

**THIAGO DE SOUZA FOLADOR**

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE GLUTAMATO DO  
TIPO NMDA NO CEREBELO DE AVES DURANTE O  
ENVELHECIMENTO**

**UNIVERSIDADE CIDADE DE SÃO PAULO  
UNICID**

**SÃO PAULO  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**THIAGO DE SOUZA FOLADOR**

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE GLUTAMATO DO  
TIPO NMDA NO CEREBELO DE AVES DURANTE O  
ENVELHECIMENTO**

**Dissertação apresentada como  
exigência parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Fisioterapia  
junto à Universidade Cidade de São  
Paulo – Unicid sob orientação da  
Prof. Dra. Raquel Simoni Pires.**

**UNIVERSIDADE CIDADE DE SÃO PAULO  
UNICID**

**SÃO PAULO  
2008**

## DEDICATÓRIA

A Deus, por me dar força para continuar a caminhada e enfrentar e superar cada desafio.

Obrigado por me fazer o que sou e por me permitir chegar onde estou.

Aos meus pais, Regina e Alcides, quero agradecer por tudo que vocês fazem por mim.

A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Por me proporcionarem as oportunidades que nunca tiveram.

Minha eterna gratidão. Obrigado!

A minha esposa, Vânia, meu presente, sem ela nenhum sonho seria possível ou valeria a pena.

Dizem que atrás de um grande homem sempre há uma grande mulher e se sou o homem que hoje sou, devo muito disso a esta grande mulher que é você!!! Te amo...

## AGRADECIMENTOS

A Profa. **Dra. Raquel Simone Pires**, pela paciência, dedicação, orientação, e por me fazer aprender a ser uma pessoa-profissional-pesquisador muito melhor. Por suas lições e seus exemplos, meu agradecimento.

Aos professores **Dr. Cláudio Antonio Barbosa** e **Dra. Andréa da Silva Torrão**, pelas valiosas contribuições e orientações no Exame de Qualificação.

Aos **professores e secretárias do Departamento de Mestrado em Fisioterapia**, respectivamente, pelo aprendizado e pelo apoio técnico.

Aos **colegas da I e II Turma Mestrado Fisioterapia**, pela coragem e companheirismo.

Aos colegas **Caroline, Bruna, Camila, Ludmila, Nataly e Lucas** pela disponibilidade e apoio.

A **Dra. Heloisa Maria de Siqueira Bueno e Paula Bertacini** pelo auxílio no apoio de análise estatística.

Ao **Laboratório de Neurociência I**, por disponibilizar o laboratório, a todos os funcionários e alunos. Em especial ao **Renato, Márcia e ao Professor Cláudio** pelo aprendizado e apoio técnico.

Ao **Laboratório de Neurobiologia Celular - ICB I** por permitir a finalização da coleta de dados.

Aos **familiares e amigos** que sempre apoiaram este trabalho, pelo carinho, em especial a minhas irmãs **Daniela** e **Mariana**, sempre muito atenciosas, e sempre disponíveis para ajudar em tudo.

A **Wanderli Lima**, minha professora de inglês, pela gentileza, dedicação e paciência nas inúmeras transcrições de inglês.

A todos os participantes da pesquisa, **professores, alunos, gestores e funcionários** pelas valiosas contribuições.

## RESUMO

Folador, T.S. Expressão dos receptores de glutamato do tipo NMDA no cerebelo de aves durante o envelhecimento [Dissertação]. São Paulo: Universidade Cidade de São Paulo; 2008.

O envelhecimento é um processo fisiológico que ocorre assincronicamente em diferentes áreas do encéfalo e, pode ser conceituado como um processo dinâmico e progressivo, no qual há alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, podendo levar a deficiências cognitivas, afetivas, de aprendizado, memória e motoras. Considerando que o cerebelo e a neurotransmissão glutamatérgica estão envolvidos no processamento de várias dessas funções, este trabalho visou estudar a expressão da subunidade NR1 dos receptores de glutamato tipo NMDA nas células de Purkinje do cerebelo de pintos durante o envelhecimento. Utilizou-se pintos (*Gallus gallus*) jovens (30 dias de vida), adultos (1 ano e 6 meses) e senis (aproximadamente 4 anos de vida) para avaliar a expressão da subunidade NR1. Os encéfalos desses animais foram submetidos às técnicas de imuno-histoquímica e *immunoblotting*. Analisou-se a densidade média de células NR1-positivas e a densidade óptica dos resultados do *immunoblotting*, os quais foram submetidos à análise estatística utilizando o teste ANOVA e o teste de Bonferroni, quando apropriado. Adotou-se nível de significância de 5%. A expressão NR1 nas células de Purkinje mostrou uma intensa imunorreatividade nos corpos celulares e de moderada a intensa na arborização dendrítica dos animais jovens. Já nos animais idosos, essa expressão apresentou uma queda acentuada, passando de leve a moderada nos corpos das células de Purkinje e leve na arborização dendrítica. Além disso, a densidade média das células de Purkinje das folhas cerebelar II, VI e IX que expressam NR1 mostraram uma diminuição estatisticamente significativa ( $p=0,028$ ) no animal idoso comparado com o animal jovem. Entretanto, observou-se um discreto aumento da porcentagem de células de Purkinje que expressam NR1 em relação as células de Purkinje nos animais idosos comparado aos jovens. A expressão de NR1 no cerebelo de galinha revelada pela técnica de *immunoblotting* não apresentou mudança significativa durante o envelhecimento.

Os nossos dados sugerem que o envelhecimento pode conduzir a mudanças no padrão de expressão da subunidade NR1 revelando uma queda na densidade média de células de Purkinje NR1-positivas e respectiva arborização dendrítica no cerebelo de galinhas, fenômeno que pode refletir os distúrbios motores e cognitivos encontrados em animais idosos.

**Palavras-chave:** Neurotransmissão glutamatérgica, receptores de glutamato, envelhecimento, cerebelo.

## ABSTRACT

Folador, T.S. Expression of NMDA type glutamate receptors in the cerebellum of birds during aging [Dissertation]. São Paulo: Universidade Cidade de São Paulo; 2008.

Aging is a physiologic process that takes place in a non-synchronous way in different areas of the brain and which can be defined as a dynamic and progressive process. There are morphological, functional and biochemical alterations which can lead to cognitive, affective, learning, memory and motor deficiencies. Since the cerebellum and the glutamatergic neurotransmission are involved in the processing of several of those functions, the present paper aimed at studying the presence of the NR1 subunit in the NMDA type glutamate receptors in the Purkinje cells of the cerebellum of chicks during aging. Young (30 days old), adult (1 year and 6 months old) and old (approximately 4 years old) chicks (*Gallus gallus*) were utilized in order to evaluate the presence of the NR1 subunit. The brains of those animals were subjected to immunohistochemical and immunoblotting techniques. Average density of positive NR1 cells and optical density of the immunoblotting results were analyzed and submitted to statistical analysis by utilizing the ANOVA test and the Bonferroni test when appropriate. A 5% significance level was adopted. The NR1 presence in the Purkinje cells showed an intense immunoreactivity in the cellular bodies and from moderate to intense in the dendritic arborization of the young animals. In the old animals, however, this presence showed a substantial decrease, going from slight to moderate in the bodies of the Purkinje cells and slight in the dendritic arborization. Moreover, the average density of the Purkinje cells in the cerebellar leaves II, VI and IX which present NR1 showed a statistically significant decrease ( $p=0,028$ ) in the old animals when compared to the young animals. Nevertheless, when compared to the young animals, a subtle increase in the percentage of Purkinje cells which present NR1 in relation to the Purkinje cells in the old animals was observed. The presence of NR1 in the chicken's cerebellum revealed by the immunoblotting technique did not present any significant change during aging. Our data suggest that aging can lead to changes in the presence pattern of the NR1 subunit showing a decrease in the average density of the positive NR1 Purkinje cells and respective dendritic arborization in the cerebellum of hens, phenomenon which can cause the cognitive and motor disorders found in old animals.

**Key words:** Glutamatergic neurotransmission, glutamate receptors, aging, cerebellum.

## SUMÁRIO

<b>I- INTRODUÇÃO</b> .....	1
I-1. Neurotransmissão Glutamatérgica .....	1
I-2. Sistema Nervoso Central e Envelhecimento.....	7
I-3. Sistema Glutamatérgico e Envelhecimento .....	9
I-4. Cerebelo .....	13
<b>II- JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS</b> .....	18
<b>III- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
III-1. Animais .....	19
III-2. Protocolo de Imuno-histoquímica .....	19
III-3. Protocolo de “IMMUNOBLOTTING” .....	21
III-4. Análise dos dados de Imuno-histoquímica .....	22
III-5. Análise Estatística .....	23
<b>IV- RESULTADOS</b> .....	24
IV-1. Análise qualitativa da expressão da subunidade NR1 no cerebelo de pinto durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento .....	24
IV-2. Análise semi-quantitativa da expressão da subunidade NR1 no cerebelo de pinto durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento .....	28
IV-3. Análise semi-quantitativa das células de Purkinje do cerebelo de pinto durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento, pela técnica de Giemsa .....	29
IV-4. “IMMUNOBLOTTING” .....	33
<b>V- DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>VI- CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41



## **I – INTRODUÇÃO**

### **I – 1. NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA.**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central em mamíferos (OZAWA et al., 1998). O sistema glutamatérgico está envolvido nas funções motoras, cognitivas, emocionais e na plasticidade sináptica tanto no desenvolvimento quanto no envelhecimento (SINGER, 1990; OZAWA et al., 1998). Entretanto, a hiper-excitabilidade glutamatérgica pode estar envolvida em algumas disfunções neuronais e doenças degenerativas, tais como a epilepsia e a doença de Alzheimer (CHOI et al., 1988). O glutamato e a glutamina são sintetizados no encéfalo, sendo suas concentrações intracelulares altas e extracelulares baixas (0,1 – 1 mM), assim mantidas pela alta afinidade dos sistemas de captação Na<sup>+</sup>-dependentes (KVAMME, et al., 1998). O glutamato não atravessa a barreira hemato-encefálica sendo sua síntese local. Após sua descarga em um evento excitatório pré-sináptico, o glutamato é eliminado no espaço extracelular. A remoção do glutamato da fenda sináptica e o cessamento de sua ação é determinada pela recaptação exercida por transportadores de alta afinidade localizados no neurônio pré-sináptico e nos astrócitos (TAKUMI et al., 1998).

Desde a década de 50, estudos sugeriram que o glutamato gerava ações excitatórias no sistema nervoso central através de uma variedade de receptores (WATKINS & JANE, 2006). Essa idéia precedeu a caracterização desses receptores. Estudos farmacológicos e eletrofisiológicos revelaram que os receptores de glutamato (GluRs) podem ser divididos em dois grupos: receptores

ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs) (SPRENGEL & SEEBURG, 1993; HOLLMANN & HEINEMANN, 1994; OZAWA et al., 1998) (Tabela 1).

Os receptores ionotrópicos (iGluRs) exibem uma estrutura tetramérica constituída por 4 subunidades que formam um complexo receptor homo ou heteromérico (KEW et al., 2005), específicos para cátions (OZAWA et al., 1998; MELDRUM, 2000), sendo capazes de gerar respostas sinápticas rápidas (BURNASHEV & ROZOV, 2000; BROCKIE et al., 2006), enquanto os mGluRs agem através das proteínas G e geram ações a longo prazo pela ativação e/ou inibição de processos intracelulares (MELDRUM, 2000).

Os receptores de glutamato ionotrópicos são classificados de acordo com a afinidade aos agonistas em três subtipos: receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores tipo ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e receptores tipo cainato (KA). Outras subunidades que vem sendo estudadas são as “orphan” formadas pelos genes  $\delta 1$  e  $\delta 2$  (LOMELI et al., 1993). Estas proteínas não formam canais funcionais, mas são responsáveis em modificar a função de canais constituídos por outras subunidades (KASHIWABUCHI et al., 1995).

O emprego de técnicas de biologia molecular possibilitou a clonagem e sequenciamento das subunidades de receptores do tipo AMPA (GluR1-4) (BOULTER et al., 1990; KEINÄNEN et al., 1990), receptores do tipo KA (GluR5-7, KA1-2) (HOLLMANN et al., 1989; BETTLER et al., 1992; BETTLER & MULLE, 1995) e receptores do tipo NMDA (NR1, NR2A-D e NR3A-B) (MONYER et al., 1992; MATSUDA et al., 2002, apud LLANSOLA et al., 2005; ZARAIN-HERZBERG et al., 2005). As propriedades funcionais dos receptores de glutamato são determinadas pelos subtipos de GluRs, por modificações pós-transcricionais do mRNA (“splicing” alternativo e edição) pela composição de subunidades do

complexo receptor e localização sináptica (OZAWA et al., 1998; BURNASHEV & ROZOV, 2000; SANCHEZ-PEREZ, et al., 2005; ZARAIN-HERZBERG et al., 2005).

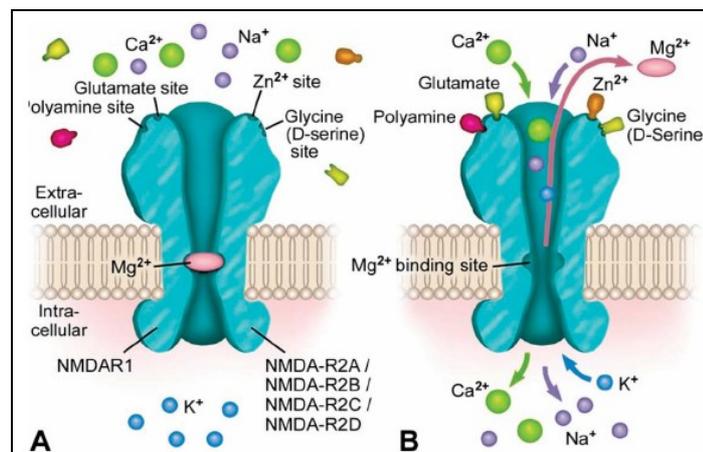
<b>RECEPTORES DE GLUTAMATO</b>						
<b>IONOTRÓPICOS</b>			<b>METABOTRÓPICOS</b>			
Classes	<b>NMDA</b>	<b>AMPA</b>	<b>CAINATO</b>	<b>Classe1</b>	<b>Classe2</b>	<b>Classe 3</b>
	NR1	GluR1	GluR5	mGluR1	mGluR2	mGluR4
		GluR2	GluR6	mGluR5	mGluR3	mGluR6
	NR2A	GluR3	GluR7			mGluR7
	NR2B	GluR4				mGluR8
	NR2C		KA1			
	NR2D		KA2			
	NR3A					
	NR3B					

**Tabela 1.** Classificação dos receptores de glutamato e respectivas subunidades.

Os canais dos receptores tipo NMDA são permeáveis aos íons cálcio e sódio, os canais dos receptores tipo AMPA e KA podem ser subdivididos nos que conduzem apenas íons sódio e os que conduzem tanto íons sódio como cálcio (DAY et al., 1995; ERREGGER et al., 2004). O complexo canal do receptor de NMDA tem vários aspectos característicos. A presença da subunidade NR1 é essencial para tornar o canal funcional, enquanto a NR2 e NR3 têm uma ação modulatória nos canais formados pelos receptores de NMDA (SANCHEZ-PEREZ, et al., 2005; ZARAIN-HERZBERG et al., 2005).

O canal deste receptor é altamente permeável ao  $Ca^{2+}$ , bem como ao  $Na^{+}$  e  $K^{+}$ , e o aumento resultante de  $Ca^{2+}$  intracelular parece ser o responsável tanto pela plasticidade neuronal como pela neurotoxicidade, a qual esse receptor parece estar envolvido (MONAGHAN et al., 1989; COLLINGRIDGE & SINGER, 1990). Este receptor pode ser distinguido dos outros receptores de glutamato, por sofrer ação de vários agonistas, além da modulação pela glicina, bloqueio do

canal pelo  $Mg^{2+}$ , ativação pela poliamina e inativação pelo  $Zn^{2+}$  (MONAGHAN et al., 1989) (Figura 1). A inibição por  $Zn^{2+}$  envolve diminuição na frequência e no tempo de abertura do canal (CHRISTINE & CHOI, 1990; LEGENDRE & WESTBROOK, 1990). A saída do  $Mg^{2+}$  do poro do canal é voltagem-dependente; assim, quando o receptor do tipo AMPA é ativado ocorre despolarização da membrana, resultando em desbloqueio do canal do receptor do tipo NMDA, por repulsão eletrostática do  $Mg^{2+}$ , permitindo então um alto influxo de íons. Como a cinética de ativação dos canais-receptores NMDA é relativamente lenta, o fluxo de íons através desses canais contribui apenas para o componente tardio do potencial excitatório pós-sináptico (EPSP).



**Figura 1.** Ilustração do receptor de glutamato do tipo NMDA. Modificado de Halbach & Dermietzel, 2006.

Nos receptores do tipo AMPA, a subunidade GluR2 é a mais importante na determinação dos fluxos do íon  $Ca^{2+}$  (PAPERNA et al., 1996; OZAWA et al.; 1998). Por exemplo, receptores que contêm a subunidade GluR2 mostram baixa permeabilidade ao  $Ca^{2+}$ , enquanto que os receptores AMPA formados por outras

subunidades permitem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . A relação entre o KA e AMPA não está clara (WATKINS et al., 1990), embora alguns estudos sugerem que os efeitos eletrofisiológicos do KA podem ser mediados pelos receptores AMPA (HOLLMANN et al., 1989; PAPERNA et al., 1996).

A clonagem e sequenciamento das subunidades dos receptores de glutamato dos tipos AMPA, KA e NMDA tornou possível o estudo da distribuição das mesmas no sistema nervoso de alguns animais experimentais. Estudos com receptores de NMDA demonstraram uma distribuição difusa pelo encéfalo, predominantemente no prosencéfalo (MONAGHAN et al, 1989; SUBRAMANIAM & McGONIGLE, 1991). Entre as estruturas do encéfalo, foi observada maior expressão na região CA1 do hipocampo (MONAGHAN et al., 1989). Com a utilização da técnica de hibridização *in situ* estudou-se a distribuição de cada subunidade no encéfalo de ratos. O mRNA de NR1 foi encontrado praticamente em todo o encéfalo de roedores adultos com proeminente expressão no cerebelo, hipocampo, córtex cerebral e bulbo olfatório, enquanto de NR2 apresentou elevada expressão no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo. A expressão de mRNA de NR2C foi mais acentuada nas células granulares do cerebelo e interneurônios do hipocampo, pequena expressão de mRNA de NR2D foi detectada no tálamo, bulbo olfatório, ponte e hipocampo (MORIYOSHI et al., 1991; MONYER et al., 1994). Com a técnica de imuno-histoquímica, os resultados obtidos basicamente coincidiram com aqueles observados com a hibridização *in situ* (PETRALIA et al., 1994).

Recentemente foi descoberta uma nova subunidade do receptor NMDA, NR3, a qual possui dois subtipos, NR3A e NR3B. Os mRNAs de NR3A-B foram altamente expressos na medula espinal, bulbo, ponte e mesencéfalo, enquanto o

proscéfalos e cerebelos mostraram baixos níveis de expressão (MATSUDA et al., 2002). A co-expressão de NR3A com NR1 e NR2A, por exemplo, causa redução das correntes iônicas na célula como um todo ou na condutância do canal individualmente (DAS et al., 1998). Desta forma, ocorre uma baixa permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, sugerindo que a subunidade NR3A deve ser uma importante reguladora da função dos receptores do tipo NMDA, controlando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais durante o potencial de ação.

Estudos de imuno-histoquímica no cérebro de ratos mostraram que as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 são abundantes e diferencialmente distribuídas em corpos celulares e processos de neurônios no córtex cerebral, gânglios da base, sistema límbico, tálamo, cerebelo e tronco cerebral. As subunidades GluR1 e GluR2/3 estão presentes nos neurônios piramidais do neocórtex e hipocampo. No estriado, as localizações celulares das subunidades GluR1-GluR4 são diferentes. Nesta região, a subunidade GluR1 está presente em muitos neurônios colinérgicos. Na substância negra estão presentes todas as subunidades do receptor do tipo AMPA, sendo que a subunidade GluR1 ocorre na maioria dos neurônios dopaminérgicos. No córtex cerebelar, corpos e processos das células de Bergmann mostraram uma imunorreatividade intensa com anticorpos contra GluR1 e GluR4, enquanto que as células de Purkinje mostraram imunorreatividade com anticorpos contra GluR2/3. Em várias regiões do cérebro, os astrócitos apresentam a subunidade GluR4 (PETRALIA & WENTHOLD, 1992; MARTIN et al., 1993). Estudos de distribuição dos mRNAs das subunidades dos receptores do tipo AMPA (GluR1-4), realizados com a técnica de hibridação *in situ*, mostraram que a expressão dessas subunidades é abundante e com um padrão de distribuição diferencial para cada uma das subunidades no SNC de

rato (KEINÄNEN et al., 1990; SATO et al., 1993). As células piramidais e células granulares do hipocampo e do córtex cerebral expressam abundantemente os mRNAs das subunidades GluR1-4. Células do sistema motor expressam intensamente os mRNAs das subunidades GluR2-4 e moderadamente os mRNAs da subunidade GluR1 (Keinanen *et al.*, 1990; Petralia & Wenthold, 1992).

## **I – 2. SISTEMA NERVOSO CENTRAL E ENVELHECIMENTO**

O envelhecimento é um processo fisiológico que ocorre assincronicamente em diferentes áreas do encéfalo e, pode ser conceituado como um processo dinâmico e progressivo, no qual há alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, que vão alterando progressivamente o organismo, tornando-o mais suscetível às agressões intrínsecas e extrínsecas que terminam por levá-lo à morte. O cérebro envelhece por uma crescente dificuldade em sintetizar substâncias essenciais à função neuronal e pela síntese de substâncias anômalas que se depositam no tecido (JOLLES et al., 1986; COLLEMAN & FLOOD, 1987; COTMAN et al., 1988; COLLINGRIDGE & BLISS, 1995).

Muitas alterações do encéfalo relacionadas com a idade ocorrem na velhice. O peso do encéfalo pode diminuir, e algumas populações de neurônios podem ter seu número reduzido pela morte celular. As primeiras análises histológicas de várias áreas encefálicas sugeriram uma grande perda neuronal, principalmente no córtex cerebral, como resultado do processo de envelhecimento (VIJAYASHANKAN & BRODY, 1977; MORA et al., 2007). Essa perda neuronal também foi observada na substância negra, hipocampo e cerebelo.

Camundongos e ratos idosos mostraram uma perda celular uniforme por todo o cerebelo (STURROCK, 1989; TAMARU et al., 1991), já nos humanos essa perda foi mais acentuada no vermis (TORVIK et al., 1986). Entretanto, análises estereológicas mais recentes não sustentam os primeiros achados. Quando os pesquisadores compararam o córtex pré-frontal, o córtex temporal superior e o hipocampo de pessoas jovens com idosos não verificaram diferenças significativas no número de neurônios piramidais durante o processo de envelhecimento normal (WICKELGREN, 1996; MORRISON & HOF, 1997). Apesar da mínima perda neuronal, algumas alterações significativas no neurônio foram notadas com o envelhecimento. O comprimento dos axônios mielinizados e o número de sinapses diminuem no córtex cerebral de humanos idosos (PAKKENBERG et al., 2003). Outro aspecto identificado no encéfalo durante o envelhecimento é a redução da arborização dendrítica (diminuição do comprimento e número de dendritos) e da densidade de espinhos dendríticos dos neurônios piramidais do córtex motor, córtex pré-frontal e córtex temporal superior em humanos e primatas não humanos (SCHEIBEL et al., 1975; NAKAMURA et al., 1985; BRABANDER et al., 1998; PETERS et al., 1998; JACOBS et al., 2001; DUAN et al., 2003; DICKESTEIN et al., 2007).

Estudos com microscopia eletrônica das áreas corticais 46 (PETERS et al., 1998) e 17 (PETERS et al., 2001) em macacos mostraram a perda de ramificações na região apical das células piramidais, acompanhado de perda dos espinhos dendríticos e redução de 40-55% do número de sinapses.

Além das alterações estruturais no neurônio, o processo normal de envelhecimento cerebral desencadeia também mudanças neuroquímicas. Várias enzimas que sintetizam neurotransmissores, tais como: dopamina, noradrenalina,

e em uma extensão menor a acetilcolina e glutamato, diminuem com a idade, indicando anormalidades nos neurônios que sintetizam estes neurotransmissores (MORA et al., 2007).

Um outro aspecto negativo do envelhecimento cerebral é a diminuição da síntese de fatores neurotróficos, tais como o fator de crescimento nervoso (NGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Considerando que esses fatores promovem a sobrevivência neuronal, crescimento de neuritos e plasticidade sináptica, a diminuição de sua síntese pode tornar as células neuronais mais vulneráveis com o decorrer do envelhecimento (MORA et al., 2007).

### **I – 3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E ENVELHECIMENTO.**

O envelhecimento poder ser definido como um processo degenerativo progressivo do organismo, podendo levar a algumas alterações cognitivas, como aprendizado, memória e nas funções motoras (JOLLES et al., 1986). Essas alterações no encéfalo envelhecido pode ser conseqüência da diminuição e perda de neurônios em várias áreas, como no neocórtex, hipocampo e substância negra (COLLEMAN & FLOOD, 1987). Além disso, alguns estudos têm sugerido o envolvimento do glutamato em funções cerebrais que se mostraram alteradas durante o envelhecimento, como aprendizado e memória (COTMAN et al., 1988; COLLINGRIDGE & BLISS, 1995), emoção e motivação (MORA & COBO, 1990; COBO & MORA, 1991) e funções motoras (SCHIMIDT et al., 1992).

Vários pesquisadores mostraram que a neurotransmissão glutamatérgica durante o processo normal de envelhecimento apresentou uma queda do número de transportadores de glutamato de alta afinidade nos terminais glutamatérgicos de ratos envelhecidos resultando numa queda na capacidade de recaptação de glutamato (WHEELER & ONDO, 1986, 1989; SARANSAARI & OJA, 1995; VATASSERY et al., 1998, apud SEGOVIA et al., 2001), desta forma ocorreria um aumento de glutamato livre na fenda sináptica, o que poderia atuar como um fator neurotóxico gerando a morte neuronal das células de Purkinje GluRs-positivas como o observado em algumas doenças neurodegenerativas (KWAK & WEISS, 2006), ou seja, a ativação dos receptores de glutamato contribui no processo de morte neuronal nessas doenças crônicas neurodegenerativas (MELDRUM, 2000).

Um outro aspecto importante da neurotransmissão glutamatérgica é a concentração de glutamato nas estruturas encefálicas. Alguns estudos revelaram que a concentração de glutamato em amostras de tecidos do córtex cerebral de ratos apresenta uma diminuição significativa com o envelhecimento (STROLIN-BENEDETTI et al, 1990; SARANSAARI & OJA, 1995, apud SEGOVIA et al., 2001). Essas mudanças ocorrem de forma distinta entre as regiões do córtex cerebral de ratos, por exemplo, na região frontal a diminuição da concentração de glutamato foi de 15-20% nos animais de 21-24 meses, porém esse resultado não foi encontrado em outras áreas, tais como, córtex da região temporal e parietal (BANAY-SCWARTZ et al., 1989; apud SEGOVIA et al., 2001). No hipocampo de roedores também foi observado uma diminuição na concentração de glutamato com o decorrer da idade. Essa diminuição foi encontrada aos 12, 18, 21-24 e 29 meses, atingindo 6-8% em ratos de 21 meses e 23% em ratos de 29 meses (STROLIN-BENEDETTI et al., 1990). Essas diminuições do conteúdo de

glutamato estão de acordo com a perda neuronal descrita nessas áreas encefálicas (SEGOVIA et al., 2001).

Estudos empregando o método de auto-radiografia quantitativa mostraram mudanças nos receptores de glutamato do tipo NMDA e AMPA relacionadas com o envelhecimento. Experimentos utilizando ligantes radioativos [ $H^3$ ]-MK-801 para os GluRs do tipo NMDA e [ $H^3$ ]-AMPA ou [ $H^3$ ]-CNQX para os do tipo AMPA em encéfalos de ratas jovens, adultas e idosas revelaram um pronunciado decréscimo da ligação de [ $H^3$ ]-MK-801 e uma tendência a diminuição da ligação [ $H^3$ ]-AMPA no estriado. No hipocampo foi observada uma diminuição desses dois ligantes radioativos e, por fim, um intenso declínio da concentração de [ $H^3$ ]-MK-801 em quase todo o córtex cerebral (WARDAS et al., 1997). No encéfalo de humanos, estudo de auto-radiografia mostrou que a concentração de [ $H^3$ ]-MK-801 foi relativamente constante durante a vida, entretanto, a de [ $H^3$ ]-CNQX iniciou no período perinatal, atingiu o pico na primeira ou segunda década e então, começou a diminuir. No cerebelo, tanto o ligante [ $H^3$ ]-MK-801 como o [ $H^3$ ]-CNQX iniciaram no período fetal e atingiram o platô aos 10 anos, não sofrendo mudanças ao longo do envelhecimento. Esses dados mostram que o processo de envelhecimento pode conduzir a mudanças nas concentrações dos ligantes [ $H^3$ ]-MK-801 e [ $H^3$ ]-AMPA em várias estruturas, fenômeno que pode refletir os distúrbios motores e de memória encontrados em ratos e humanos idosos (COURT et al., 1993; WARDAS et al., 1997). Outros estudos, empregando diferentes técnicas, têm mostrado uma diminuição em torno de 20 a 50% na densidade dos receptores de glutamato tipo NMDA na maioria das áreas corticais, estriado e hipocampo de ratos, camundongos e macacos envelhecidos (PETERSEN & COTMAN, 1989;

TAMARU et al., 1991; WENK et al., 1991; MAGNUSSON & COTMAN, 1993; MITCHELL & ANDERSON, 1998, apud SEGOVIA et al., 2001).

Estudos com ligantes radioativos mostraram um decréscimo na densidade de receptores glutamatérgicos tipo AMPA no córtex frontal e parietal, e no hipocampo de camundongos (MAGNUSSON & COTMAN, 1993).

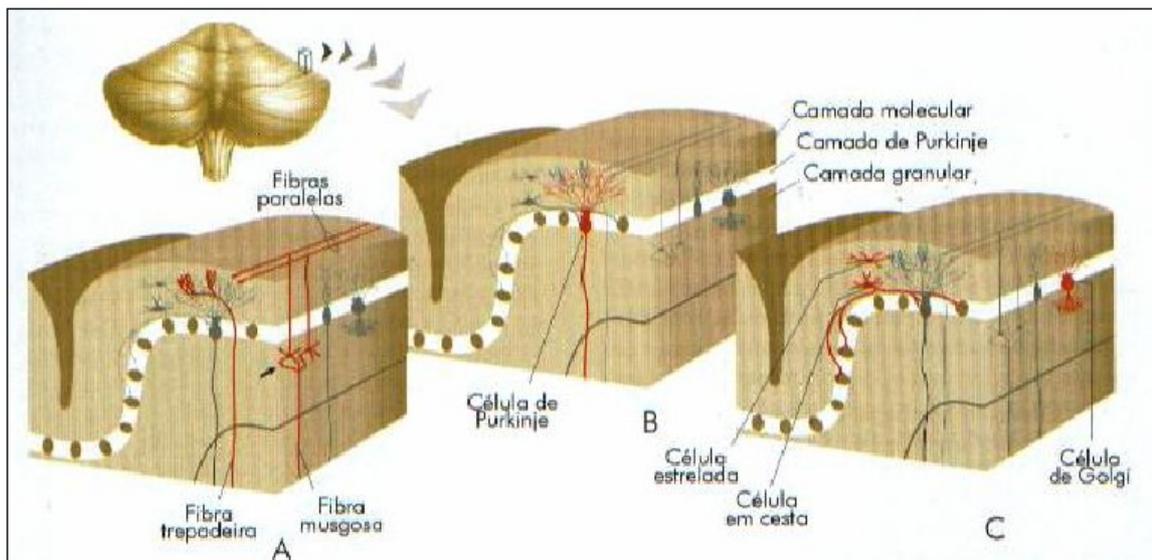
A expressão e distribuição dos receptores ionotrópicos de glutamato do tipo NMDA e AMPA está diminuída significativamente em algumas áreas do córtex cerebral e do hipocampo durante o envelhecimento (GAZZALEY et al., 1996; HOF et al., 2002). Neurônios do córtex pré-frontal de macacos idosos mostraram uma queda mais acentuada da expressão da subunidade GluR2 comparada a outras áreas corticais, tais como córtex temporal. Já a subunidade NR1 revelou uma diminuição significativa nas projeções cortico-corticais originadas do córtex temporal superior (HOF et al., 2002). O glutamato e seus receptores participam da maioria das sinapses responsáveis pelas funções motoras e cognitivas, que se apresentam alteradas com o envelhecimento. Portanto, alterações nessas funções podem ser conseqüências das mudanças estruturais e neuroquímicas observadas nos neurônios durante o envelhecimento cerebral podendo comprometer a transmissão sináptica nesses circuitos gerando prejuízos na potenciação e depressão de longa duração (LTP/LTD) que são consideradas o substrato neural das disfunções cognitivas e motoras observadas em idosos (BURKE & BARNES, 2006; MATTSON & MAGNUS, 2006).

#### **I – 4. CEREBELO**

O cerebelo está relacionado com a coordenação temporal e precisão espacial dos movimentos, com a regulação do tônus muscular bem como aprendizagem motora e certas funções cognitivas (ITO, 2000; DELGADO-GARCIA, 2001; SEKIRNJAK et al., 2003). O cerebelo de mamíferos e aves é formado por folhas sucessivas, que se dispõem uma atrás da outra no eixo antero-posterior e é dividido em três partes de acordo com seu desenvolvimento evolutivo e funcionalidade, sendo estas: arquicerebelo, formado pelo lobo nóduloflocular, responsável em manter a postura corporal adequada em repouso ou em movimento, normalmente facilitando flexores e inibindo extensores, composto pelo lóbulo X; paleocerebelo, formado pelas partes anteriores à fissura primária, ou seja, lóbulos I-V e VIII-IX, responsável pela regulação do tônus muscular, através dos receptores de estiramento; e neocerebelo, entre a fissura primária e a póstero-lateral (lobo posterior), lóbulos VI e VII (DELGADO-GARCIA, 2001; SARNA & HAWKES, 2003), sendo responsável pela coordenação de movimentos complexos iniciados a níveis corticais, ou seja, movimentos voluntários e pelas funções perceptivas, cognitivas e emotivas (DELGADO-GARCIA, 2001).

O córtex cerebelar é formado por três camadas distintas: molecular, das células de Purkinje e granular. A disposição celular em cada uma dessas camadas é mesma em todos os lobos, diferindo somente na procedência das vias

aferentes e no destino das vias eferentes (DELGADO-GARCIA, 2001; SARNA & HAWKES, 2003).



**Figura 2.** Representação das fibras e células que compõem as camadas do córtex cerebelar. Modificado de Martin (1996).

A camada molecular apresenta baixa densidade celular, arborizações dendríticas e axônios delgados de dois tipos de neurônios, que têm sua atividade facilitada pelas fibras paralelas; células em cesto, com axônios longos, que enviam ramificações para a camada molecular para as células de Purkinje, fazendo sinapses no soma das células de Purkinje; e células estreladas externas, que apresentam axônios curtos, realizando contatos sinápticos com os dendrítos distais das células de Purkinje (DELGADO-GARCIA, 2001), sendo ambas sinapses inibitórias (ECCLES, 1970).

A camada da célula de Purkinje é composta de células grandes dispostas ao longo do bordo superior próximo à camada molecular. No colo das células de Purkinje, surge uma árvore dendrítica complexa estendendo-se na camada

molecular e do lado oposto partem axônios mielinizados que caminham para a substância branca em direção aos núcleos cerebelares profundos, fazendo ali sinapses inibitórias (ECCLES, 1970). Ao redor das células de Purkinje, encontramos corpos celulares de células da glia ou de Bergmann que são compostas por astrócitos protoplasmáticos unipolar no córtex cerebelar, as fibras destas fazem sinapses com os dendritos das células de Purkinje (YAMADA & WATANABE, 2002).

Já na camada granular, encontramos as células granulares cerebelares, que é o tipo de neurônio mais numeroso no encéfalo (BOWER & PARSONS, 2003). Seus axônios ascendem para a camada molecular e se bifurcam formando as fibras paralelas que fazem sinapses excitatórias com as células de Purkinje (ECCLES, 1970). Nesta camada temos também as células inibitórias de Golgi tipo II que localizam-se na parte superior da camada, apresentando ramos dendríticos por todas as camadas do córtex cerebelar, porém mais extensos na camada molecular.

As aferências do cerebelo são as fibras musgosas e as fibras trepadeiras. Ambos os tipos fazem sinapses excitatórias glutamatérgicas com os neurônios cerebelares, mas cada um termina numa região diferente do córtex cerebelar e produz diferentes padrões de disparo nas células de Purkinje (DELGADO-GARCIA, 2001; SARNA & HAWKES, 2003).

As fibras musgosas originam-se de núcleos na medula espinal e no tronco encefálico e conduzem informações sensoriais da periferia, bem como informações do córtex cerebral. Essas fibras terminam como sinapses excitatórias sobre os dendritos das células granulares na camada granular. E das células granulares partem as fibras paralelas que vão fazer sinapses excitatórias com as

células de Purkinje. Os terminais das fibras musgosas apresentam um padrão de distribuição distinto no cerebelo que é dependente do nível medular que se originam (OKADO et. al, 1987). As fibras espinocerebelares da região lombar chegam nas folhas I-V (lobo anterior), predominando na folha I. A maioria das fibras musgosas originárias da região torácica chegam no lobo anterior e na folha VI e, poucas fibras chegam na folha IX. Já as fibras espinocerebelares oriundas da região cervical se projetam para as folhas II-IX. As fibras trepadeiras originam-se do núcleo olivar inferior e conduzem informações somatossensórias, visuais e do córtex cerebral. Estas se projetam diretamente sobre as células de Purkinje. As células de Purkinje, via eferente do córtex cerebelar, se projetam para os núcleos cerebelares profundos e estes para várias regiões encefálicas. Tanto as fibras musgosas como as trepadeiras enviam colaterais para os neurônios dos núcleos cerebelares. Desta forma, os neurônios dos núcleos cerebelares recebem aferências excitatórias das fibras musgosas e trepadeiras e inibitórias das células de Purkinje (Delgado-Garcia, 2001; Sarna & Hawkes, 2003; Nakanishi, 2005)..

Os núcleos profundos do cerebelo de aves têm sido divididos de maneiras diferentes por diversos autores, considerando à delimitação de cada um e suas nomenclaturas. Com base nas diferenças de citoarquitetura e localização, foram identificados quatro núcleos profundos no cerebelo: medial, intermédio, intercalado e lateral, conforme os achados de Ramon e Cajal. Observa-se que para cada núcleo existem diferenças regionais quanto ao tamanho, formato e densidade celulares (WOLD, 1981). Dos núcleos cerebelares, o medial é o maior, mais rico em células e está situado mais rostralmente. Este é constituído por uma mistura de células de pequeno e médio tamanho e de vários formatos. O núcleo intermédio assemelha-se citoarquitetonicamente ao núcleo medial. Entretanto, em

sua parte rostral, as células estão colocadas mais próximas umas das outras. O núcleo intercalado é o menor núcleo cerebelar e o que contém também as menores células. Finalmente, o núcleo lateral é formado por dois grupamentos de células distintos que migram caudalmente, fundindo-se num único grupamento nuclear. Este é formado por células pequenas e médias de diferentes formas e é separado por fibras grossas.

As células do cerebelo recebem várias aferências excitatórias, sendo na sua maioria mediadas pelo glutamato e seus receptores do tipo NMDA e AMPA (VOUKELATOU et al., 1992; GAUCK & JAEGER, 2003; SARNA & HAWKES, 2003). Portanto, sinais excitatórios que chegam ao núcleo cerebelar são seguidos por sinais inibitórios oriundos das células de Purkinje; porém, as saídas dos núcleos cerebelares para as áreas motoras continuam sendo excitatórias, promovendo correção do movimento e aprendizado motor (Delgado-Garcia, 2001; Sarna & Hawkes, 2003; Nakanishi, 2005).

## **II – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

O envelhecimento é um processo fisiológico dinâmico e progressivo, no qual há alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, que podem desencadear deficiências cognitivas, afetivas, de aprendizado, memória e motoras. Considerando que o cerebelo e a neurotransmissão glutamatérgica estão envolvidos no processamento de várias dessas funções, este trabalho visou estudar a expressão da subunidade NR1 dos receptores de glutamato tipo NMDA nas células de Purkinje do cerebelo de pintos durante o envelhecimento.

### **III - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **III – 1. ANIMAIS**

Nesse trabalho foram utilizados 8 pintos (*Gallus gallus*) jovens (30 dias de vida pós-natal – P1m), 4 adultos (cerca de 1 ano e 6 meses de vida – P1a6m) e 8 senis (aproximadamente 4 anos de vida – P4a). Os experimentos respeitaram as normas e preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBREA), além de ter sido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Cidade de São Paulo (UNICID), protocolo número 13288970.

#### **III – 2. PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Os animais jovens (n=4) e senis (n=4) foram anestesiados profundamente com quetamina e xilazina e perfundidos, via transcardíaca, com salina e com paraformaldeído (PFA) a 2% em tampão fosfato 0,1M (PB, pH 7,4). Os encéfalos foram, então, removidos cuidadosamente e colocados na mesma solução fixadora por 4 a 6 horas para pós-fixação e, em seguida, crioprotetidos em sacarose 30% por um período de 36 a 48 horas. Após esse período, estes foram incluídos em meio de congelamento (TBS, Durham, N.C.) e cortados numa espessura de 40µm em um criostato (CM3050, Leica), no plano sagital. Os cortes do encéfalo de pintos jovens e senis foram armazenados numa solução criopotetora para posterior processamento imuno-histoquímico ou pelo método de Giemsa.

Nesse processo foi empregado o anticorpo comercial primários de camundongo específico contra a subunidade NMDAR1 (NR1) visando determinar

o nível de expressão no cerebelo de pintos jovens e senis. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário em uma concentração de 1:1000 em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M) com 0,3% de Triton X-100 por um período de 12 a 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram lavados em PB 0,1M, 3 vezes de 10 minutos cada. Em seguida, foi aplicado aos cortes um anticorpo secundário biotinilado (comercial) dirigido contra as imunoglobulinas do animal em que foi feito o anticorpo primário (camundongo) na diluição de 1:250 com 0,3% Triton X-100 em PB 0,1M, por 1 hora e meia, à temperatura ambiente. Após as lavagens, os cortes foram incubados no complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite Kit, Vector Labs) por uma hora à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram lavados e reagidos com 0,05% de diaminobenzidina e 0,01% de água oxigenada (método da avidina-biotina-peroxidase, ABC) para revelação da reação, os cortes foram imersos na solução diaminobenzidina (DAB) por cerca de 5 minutos e reagidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os cortes foram mantidos até que a reação fosse evidenciada, atingindo o ponto de contraste entre a área marcada e a não marcada sendo então lavados numa série de 3 vezes de 10 minutos e em seguida montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram tratadas com tetróxido de ósmio por 1 minuto e em seguida desidratadas numa série crescente de álcoois, colocadas no Hemo-De e cobertas com Permount e lamínulas, após ter passado por um processo de secagem em placa quente por um a dois dias.

Utilizamos a técnica de Giemsa com o intuito de evidenciar a densidade média de células de Purkinje nas folhas cerebelares estudadas dos animais jovens e idosos para podermos compará-la com a densidade média de células de Purkinje que expressam a subunidade NR1.

### III – 3. PROTOCOLO DE “IMMUNOBLOTTING”

Os animais jovens (n=4), adultos (n=4) e idosos (n=4) foram guilhotinados e os cerebelos foram rapidamente coletados e homogeneizados a 4°C em tampão de extração (Tris pH 7,4 100 mM; EDTA 10 mM; PMSF 2 mM; aprotinina 0,01 mg/ml) com um homogenizador do tipo Turratec modelo MA-102/mini (Marconi; São Paulo, Brasil). Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C em uma centrífuga modelo CT14000 DR (Cientec, São Paulo, Brasil).

O conteúdo protéico do material isolado dos animais jovem, adulto e idoso foram dosados pelo método de Bradford (Amresco, U.S.A)(Bradford, 1979). Amostras dos sobrenadantes contendo cerca de 100 µg de proteína total do cerebelo de pintos jovens, adultos e idosos foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT 100 mM e submetidas a eletroforese em géis de acrilamida a 8% contendo dodecil sulfato de sódio utilizando uma cuba para mini-gel (Mini-Protean 3; Bio-Rad). Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,45 µm de diâmetro) utilizando-se um sistema de transferência (Trans-Blot cell system; Bio-Rad), em tampão contendo SDS. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10mM e NaCl 0,15M, pH 7,5), por 2 horas sob agitação leve. Após esse período, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonal específico para NR1 na concentração de 1:1000, e beta-actina na concentração de 1:10000 em solução bloqueadora, por 18 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário

marcado com peroxidase (Amershan Biosciences, Little Chalfon, Buckinghamshire, UK) diluído a 1:10000 em solução bloqueadora. O excesso de conjugado foi removido com mais um ciclo de lavagens e os antígenos foram revelados utilizando o Kit ECL (Amershan Biosciences, Little Chalfon, Buckinghamshire, UK) de quimioluminescência. 42 beta-actina

As bandas obtidas nos filmes foram escaneadas e analisadas quanto a densidade óptica da imunorreatividade usando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EUA). Dos dados obtidos realizou-se uma razão entre a densidade óptica da subunidade NR1 e da beta-actina, e estes dados foram então submetidos à análise estatística no programa SPSS, versão 10.0.

### **III – 4. ANÁLISE DOS DADOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

#### **- Análise qualitativa:**

O material obtido foi analisado em um microscópio óptico. A intensidade da imunorreatividade da subunidade NR1 dos receptores de glutamato tipo NMDA foi estimada subjetivamente de ausente a intensa, de acordo com a presença das mesmas nos pericários e neurópila de uma mesma estrutura, em 4 pintos e 4 galinhas, de 5 a 7 cortes de cada cerebelo estudado. A identificação das células e camadas do cerebelo foi baseada no Atlas esterotáxico de pintos (KUENZEL & MASON, 1988).

#### **- Análise semi-quantitativa:**

Considerando observações preliminares da presença de um declínio do número de células de Purkinje NR1-positivas ao longo do envelhecimento, quantificamos as células de Purkinje e analisamos a densidade média de células de Purkinje que expressam NR1 em animais jovens e idosos. Além disso, comparamos essa densidade de células NR1-positivas em relação ao total de células de Purkinje, identificadas pelo método de Giemsa. A quantificação foi realizada nas folhas cerebelares II, VI e IX de 5 cortes, em 4 animais com 1 mês e em 4 animais idosos. Em cada um dos cortes analisamos quatro campos de 10.000  $\mu\text{m}^2$ . Os dados colhidos foram submetidos à análise estatística no programa SPSS, versão 10.0.

### **III – 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados de imuno-histoquímica e *immunoblotting* apresentaram uma distribuição normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias de tendência central (média) e dispersão da amostra (erro-padrão) estão apresentados no gráfico dos resultados.

As comparações entre os grupos foram conduzidas a partir do teste ANOVA para medidas não-repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni e de Tukey B quando a análise de variância apresentou diferença estatisticamente significativa. Para todos os testes, o nível de significância assumido foi de  $p < 0,05$ .

## IV – RESULTADOS

### IV – 1. Análise qualitativa da expressão da subunidade NR1 no cerebelo de pinto durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento.

Os nossos dados mostraram que a célula de Purkinje foi a única célula do córtex cerebelar de pintos e galinhas a expressar a subunidade NR1 dos receptores de glutamato tipo NMDA (Figura 3). Além disso, foi observada também uma imunorreatividade em neurópila da camada molecular juntamente com a imunorreatividade da árvore dendrítica das células de Purkinje. A subunidade NR1 mostrou uma diminuição da expressão nas células de Purkinje do cerebelo de pintos durante o envelhecimento. Essa diferença no padrão temporal de expressão está ilustrada na Tabela 2.

Idade	Células de Purkinje	Árvore dendrítica das céls. Purkinje	Neurópila da Camada molecular
P1m	+++	++/+++	++/+++
P4a	+/++	+/++	+

Escala de intensidade de imunorreatividade contra a subunidade NR1 dos receptores de glutamato: -, ausente; +, leve; +/ ++, leve a moderada; ++, moderada; ++/ +++ , moderada a intensa; +++ , intensa.

**Tabela 2** - Distribuição da subunidade NR1 dos receptores de glutamato no córtex cerebelar de pintos ao longo do envelhecimento.

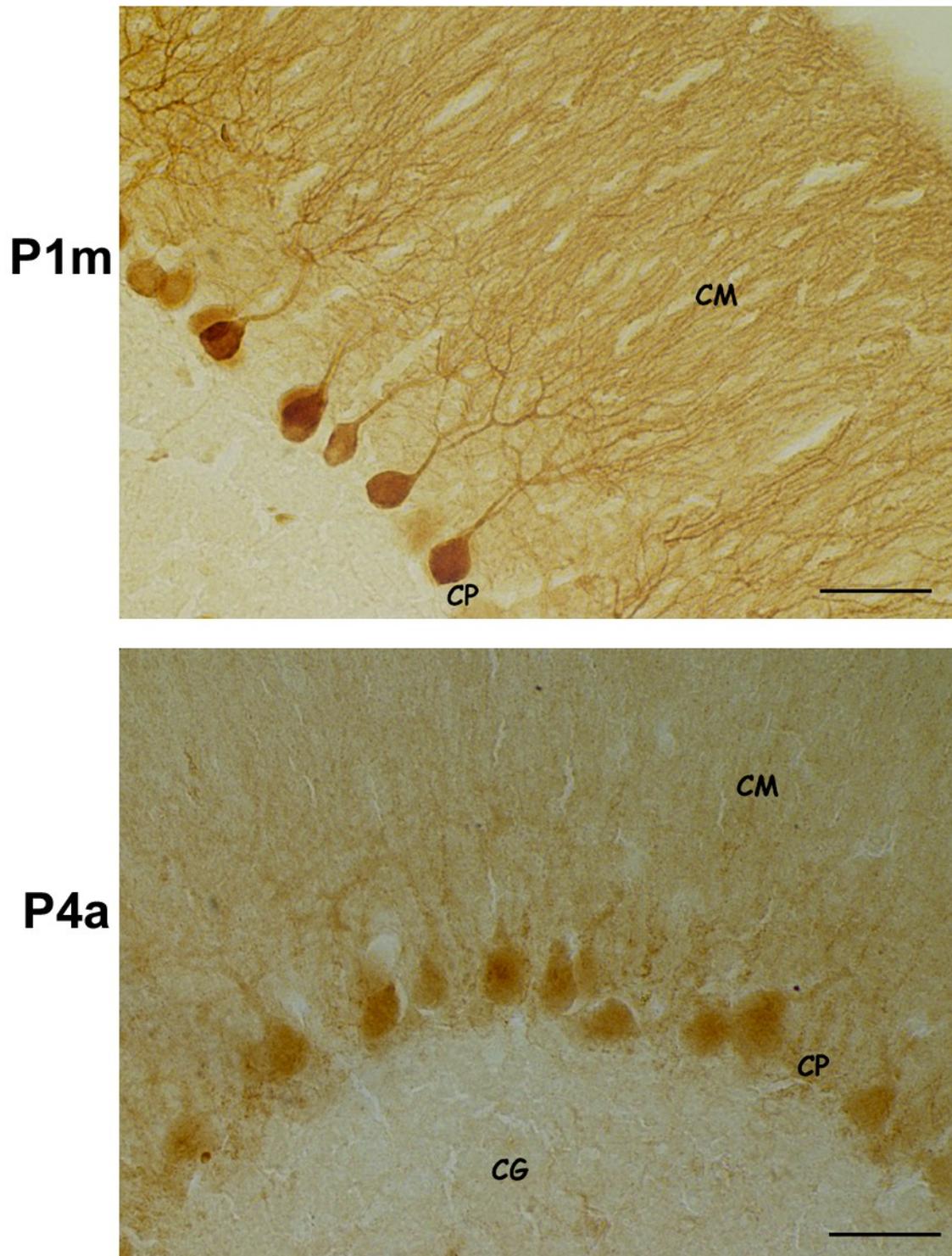
A imunorreatividade contra NR1 nos pericários das células de Purkinje mostrou-se intensa em pintos jovens (P1m) e de leve a moderada em galinhas idosas (P4a). Já na árvore dendrítica das células de Purkinje foi observada uma expressão de moderada a intensa no período inicial pós-natal diminuindo para leve a moderada em P4a. A imunorreatividade contra NR1 na neurópila da

camada molecular mostrou-se leve a moderada em P1m, com uma diminuição em P4a revelando uma imunorreatividade leve. (Figura 4).

A expressão da subunidade NR1 também foi observada nos núcleos cerebelares profundos medial, intermédio e lateral, tanto dos animais jovens como dos envelhecidos.



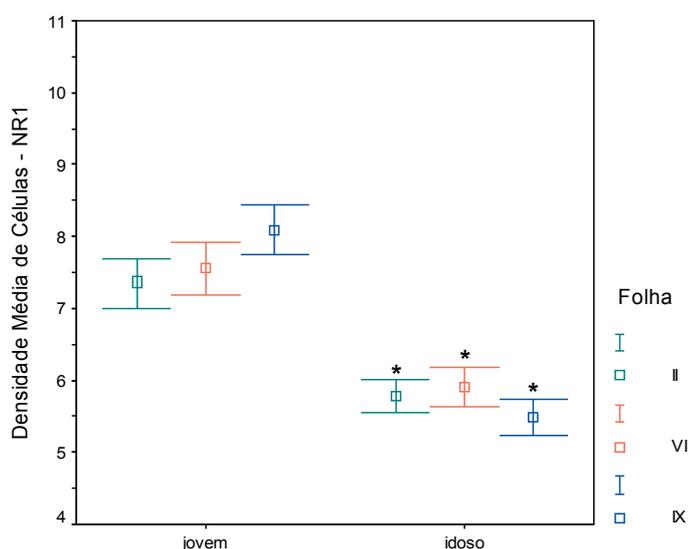
**Figura 3.** Imagem digital de corte sagital de cerebelo de pinto jovem (P1m) ilustrando a expressão da subunidade NR1 nas células de Purkinje. CM- camada molecular, CP- camada de células de Purkinje, CG- camada granular. Barra de escala – 100  $\mu$ m.



**Figura 4.** Imagens digitais de cortes sagitais do cerebelo ilustrando uma expressão temporal distinta da subunidade NR1 nas células de Purkinje de animais jovens (P1m) e idosos (P4a). CM- camada molecular, CP- camada de células de Purkinje, CG- camada granular. Barra de escala – 50  $\mu$ m

#### IV – 2. Análise semi-quantitativa da expressão da subunidade NR1 no cerebelo de pinto durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento.

Os nossos dados quantitativos da densidade média de células de Purkinje das folhas cerebelar II, VI e IX que expressam NR1 revelaram uma diminuição estatisticamente significativa dos animais idosos ( $p=0,028$ ) quando comparamos a expressão dessa proteína nos animais jovens (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito do envelhecimento sobre a expressão da subunidade NR1 nas várias folhas cerebelares estudadas. A densidade média das células de Purkinje NR1-positivas nas folhas cerebelares II, VI e IX mostrou uma diminuição estatisticamente significativa nos animais idosos comparada a dos animais jovem ( $*p=0,028$ ). Área analisada =  $10.000\mu\text{m}^2$ .

Os valores da densidade média de células de Purkinje NR1-positivas na folha II de P1m foi de  $7,34\pm 0,17$  (média±erro padrão) e em P4a foi de  $5,78\pm 0,12$ . Células de Purkinje da folha VI que expressam NR1 apresentaram uma densidade média de  $75,6\pm 0,18$  em P1m e média de  $5,9\pm 0,14$  em P4a. A densidade média das células de Purkinje NR1-positivas nas folhas IX em P1m foi de  $8,09\pm 0,17$  e em P4a foi de  $5,49\pm 0,13$  (Figura 5). Esses dados revelam que as

folhas IX dos animais idosos apresentaram uma queda em torno de 32% na densidade média de células de Purkinje que expressam NR1 em relação à dos animais jovens. Já as folhas VI e II das galinhas idosas mostraram uma diminuição de 22% e 21%, respectivamente, em relação a densidade média dos animais jovens.

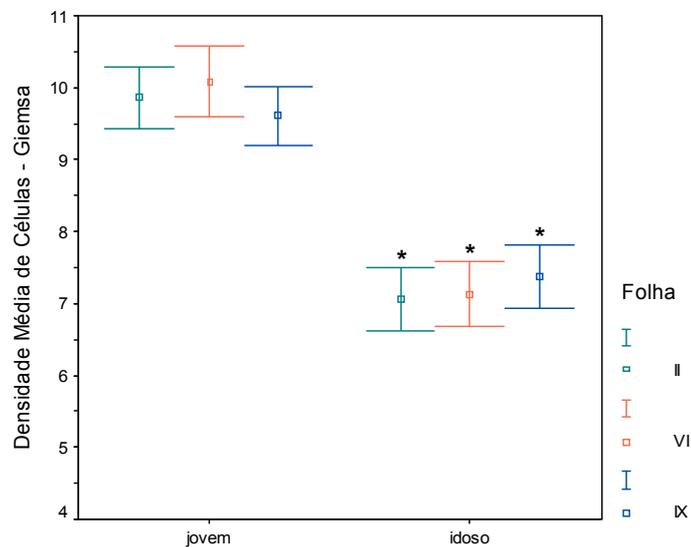
Um outro dado revelado pelo nosso estudo é que a densidade média de células de Purkinje NR1-positivas não variou significativamente entre as folhas de animais de mesma idade ( $p=0,851$ ).

#### **IV – 3. Análise semi-quantitativa das células de Purkinje do cerebelo de pinto durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento, pela técnica de Giemsa.**

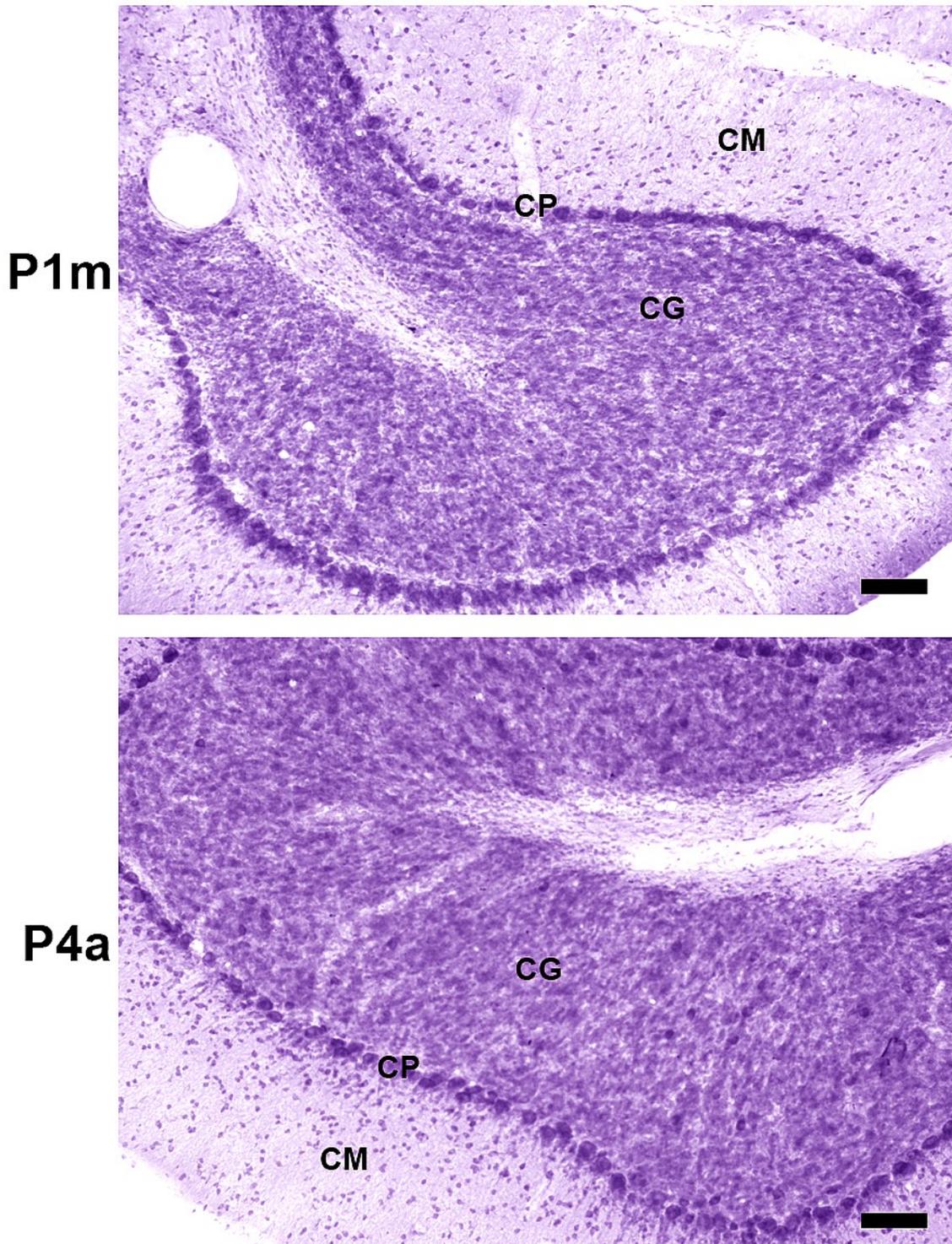
A densidade média de células de Purkinje nas folhas II, VI e IX revelada pela técnica de Giemsa mostrou uma diminuição estatisticamente significativa da densidade de células de Purkinje dos animais idosos (P4a) comparada a dos animais jovens (P1m) ( $p=0,007$ ). Os valores das médias e erro padrão estão ilustrados na figura 6. A densidade média de células de Purkinje nas folhas II do animal de 1 mês (P1m) foi de  $9,86 \pm 0,21$  e o da galinha idosa (P4a) foi de  $7,06 \pm 0,22$ . Nas folhas VI, as densidades médias de células de Purkinje foram de  $10,09 \pm 0,25$  para os animais jovens e de  $7,13 \pm 0,23$  para os animais idosos (P4a). Enquanto, nas folhas IX do animal P1m a densidade média foi  $9,61 \pm 0,20$  e de  $7,38 \pm 0,22$  para os de P4a. Esses dados mostram que as folhas cerebelares II (Figura 7) e VI apresentaram uma maior queda na densidade de células de

Purkinje, em torno de 28,5%, quando comparamos os animais idosos com os jovens. Em seguida, vem a folha IX mostrando uma diminuição de 23% na densidade de células de Purkinje dos animais idosos em relação aos jovens.

A análise estatística da densidade média de células de Purkinje entre as folhas de animais de mesma idade não variou significativamente ( $p=0,864$ ).

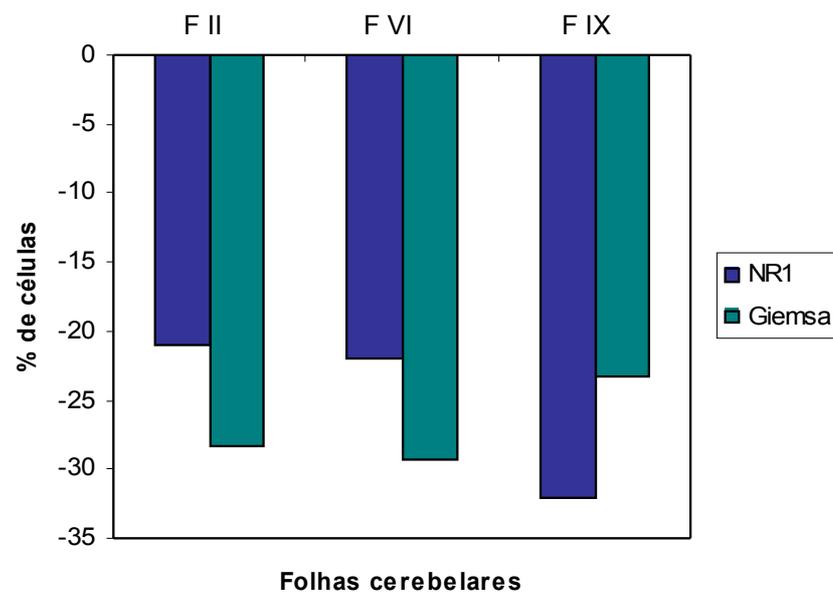


**Figura 6.** A densidade média de células de Purkinje nas folhas cerebelares II, VI e IX de animais idosos, pela técnica de Giemsa, mostrou uma diminuição estatisticamente significativa comparada a dos animais jovens (\* $p=0,007$ ). Área analisada =  $10.000\mu\text{m}^2$ .



**Figura 7.** Imagens digitais de cortes sagitais de cerebelo de pintos jovens e idosos reveladas pela técnica de Giemsa. CM- camada molecular, CP- camada de células de Purkinje, CG- camada granular. Barra de escala – 100  $\mu\text{m}$ .

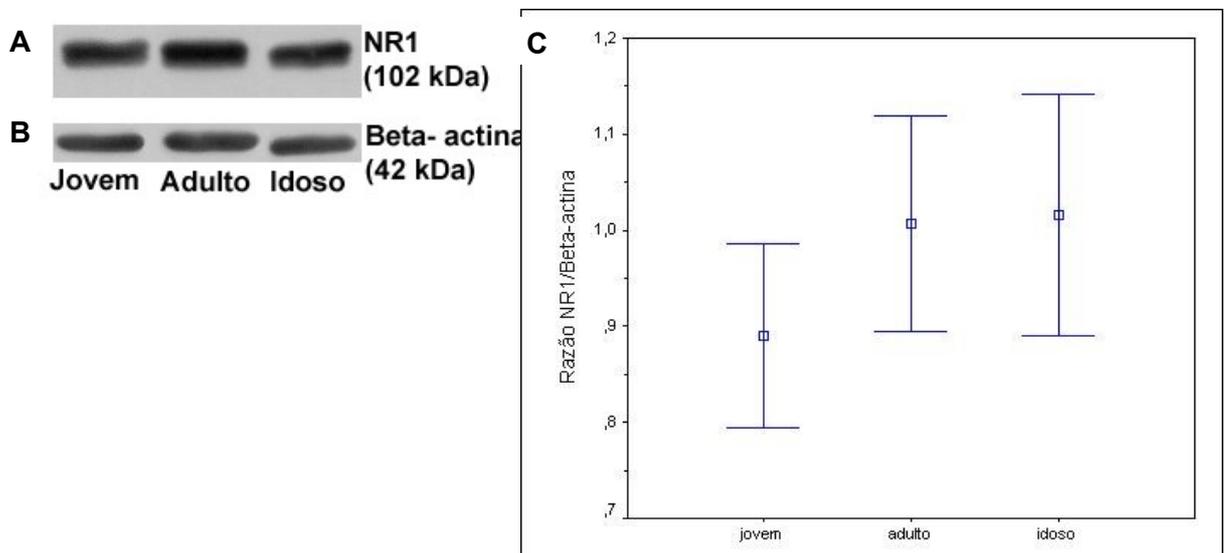
Apesar da análise estatística da densidade média de células de Purkinje NR1-positivas e da densidade média das células de Purkinje não variar significativamente entre as folhas de animais de mesma idade, quando comparamos o efeito do envelhecimento sobre a densidade média das células de Purkinje, elas apresentaram um padrão de queda diferente entre as folhas. Isto é, a folha IX apresentou uma maior queda da densidade média de células de Purkinje NR1-positiva (32%) com uma menor queda da densidade de células de Purkinje (23,2%), detectadas pela técnica de Giemsa, enquanto as outras duas folhas revelaram o inverso (Figura 8).



**Figura 8.** Queda da porcentagem de células de Purkinje que expressam NR1 e das células de Purkinje, pela técnica de Giemsa, nas folhas II, VI e IX de galinhas idosas em relação às jovens. Os dados mostram que quanto menor a queda de células de Purkinje NR1-positivas maior é a queda das células de Purkinje, reveladas pelo método de Giemsa, no córtex cerebelar de galinhas idosas. Área analisada =  $10.000\mu\text{m}^2$ .

#### IV -4. “IMMUNOBLOTTING”

Os dados de *immunoblotting* mostraram não haver mudanças estatísticas na expressão de NR1 ao longo do desenvolvimento pós-natal e envelhecimento. A média  $\pm$  erro padrão foi de  $0,89 \pm 0,04$  para os animais jovens, e de  $1,00 \pm 0,04$  para os animais adultos, enquanto para os idosos foi de  $1,01 \pm 0,05$  (Figura 9).



**Figura 9.** Expressão de NR1 no cerebelo de animais (*Gallus gallus*) ao longo do envelhecimento. Avaliação por *immunoblotting*: A – *Immunoblots* de NR1 em animais jovem, adulto e idoso; B – controle com Beta-actina das amostras; C – A razão da densidade óptica de NR1/Beta-actina não foi estatisticamente significativa.

## V – DISCUSSÃO

A participação dos receptores de glutamato tipo NMDA nas funções motoras, cognitivas, emocionais e na plasticidade sináptica do desenvolvimento ao envelhecimento, bem como na excitotoxicidade presente em várias condições patológicas, suportam a relevância de estudar a transmissão glutamatérgica dentro do SNC. Considerando que muitas dessas funções são processadas no cerebelo (ITO, 2000; DELGADO-GARCIA, 2001; SEKIRNJAK et al., 2003), tornando-o um excelente modelo para determinar a composição dos receptores de glutamato nos tipos celulares específicos.

O nosso estudo revelou que a subunidade NR1 foi expressa nas células dos núcleos cerebelares medial, intermédio e lateral e no córtex cerebelar a única célula a expressar essa subunidade foi a célula de Purkinje, tanto nos animais jovens como nos envelhecidos. Estudos de hibridação *in situ* e de imunohistoquímica em roedores revelaram que essa subunidade foi expressa tanto pelas células de Purkinje como pelas células de Golgi (MORIYOSHI et al., 1991; PETRALIA et al., 1994), sugerindo uma possível diferença entre as espécies, apesar dessa expressão no córtex de rato ter predominado nas células de Purkinje.

Os nossos resultados imunohistoquímicos revelaram uma diminuição da imunorreatividade NR1 no corpo celular e arborização dendrítica das células de Purkinje no decorrer da vida pós-natal. Um declínio da expressão da subunidade NR1 foi observado no pericário e na arborização dendrítica das células de Purkinje dos animais idosos quando comparamos com os jovens. Esse declínio do número de receptores de GluRs com o envelhecimento do cerebelo parece

corroborar os dados obtidos em outras estruturas encefálicas de ratos, camundongos e macacos idosos (PETERSEN & COTMAN, 1989; TAMARU et al., 1991; WENK et al., 1991; MAGNUSSON & COTMAN, 1993; MITCHELL & ANDERSON, 1998; HOF et al., 2002). Estudos com ligantes radioativos e de hibridização *in situ* no encéfalo de ratos jovens, adultos e idosos mostraram que o processo de envelhecimento pode conduzir a mudanças nas concentrações dos ligantes [ $H^3$ ]-MK-801 e [ $H^3$ ]-AMPA e nos mRNAs das subunidades dos receptores de glutamato do tipo NMDA e AMPA em várias estruturas, fenômeno que pode refletir os distúrbios motores e de memória encontrados em ratos, camundongos e humanos idosos (PAGLIUSI et al., 1994; WARDAS et al., 1997). Estes dados corroboram os nossos achados, onde houve mudanças na expressão da subunidade NR1 do GluRs tipo NMDA no cerebelo de galinhas idosas. Entretanto, outros estudos de auto-radiografia com ligantes radioativos em encéfalos de humanos revelaram que a concentração do ligante [ $H^3$ ]-MK-801 específico para os receptores tipo NMDA observada no hipocampo, córtex entorrinal e cerebelo se manteve constante ao longo da vida enquanto a concentração do ligante [ $H^3$ ]-AMPA atingiu um pico entre a primeira e segunda década de vida, tendendo a queda com o avançar da idade (JOHNSON et al., 1993, COURT et al., 1993).

Os nossos resultados de densidade média de células de Purkinje NR1-positivas nas folhas cerebelares de galinhas idosas mostraram uma queda estatisticamente significativa em relação ao animal jovem revelando uma diminuição da expressão dessa subunidade durante o envelhecimento. A magnitude dessa queda foi de 20 a 30%, semelhante à evidenciada em outras áreas encefálicas, tais como córtex cerebral, estriado e hipocampo de roedores (PETERSEN & COTMAN, 1989; TAMARU et al., 1991; WENK et al., 1991;

MAGNUSSON & COTMAN, 1993; MITCHELL & ANDERSON, 1998; HOF et al., 2002). Esta diminuição pode ser interpretada talvez sob dois aspectos. Primeiro, como um remodelamento na neurotransmissão glutamatérgica, mas por outro lado, pode ser um dos responsáveis pelos distúrbios motores e cognitivos observados nos idosos.

Durante o processo normal de envelhecimento do sistema nervoso central não foi observado alterações na quantidade de glutamato liberado na fenda sináptica, mas foi observada uma queda do número de transportadores de glutamato de alta afinidade nos terminais glutamatérgicos de animais envelhecidos resultando numa queda na capacidade de recaptação de glutamato (WHEELER & ONDO, 1982, 1986; SARANSAARI & OJA, 1995; VATASSERY et al., 1998, apud SEGOVIA et al., 2001) com conseqüente aumento de glutamato livre na fenda sináptica (MELDRUM & GARTHWAITE, 1990; CHOI & ROTHMAN, 1990; LYND-BALTA et al., 1996; FRANCIOSI, 2001; SARNA & HAWKES, 2003).

Os nossos dados mostram tanto uma diminuição na imunorreatividade das células de Purkinje NR1-positivas como uma queda da densidade média de células de Purkinje NR1-positivas. Desta forma, diminuir a expressão de receptores que permitem um grande influxo de cálcio seria um importante mecanismo para preservação de um maior número de células de Purkinje no decorrer do envelhecimento, visto que esses receptores permitem grande influxo de cálcio.

Os dados deste trabalho revelam que durante o envelhecimento, quanto menor a queda de células de Purkinje NR1-positivas (em torno de 20% nas folhas II e IV), maior foi a queda das células de Purkinje (em torno de 30% nas folhas II e VI), reveladas pelo método de Giemsa, no córtex cerebelar. Vários estudos têm

demonstrado que a excessiva ativação dos receptores de glutamato pode resultar em morte neuronal gerada pela excitotoxicidade (CHOI & VISESKUL, 1988; McDONALD et al., 1998; MALCON et al., 2000). A ativação dos receptores do subtipo NMDA leva a um aumento exagerado do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular ativando enzimas dependentes deste íon, como a fosfolipase C, proteína quinase C, calcineurina e a óxido nítrico sintase (McDONALD & SCHOEPP, 1993) levando a produção de radicais livres e morte celular. Portanto, apesar de não haver diferença significativa entre a diminuição da densidade de células de Purkinje entre as folhas cerebelares durante o envelhecimento, a folha IX que apresentou uma maior queda da densidade de células NR1-positivas (32%) pode ter poupado mais células da morte, visto que essa folha revelou o menor decréscimo na densidade celular (23%).

O método de coloração de Giemsa revelou uma queda significativa da densidade média de células de Purkinje nas folhas II, VI, e IX do cerebelo de galinha idosa se comparada à da jovem. Essa diminuição já foi demonstrada no cerebelo de outros animais por vários autores. Camundongos e ratos idosos mostraram uma perda celular uniforme por todo o cerebelo (STURROCK, 1989; TAMARU, 1991) semelhante à observada por nós no cerebelo de galinhas, já nos humanos essa perda foi mais acentuada no vermis (TORVIK et al., 1986).

A diminuição na densidade de células de Purkinje NR1-positivas, por outro lado, pode comprometer substancialmente a neurotransmissão glutamatérgica no cerebelo de galinhas idosas. Esses achados podem sugerir que a redução na plasticidade neuronal na fase tardia da vida pode ser consequência da diminuição da neurotransmissão glutamatérgica mediada pelos receptores do tipo NMDA.

Vários estudos demonstraram que os receptores de glutamato do tipo

NMDA são essenciais para o aprendizado motor (THOMPSON et al., 1997; TAKATSUKI et al, 2001, apud SANCHEZ-PEREZ et al., 2005) e para o controle da coordenação motora (CONTRERAS, 1990; ROGAWSKI & PORTER, 1990; SANCHEZ-PEREZ et al., 2005), e que durante o processo normal de envelhecimento algumas formas de aprendizado motor mostram-se alteradas (THOMPSON et al.,1997). Portanto, nossos dados sugerem que o envelhecimento pode conduzir a mudanças na expressão da subunidade NR1 nas células de Purkinje do cerebelo de pintos podendo comprometer a transmissão sináptica nesses circuitos gerando prejuízos na potenciação e depressão de longa duração (LTP/LTD) que são consideradas o substrato neural das disfunções cognitivas e motoras (BURKE & BARNES, 2006; MATTSON & MAGNUS, 2006). Desta forma, o cerebelo tem se mostrado um modelo experimental interessante para se estudar os possíveis mecanismos celulares envolvidos nessa perda neuronal observada com o envelhecimento, o que poderia facilitar a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos degenerativos de algumas doenças do SNC.

A diminuição da eficiência da neurotransmissão glutamatérgica decorrente da diminuição da expressão dos receptores de glutamato tipo AMPA e NMDA em várias estruturas cerebrais durante o envelhecimento, observada neste e outros trabalhos (PETERSEN & COTMAN, 1989; TAMARU et al., 1991; WENK et al., 1991; MAGNUSSON & COTMAN, 1993; PAGLIUSI et al., 1994; WARDAS et al., 1997; MITCHELL & ANDERSON, 1998; HOF et al., 2002) pode ser compensada nos idosos com a ativação de áreas corticais e subcorticais adicionais para a execução de tarefas motoras simples quando comparada às áreas encefálicas de

jovens observadas em estudos com a técnica de neuroimagem funcional (MATTAY et al., 2002; HEUNINCKX et al., 2005; HEUNINCKX et al., 2008a,b).

Os nossos dados de *immunoblotting* mostraram não haver mudanças estatísticas na expressão de NR1 ao longo do desenvolvimento pós-natal e envelhecimento, não corroborando os nossos dados de imuno-histoquímica. Apesar dos dois métodos avaliarem a expressão da subunidade NR1 no tecido cerebelar, existe diferença no processamento deles. A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para revelar a expressão da subunidade NR1 especificamente nas células de Purkinje, enquanto o método de *immunoblotting* avaliou a expressão da subunidade NR1 em todo o cerebelo, incluindo córtex cerebelar e núcleos cerebelares, o que pode mascarar os resultados ou diluir os efeitos causados pelo envelhecimento sobre a expressão pelas células de Purkinje. Entretanto, estudos com ligantes radioativos no cerebelo de humanos mostraram que os receptores tipo NMDA surgem no período fetal, aumentam até atingir o platô por volta dos 10 anos e se mantêm ao longo da vida (COURT et al., 1993; JOHNSON et al., 1993).

## VI – CONCLUSÃO

Os nossos resultados revelaram que:

- As células de Purkinje no cerebelo de pintos foram as únicas células do córtex cerebelar que expressaram a subunidade NR1 do receptor de glutamato tipo NMDA.
- O envelhecimento pode conduzir mudanças nas células de Purkinje que vão desde a morte celular até uma queda na densidade média de células de Purkinje NR1-positivas no cerebelo de galinhas. Fenômeno que pode refletir os distúrbios motores e de memória encontrados em animais idosos.
- A redução na plasticidade neuronal na fase tardia da vida pode ser decorrente da diminuição da neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores tipo NMDA.

## VII – REFERÊNCIAS

- Banay-Schwartz M; Lajtha A; Palkovits M. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements. I. Glutamate and related amino acids. **Neurochem Res.** 1989 Jun;14(6):555-62.
- Bettler, B.; Egebjerg, J.; Sharma, G.; Pecht, G.; Hermans-Borgmeyer, I.; Moll, C.; Stevens, C.F.; Heinemann, S. Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. **Neuron**,1992; 8: 257-65.
- Bettler B & Mulle C. Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. **Neuropharmacology.** 1995 Feb;34(2):123-39. Review.
- Bonhaus DW, Perry WB, McNamara JO. Decreased density, but not number, of N-methyl-D-aspartate, glycine and phencyclidine binding sites in hippocampus of senescent rats. **Brain Res.** 1990 Nov 5;532(1-2):82-6.
- Borson ND, Salo WL, Drewes LR. A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. **PCR Methods Appl.** 1992 Nov;2(2):144-8.
- Boulter, J.; Hollmann, M.; O Shea-Greenfield, A.; Hartley, M.; Deneris, E.; Maron, C.; Heinemann, S.; Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunits genes. **Science.** 1990. 249: 1033-1037.
- Bower JM & Parsons LM. Rethinking the "lesser brain".**Sci Am.**,2003; 289(2):50-7.
- de Brabander JM, Kramers RJ, Uylings HB. Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. **Eur J Neurosci.** 1998 Apr;10(4):1261-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal Biochem.** 1979. 72, 248.
- Brockie PJ & Maricq AV. Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology. **WormBook.** 2006 Jan; 19:1-16.
- Burke SN & Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. **Nat Rev Neurosci.** 2006 Jan;7(1):30-40.
- Burnashev, N. & Rozov, A. Genomic control of receptor function. **Cell Mol. Life Sci,** 2000; 57: 1499-507.
- Cauli O, Llansola M, Rodrigo R, El Mili N, Errami M, Felipe V. Altered modulation of motor activity by group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in hyperammonemic rats. **Metab Brain Dis.** 2005 Dec;20(4):347-58. Review.

Cobo M & Mora F. Acidic Amino Acids and Self-stimulation of the Prefrontal Cortex in the Rat: A Pharmacological Study., **Eur J Neurosci.**1991;3(6):531-538.

Collingridge, G.L. & Singer, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. **Trends Pharmacol. Sci.**, 1990;11: 290-6.

Collingridge GL & Bliss TV. Memories of NMDA receptors and LTP. **Trends Neurosci.** 1995; 18(2):54-6.

Court JA, Perry EK, Johnson M, Piggott MA, Kerwin JA, Perry RH, Ince PG. Regional patterns of cholinergic and glutamate activity in the developing and aging human brain. **Brain Res Dev Brain Res.** 1993 Jul 16;74(1):73-82.

Chapman AG, Nanan K, Williams M, Meldrum BS. Anticonvulsant activity of two metabotropic glutamate group I antagonists selective for the mGlu5 receptor: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), and (E)-6-methyl-2-styryl-pyridine (SIB 1893). **Neuropharmacology.** 2000 Jul 10;39(9):1567-74.

Christine CW.& Choi DW. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. **J Neurosci.** 1990 Jan;10(1):108-116.

Choi, DW. & Rothman, SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Ann. Rev. Neurosci.**,1990; 13: 171-82.

**Choi DW & Viseskul V.** Opioids and non-opioid enantiomers selectively attenuate N-methyl-D-aspartate neurotoxicity on cortical neurons. **Eur J Pharmacol.** **1988 Oct 11;155(1-2):27-35.**

Colleman, PD & Flood, DG. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer disease. **Neurobiol. Aging** 1987; 8(6):521-545. Review.

Contreras PC, Bremer ME, Gray NM. Ifenprodil and SL 82.0715 potently inhibit binding of [3H](+)-3-PPP to sigma binding sites in rat brain. **Neurosci Lett.** 1990 Aug 14;116(1-2):190-3.

Cotman CW, Anderson KJ. Synaptic plasticity and functional stabilization in the hippocampal formation: possible role in Alzheimer's disease., **Adv Neurol.**1988; 47:313-35.

Court, JA.; Perry, EK.; Johnson, M.; Piggot, MA.; Kerwin, JA.; Perry, RH.; Ince, PG. Regional patterns of cholinergic and glutamate activity in the developing and aging human brain. **Dev Brain Res.**, 1993 Jul 16;74(1):73-82.

Day, NC.; Williams TL, Ince PG, Kamboj RK, Lodge D, Shaw PJ. Distribution of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the human hippocampus and cerebellum. **Brain Res Mol Brain Res.**,1995; 31:17-32.

Das S.; Sasaki YF.; Rothe T.; Premkumar LS.; Takasu M.; Crandall JE.; Dikkes P.; Conner DA.; Rayudu PV.; Cheung W.; Vincent Chen H-S; Lipton SA.; Nakanishi

N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. **Nature**. 1998; 393:377-381.

Das S, Olurotimi O. Noisy recurrent neural networks: the continuous-time case. **IEEE Trans Neural Netw**. 1998;9(5):913-36.

De Brabander JM, Kramers RJ, Uylings HB. Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex., **Eur J Neurosci**.1998;10(4):1261-9.

Delgado-García JM. Structure and function of the cerebellum., **Rev Neurol**. 2001; 15;33(7):635-42.

Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. Changes in the structural complexity of the aged brain. **Aging Cell**. 2007 Jun;6(3):275-84. Review.

**Duan ZJ, Zhang LL, Xie ZP, Yu ZA, Zhang LP, Zhang B, Liu YQ, Wang JW, Li WP, Zhang CH, Ma XJ, Shu YL, Duan SM, Li DX, Hou YD.** Anti-SARS virus activities of different recombinant human interferons in cell culture system. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**. 2003 Sep;17(3):205-8.

**Eccles JC.** Neurogenesis and morphogenesis in the cerebellar cortex., **Proc Natl Acad Sci U S A**.1970; **66(2):294-301**.

Erreger, K; Chen, P.E.; Wyllie, DJ; Traynelis, S.F. Glutamate receptor gating. **Crit Rev Neurobiol**.,2004; 16:187-224.

Franciosi S. AMPA receptors: potential implications in development and disease. **Cell Mol Life Sci**. 2001 Jun;58(7):921-30. Review.

Gauck V, Jaeger D. The contribution of NMDA and AMPA conductances to the control of spiking in neurons of the deep cerebellar nuclei. **J neurosci**. 2003 Sep 3;23(22): 8109-18.

Gazzaley AH, Weiland NG, McEwen BS, Morrison JH. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus., **J Neurosci**.1996; 1;16(21):6830-8.

Halbach, O.B. & Dermietzel R. **Neurotransmitters and Neuromodulators. Handbook of Receptors and Biological Effects**. Willey-Vch. Second edition. Germany, 2006.

Heuninckx S, Wenderoth N, Debaere F, Peeters R, Swinnen SP. Neural basis of aging: the penetration of cognition into action control. **J Neurosci**. 2005 Jul 20;25(29):6787-96.

Heuninckx S, Wenderoth N, Swinnen SP. Age-related reduction in the differential pathways involved in internal and external movement generation. **Neurobiol Aging**. 2008 May 8.

Heuninckx S, Wenderoth N, Swinnen SP. Systems neuroplasticity in the aging brain: recruiting additional neural resources for successful motor performance in elderly persons. **J Neurosci.** 2008 Jan 2;28(1):91-9.

Hof PR, Duan H, Page TL, Einstein M, Wicinski B, He Y, Erwin JM, Morrison JH. Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys., **Brain Res.** 2002;22;928(1-2):175-86.

Hollmann, M. & Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. **Ann. Rev. Neurosci.**,1994; 17: 31-108.

Hollmann, M.; O'Shea-Greenfield, A.; Rogers, S. W.; Heinemann, S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. **Nature**,1989; 342: 643-8.

Ito, M. Mechanisms of motor learning in the cerebellum. **Brain Res.** 2000; 886:237-245.

**Jacobs MA, Horská A, van Zijl PC, Barker PB.** Quantitative proton MR spectroscopic imaging of normal human cerebellum and brain stem., **Magn Reson Med.**2001; 46(4):699-705.

Johnson M, Perry EK, Ince PG, Shaw PJ, Perry RH. Autoradiographic comparison of the distribution of {3H}MK801 and {3H}CNQX in the human cerebellum during development and aging. **Brain Res.** 1993 Jul 2;615(2):259-66.

**Jolles J.** Cognitive, emotional and behavioral dysfunctions in aging and dementia. **Prog Brain Res.** 1986; 70:15-39.

Kashiwabuchi N.; Ikeda K.; Araki K.; Hirano T.; Shibuki K.; Takayama C.; Inoue Y.; Ktsuwada T.; Yagi T.; Kang Y., et al. Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. **Cell.** 1995 Apr 21;81(2):245-252.

**Kew JN & Kemp JA.** Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl).** 2005 Apr;179(1):4-29.

Keinanen, K.; Wisden, W.; Sommer, B.; Werner, P.; Herb, A.; Verdoorn, T.A.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H. A family of AMPA-selective glutamate receptors. **Science**, 1990;249:556-60.

Kuenzel WJ & Masson M. **A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Chick (*gallus domesticus*).** Ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 1988.

Kvamme OJ, Eliasson G, Jensen PB. Co-operation of care and learning across the interface between primary and secondary care. **Scand J Prim Health Care**. 1998;16(3):131-4.

Kwak S & Weiss JH. Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. **Curr Opin Neurobiol**. 2006;16(3):281-7.

Legendre P. & Westbrook G.L. The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. **J Physiol**. 1990 Oct;429:429-449.

Llansola M, Sanchez-Perez A, Cauli O, Felipo V. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. **Cerebellum**. 2005;4(3):154-61. Review.

Lomeli H.; Sprengel R.; Laurie D.J.; Kohr G.; Herb A.; Seeburg P.H; Wisden W. the rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. **FEBS Lett**. 1993 Jan 11;315(3):318-322.

Lynd-Balta E, Pilcher WH, Joseph SA. Distribution of AMPA receptor subunits in the hippocampal formation of temporal lobe epilepsy patients. **Neuroscience**. 1996 May;72(1):15-29.

Magnusson, K.R. & Cotman, C.W. Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains. **Neurobiol. Aging**, 1993. 14:197-206.

Malcon C, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. **Brain Res**. 2000 Mar 31;860(1-2):195-8.

Martin LJ; Blackstone CD; Levey AI; Huganir RL; Price DL. AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. **Neurosci**. 1993 Mar; 53(2): 327-58.

Mattay VS, Fera F, Tessitore A, Hariri AR, Das S, Callicott JH, Weinberger DR. Neurophysiological correlates of aged-related changes in human motor function. **Neurology**. 2002 Feb 26;58(4):630-5.

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

Mattson MP & Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nat Rev Neurosci**. 2006 Apr;7(4):278-94. Review.

McDonald JW & Schoepp DD. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. **Brain Res**. 1993 Oct 8;624(1-2):239-44.

McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. **Nat Med.** 1998 Mar;4(3):291-7.

Meldrum, B. & Garthwaite, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol. Sci.**,1990; 11:379-87.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.**, 2000, 130: 1007S-1015S.

Mitchell JJ & Anderson KJ. Age-related changes in (3H)MK-801 binding in the Fischer 344 rat brain. **Neurobiol Aging.** 1998 May-Jun;19(3):259-65.

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

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

**Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH.** Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron.** 1994;12(3):529-40.

Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain., **Brain Res Rev.**2007; 55(1):78-88.

Mora F & Cobo M. The neurobiological basis of prefrontal cortex self-stimulation: a review and an integrative hypothesis. **Prog Brain Res.**1990; 85:419-31.

Morrison JH & Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. **Science.**1997;17;278(5337):412-9 .

**Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S.** Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. **Nature.**1991; 7;354(6348):31-7.

Nakamura H, Yokoyama Y, Motoyoshi S, Seto Y, Kadokawa T, Shimizu M. Inhibition of prostaglandin generation in the rabbit brain in-vivo by AD-1590, a non-steroidal anti-inflammatory agent with potent antipyretic activity., **J Pharm Pharmacol.**1985; 37(12):894-8.

Nakanishi S. Synaptic mechanisms of the cerebellar cortical network. **Trends in Neurosciences.** 2005, Feb. 28(2): 93-100.Review.

Obrenovitch TP & Ureniak J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Prog Neurobiol.** 1997; 51 (1):39-87. Review.

Okado N, Ito R, Homma S. The terminal distribution pattern of spinocerebellar fibers. An anterograde labeling study in the posthatching chick. **Anat Embryol (Berl)**. 1987;176(2):175-82.

Ozawa, S.; Kamiya, H.; Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 1998; 54: 581-618.

Pagliusi SR, Gerrard P, Abdallah M, Talabot D, Catsicas S. Age-related changes in expression of AMPA-selective glutamate receptor subunits: is calcium-permeability altered in hippocampal neurons? **Neuroscience**. 1994 Aug;61(3):429-33.

Pakkenberg B, Pelvig D, Marner L, Bundgaard MJ, Gundersen HJ, Nyengaard JR, Regeur L. Aging and the human neocortex., **Exp Gerontol**. 2003;38(1-2):95-9.

Paperna, T.; Lamed, Y.; Teichberg, V.I. CDNA cloning of chick brain  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors reveals conservation of structure, function and post-transcriptional processes with mammalian receptors. **Mol. Brain Res.**, 1996; 36: 101-13.

Peters A, Sethares C, Moss MB The effects of aging on layer 1 in area 46 of prefrontal cortex in the rhesus monkey., **Cereb Cortex**. 1998; 8(8):671-84.

Peters SL, Sand C, Batinik HD, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Reactive oxygen species potentiate the negative inotropic effect of cardiac M2-muscarinic receptor stimulation., **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 2001; 364(2):166-71.

Petersen, C. & Cotman, CW. Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-d-aspartic acid receptor during aging. **Neurosci. Lett**. 1989. 104: 309-313.

Petralia RS & Wenthold RJ. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. **J Comp Neurol**. 1992;318(3):329-54.

Petralia, RS.; Yokotani, N.; Wenthold, RJ. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. **J Neurosci**. 1994. 14(2): 667-696.

Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacol Rev**. 1990 Sep;42(3):223-86.

**Sanchez-Perez A, Llansola M, Cauli O, Felipo V.** Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. **Cerebellum**. 2005;4(3):162-70.

Saransaari, P & Oja, SS., 1995. Age-related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. **Mech. Ageing Dev**. 81:61-71.

Sarna JR & Hawkes R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. **Prog Neurobiol.**,2003; 70: 473-507.

**Sato B, Kouhara H, Koga M, Kasayama S, Saito H, Sumitani S, Hashimoto K, Kishimoto T, Tanaka A, Matsumoto K.** Androgen-induced growth factor and its receptor: demonstration of the androgen-induced autocrine loop in mouse mammary carcinoma cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**1993; 47(1-6):91-8.

Segovia, G.; Porras, A.; Del Arco, A.; Mora, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech Ageing Dev.**, 2001;122: 1-29.

Sekirnjak, C.; Vissel, B.; Bollinger, J.; Faulstich, M.; DU LAC, S. Purkinje cell synapses target physiologically unique brainstem neurons. **J Neurosci.**,2003; 23: 6392-6398.

Scheibel ME, Lindsay RD, Tomiyasu U, Scheibel AB. Progressive dendritic changes in aging human cortex., **Exp Neurol.**1975; 47(3):392-403.

Schmidt TA, Larsen JS, Kjeldsen K. Quantification of rat cerebral cortex Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase: effect of age and potassium depletion. **J Neurochem.**1992;59(6):2094-2104.

Singer W. The formation of cooperative cell assemblies in the visual cortex. **J Exp Biol.** 1990 oct;153:177-97.

Sprengel R, Seeburg PH. The unique properties of glutamate receptor channels. **FEBS Lett.** 1993 Jun 28;325(1-2):90-4.

Sturrock RR. Age related changes in Purkinje cell number in the cerebellar nodulus of the mouse. **J Hirnforsch.** 1989;30(6):757-60.

Strolin-Benedetti, M., Cini, M., Fusi, R., Marrari, P., Dostert, P. The effects of aging on MAO activity and amino acid levels in rat brain. **J Neural Transm Suppl.** 1990;29:259-68.

Subramaniam S, McGonigle P. Quantitative autoradiographic characterization of the binding of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5, 10-imine ([<sup>3</sup>H]MK-801) in rat brain: regional effects of polyamines; **J Pharmacol Exp Ther.**1991;256(2):811-9.

Takatsuki K, Kawahara S, Takehara K, Kishimoto Y, Kirino Y. Effects of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK-801 on classical eyeblink conditioning in mice. **Neuropharmacology.** 2001 Oct;41(5):618-28.

**Takumi Y, Bergersen L, Landsend AS, Rinvik E, Ottersen OP.** Synaptic arrangement of glutamate receptors; **Prog Brain Res.** 1998;116:105-21.

Tamaru, M.; Yoneda, Y.; Ogita, K.; Shimizu, J.; Nagata, Y. Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. **Brain Res.**,1991; 542:83-90.

Thompson RF, Bao S, Chen L, Cipriano BD, Grethe JS, Kim JJ, Thompson JK, Tracy JA, Weninger MS, Krupa DJ. Associative learning. **Int Rev Neurobiol.** 1997;41:151-89. Review.

Torvik A, Torp S, Lindboe CF. Atrophy of the cerebellar vermis in ageing. A morphometric and histologic study., **J Neurol Sci.**1986; 76(2-3):283-94.

Uemura S, Ienaga K, Higashiura K, Kimura H.. Gamma-glutamyltaurine has potent and long-lasting antiepileptic action as demonstrated by intra-amygdaloid injection in amygdala-kindled rats. **Brain Res.** 1992 Oct 30;594(2):347-50.

Vatassery, G.T., Lai, J.C.K., Smith, W., Quach, H.T., 1998. Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamin E to oxidative stress. **Neurochem. Res.** 23: 121-125.

**Vijayashankar N, Brody H.** A study of aging in the human abducens nucleus. **J Comp Neurol.**1977; 1;173(3):433-8.

Voukelatou, G.; Aletras, A.J.; Tsourinakis, T.; Kouvelas, E.D. Glutamate-like immunoreactivity in chick cerebellum and optic tectum. **Neuroc. Res.**, 1992;17: 1267-1273.

**Zarain-Hezberg, A.; Lee-Rivera, I.; Rodríguez, G.; López-Colomé A. M.** Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene. **Brain Res Mol Brain Res.**,2005; 137: 235-51.

Wardas, J.; Pietraszek, M.; Schulze, G.; Ossowska, K.; Wolfarth, S. Age-related changes in glutamate receptors: An autoradiographic analysis. **Polish J. Pharmacol.**,1997; 49: 401-10.

Watkins JC & Jane DE. The glutamate story **British Journal of Pharmacology.** 2006 Aug 23;947(1):122-30.

**Watkins BA, Dorn HH, Kelly WB, Armstrong RC, Potts BJ, Michaels F, Kufta CV, Dubois-Dalcq M.** Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures. **Science.**1990;3;249(4968):549-53.

Wenk G.; Walker, LC., Price, DL., Cork, LC., Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. **Neurobiol. Aging** 1991. 12: 93-98.

Wheeler DD & Ondo JG. Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. **Exp Gerontol.** 1986;21(3):159-68.

Wheeler DD & Ondo JG. Effect of castration on the high affinity glutamate transporter in rat hypothalamic and cortical synaptosomes. **Neurochem Res.** 1982 Aug;7(8):923-42.

**Wickelgren I.** For the cortex, neuron loss may be less than thought., **Science.**1996; 25;274(5287):484-5.

Wold JE. The vestibular nuclei in the domestic hen (*Gallus domesticus*): VI. Afferents from the cerebellum., **J Comp Neurol.**1981;20;201(3):319-41.

Yamada K.; Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. **Anat Sci Int.** 2002; 77(2): 94-108.

# 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](#)