Slaughter, M. Excitatory amino acid receptors of the retina: diversity of subtypes and conductance mechanisms. *Trends Neurosci*, V. 9, p. 211-218, 1986.

Monaghan, D. T., R. J. Bridges & C. W. Cotman. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.29, p.365-402. 1989.

Monahan, J. B. & J. Michel. Identification and characterization of an N-methyl-D-aspartate-specific L-[3H]glutamate recognition site in synaptic plasma membranes. *J Neurochem*, v.48, n.6, Jun, p.1699-708. 1987.

Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann & P. H. Seeburg. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, v.256, n.5060, May 22, p.1217-21. 1992.

Mori, H. & M. Mishina. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, v.34, n.10, Oct, p.1219-37. 1995.

Morikawa, E., H. Mori, Y. Kiyama, M. Mishina, T. Asano & T. Kirino. Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J Neurosci*, v.18, n.23, Dec 1, p.9727-32. 1998.

Moriyoshi, K., M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno & S. Nakanishi. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, v.354, n.6348, Nov 7, p.31-7. 1991.

Mothet, J. P., A. T. Parent, H. Wolosker, R. O. Brady, Jr., D. J. Linden, C. D. Ferris, M. A. Rogawski & S. H. Snyder. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

v.97, n.9, Apr 25, p.4926-31. 2000.

Mott, D. D., J. J. Doherty, S. Zhang, M. S. Washburn, M. J. Fendley, P. Lyuboslavsky, S. F. Traynelis & R. Dingledine. Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci*, v.1, n.8, Dec, p.659-67. 1998.

Nagy, G. G., M. Watanabe, M. Fukaya & A. J. Todd. Synaptic distribution of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord revealed with an antigen-unmasking technique. *Eur J Neurosci*, v.20, n.12, Dec, p.3301-12. 2004.

Nakanishi, S. Molecular diversity of the glutamate receptors. *Clin Neuropharmacol*, v.15 Suppl 1 Pt A, p.4A-5A. 1992.

Nicholls, D.G., K., Hossman, K.A., Siesjö, B.K. & Welsh, F.A. Molecular Mechanisms of the schemic brain damage. *Eds Kogure*, (Elsevier, Amsterdam) 97-106. 1985.

Niemann, S., H. Kanki, Y. Fukui, K. Takao, M. Fukaya, M. N. Hynynen, M. J. Churchill, J. M. Shefner, R. T. Bronson, R. H. Brown, Jr., M. Watanabe, T.

Miyakawa, S. Itohara & Y. Hayashi. Genetic ablation of NMDA receptor subunit NR3B in mouse reveals motoneuronal and nonmotoneuronal phenotypes. *Eur J Neurosci*, v.26, n.6, Sep, p.1407-20. 2007.

Nishi, M., H. Hinds, H. P. Lu, M. Kawata & Y. Hayashi. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci*, v.21, n.23, Dec 1, p.RC185. 2001.

Nowak, L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet & A. Prochiantz. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, v.307, n.5950, Feb 2-8, p.462-5. 1984.

Olney, J. W. Excitotoxicity and N-Methyl-D-Aspartate receptors. *Drug Dev. Res.*, V. 17, p. 299-319, 1989.

Paes De Carvalho, R. Development of A1 adenosine receptors in the chick embryo retina. *J Neurosci Res*, v.25, n.2, Feb, p.236-42. 1990.

Paes De Carvalho, R. & F. G. De Mello. Expression of A1 adenosine receptors modulating dopamine-dependent cyclic AMP accumulation in the chick embryo

retina. *J Neurochem*, v.44, n.3, Mar, p.845-51. 1985.

Paes-De-Carvalho, R. Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. *An Acad Bras Cienc*, v.74, n.3, Sep, p.437-51. 2002.

Papadakis, M., L. M. Hawkins & F. A. Stephenson. Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *J Biol Chem*, v.279, n.15, Apr 9, p.14703-12. 2004.

Perez-Otano, I., C. T. Schulteis, A. Contractor, S. A. Lipton, J. S. Trimmer, N. J. Sucher & S. F. Heinemann. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci*, v.21, n.4, Feb 15, p.1228-37. 2001.

Phillis, J. W. & P. H. Wu. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol*, v.16, n.3-4, p.187-239. 1981.

Radegran, G. & Y. Hellsten. Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. *Acta Physiol Scand*, v.168, n.4, Apr, p.575-91. 2000.

Rang, H. P., Dale, M.M. & Ritter, J.M. Farmacologia. *Editores Guanabara Koogan*, 3<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro, 2001.

Ransom, R. W. & N. L. Stec. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem*, v.51, n.3, Sep, p.830-6. 1988.

Ralevic, V. & G. Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, v.50, n.3, Sep, p.413-92. 1998.

Reynolds, I. J. & R. J. Miller. [3H]MK801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor reveals drug interactions with the zinc and magnesium binding sites. *J Pharmacol Exp Ther*, v.247, n.3, Dec, p.1025-31. 1988.

Reynolds, I. J. & T. G. Hastings. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci*, v.15, n.5 Pt 1, May, p.3318-27. 1995.

Ribeiro J.A.. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the pal damage, *J. Neurosci.*, v. 9, p. 1579–1590, 1989.

Robinson, M. B. & J. T. Coyle. Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *Faseb J*, v.1, n.6, Dec, p.446-55. 1987.

Rock, D. M. & R. L. Macdonald. The polyamine spermine has multiple actions on N-methyl-D-aspartate receptor single-channel currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol*, v.41, n.1, Jan, p.83-8. 1992.

Roman, R. M. & J. G. Fitz. Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology*, v.116, n.4, Apr, p.964-79. 1999.

Sacaan, A. I. & K. M. Johnson. Spermine enhances binding to the glycine site associated with the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Mol Pharmacol*, v.36, n.6, Dec, p.836-9. 1989.

Sampaio, L. F. & R. Paes-De-Carvalho. Developmental regulation of group III metabotropic glutamate receptors modulating adenylate cyclase activity in the avian retina. *Neurochem Int*, v.33, n.4, Oct, p.367-74. 1998.



Scatton, B. The NMDA receptor complex. *Fundam Clin Pharmacol*, v.7, n.8, p.389-400. 1993.

Schell, M. J. The N-methyl D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.359, n.1446, Jun 29, p.943-64. 2004.

Schell, M. J., R. O. Brady, Jr., M. E. Molliver & S. H. Snyder. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci*, v.17, n.5, Mar 1, p.1604-15. 1997.

Schell, M. J., M. E. Molliver & S. H. Snyder. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.92, n.9, Apr 25, p.3948-52. 1995.

Schiffer, H. H., G. T. Swanson & S. F. Heinemann. Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron*, v.19, n.5, Nov, p.1141-6. 1997.

Schoepp, D., J. Bockaert & F. Sladeczek. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v.11, n.12, Dec, p.508-15. 1990.

Schuler, T., I. Mesic, C. Madry, I. Bartholomaeus & B. Laube. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 hetero-dimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem*, Oct 24. 2007.

Seeburg, P. H. The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol Sci*, v.14, n.8, Aug, p.297-303. 1993.

Sebastiao, A. M. & J. A. Ribeiro. Evidence for the presence of excitatory A2 adenosine receptors in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, v.138, n.1, Apr 13, p.41-4. 1992.

Smothers, C. T. & J. J. Woodward. Effect of the NR3 subunit on ethanol inhibition of recombinant NMDA receptors. *Brain Res*, v.987, n.1, Oct 10, p.117-21. 2003.

Smothers, C. T. & J. J. Woodward. Pharmacological characterization of glycine-activated currents in HEK 293 cells expressing N-methyl-D-aspartate NR1 and NR3 subunits. *J Pharmacol Exp Ther*, v.322, n.2, Aug, p.739-48. 2007.

Sommer, B., N. Burnashev, T. A. Verdoorn, K. Keinanen, B. Sakmann & P. H. Seeburg. A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J*, v.11, n.4, Apr, p.1651-6. 1992.

Stephenson, F. A. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets*, v.2, n.3, Sep, p.233-9. 2001.

Strack, S. & R. J. Colbran. Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. *J Biol Chem*, v.273, n.33, Aug 14, p.20689-92. 1998.

Sugihara, H., K. Moriyoshi, T. Ishii, M. Masu & S. Nakanishi. Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun*, v.185, n.3, Jun 30, p.826-32. 1992.

Sun, L., F. L. Margolis, M. T. Shipley & M. S. Lidow. Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett*, v.441, n.3, Dec 28, p.392-6. 1998.

Tovar, K. R. & G. L. Westbrook. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*, v.19, n.10, May 15, p.4180-8. 1999.

Tovar, K. R. & Westbrook, G. L. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*, v.19, n.10, May 15, p.4180-8. 1999.

Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.76, n.9, Sep, p.4350-4. 1979.

Van Calker, D., M. Muller & B. Hamprecht. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*, v.33, n.5, Nov, p.999-1005. 1979.

Van Belle H., Goossens F. & Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J. Physiol.*, V. 252, p. 886 – 893, 1997.

Verdoorn, T. A., N. Burnashev, H. Monyer, P. H. Seeburg & B. Sakmann. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science*, v.252, n.5013, Jun 21, p.1715-8. 1991.

Vicini, S., J. F. Wang, J. H. Li, W. J. Zhu, Y. H. Wang, J. H. Luo, B. B. Wolfe & D. R. Grayson. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol*, v.79, n.2, Feb, p.555-66. 1998.

Watanabe, M., Y. Inoue, K. Sakimura & M. Mishina. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport*, v.3, n.12, Dec, p.1138-40. 1992.

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

Watkins, J. C., P. Krogsgaard-Larsen & T. Honore. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci*, v.11, n.1, Jan, p.25-33. 1990.

Werner, P., M. Voigt, K. Keinanen, W. Wisden & P. H. Seeburg. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature*, v.351, n.6329, Jun 27, p.742-4. 1991.

Wood, P. L., T. S. Rao, S. Iyengar, T. Lanthorn, J. Monahan, A. Cordi, E. Sun, M. Vazquez, N. Gray & P. Contreras. A review of the in vitro and in vivo neurochemical characterization of the NMDA/PCP/glycine/ion channel receptor macrocomplex. *Neurochem Res*, v.15, n.2, Feb, p.217-30. 1990.

Yeh, G. C., D. W. Bonhaus & J. O. Mcnamara. Evidence that zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor-gated ion channel activation by noncompetitive antagonism of glycine binding. *Mol Pharmacol*, v.38, n.1, Jul, p.14-9. 1990.

Zhang, S., S. Kashii, H. Yasuyoshi, M. Kikuchi, Y. Honda, K. Kaneda, S. Sato & A. Akaike. Protective effects of ifenprodil against glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, v.238, n.10, Oct, p.846-52. 2000.

Zeron, M. M., O. Hansson, N. Chen, C. L. Wellington, B. R. Leavitt, P. Brundin, M. R. Hayden & L. A. Raymond. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, v.33, n.6, Mar 14, p.849-60. 2002.

Zhou, J. G., J. R. Meno, S. S. Hsu & H. R. Winn. Effects of theophylline and cyclohexyladenosine on brain injury following normo- and hyperglycemic ischemia: a histopathologic study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, v.14, n.1, Jan, p.166-73. 1994.

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R. Ras and rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*, 110:443–455. (2002).

Zhu, Y., D. Pak, Y. Qin, S. G. McCormack, M. J. Kim, J. P. Baumgart, V. Velamoor, Y. P. Auberson, P. Osten, L. Van Aelst, M. Sheng & J. J. Zhu. Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation. *Neuron*, v.46, n.6, Jun 16, p.905-16. 2005.

Disponível em : <<http://webvision.med.utah.edu/imageswv/GLU13.jpeg/>>

Acesso em: 15 jan. 2008.

Disponível em : <<http://www.chris-parsons.onlinehome.de/nmda.htm/>>

Acesso em: 15 jan. 2008.

Disponível em : <<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03007105h.htm/>>

Acesso em: 15 jan. 2008.

Disponível em :< [http://www.aderis.com/img/art\\_adenosine.gif/](http://www.aderis.com/img/art_adenosine.gif/)> Acesso em:

15 jan. 2008.



# 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](#)