

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

*Papel das reservas intracelulares de cálcio no efeito de aminoácidos excitatórios sobre a fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em hipocampo de ratos jovens.*

*Daniela Mendes Oppelt*

*Orientadora*  
*Profa. Susana Tchernin Wofchuk*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre  
2002

*“Chegou o momento de entender e experimentar a energia que está presente e conecta todas as experiências, fenômenos e seres. Quando conseguirmos isso, nossa vida se expandirá e seremos capazes de remover os obstáculos que nos impedem de atingir nossas metas, a paz interior, a alegria e a felicidade”.*

*Brian Weiss*

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Danilo e Zuleica que, apesar de não estarem  
presentes fisicamente em minha vida neste  
momento, muito me iluminaram e  
incentivaram ao longo desta caminhada.*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1. 1. Astrócitos.....	1
1. 2. Glutamato e Seus Receptores.....	2
1.2.1. Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos.....	4
1.2.1.1. Receptores NMDA.....	4
1.2.1.2. Receptores não-NMDA (AMPA e KA).....	5
1.2.2. Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos.....	6
1. 3. Cálcio e Reservas Intracelulares.....	8
1.3.1. Reservas Intracelulares de Ca <sup>2+</sup> Reguladas por Receptores de Inositol Trifosfato.....	12
1.3.2. Reservas Intracelulares de Ca <sup>2+</sup> Reguladas por Receptores Rianodina.....	13
1. 4. Fosforilação de Proteínas no SNC.....	16
1.4.1. Proteínas Quinases.....	18

1.4.1.1. Proteínas Quinases Dependentes de Segundos Mensageiros.....	18
1.4.1.2. Proteínas Quinases Independentes de Segundos Mensageiros.....	20
1.4.1.3. Proteínas Tirosina-Quinases.....	21
1.4.2. Proteínas Fosfatases.....	21
1. 5. Filamentos Intermediários.....	23
1. 6. Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP).....	24
1. 7. Objetivos.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2. 1. Materiais.....	30
2. 2. Métodos.....	31
2.2.1. Animais.....	31
2.2.2. Obtenção das fatias de tecido.....	31
2.2.3. Pré-incubação.....	31
2.2.4. Marcação das fosfoproteínas com [ <sup>32</sup> P] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	32
2.2.5. Eletroforese Bidimensional.....	33
2.2.5.1. Primeira Dimensão (NEPHGE).....	33
2.2.5.2. Segunda dimensão (SDS-PAGE).....	34
2.2.6. Fixação, secagem e exposição autorradiográfica dos géis.....	36
2.2.7. Quantificação e estatística.....	37

3. RESULTADOS.....	38
3. 1. Efeito da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD em hipocampo de ratos jovens.....	38
3. 2. Papel das reservas intracelulares de Ca <sup>2+</sup> sobre o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens.....	41
3. 3. Efeito da ausência e presença de íons Ca <sup>2+</sup> provenientes das populações (“pools”) extracelular e intracelular sobre a modulação da fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens.....	47
3. 4. Papel do Ca <sup>2+</sup> intracelular livre sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD em hipocampo de ratos jovens.....	51
3. 5. Envolvimento dos receptores adenosina (AdoRs) e dos níveis de AMP cíclico (AMP <sub>c</sub> ) sobre o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens.....	54
4. DISCUSSÃO.....	58
4. 1. Papel das reservas intracelulares de Ca <sup>2+</sup> sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD em fatias hipocampais de ratos jovens.....	60
4. 2. Efeito de íons Ca <sup>2+</sup> sobre a modulação da fosforilação da GFAP em fatias hipocampais de ratos jovens.....	65
4. 3. Envolvimento de receptores adenosina (AdoRs) e de AMP cíclico (AMP <sub>c</sub> ) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP em fatias hipocampais de ratos jovens.....	67

5. CONCLUSÕES.....	69
6. CONCLUSÃO FINAL.....	72
7. CONSIDERAÇÃO FINAL.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

## *AGRADECIMENTOS*

Aos meus pais, seres iluminados que sempre me apoiaram e me transmitiram muito amor, muita luz e muita força em todos os momentos da minha vida.

À minha família (tios(as), primos(as), minha avó e meu cãozinho Jimmie), que sempre confiaram em mim e deram-me muito apoio no decorrer deste trabalho. Um obrigada especial à tia Zélia e às primas Darliane e Carine, que me acolheram com muito amor em seus lares durante a parte final desta Dissertação.

À minha Orientadora, Susana Wofchuk, pelo ensinamento, dedicação e amizade, dentro e fora do laboratório, ao longo deste trabalho.

Ao Professor Richard Rodnight, pelas idéias partilhadas comigo e pelo grande auxílio ao longo desta Dissertação.

À Trícia, pela amizade e pelo grande aprendizado que recebi nestes 5 anos de convívio.

Aos meus bolsistas (e amigos) Douglas e Joel pela dedicação e paciência nos experimentos que fazem parte desta Dissertação.

À Verlaine, pela grande ajuda com as “caixas de géis” e pelo companheirismo dentro do laboratório.

Às grandes amigas Lauren, Mônica, Sirlene, Lúcia, Cláudia e, em especial à minha “quase irmã” Daniela Gonçalves, que sempre estiveram ao meu lado nas alegrias e nas tristezas.

Ao LabS100 por todo o carinho e amizade, em especial à minha priminha Sabrina, Emeli, Juliana, Francine, Marina, Érica e Cristina.

Aos amigos Joel, Dioguinho e Otemar, pela amizade e pelo companheirismo no dia-a-dia do laboratório.

Ao Professor C. A. e à Carmem, pela constante disposição para discutir minhas dúvidas relacionadas à metodologia e aos programas de computador, respectivamente.

Às Professoras Chris e Beti pelo auxílio metodológico, pelos ensinamentos teóricos e pelo grande carinho que sempre tiveram comigo.

Ao Departamento de Bioquímica, em especial ao Curso de Pós-Graduação, por ter me acolhido e possibilitado a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é uma proteína da classe dos filamentos intermediários, exclusivamente expressa em astrócitos no sistema nervoso central (SNC). A função específica da fosforilação desta proteína é ainda desconhecida. No entanto, tem sido demonstrado que o equilíbrio dinâmico entre o estado fosforilado e desfosforilado de sítios específicos da GFAP pode regular a polimerização e despolimerização dos filamentos intermediários durante eventos de estruturação do citoesqueleto glial.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens (P12-P16) é estimulada no mesmo nível por glutamato, via um receptor glutamatérgico metabotrópico do grupo II (mGluR II), e pela ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (presença de EGTA). Entretanto, o tratamento simultâneo com glutamato e EGTA não resulta em efeito sinérgico, sugerindo um mesmo mecanismo de ação para estas duas situações estimulatórias da fosforilação da GFAP (WofchuK & Rodnight, 1994; Kommers *et al.*, 1999; Rodnight *et al.*, 1997). Este mecanismo provavelmente não envolve reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  associadas a receptores de  $\text{IP}_3$ , uma vez que mGluRs II estão envolvidos com o mecanismo de transdução de sinal via adenilato ciclase e não via hidrólise de fosfoinositídeos. Uma hipótese proposta é de que o glutamato, via mGluR, bloqueia canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, inibindo uma cascata de desfosforilação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , associada a GFAP (Rodnight *et al.*, 1997). Interessantemente, os receptores rianodina (RyRs) presentes nas reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por tais receptores estão associados com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Chavis *et al.*, 1996).

Com base nestes dados, buscou-se neste trabalho avaliar se a modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo de ratos

jovens envolve as reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por RyRs e se o  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente destas reservas atua de maneira semelhante ao  $\text{Ca}^{2+}$  oriundo do espaço extracelular.

Nossos resultados mostraram que há uma evidente participação do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente das reservas intracelulares reguladas por RyRs no mecanismo modulatório da fosforilação da GFAP via ativação de mGluRs em fatias de hipocampo de ratos jovens, uma vez que a cafeína e a rianodina (agonistas de RyRs) reverterem totalmente o efeito estimulatório do agonista glutamatérgico metabotrópico 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da proteína e este efeito da cafeína é inibido por dantrolene (antagonista de RyRs). Talvez o  $\text{Ca}^{2+}$  oriundo das reservas reguladas por RyRs tenha o mesmo papel do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do espaço extracelular, ou seja, desencadeia uma cascata de desfosforilação associada à GFAP mediada pela calcineurina, uma vez que quelando o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre com BAPTA-AM, após a mobilização destas reservas, tal efeito não ocorre.

A participação de receptores adenosina (AdoRs) e do AMP cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) ainda permanece a ser estudada. Entretanto, é sabido que em ratos jovens a ativação de mGluRs aumenta a formação de  $\text{AMP}_c$  potenciando o efeito de outros tipos de receptores, como os AdoRs e, provavelmente, isto é mediado por um mGluR II (Schoepp & Johnson, 1993; Winder & Conn, 1996).

Neste trabalho mostrou-se justamente o possível envolvimento de tais mecanismos de transdução de sinal na modulação da fosforilação da GFAP, pois a adenosina deaminase (enzima que metaboliza adenosina endógena) e a forskolina (agente que estimula a enzima adenilato ciclase) alteraram o nível de fosforilação da GFAP.

Estes resultados evidenciam o envolvimento das reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por RyRs no mecanismo de transdução de sinal que modula o estado de fosforilação GFAP mediado pela ativação de mGluRs.

## ***ABSTRACT***

The glial fibrillary acidic protein (GFAP) is an intermediate filament protein that is exclusively expressed in astrocytes in the central nervous system (CNS). The specific function of GFAP phosphorylation is still unknown. However, it is shown that dynamic equilibrium between the phosphorylated and dephosphorylated state of GFAP may regulate the polymerization and depolymerization of the intermediate filament during reorganization of the glial cytoskeleton.

Our group showed that GFAP phosphorylation from immature hippocampal slices (P12-P16) is stimulated, at the same level, by glutamate via a type II metabotropic glutamate receptor (mGluR II), and by absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA present); in the meantime, the simultaneous treatment with glutamate and EGTA does not result in a synergistic effect, suggesting a same mechanism of action for this two situations (Wofchuk and Rodnight, 1994; Kommers *et al.*, 1999; Rodnight *et al.*, 1997). This mechanism probably does not involve internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores regulated by  $\text{IP}_3$  receptors, because mGluRs II are involved with modulation of adenylyl cyclase and not via phosphatidylinositol hydrolysis. The hypothesis proposed is that glutamate, via mGluRs, inhibits L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and down regulates a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent dephosphorylation event coupled to GFAP (Rodnight *et al.*, 1997). Interestingly, ryanodine receptors (RyRs) present in the internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores regulated by these receptors have been shown to be associated with L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Chavis *et al.*, 1996).

Based in these data, this work intent to value if the glutamatergic modulation of GFAP phosphorylation from immature hippocampal slices

involve the internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores regulated by RyRs and if the  $\text{Ca}^{2+}$  originated from this stores acts by a similar manner from that of the external  $\text{Ca}^{2+}$ .

Our results showed that there is an evident participation of  $\text{Ca}^{2+}$  originated from internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores regulated by RyRs in the modulation of GFAP phosphorylation via mGluRs activation in immature hippocampal slices, because caffeine and ryanodine (RyRs agonists) revert completely the stimulation of GFAP phosphorylation given by 1S,3R-ACPD (mGluR agonist) and the effect of caffeine is inhibited by dantrolene (RyRs antagonist). Maybe the  $\text{Ca}^{2+}$  originated from internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores regulated by RyRs has the same role of external  $\text{Ca}^{2+}$ , that is, to stimulate a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent dephosphorylation event coupled to GFAP mediated by calcineurin, because using an intracellular calcium chelator, BAPTA-AM, after the mobilization of this internal stores, the caffeine effect does not occur.

The participation of adenosine receptors (AdoRs) and of cyclic AMP (cAMP) still remain unknown. However, it is known that in immature rats mGluRs increase cAMP formation potentiating the effect of other receptors, as AdoRs and probably this is mediated by mGluRs II (Schoepp and Johnson, 1993; Winder and Conn, 1996). In this work we showed the possible involvement of these signal transduction mechanisms in the modulation of GFAP phosphorylation, since adenosine deaminase and forskolin changed the level of GFAP phosphorylation.

These results evidence the involvement of internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores regulated by RyRs in the mechanism that modulate the GFAP phosphorylation state via mGluRs activation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1:	Representação esquemática de um sistema fosforilante.....	17
Figura 1. 2:	Ilustração esquemática da estrutura de um filamento de GFAP.....	25
Figura 3. 1:	Autorradiografias representativas do efeito da cafeína (1 mM e 10 mM) sobre a estimulação do 1S,3R-ACPD (100 µM) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	40
Figura 3. 2:	Efeito da cafeína em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 µM em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle Ca <sup>2+</sup> 1 mM (100%).....	40
Figura 3. 3:	Autorradiografias representativas do efeito da rianodina (10 nM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM) sobre a estimulação do 1S,3R-ACPD (100 µM) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	44
Figura 3. 4:	Efeito da rianodina em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 µM em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle Ca <sup>2+</sup> 1 mM (100%).....	44
Figura 3. 5:	Autorradiografias representativas do efeito do dantrolene (50 µM) sobre a ação da cafeína (10 mM) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD (100 µM) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	45
Figura 3. 6:	Efeito do dantrolene 50 µM sobre a ação da cafeína 10mM na estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 µM em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle Ca <sup>2+</sup> 1 mM (100%).....	45

Figura 3. 7:	Autorradiografias representativas do efeito da tapsigargina (1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) sobre a estimulação do 1S,3R-ACPD (100 $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	46
Figura 3. 8:	Efeito da tapsigargina em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle $Ca^{2+}$ 1 mM (100%).....	46
Figura 3. 9:	Autorradiografias representativas do efeito da cafeína (10 mM) sobre a estimulação causada pelo 1S,3R-ACPD (100 $\mu$ M) e pelo EGTA (1 mM) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	49
Figura 3. 10:	Efeito da cafeína 10 mM sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M e pelo EGTA 1 mM em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado aos respectivos controles 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M e EGTA 1 mM =100%.....	49
Figura 3. 11:	Autorradiografias representativas do efeito do Bay K 8644 (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 300 $\mu$ M) sobre a estimulação causada pelo 1S,3R-ACPD (100 $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	50
Figura 3. 12:	Efeito do Bay K 8644 em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle $Ca^{2+}$ 1 mM (100%).....	50
Figura 3. 13:	Autorradiografias representativas do efeito do BAPTA-AM (BAP) (5 $\mu$ M e 50 $\mu$ M) sobre a ação da cafeína (10 mM) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD (100 $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	53

Figura 3. 14:	Efeito do BAPTA-AM sobre a ação da cafeína 10 mM na estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle $Ca^{2+}$ 1 mM (100%).....	53
Figura 3. 15:	Autorradiografias representativas do efeito da adenosina deaminase (1 unidade/mL) sobre a estimulação causada pelo 1S,3R-ACPD (100 $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	56
Figura 3. 16:	Efeito da adenosina deaminase 1 unidade/mL sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle $Ca^{2+}$ 1 mM (100%).....	56
Figura 3. 17:	Autorradiografias representativas do efeito da forskolina (30 $\mu$ M) sobre a ação da cafeína (10 mM) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD (100 $\mu$ M) sobre a fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens.....	57
Figura 3. 18:	Efeito da forskolina 30 $\mu$ M sobre os efeitos da cafeína 10 mM e do 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M sobre a fosforilação da GFAP em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado ao controle $Ca^{2+}$ 1 mM (100%).....	57
Figura 4. 1:	Mecanismos de ação da cafeína. A cafeína atua, em ordem crescente de concentração, antagonizando receptores adenosina, inibindo fosfodiesterases e mobilizando cálcio intracelular.....	61

## *LISTA DE TABELAS*

Tabela 1. 1 : Moduladores das reservas intracelulares de Ca <sup>2+</sup> .....	15
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

1S,3R-ACPD	ácido (1S,3R)-1- aminociclopentano-1,3-dicarboxílico
ADA	adenosina deaminase
AdoR	receptor adenosina
ADP	adenosina difosfato
AMP <sub>c</sub>	adenosina monofosfato cíclico
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxazol-4-propiónico
L-AP4	ácido 2-amino-4-fosfonobutírico
ATP	adenosina trifosfato
BAP	BAPTA-AM
BAPTA-AM	ácido tetracético 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano - éster acetoximetil
BayK	Bay K 8644
Bay K 8644	metil-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3-nitro-4(2-trifluorometil-fenil)-piridina-5-carboxilato
BHQ	2,5-Di(terc-butil)-1,4-benzohidroquinona
Ca <sup>2+</sup>	íon cálcio
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
Caf	cafeína
L-CCG I	2-carboxiciclopropil-glicina
quinase cdc 2	proteína quinase dependente de ciclina
CICR	liberação de Ca <sup>2+</sup> induzida por Ca <sup>2+</sup>
CK	caseína quinase
DAG	diacilglicerol
Dan	dantrolene
DARPP-32	fosfoproteína de 32 KDa regulada por dopamina e AMP <sub>c</sub>

DCG IV	2-(2,3-dicarboxiciclopropil)-glicina
DHPG	3,5-dihidroxifenilglicina
EGTA	ácido etilenoglicol tetracético
FI	filamento intermediário
Fk	forscolina
GABA	ácido $\gamma$ aminobutírico
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GluR	receptor glutamatérgico
iGluR	receptor glutamatérgico ionotrópico
mGluR	receptor glutamatérgico metabotrópico
GMP <sub>c</sub>	guanosina monofosfato cíclico
GTP	guanosina trifosfato
HEPES	ácido etanosulfônico-2-hidroxi-etil-piperazina
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	ácido fosfórico
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R	receptor de IP <sub>3</sub>
IP <sub>4</sub>	inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato
K <sup>+</sup>	íon potássio
KA	cainato
KCl	cloreto de potássio
LTD	depressão de longa duração
LTP	potenciação de longa duração
MAP1	proteína associada a microtúbulo tipo 1
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
Mg <sup>2+</sup>	íon magnésio
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnésio
Na <sup>+</sup>	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio

NaOH	hidróxido de sódio
NEPHGE	eletroforese em gradiente de pH não-equilibrado
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDA NR1	subunidade NR1 do receptor N-metil-D-aspartato
NMDA NR2	subunidade NR2 do receptor N-metil-D-aspartato
NMDA NR3	subunidade NR3 do receptor N-metil-D-aspartato
<sup>32</sup> P	rádio-isótopo 32 de fósforo
Pi	fosfatidil inositol
PIP <sub>2</sub>	fosfatidil inositol-4,5-difosfato
PKA	proteína quinase dependente de AMP <sub>c</sub>
PKC	proteína quinase dependente de Ca <sup>+2</sup> e fosfolipídios
PKCaM	proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina
PKG	proteína quinase dependente de GMP <sub>c</sub>
PP1	proteína fosfatase do tipo 1
PP2A	proteína fosfatase do tipo 2A
PP2B	proteína fosfatase do tipo 2B
PP2C	proteína fosfatase do tipo 2C
PP3	proteína fosfatase tipo 3
PP4	proteína fosfatase tipo 4
RE	retículo endoplasmático
Rya	rianodina
RyR	receptor rianodina
bRyR	receptor rianodina tipo cerebral
cRyR	receptor rianodina tipo cardíaco
sRyR	receptor rianodina tipo muscular esquelético
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Ser	serina

SERCA	bomba $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica dos retículos sarcoplasmático e endoplasmático
SNC	sistema nervoso central
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	tetrametil etileno diamina
Tg	tapsigargina
Thr	treonina

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Astrócitos

Rudolph Virchow foi quem descreveu pela primeira vez, em 1846, a neuroglia (“nerve glue”) como um tecido funcional, anatomicamente distinto do neuronal e conectivo do sistema nervoso central (SNC) (Jacobson, 1991). Já em 1895, Mihály Lenhssék propôs designar as células da neuroglia de astrócitos. No início deste século, Santiago Ramón Y Cajal aprofundou os estudos da neuroglia, descrevendo claramente dois tipos de astrócitos: os protoplasmáticos, na substância cinzenta (freqüentemente ramificados e com largas expansões) e os fibrosos, na substância branca (com menos ramificações, cilíndricas e longas). Adicionalmente, Cajal atribuiu funções para estas células: nutrição, isolamento e suporte estrutural de neurônios. A última grande descoberta sobre a glia foi realizada por Pío del Río-Hortega, entre 1919 e 1921, o qual caracterizou dois outros tipos de neuroglia: a oligodendroglia e a microglia (Young, 1991; Tower, 1992).

Desta forma, hoje reconhece-se no SNC três grandes grupos de células gliais: (1) astrócitos e oligodendrócitos, ambos de origem ectodérmica, que formam a macroglia; (2) a microglia, de origem mesodérmica; (3) células ependimais, de origem ectodérmica (Raine, 1993).

Os astrócitos constituem aproximadamente 50% do número total de células do SNC (Pope, 1978). Eles se associam, através de seus processos, a diversos componentes celulares, entre estes o endotélio capilar e os neurônios. Nestes últimos os astrócitos estão intimamente associados com os corpos celulares, dendritos e até mesmo com a própria sinapse (Kimelberg & Norenberg, 1989). É sabido que astrócitos e neurônios apresentam um sofisticado sistema de comunicação recíproca que pode regular a liberação de

neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Carmignoto, 2000).

As funções desempenhadas pelos astrócitos no SNC são diversas, tais como: (1) manutenção da homeostase de íons extracelulares, especialmente o  $K^+$  (Walz, 1989); (2) metabolismo de neurotransmissores, particularmente o glutamato e o GABA (Hansson & Rönnbäck, 1995); (3) atuam como guias na migração de neurônios nos estágios iniciais do desenvolvimento (McKay, 1989); (4) síntese e liberação de fatores tróficos e substâncias neuroativas para os neurônios e para outros astrócitos (Stockli *et al.*, 1989; Hansson & Rönnbäck, 1995); (5) estoque de glicogênio para reserva de energia (Magistretti *et al.*, 1986); (6) participação na resposta imune no cérebro (Giulian *et al.*, 1988); (7) participação na resposta a injúrias ao SNC, tornando-se reativos (processo denominado de gliose reativa), o que é caracterizado por um severo aumento na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uma proteína de citoesqueleto que é marcadora de células astrocíticas (Eng *et al.*, 1992; Giulian, 1993; Eng & Ghirnikar, 1994); (8) regulação do espaço extracelular através da variação do volume astrocítico (Kimelberg *et al.*, 1992; Hansson & Rönnbäck, 1995).

Os astrócitos têm a capacidade de realizar muitas destas funções pois possuem um variado arranjo de canais iônicos e receptores para neurotransmissores e a ativação de muitos destes pode estimular sistemas de segundos mensageiros (Kimelberg, 1988).

## **1.2. Glutamato e Seus Receptores**

O glutamato é reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório do SNC e exerce um importante papel na plasticidade neural e neurotoxicidade (Nakanishi, 1992). Muitas das ações deste neurotransmissor são mediadas por receptores glutamatérgicos, os quais podem ser ionotrópicos

ou metabotrópicos. Esta classificação é baseada nas diferenças em relação à estrutura molecular, aos mecanismos de transdução de sinal e às propriedades farmacológicas destes receptores. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) estão associados a canais iônicos e quando estimulados são permeáveis a cátions, como o cálcio e o sódio (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Schoepp *et al.*, 1995). Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são funcionalmente e farmacologicamente diferentes dos iGluRs. Eles estão acoplados à proteína G e podem evocar uma variedade de sinais intracelulares (Hansson & Rönnbäck, 1995; Pin & Duvoisin, 1995; Porter & McCarthy, 1995).

Atualmente sabe-se que o glutamato e seus receptores estão envolvidos em uma variedade de processos durante o desenvolvimento das células neurais, incluindo proliferação, migração e plasticidade sináptica (McDonald & Johnston, 1990), bem como a modulação de mecanismos de aprendizado e memória (Bianchin *et al.*, 1994; Izquierdo, 1994; Izquierdo & Medina, 1997) e até no envelhecimento (Segovia *et al.*, 2001). Durante o desenvolvimento do SNC, o glutamato pode ser liberado por cones de crescimento e axônios e influenciar a proliferação e/ou a migração de células gliais (Rakic & Komuro, 1995).

Em astrócitos, entretanto, o glutamato pode também exercer alguns efeitos não mediados por receptor. Estes são causados pela sua captação e incluem aumento de volume destas células (Shao *et al.*, 1994). Desta forma, a captação de glutamato é um evento muito importante, pois além de promover alguns dos efeitos deste neurotransmissor, o remove rapidamente da fenda sináptica, impedindo que ocorra dano e morte neuronal através da excessiva ativação de seus receptores (Choi *et al.*, 1987; Meldrum, 2000).

### 1.2.1. Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos

Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com critérios moleculares, eletrofisiológicos e farmacológicos; e são denominados segundo o

agonista com o qual eles são seletivamente ativados: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA). (Hollmann & Heinemann, 1994). AMPA e KA são freqüentemente chamados de receptores não-NMDA. Os três tipos de iGluRs geralmente coexistem em uma única sinapse no SNC, estando envolvidos na ampliação do sinal glutamatérgico (Cotman *et al.*, 1995; Ozawa *et al.*, 1998).

#### 1.2.1.1. Receptores NMDA

Os receptores NMDA são altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , dependentes de voltagem e possuem como co-agonistas glicina e D-serina (Collingridge & Watkins, 1994). Estes receptores parecem ter um papel central na potenciação de longa duração (LTP), na depressão de longa duração (LTD) e em eventos de plasticidade do SNC. Quando superativados, parecem causar danos via excitotoxicidade (Cotman *et al.*, 1995; Gottlieb & Matute, 1997). Em potenciais de repouso os canais NMDA neuronais estão normalmente bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$  e a liberação do canal depende da despolarização da membrana. O nível de corrente que promove a despolarização depende da ativação de receptores AMPA e KA e de outros sinais modulatórios pós-sinápticos que possam controlar a despolarização. A modulação específica da atividade dos canais NMDA é necessária para uma função neural normal. Os subtipos de receptores NMDA apresentam três famílias de subunidades, as quais possuem formas variantes: NMDA NR1, NMDA NR2 e NMDA NR3 (Ozawa *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998).

A expressão das diferentes subunidades do receptor NMDA varia muito no SNC sendo o hipocampo e o córtex cerebral estruturas particularmente ricas neste tipo de receptor (Watkins *et al.*, 1990). É bem caracterizado que nas células neuronais os receptores NMDA estão presentes e são funcionais. A expressão e a funcionalidade destes receptores em células gliais ainda permanecem obscuras, entretanto, atualmente inúmeros trabalhos têm

demonstrado a expressão de receptores NMDA em astrócitos corticais, principalmente em seus processos (Conti *et al.*, 1996; 1997; 1999). Além disso, após um evento isquêmico, astrócitos hipocâmpais expressam as subunidades NMDA NR2A/B (Gottlieb & Matute, 1997).

#### 1.2.1.2. *Receptores não-NMDA (AMPA e KA)*

Tanto AMPA quanto KA estão associados primariamente a canais independentes de voltagem. São permeáveis a sódio e potássio, mas algumas subunidades têm permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Cotman *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1996; 1997). Estes receptores são estimulados pelo efeito excitatório rápido do glutamato. Isto causa despolarização pela abertura de canais de membrana, permeáveis aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , propiciando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais dependentes de voltagem. Este é o caso, por exemplo, da despolarização mediada por AMPA estimulando receptores NMDA pelo deslocamento do  $\text{Mg}^{2+}$ .

Os receptores AMPA e KA possuem múltiplas subunidades: GluR1-GluR4 e GluR5-GluR7/KA1-KA2, respectivamente. Ambos estão distribuídos em todo o SNC, entretanto, a expressão de suas subunidades é muito heterogênea entre diferentes estruturas e tipos celulares. A distribuição de receptores AMPA acompanha àquela apresentada pelos receptores NMDA. Por outro lado, os receptores KA estão mais concentrados em poucas áreas do SNC: região CA3 do hipocampo, estriato e tálamo (Cotman *et al.*, 1995).

No geral, a expressão de iGluRs em células gliais apresenta um aumento após insultos isquêmicos, principalmente nas diferentes regiões do hipocampo (Gottlieb & Matute, 1997).

#### 1.2.2. Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos

Os mGluRs constituem uma classe de receptores ligados a proteínas G, os quais diferem estrutural, funcional e farmacologicamente dos iGluRs

(Schoepp & Conn, 1993; Pin & Duvoisin, 1995). Até o momento, oito subtipos de mGluRs foram clonados e caracterizados. Estes receptores podem ser classificados em três grupos, onde os membros de cada grupo possuem grande homologia entre si (~ 70%) e similaridades farmacológicas (Pin & Duvoisin, 1995; Conn & Pin, 1997).

O Grupo I compreende os subtipos mGluR1 (Masu *et al.*, 1991; Houamed *et al.*, 1991) e mGluR5 (Abe *et al.*, 1992), os quais estão acoplados à hidrólise de fosfoinositídeos de membrana e são potentemente ativados por quisqualato, mas também são sensíveis ao ácido (1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico (1S,3R-ACPD). Atualmente, o agonista 3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) é descrito como altamente seletivo para receptores do Grupo I (Ozawa *et al.*, 1998).

O Grupo II inclui os subtipos mGluR2 e mGluR3 (Tanabe *et al.*, 1992), que são ligados à formação de AMP cíclico (AMP<sub>c</sub>) e são potencialmente estimulados por 1S,3R-ACPD, por (2S,3S,4S)- $\alpha$ -(carboxiciclopropil)-glicina (L-CCG I) e por DCG IV (Schoepp, 1994; Bruno *et al.*, 1996; Ozawa *et al.*, 1998).

O Grupo III compreende os subtipos mGluR4 (Tanabe *et al.*, 1993), mGluR6 (Nakajima *et al.*, 1993), mGluR7 (Okamoto *et al.*, 1994; Saugstad *et al.*, 1994) e mGluR8 (Duvoisin *et al.*, 1995). Os receptores do Grupo III, assim como os do Grupo II, estão ligados à modulação da enzima adenilato ciclase e à consequente síntese de AMP<sub>c</sub>. São seletivamente ativados pelo ácido L-2-amino-4-fosfanobutírico (L-AP4) (Schoepp, 1994; Ozawa *et al.*, 1998).

São muitos os agonistas que agem nos receptores glutamatérgicos. O 1S,3R-ACPD foi o primeiro a ser identificado como agonista seletivo de receptores metabotrópicos, sendo então de grande importância para o estudo deste tipo de receptores glutamatérgicos.

A distribuição dos diferentes subtipos de mGluRs no SNC é bastante irregular, apresentando grandes variações em relação a diferentes estruturas,

tipos celulares e estágios de desenvolvimento (Vecil *et al.*, 1992; Schoepp, 1994).

Muitos dos receptores metabotrópicos de Grupo I, basicamente o subtipo mGluR5, estão presentes na membrana pré-sináptica e apresentam, curiosamente, envolvimento tanto em eventos de neurotoxicidade quanto em eventos de neuroproteção (Nicoletti *et al.*, 1999). O subtipo mGluR1 tem significativa expressão em células granulares do giro denteado e em células piramidais da região CA3 do hipocampo; células de Purkinje do cerebelo, células do bulbo olfatório e neurônios do tálamo e septo lateral. O receptor parece estar localizado pós-sinápticamente e não foi demonstrado em glia (Cotman *et al.*, 1995). O subtipo mGluR5 é expresso no córtex cerebelar, no hipocampo, no subiculum, no septo lateral, no bulbo olfatório, no núcleo olfatório anterior, no estriato, no caudato e no córtex. Sua presença pré-sináptica nos axônios terminais indica que os mGluR5 podem exercer funções como receptores pré-sinápticos (Romano *et al.*, 1995).

Os receptores metabotrópicos do Grupo II apresentam grande homologia (~ 70%) quanto a sua expressão. O subtipo mGluR2 é encontrado tanto pré como pós-sinápticamente em cérebro de ratos (Neki *et al.*, 1996). Possui proeminente expressão no córtex cerebelar, no acessório do bulbo olfatório, nos neurônios piramidais do córtex entorrinal e no giro denteado (Ohishi *et al.*, 1994). Sua expressão em células gliais do SNC não foi demonstrada (Cotman *et al.*, 1995). O subtipo mGluR3 é expresso nos neurônios do córtex cerebelar, no núcleo reticular talâmico, no caudato, no núcleo supraóptico e nas células granulares do giro denteado. O mGluR3 é expresso em células gliais (Tanabe *et al.*, 1992, 1993; Cotman *et al.*, 1995).

Os receptores metabotrópicos do Grupo III têm ampla distribuição, assim como os receptores dos demais grupos. O mGluR4 é expresso nas células granulares do cerebelo, nos neurônios da lâmina granular interna do bulbo olfatório, no tálamo, no septo lateral, no córtex entorrinal, no giro

denteado e na região CA3 do hipocampo (Cotman *et al.*, 1995). O mGluR6 é expresso principalmente na retina (Nakajima *et al.*, 1993), enquanto que o subtipo mGluR8 é expresso na retina e no bulbo olfatório (Duvoisin *et al.*, 1995).

### 1.3. Cálcio e Reservas Intracelulares

O íon cálcio é um segundo mensageiro que tem papel fundamental na regulação de vários processos biológicos. Um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático representa um passo crucial para a liberação de neurotransmissores e para a modulação da excitabilidade de membranas celulares. Esses processos dependem basicamente da passagem de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais presentes na membrana plasmática, do seu transporte por bombas iônicas ou da sua liberação a partir das reservas intracelulares (Prado, 2001).

Embora o  $\text{Ca}^{2+}$  seja fundamental à manutenção da vida, um aumento prolongado na concentração deste íon pode levar a célula à morte. Ao contrário das outras moléculas de segundos mensageiros, o  $\text{Ca}^{2+}$  não pode ser metabolizado. Desta forma, os níveis de cálcio dentro da célula são regulados por proteínas ligadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  e por bombas que transportam ativamente este íon, tanto para as reservas intracelulares (as SERCAs - "sarcoplasmic-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases"), quanto para o espaço extracelular (as bombas trocadoras  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ).

As proteínas ligadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  são normalmente divididas em proteínas gatilho ("trigger") e proteínas tamponantes. As proteínas gatilho mudam sua conformação quando há ligação com o  $\text{Ca}^{2+}$ , passando a modular moléculas efetoras tais como enzimas e canais iônicos. Como exemplo, temos a calmodulina, que ligada ao  $\text{Ca}^{2+}$  torna-se um importante modulador de proteínas quinases e outras enzimas. As proteínas tamponantes, por exemplo a

parvalbumina, podem simplesmente ligar  $\text{Ca}^{2+}$  quando sua concentração estiver aumentada dentro da célula ou de uma organela (Clapham, 1995).

Embora as proteínas ligadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  auxiliem na homeostase deste íon, elas sozinhas não podem controlar todas as fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  que circundam a célula. A acentuada diferença entre a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\sim 50 - 100 \mu\text{M}$ ) e a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $\sim 1 \text{ mM}$ ) exige um eficiente sistema de bombas a fim de que este gradiente seja mantido. As SERCAs permitem a rápida captação de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático às custas de 1 a 2 ATPs por íon transportado e, até o momento, cinco subtipos já foram identificados: SERCA 1a, 1b, 2a, 2b e 3, as quais apresentam diferenças quanto à distribuição e quanto à afinidade por  $\text{Ca}^{2+}$  (Simpson *et al.*, 1995). Da mesma forma, a bomba  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , presente na membrana plasmática, também auxilia na regulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transportando-o ativamente para o espaço extracelular (Clapham, 1995).

As mitocôndrias representam uma reserva adicional de  $\text{Ca}^{2+}$ , acumulando este íon em níveis superiores a  $0,5 \text{ mM}$  na matriz mitocondrial. Embora os transportadores mitocondriais de  $\text{Ca}^{2+}$  apresentem menor afinidade por este íon do que as SERCAs, eles também desempenham importante papel na regulação quando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico superam  $0,5 \text{ mM}$  (Pozzan *et al.*, 1994). Em condições patológicas, as mitocôndrias são capazes de absorver grandes quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rizuto *et al.*, 1993). Da mesma forma, em eventos como isquemia ou anóxia, os astrócitos são capazes de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  a partir da reserva mitocondrial (Carmignoto, 2000).

O processo de aumento nos níveis do íon cálcio ocorre via canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais estão subdivididos em cinco subtipos: dependentes de voltagem, operados por receptor, operados pela proteína G, operados por segundos mensageiros e ativados pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Récasens & Vignes, 1994).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem são capazes de aumentar muito os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e são essenciais para muitas funções celulares, tais como contração muscular, propagação de potenciais de ação, manutenção da atividade elétrica e regulação de neurotransmissores (Hui, 1991). A despolarização da membrana plasmática desencadeia uma mudança conformacional na região da molécula sensível à voltagem, promovendo um fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana plasmática. Estes canais apresentam uma atividade auto-limitante que comanda o fechamento do canal. Até o momento, cinco tipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem foram descritos: tipo -L, -N, -P, -Q e -T (Récasens & Vignes, 1994). Estes tipos diferem entre si em suas respostas a neuromoduladores, na distribuição entre neurônios e células gliais e também quanto à sublocalização dentro de uma mesma célula (Clapham, 1995).

Os astrócitos apresentam uma extraordinária variabilidade em relação à expressão de moléculas responsáveis pela distribuição de íons cálcio no citoplasma. Embora eles não sejam capazes de gerar potenciais de ação, os astrócitos podem expressar em suas membranas canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, bem como canais operados por ligantes (receptores AMPA e purinérgicos), os quais, em conjunto com receptores metabotrópicos controlam a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir das reservas intracelulares (Carmignoto, 2000). Trabalhos recentes mostram que o aumento substancial na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em astrócitos é decorrente da ativação de receptores metabotrópicos por glutamato e/ou por outros neurotransmissores liberados de terminais sinápticos despolarizados, e a subsequente liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares (Pasti *et al.*, 1997; Carmignoto *et al.*, 1998; Carmignoto, 2000).

Sinais intercelulares de cálcio têm sido identificados em uma variedade de células em cultura. No SNC, ondas de cálcio têm sido observadas principalmente entre neurônios (Yuste *et al.*, 1995) e entre as células gliais,

incluindo os astrócitos (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991). Acredita-se que estes sinais intercelulares contribuam para as interações neuro-gliais (Attwell, 1994). Em astrócitos, as ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  e as oscilações na concentração intracelular deste íon representam uma forma glial de excitabilidade, a qual permite que estas células integrem sinais extracelulares, comuniquem-se mutuamente e troquem informações com neurônios (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Smith, 1994; Carmignoto, 2000). Em cultura de células astrocíticas de rato observou-se que a propagação das ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  envolve uma sequência de passos intracelulares bem como de passos intercelulares, nos quais a fosfolipase C, o inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), as reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  e as junções “gap” exercem um papel fundamental (Venance *et al.*, 1997).

Os astrócitos possuem uma grande sensibilidade à liberação neuronal de glutamato, a qual desencadeia sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  nestas células permitindo que haja um sistema de comunicação bidirecional entre neurônios e astrócitos, o que garante a perfeita coordenação das funções cerebrais (Carmignoto, 2000). Desta forma, o glutamato liberado pelos terminais sinápticos pode modular, direta ou indiretamente, a maioria dos canais de cálcio e sua ação ocorre via receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs).

Os receptores NMDA (iGluRs) constituem uma família de receptores altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Os receptores não-NMDA, compostos pela família AMPA e KA também são receptores ligados a canais iônicos; no entanto, não são altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  como os receptores NMDA. A ativação dos receptores não-NMDA produz despolarização, a qual promove a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, como é o caso da despolarização mediada por AMPA estimulando receptores NMDA. Por outro lado, a ativação de mGluRs estimula a produção de segundos mensageiros e/ou a regulação da função de canais iônicos (Récasens & Vignes, 1994). Alguns agonistas de mGluRs mostraram-se capazes de inibir canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem em cultura de neurônios de hipocampo, bulbo

olfatório e cerebelo (Baskys, 1992; Pin & Duvoisin, 1995; Tyler & Lovinger, 1995).

O aumento na concentração interna de cálcio envolve a mobilização das reservas internas, como as associadas ao retículo endoplasmático (RE) e as mitocondriais, e/ou do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (espaço extracelular). As reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  associadas ao RE estão descritas a seguir.

### 1.3.1. Reservas Intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ Reguladas por Receptores de Inositol Trifosfato

No evento de transdução de sinal envolvendo o  $\text{Ca}^{2+}$ , um primeiro mensageiro liga-se ao receptor na membrana plasmática e este, por sua vez, estimula a fosfolipase C a converter fosfolipídios de membrana ( $\text{PIP}_2$ ) em inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG) (Berridge & Irvine, 1989). O  $\text{IP}_3$  atua como segundo mensageiro ligando-se ao seu receptor no retículo endoplasmático (RE), promovendo a liberação do íon cálcio das reservas intracelulares associadas a receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ).

Os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  são constituídos por monômeros protéicos com peso molecular entre 305 e 313 kDa que se arranjam de uma maneira homotetramérica, formando um canal central permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana do RE. Até o momento, três subtipos de  $\text{IP}_3\text{R}$  foram caracterizados, os quais diferem quanto à expressão, à distribuição regional e à sensibilidade ao  $\text{IP}_3$ . O  $\text{IP}_3\text{R}$  tipo-1 é o subtipo predominante no SNC, sendo amplamente expresso. Os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  tipo-2 e tipo-3 também estão presentes no cérebro, entretanto, possuem uma distribuição mais discreta e um nível de expressão muito menor do que o  $\text{IP}_3\text{R}$  tipo-1 (Simpson *et al.*, 1995).

A atividade dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$  é controlada pela concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, sendo este mecanismo importantíssimo no controle da homeostase deste íon. Entretanto, a modulação da função destes receptores pelo  $\text{Ca}^{2+}$  no cérebro é complicada pelo fato de aí existir a calmedina - uma

proteína que inibe, de uma maneira dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a ligação do  $\text{IP}_3$  ao seu receptor. Outros moduladores endógenos que regulam a função dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$  incluem: proteínas quinases dependentes de  $\text{AMP}_c$  (PKA), de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolipídios (PKC) e de  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina (PKCaM II); a calpaína - uma protease ativada por  $\text{Ca}^{2+}$ ; e o ATP (Simpson *et al.*, 1995). Os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  também possuem alguns agentes experimentais que modulam sua atividade, os quais estão citados na Tabela 1. 1.

### 1.3.2. Reservas Intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ Reguladas por Receptores Rianodina

Muitos tipos de células possuem um segundo mecanismo pelo qual o íon cálcio pode ser liberado a partir das reservas intracelulares. Juntamente com  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , muitas células expressam diferentes subtipos de uma família de receptores, os quais são complexos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  que se relacionam estruturalmente aos  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , mas são muito diferentes quanto ao mecanismo de ação. Estes receptores são caracterizados por sua habilidade de ligação à rianodina - um alcalóide de planta - sendo por isso chamados de receptores rianodina (RyRs) (Simpson *et al.*, 1995).

Os RyRs são formados por monômeros protéicos de alto peso molecular (550 - 565 kDa) que se associam formando um complexo tetramérico funcional. Estes receptores foram identificados inicialmente no retículo sarcoplasmático de músculos esqueléticos e cardíacos, estando envolvidos na regulação da contração das fibras musculares (Sorrentino & Volpe, 1993). Até o momento, foram identificados três subtipos de RyRs: tipo-1 ou tipo muscular esquelético (RyR1 ou sRyR); tipo-2 ou tipo cardíaco (RyR2 ou cRyR); e tipo-3 ou tipo cerebral (RyR3 ou bRyR). Estes subtipos possuem uma terminologia que os relaciona a sua expressão original, mas são estruturalmente semelhantes, apresentando diferenças nas propriedades funcionais, nos mecanismos de regulação e na distribuição regional (Mori *et al.*, 2000).

O subtipo RyR1 é encontrado no retículo sarcoplasmático em íntima associação com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, presentes na membrana plasmática. Esta associação produz uma despolarização que diretamente permite a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do retículo. Os subtipos RyR2 e RyR3 são ativados por acúmulo local de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo um aumento na concentração intracelular deste íon em resposta ao seu acúmulo (liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  - CICR) (Simpson *et al.*, 1995).

No SNC, a distribuição regional dos diferentes subtipos de RyRs é bastante irregular e apresenta muitas variações ao longo do desenvolvimento deste sistema. O subtipo RyR1 é primeiramente encontrado no córtex cerebral e no bulbo olfatório e entre o primeiro e o sétimo dia pós-natal (P1-P7) começa a ser expresso na região CA1 do hipocampo. Entretanto, durante a fase adulta este subtipo de receptor é encontrado somente no giro dentado do hipocampo e na camada das células de Purkinje do cerebelo. O subtipo RyR2 possui uma expressão mais ampla, sendo encontrado em várias regiões cerebrais desde a fase embrionária até o estágio adulto. As regiões cerebrais que expressam este subtipo de receptor são: a camada granular olfatória, o córtex cerebral, o hipocampo e a camada granular cerebelar. O subtipo RyR3 é encontrado por todo o cérebro durante a fase embrionária e, após este período, é fortemente expresso no hipocampo, no córtex cerebral e no bulbo olfatório. No estágio adulto, este subtipo de receptor tem proeminente expressão na região CA1 do hipocampo (Mori *et al.*, 2000).

A atividade dos RyRs é regulada por moduladores endógenos e por agentes experimentais. Entre os moduladores endógenos pode-se incluir o  $\text{Mg}^{2+}$ ; nucleotídeos da adenina, tais como o ATP; a calmodulina; várias proteínas quinases; e, principalmente, a ADP-ribose cíclica - um importante ativador endógeno dos RyRs, encontrado em uma ampla variedade de tecidos (Simpson *et al.*, 1995). Entre os agentes experimentais mais utilizados que regulam a atividade dos RyRs pode-se citar: (1) a rianodina - um agente

específico destes receptores que em baixas concentrações (nM) os estimula e em altas concentrações ( $\mu\text{M}$ ) os inibe, modulando, desta maneira, a liberação ou não de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente (Simpson *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 1998); (2) a cafeína - a qual estimula estes receptores somente em altas concentrações (mM), permitindo, desta forma, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas reguladas por estes receptores (Nehlig *et al.*, 1992; Simpson *et al.*, 1995; Fredholm, 1995; Simpson *et al.*, 1998; Daly, 2000); e (3) o dantrolene - o qual age como antagonista dos RyRs, inibindo a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  destas reservas (Simpson *et al.*, 1995; Wei & Perry, 1996) (ver Tabela 1. 1).

Tabela 1. 1: Moduladores das reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$

<b>Sítio de ação</b>	<b>Agonistas</b>	<b>Antagonistas</b>
IP <sub>3</sub> Rs	IP <sub>3</sub> IP <sub>4</sub> e muitos análogos	Heparina Decavanadato Cafeína ?
RyRs	Cafeína Rianodina ( $\downarrow$ concentrações) ADP-ribose cíclica	Rianodina Dantrolene "Ruthenium red" ADP-ribose-8-amino-cíclica (seletivo para RyR2 ?)
SERCAs		Tapsigargina BHQ Ácido Ciclopiazônico

Uma variedade de agentes endógenos e experimentais regulam os mecanismos de captação ou de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares. Os mais importantes destes agentes estão listados na tabela acima. Abreviações: BHQ, 2,5-Di(terc-butil)-1,4-benzohidroquinona; IP<sub>3</sub>Rs, receptores de IP<sub>3</sub>; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; IP<sub>4</sub>, inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato; e RyRs, receptores rianodina (Adaptado de Simpson *et al.*, 1995).

#### 1.4. Fosforilação de Proteínas no SNC

A fosforilação de proteínas é um processo molecular reversível de modulação intracelular e desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo utilizado no processo de transdução de sinal (Hunter, 1995). Comum a todos os organismos eucariontes, o mecanismo de fosforilação protéica envolve pelo menos três elementos: (1) proteína quinase; (2) proteína fosfatase; (3) substrato protéico, o qual tem suas propriedades conformacionais e funcionais alteradas em decorrência de seu estado fosforilado/desfosforilado (Walaas & Greengard, 1991; Rodnight *et al.*, 1997). As proteínas quinases são fosforiltransferases que catalisam a transferência do fosfato  $\gamma$  do ATP ou GTP para o grupo hidroxila de resíduos serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. As proteínas fosfatases são fosforiltransferases que realizam o inverso, ou seja, catalisam a hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico (Nestler & Greengard, 1994) (Figura 1. 1). Então, a fosforilação de uma determinada proteína ocorre em sítios específicos pela ação de uma ou mais quinases e a desfosforilação pela atividade específica de fosfatases. Deste modo, o processo de fosforilação depende de uma ação coordenada de atividades quinásicas e atividades fosfatásicas, ambas sujeitas à regulação por diversos mensageiros celulares (Hubbard & Cohen, 1993; MacKintosh & MacKintosh, 1994; Hunter, 1995).

O sistema nervoso é um tecido muito rico em sistemas fosforilantes e este processo desempenha um papel fundamental nas funções neuronal e glial. Desta forma, uma diversidade de funções pode ser regulada através do processo de fosforilação/desfosforilação de proteínas no SNC, incluindo: expressão de genes, atividade de enzimas, condutância de canais iônicos, atividade de receptores, biossíntese de neurotransmissores, modulação da transmissão sináptica, ancoramento e transporte de vesículas sinápticas, plasticidade das células no SNC e a dinâmica remodelagem da arquitetura citoesquelética das células nervosas (Nixon & Sihag, 1991; Walaas &

Greengard, 1991; Rodnight & Wofchuk, 1992; Nairn & Shenolikar, 1992; Inagaki *et al.*, 1994a; Pasqualotto & Shaw, 1996).

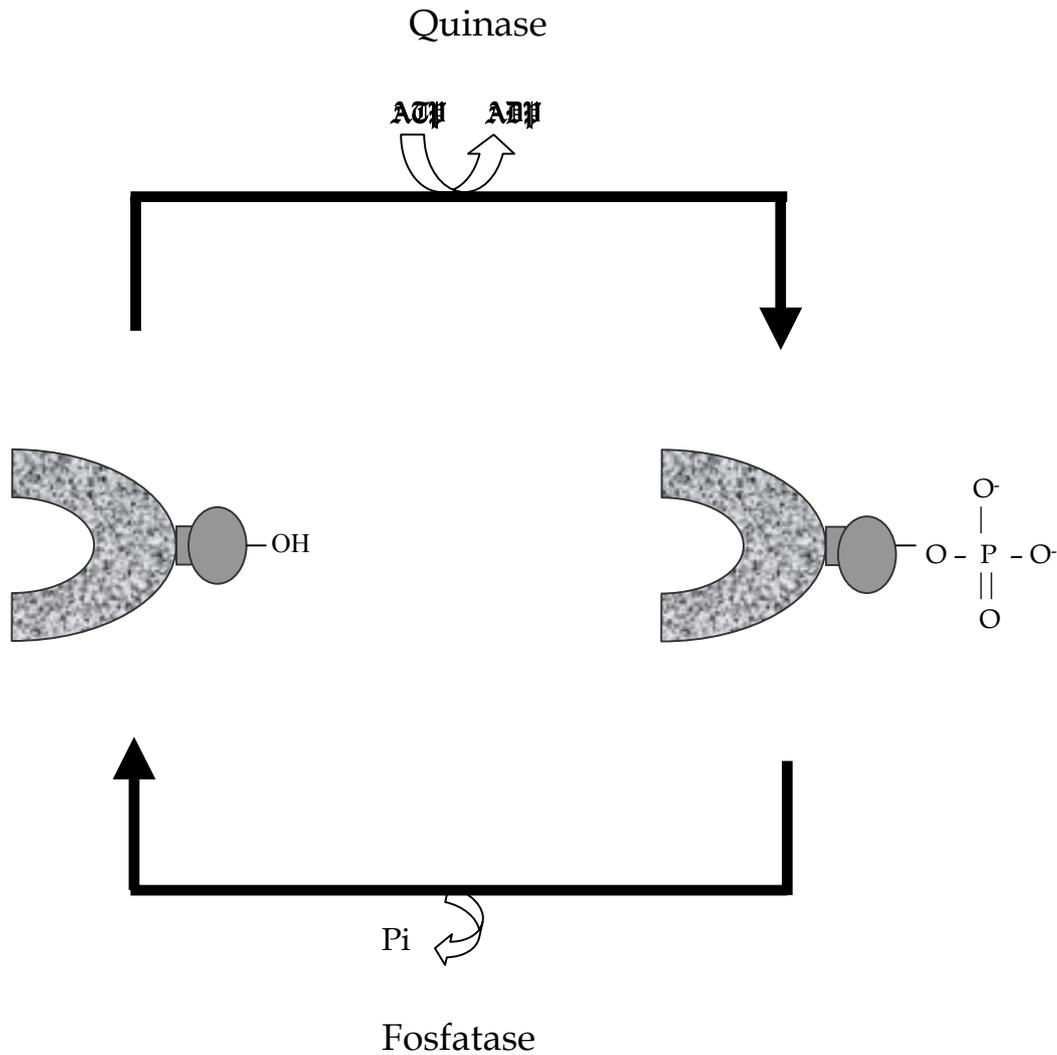


Figura 1. 1: Representação esquemática de um sistema fosforilante. A reação de fosforilação é catalisada por uma quinase que transfere o grupo fosfato de uma molécula de ATP para o grupo hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. A remoção do grupo fosfato é catalisada por uma fosfatase.

A fosforilação protéica também está intimamente envolvida nas várias formas de plasticidade sináptica, exercendo um importante papel no início da LTP e da LTD (Schulman, 1995; Adams *et al.*, 2000) e em eventos de aprendizado e memória (Izquierdo & Medina, 1997; Viola *et al.*, 2000).

#### 1.4.1. Proteínas Quinases

De uma forma geral, três mecanismos fisiológicos clássicos podem ativar as proteínas quinases: produção de segundos mensageiros, autofosforilação enzimática e acoplamento de primeiros mensageiros a complexos receptor-quinase (Walaas & Greengard, 1991).

As quinases podem ser classificadas de acordo com os resíduos de aminoácidos que fosforilam em dois grupos principais: serina/treonina quinases e tirosina quinases. Aproximadamente 95% dos resíduos fosforilados são em serina e de 3 a 4% em treonina, enquanto que apenas 1% das fosfoproteínas no SNC são fosforiladas em resíduos de tirosina (Greengard, 1987; Nestler & Greengard, 1994).

As proteínas serina/treonina quinases são comumente ativadas via sistemas de segundos mensageiros, tais como: AMP<sub>c</sub>, GMP<sub>c</sub>, Ca<sup>2+</sup>, DAG e IP<sub>3</sub>, entre outros. As proteínas tirosina quinases estão normalmente associadas a receptores e são ativadas diretamente pela ligação de primeiros mensageiros. Além destes mecanismos, é sabido também que a grande maioria das quinases apresentam sítios autofosforiláveis que regulam sua atividade (Nestler & Greengard, 1994).

##### 1.4.1.1. *Proteínas Quinases Dependentes de Segundos Mensageiros*

*Proteínas quinases dependentes de AMP<sub>c</sub> (PKA):* Entre as principais funções fisiológicas da PKA pode-se citar a regulação de canais iônicos, a síntese e liberação de neurotransmissores e a reorganização do citoesqueleto (O'Callaghan, 1994). São proteínas encontradas em todas as células

eucarióticas e atuam sobre um grande número de substratos protéicos. No estado inativo a PKA é formada por um complexo protéico de duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias. A ligação de quatro moléculas de AMP<sub>c</sub> às subunidades regulatórias altera a conformação destas, promovendo a liberação das subunidades catalíticas que tornam-se ativas para fosforilar o substrato protéico (Alberts *et al.*, 1994; Nestler & Greengard, 1994).

*Proteínas quinases dependentes de GMP<sub>c</sub> (PKG):* Entre as funções fisiológicas da PKG no SNC destaca-se a sua participação na regulação de canais iônicos. É uma proteína encontrada basicamente no músculo liso de mamíferos (Cohen, 1992) e em cerebelo, principalmente nas células de Purkinje (Schlinchter *et al.*, 1980). É formada por duas subunidades idênticas. O GMP<sub>c</sub> liga-se à subunidade regulatória e os dois domínios inibitórios localizados nesta subunidade são deslocados de modo que a subunidade catalítica possa atuar sobre o substrato. A inativação da PKG ocorre devido à hidrólise do GMP<sub>c</sub> por uma fosfodiesterase.

*Proteínas quinases dependentes de cálcio e calmodulina (PKCaM):* No SNC existem pelo menos 5 tipos de proteínas quinases dependentes de Ca<sup>2+</sup> e calmodulina. A PKCaM tipo II é particularmente abundante e ativa no cérebro e em certas regiões chega a representar 2% da proteína total existente (Bronstein *et al.*, 1993). No SNC esta enzima pode estar presente na forma heteromérica ou homomérica, contendo de 10 a 12 subunidades autofosforiláveis (processo bastante peculiar, envolvido na regulação da atividade da PKCaM II). Cada subunidade possui um domínio catalítico, um domínio regulatório que liga à calmodulina e um domínio de associação (Walaas & Greengard, 1991; Bronstein *et al.*, 1993; Schulman, 1995). A PKCaM II está envolvida, no SNC, na síntese e liberação de neurotransmissores, LTP e reorganização do citoesqueleto (O'Callaghan, 1994).

*Proteínas quinases dependentes de cálcio e fosfolipídios (PKC):* Entre as atribuições fisiológicas da PKC encontram-se a síntese e liberação de neurotransmissores, a regulação de canais iônicos (O'Callaghan, 1994), além do envolvimento nos processos de formação de memória via LTP (Cattabeni, 1997). São proteínas monoméricas e as subespécies exibem um único polipeptídeo com variações sequenciais. Presentes no SNC, assim como nos tecidos periféricos, compreendem uma família de isoformas, as quais apresentam distintas localizações subcelulares e diferentes maneiras de ativação no que se refere à translocação para a membrana e quanto ao requerimento por  $Ca^{2+}$  e diacilglicerol (DAG). No entanto, o mecanismo clássico de ativação consiste no fato de que, na presença de  $Ca^{2+}$ , a PKC transloca-se do citosol para a membrana onde liga-se à fosfatidilserina e ao DAG, provenientes da hidrólise do fosfatidilinositol de membrana. Tais fosfolipídios promovem o deslocamento do domínio inibitório da enzima formando um complexo ativo associado à membrana plasmática (Nishizuka, 1989; Walaas & Greengard, 1991; Inagaki *et al.*, 1994a).

#### 1.4.1.2. *Proteínas Quinases Independentes de Segundos Mensageiros*

O cérebro contém uma variedade de proteínas serina-treonina quinases que não são reguladas diretamente por segundos mensageiros, as quais possuem suas funções fisiológicas e seus mecanismos de ação pouco esclarecidos. Neste grupo de proteínas encontram-se : caseína quinase I e II (CK I e CK II), que promovem a fosforilação da DARPP-32 ("dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 KDa"), MAP1 (proteína associada a microtúbulo tipo 1) e tubulinas (Girault *et al.*, 1989; Serrano *et al.*, 1989); MAPKs ("mitogen activated protein kinases"), que são ativadas por fatores mitogênicos e estão relacionadas com muitos processos de sinalização intracelular; proteínas quinases dependentes de ciclinas, as quais desempenham funções ligadas à regulação do ciclo celular. Em astrócitos a

quinase cdc 2 tem sido referida como proteína quinase dependente de ciclinas (Inagaki *et al.*, 1994a).

#### 1.4.1.3. *Proteínas Tirosina-Quinases*

Esta classe de proteínas quinases está relacionada estritamente com diferenciação celular, basicamente com processos de proliferação e crescimento celular, e possui um papel regulatório relevante no SNC devido ao envolvimento com mecanismos de transdução de sinal (Greengard, 1987; Nestler & Greengard, 1994). A atividade das tirosina-quinases é regulada pela ligação do efetor ao receptor de membrana que promove a autofosforilação dos próprios resíduos de tirosina (Walaas & Greengard, 1991).

#### 1.4.2. Proteínas Fosfatases

Embora os primeiros estudos de fosforilação de proteínas estivessem concentrados nas propriedades das quinases, as proteínas fosfatases são imprescindíveis para a dinâmica de um sistema fosforilante. As proteínas fosfatases promovem a reversibilidade da ação quinásica através da hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico. Seu papel na regulação do estado fosforilado/desfosforilado de proteínas tem sido cada vez mais evidente (Cohen, 1992; Hunter, 1995).

As proteínas fosfatases podem ser de três tipos: ácidas, básicas ou neutras. Os dois primeiros tipos estão presentes em pequenas quantidades no SNC, de modo que não chegam a ter um papel muito significativo. No entanto, as fosfatases neutras apresentam-se em grandes quantidades no SNC e são divididas em duas classes, de acordo com a especificidade pelo substrato: serina/treonina fosfatases (que desfosforilam resíduos de fosfoserina e fosfotreonina) e tirosina fosfatases (que atuam sobre resíduos de fosfotirosina) (Nestler & Greengard, 1994). Um terceiro grupo é constituído de fosfatases que possuem especificidade dupla no que diz respeito aos resíduos

de aminoácidos que desfosforilam, atuando sobre fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina. Estas atualmente encontram-se no grupo das tirosina fosfatases (Jia, 1997). Apesar desta classificação, algumas fosfatases são capazes de atuar sobre outros sítios de modo que ocorre uma certa sobreposição de sítios desfosforiláveis em um mesmo substrato.

No SNC algumas fosfatases têm sua atividade regulada, direta ou indiretamente, por certos segundos mensageiros: AMP<sub>c</sub>, GMP<sub>c</sub> e Ca<sup>2+</sup>. Estes diferentes sistemas regulatórios possuem distintas distribuições celulares e regionais. Certos neurotransmissores, por exemplo, podem produzir alguns de seus efeitos fisiológicos no cérebro regulando os inibidores de algumas proteínas fosfatases em células específicas. As principais proteínas fosfatases que exercem alguma atividade no SNC estão descritas a seguir:

*Proteína fosfatase tipo 1 (PP1):* Apresenta uma ampla variedade de substratos, sendo inibida por três diferentes polipeptídeos que são: inibidor 1, inibidor 2 e a DARPP-32. Estas atividades inibitórias são definidas por reações de fosforilação e desfosforilação (Cohen *et al.*, 1989). A PP1 é formada por uma subunidade catalítica que combina-se com diferentes subunidades regulatórias. Sua atividade muitas vezes se sobrepõe à atividade de outras fosfatases. No SNC, a PP1 é muito abundante e apresenta ampla distribuição e atividade (Sim, 1994).

*Proteína fosfatase tipo 2A (PP2A):* É composta pelas subunidades catalítica, estrutural e regulatória. Esta classe de proteínas fosfatases é inibida por fosforilação via proteína tirosina quinase (Chen *et al.*, 1992).

*Proteína fosfatase tipo 2B (PP2B):* É conhecida também como calcineurina, sendo formada por uma subunidade catalítica e outra regulatória. Esta fosfatase vem sendo alvo de intensas investigações, pois é altamente concentrada no SNC

e requer a ativação por cálcio e calmodulina. Além disso, esta proteína parece mediar eventos que envolvam a elevação da concentração de cálcio intracelular, possuindo, dessa forma, importante papel na neurotoxicidade (Strack *et al.*, 1996). Os substratos mais conhecidos da PP2B são as proteínas reguladoras da atividade de outras fosfatases, como o inibidor 1 e a DARPP-32 (Wera & Hemmings, 1995).

*Proteína fosfatase tipo 2C (PP2C):* É uma proteína fosfatase dependente de  $Mg^{2+}$ , sendo significativamente expressa em hipocampo e cerebelo. Entretanto, existem poucos substratos seletivos descritos desta fosfatase (Abe *et al.*, 1992).

*Proteínas fosfatases tipo 3 (PP3) e tipo 4 (PP4):* Consistem em proteínas integrais de membrana. A PP3 está envolvida com a proliferação celular (Honkanen *et al.*, 1991), enquanto que a PP4 atua provavelmente na divisão celular (Cohen, 1993).

## **1.5. Filamentos Intermediários**

Os filamentos intermediários (FIs), juntamente com os microtúbulos e os microfilamentos, formam o citoesqueleto celular. Todos estes componentes são formados pela polimerização de subunidades protéicas específicas. Os monômeros de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina formam os microtúbulos, os monômeros de actina formam os microfilamentos e uma heterogênea classe de proteínas fibrosas formam os filamentos intermediários (Steinert & Roop, 1988).

Estudos da sequência de aminoácidos mostram que nos FIs a região central (em  $\alpha$ -hélice) é altamente conservada enquanto que as regiões amino-terminal e carboxi-terminal apresentam diferenças que permitem uma subclassificação em seis diferentes tipos: tipo I - queratinas ácidas; tipo II - queratinas neutras e básicas; tipo III - vimentina, desmina e GFAP; tipo IV

- neurofilamentos; tipo V - lamininas nucleares e tipo VI - nestina (Fuchs & Weber, 1994).

A regulação da polimerização/despolimerização dos FIs é realizada pelo estado de fosforilação dos mesmos; isto sugere que a organização intracelular é controlada pela atividade de quinases e fosfatases (Inagaki *et al.*, 1996). Tal processo desempenha um importante papel na reorganização citoesquelética, a qual ocorre durante o desenvolvimento, diferenciação e divisão celular (Vinadé *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* mostraram que a fosforilação das proteínas que compõem um FI resulta em sua despolimerização e a fosforilação das subunidades impede a sua polimerização (Eriksson *et al.*, 1992; Inagaki *et al.*, 1996).

## **1.6. Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)**

A GFAP é uma proteína componente dos FIs, sendo expressa no SNC exclusivamente em astrócitos. Desde sua descoberta por Eng e colaboradores em 1971, um dos mais importantes usos da GFAP tem sido como marcador de células astrocíticas. Desta forma, muitos estudos envolvendo os diferentes subtipos, o desenvolvimento e os processos plásticos dos astrócitos têm como alvo principal a GFAP.

Similar a outras proteínas dos FIs, a GFAP polimeriza e é responsável pela formação dos filamentos astrocíticos de 10 nm. Isto inclui a formação de dímeros paralelos, a partir dos monômeros de GFAP, que por sua vez se associam de forma antiparalela para formar o protofilamento (tetrâmero) (Figura 1. 2).

O peso molecular do monômero de GFAP é de aproximadamente 50kDa em SDS-PAGE e seu ponto isoelétrico é cerca de 6,3 (Gonçalves *et al.*, 1990; Gonçalves & Rodnight, 1992). O monômero de GFAP consiste em um domínio central em  $\alpha$ -hélice, uma cabeça N-terminal e uma cauda C-terminal, ambas

não helicoidais. A região central possui aproximadamente 70% de homologia com a região central das demais proteínas de FI tipo III. A porção N-terminal é altamente carregada e apresenta 5 sítios fosforiláveis. Todos os FIs tipo III apresentam um segmento C-terminal não helicoidal e altamente conservado (Rodnight *et al.*, 1997).

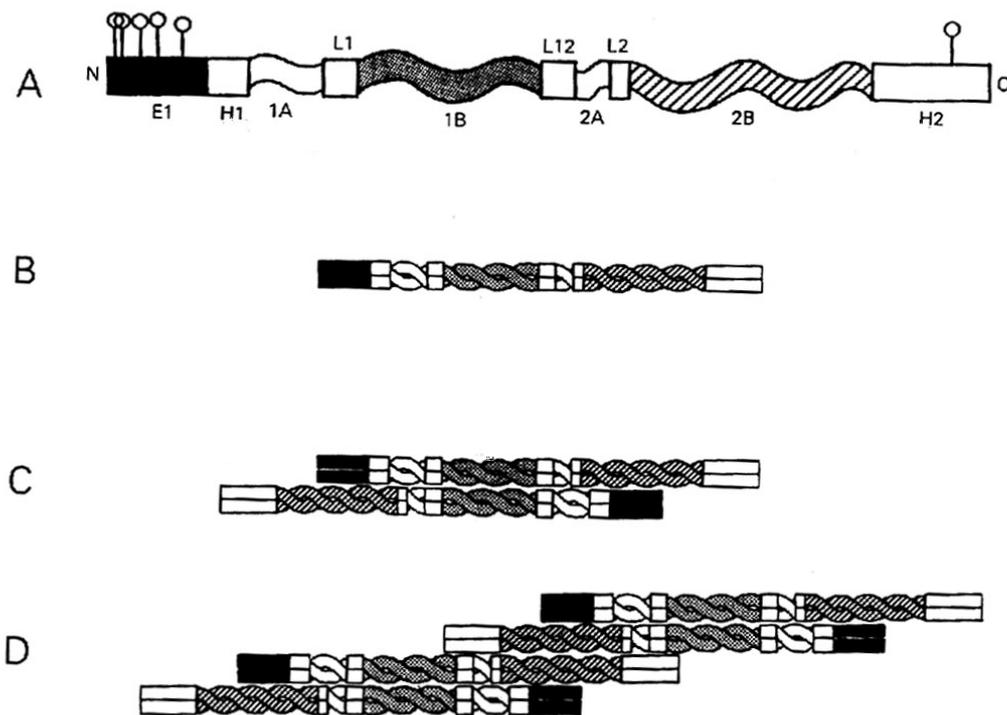


Figura 1. 2: Ilustração esquemática da estrutura de um filamento de GFAP. A) Estrutura do monômero de GFAP de porco, com 5 sítios fosforiláveis na porção N-terminal e um sítio na porção C-terminal. B) Arranjo dos monômeros de GFAP em dímeros paralelos. C) Arranjo de dímeros anti-paralelos em tetrâmero ou protofilamento. D) Estrutura de um octômero. (Adaptado de Rodnight *et al.*, 1997).

A GFAP de rato possui sequência conhecida e apresenta similaridade com a GFAP de porco (Feinstein *et al.*, 1992). Estudos *in vitro* com GFAP de porco demonstraram a presença de seis sítios fosforiláveis, cinco deles na porção N-terminal (Thr7, Ser8, Ser13, Ser17 e Ser34) e um na porção C-terminal (Ser389). As quinases implicadas têm sido indicadas como sendo: a PKA (Thr7, Ser8, Ser13 e Ser34); a PKC (Ser8, Ser13 e Ser34); a CaMK II (Ser13, Ser17, Ser34 e Ser389) e a quinase cdc 2 (Ser8) (Inagaki *et al.*, 1994b; Tsujimura *et al.*, 1994). Os sítios fosforiláveis em GFAP de rato ainda não foram identificados, mas a grande homologia entre os domínios N-terminais de ambas espécies é suficiente para indicar que possivelmente estes sítios também estejam presentes na GFAP de rato e que neles atuem as mesmas quinases indicadas para GFAP de porco (Rodnight *et al.*, 1997).

Quanto à distribuição no SNC de GFAP fosforilada, sabe-se que ocorre uma grande variação regional no nível de fosforilação desta proteína e em hipocampo ela encontra-se mais fosforilada do que em qualquer outra estrutura cerebral estudada (Rodnight & Leal, 1990). Córtex cerebelar, por exemplo, apresenta cerca de 42% do nível de GFAP fosforilada comparado ao hipocampo (Leal, 1995). É importante salientar que a análise comparativa entre o imunoconteúdo de GFAP e seu nível de fosforilação mostra que em corda espinhal a quantidade de GFAP imunodetectada é maior que aquela encontrada em hipocampo. Entretanto, em corda espinhal, a quantidade de GFAP fosforilada é aproximadamente 2,5% da quantidade encontrada em hipocampo (Gonçalves & Rodnight, 1992), indicando que é incorreto correlacionar diretamente níveis de expressão com níveis de fosforilação. Além da variação regional, a GFAP possui variação ontogenética, apresentando níveis baixos nos primeiros dias de vida pós-natal, aumentando significativamente com o desenvolvimento (Nichols *et al.*, 1993).

Estudos prévios relacionados às propriedades do sistema fosforilante da GFAP mostraram que esta aparece fosforilada em hipocampo de ratos a partir

do 9º dia pós-natal e tem seu nível aumentado com o crescimento do animal. A fosforilação desta proteína é altamente estimulada por glutamato em fatias de hipocampo de ratos jovens (P12-P16), o que não foi observado em ratos adultos (Wofchuk & Rodnight, 1990). O efeito do glutamato sobre a GFAP em hipocampo de ratos jovens parece ocorrer via mGluRs, uma vez que o agonista metabotrópico 1S,3R-ACPD aumenta o nível de fosforilação da proteína de forma similar àquele aumento obtido com glutamato e na presença da *toxina pertussis* ocorre uma diminuição na estimulação da fosforilação da proteína promovida por glutamato, sugerindo o envolvimento de proteínas G neste mecanismo (Wofchuk & Rodnight, 1994; Rodnight *et al.*, 1997). Além disso, agonistas de iGluRs não alteram o nível de fosforilação da GFAP.

Em fatias de hipocampo de animais jovens (P12-P16) o nível de fosforilação desta proteína também aumenta na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (presença de EGTA) quando comparado ao nível obtido na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  externo e este efeito inibitório sobre a fosforilação da GFAP ocorre, aparentemente, através de canais tipo L, uma vez que é bloqueado por nifedipina (antagonista específico de canais tipo L); entretanto, aos 20 dias de idade (P20) a presença ou a ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  não altera o nível de fosforilação da GFAP e, a partir desta idade, o sistema de fosforilação da proteína torna-se dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Wofchuk & Rodnight, 1995; Rodnight *et al.*, 1997). O nível de fosforilação da GFAP na presença de glutamato é semelhante ao nível obtido na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (presença de EGTA) e o tratamento simultâneo com glutamato e EGTA não resulta em efeito sinérgico, sugerindo um mesmo mecanismo de ação para estas duas situações estimulatórias da fosforilação da proteína (Wofchuk & Rodnight, 1994; Rodnight *et al.*, 1997).

A desfosforilação da GFAP em hipocampo de animais jovens mostrou ser catalisada pela proteína fosfatase PP1 (Vinadé & Rodnight, 1996), não havendo evidências de um envolvimento direto do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a

desfosforilação desta proteína. No entanto, observou-se um envolvimento da PP2B (ou calcineurina) no processo de desfosforilação da GFAP. Uma vez que não foi evidenciado um envolvimento direto do  $\text{Ca}^{2+}$ , a ação da calcineurina provavelmente ocorre via uma cascata enzimática dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a qual é conhecida por regular a PP1 em muitos tecidos e que parece estar envolvida no fenômeno de LTD (Mulkey *et al.*, 1994). Este evento em cascata baseia-se no fato de que a PP1 é inibida pelo inibidor 1 na forma fosforilada e este sofre desfosforilação pela calcineurina. Logo, na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo ou por bloqueio da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, a calcineurina permanece inativa permitindo a inibição da PP1 pelo inibidor 1 fosforilado o que impede, desta forma, a reversibilidade do processo de fosforilação da GFAP, deslocando o equilíbrio para a forma fosforilada da proteína (Vinadé & Rodnight, 1996; Vinadé *et al.*, 1997; Rodnight *et al.*, 1997).

Em função de todos os aspectos levantados em relação à modulação do estado fosforilado/desfosforilado da GFAP e considerando que: (1) o glutamato, via mGluRs, possivelmente inibe entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais tipo L, impedindo a desfosforilação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  associada à GFAP (Rodnight *et al.*, 1997); (2) a estimulação da fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo de ratos jovens (P12-P16) ocorre via um mGluR de propriedades farmacológicas do grupo II (mGluR II) (Kommers *et al.*, 1999), o qual está envolvido com o mecanismo de transdução de sinal via adenilato ciclase e (3) os receptores rianodina (RyRs), presentes nas reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por tais receptores, estão relacionados com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Chavis *et al.*, 1996), tornou-se importante caracterizar se a modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP envolve as reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por RyRs, descartando o envolvimento de reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  associadas a  $\text{IP}_3$  em função de ser um mGluR II envolvido na modulação da fosforilação da GFAP por glutamato.

## 1.7. Objetivos

### Objetivo geral:

- Investigar o possível envolvimento de reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  no efeito de aminoácidos excitatórios sobre a modulação da fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens.

### Objetivos específicos:

- Verificar se a mobilização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  via ativação de receptores rianodina (RyRs) está envolvida na modulação da fosforilação da GFAP em fatias hipocámpais de animais jovens e comparar com os dados prévios sobre o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular;
- Elucidar os mecanismos de ação da cafeína sobre o estado fosforilado da GFAP induzido pela ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos em fatias hipocámpais de ratos jovens;
- Analisar se há envolvimento de AMP cíclico ( $\text{AMP}_c$ ), bem como de receptores adenosina, no efeito da cafeína sobre a modulação da fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Alguns reagentes utilizados e a respectiva procedência estão citados a seguir: acrilamida para gel (SIGMA); 1S,3R-ACPD (Tocris); adenosina deaminase (Calbiochem); agarose (SIGMA); anfolina 2-4 (Servalyt); anfolina 5-7 (Pharmacia); anfolina 3,5-10 (Amersham Pharmacia Biotec); BAPTA-AM (SIGMA); Bay K 8644 (Calbiochem); bis-acrilamida (SIGMA); cafeína (SIGMA); citocromo C (SIGMA); dantrolene (SIGMA); dodecil (lauril) sulfato de sódio (SDS) 95% (SIGMA); forskolina (SIGMA); glicina (SIGMA); HEPES (SIGMA); Igepal (SIGMA); mercaptoetanol (SIGMA); rianodina (RBI); tetrametiletilenodiamida - TEMED (SIGMA); tapsigargina (Tocris); trizma base (SIGMA).

A preparação das soluções gerais utilizadas neste estudo era feita com água proveniente do destilador de vidro Micronal ou Milli-Q ("Millipore"). Os reagentes especiais eram diluídos com solventes específicos.

O isótopo  $^{32}\text{P}$  (radioativo), sob forma de  $^{32}\text{P}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  livre de carreador, era obtido da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN-IPEN (SP). Os filmes de Raio-X (X-Omat - 13x18), bem como o revelador e o fixador (GBX) eram obtidos da Kodak.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Animais

Para este estudo eram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, com idade entre 13 e 16 dias pós-natal, procedentes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 2.2.2. Obtenção das fatias de tecido

Os ratos eram mortos por decapitação e o cérebro era rapidamente removido e colocado sobre uma placa de vidro invertida sobre gelo. Esta era recoberta por papel filtro embebido em meio HEPES salina (composição: NaCl, 124 mM; KCl, 4 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM; glicose, 12 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1 mM e HEPES sódico, 25 mM pH 7,4). É importante salientar que nos experimentos em que era analisada a ausência de cálcio extracelular, utilizou-se o meio HEPES salina e EGTA 1 mM ao invés de CaCl<sub>2</sub> 1 mM. A seguir o hipocampo era dissecado e seccionado transversalmente em fatias de 0,4 mm de espessura através de um fatiador (“McIlwain chopper”).

### 2.2.3. Pré-incubação

Cada fatia era cuidadosamente transferida, com auxílio de finos pincéis, para tubos plásticos cônicos, contendo 100 µl de meio HEPES salina (descrito anteriormente). Aos tubos teste, contendo os inibidores, os antagonistas ou ainda os outros agonistas ou estimuladores durante a pré-incubação e a incubação, era adicionado 80 µl de meio e 20 µl do mesmo meio contendo estes

agentes. A pré-incubação era feita por 30 minutos a 30 °C, em banho-maria (“Precision - Reciprocal Shaking Bath”), sob agitação constante.

#### 2.2.4. Marcação das fosfoproteínas com $[^{32}\text{P}] \text{Na}_2\text{HPO}_4$

Ao término do período de pré-incubação, o meio era substituído por 20 ou 30  $\mu\text{l}$  (dependendo do número de variáveis de cada experimento) do mesmo meio contendo 40  $\mu\text{Ci}$  de  $[^{32}\text{P}]$ ortofosfato por tubo. Aos tubos controle eram acrescentados 20 ou 30  $\mu\text{l}$  de meio e aos tubos teste 20 ou 30  $\mu\text{l}$  do mesmo meio, contendo o agonista glutamatérgico e/ou os agentes experimentais utilizados neste estudo. As fatias eram então incubadas por 60 minutos a 30 °C em banho-maria, sob agitação constante. Nos experimentos que verificaram o efeito da ausência de cálcio externo utilizou-se meio HEPES salina contendo EGTA 1 mM.

Finalizado o tempo de incubação, as reações eram interrompidas pela adição de 1 ml, a cada tubo, de ácido tricloroacético 10% (TCA). Os tubos eram mantidos em gelo por aproximadamente 10 minutos para então descartar este meio. A seguir as fatias eram lavadas uma vez com TCA 4% e duas vezes com água Milli-Q, para a remoção do fosfato radioativo não incorporado e do excesso de TCA. Finalmente, as fatias eram transferidas para tubos “Eppendorf” contendo 100  $\mu\text{l}$  de solução de lise, também chamada solução de amostra (composição: uréia 9,5 M; lisina 12,5 mM; SDS 0,2%, Nonidet P-40 4%;  $\beta$ -mercaptoetanol 2%; azul de bromofenol 0,005%). As amostras eram então homogeneizadas em agitador de tubos e congeladas a -20 °C.

O agonista glutamatérgico utilizado na incubação era o 1S,3R-ACPD na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Os inibidores ou os antagonistas utilizados e suas respectivas concentrações eram: adenosina deaminase (1 unidade/mL); dantrolene (50  $\mu\text{M}$ ); tapsigargina (1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) e BAPTA-AM (5  $\mu\text{M}$  e 50

$\mu\text{M}$ ). Os outros agonistas ou estimuladores utilizados e suas respectivas concentrações eram: cafeína (1 mM e 10 mM); rianodina (10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ); Bay K 8644 (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$ ) e forskolina (30  $\mu\text{M}$ ). Todos estes agentes eram armazenados em soluções estoque e diluídos em meio HEPES salina nas concentrações desejadas, no momento do uso.

### 2.2.5. Eletroforese Bidimensional

As fosfoproteínas eram separadas através da técnica de eletroforese bidimensional baseada em O'Farrell e colaboradores (1977) modificada por Rodnight e colaboradores (1988). Esta metodologia consiste de duas etapas e promove a separação de uma mistura de proteínas de acordo com duas características distintas. Na primeira dimensão as proteínas migram conforme sua carga através de uma eletroforese não equilibrada em gel tubular de poliacrilamida com gradiente de pH (NEPHGE). Na segunda dimensão, as proteínas previamente separadas conforme sua carga elétrica, migram de acordo com seus respectivos pesos moleculares através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

#### 2.2.5.1. Primeira Dimensão (NEPHGE)

O gel utilizado na primeira dimensão apresentava a seguinte composição: acrilamida/bis-acrilamida (29/1) 3,5%; uréia 9,2 M; anfolina pH 2-4 0,2%; anfolina pH 3,5-10 1,6%; anfolina pH 5-7 0,2%; Igepal 2% e TEMED 0,2%. Esta mistura de gel permanecia estocada em alíquotas de 0,3 ml a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No momento de utilização, a mistura de gel era descongelada e então eram adicionados 1,5  $\mu\text{l}$  de persulfato de amônio 10%, concentração final de 0,05%, para ocorrer a polimerização do gel.

Após a adição do persulfato de amônio, capilares de vidro com 15 cm de comprimento e 1,0 mm de diâmetro interno eram preenchidos com a mistura de gel com auxílio de cânulas de silicone. Na extremidade superior mantinha-se 3 cm sem a mistura, onde, após a polimerização do gel (aproximadamente 2 horas), eram aplicadas as amostras. Em cada gel era aplicada apenas uma das amostras. Após a polimerização, os capilares contendo o gel eram montados nas cubas de primeira dimensão. Utilizava-se duas cubas onde 12 amostras eram aplicadas em cada uma, finalizando um total de 24 amostras sendo submetidas à separação eletroforética simultaneamente.

As amostras, previamente solubilizadas em tampão de lise para eletroforese bidimensional, eram descongeladas e aplicadas em volumes iguais de 30 µl na porção superior de cada capilar. Acima de cada amostra eram aplicados 10 µl de solução de uréia 8% com citocromo C como marcador da frente de corrida.

Eram utilizados como tampão superior  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 mM (anólito) e como tampão inferior NaOH 20 mM (católito). A voltagem máxima aplicada era de 800 V, corrente de 10 mA e potência de 0,1 watt/tubo. A corrida eletroforética era interrompida quando as bandas de citocromo C atingiam uma distância de 7,5 cm de migração (cerca de 2 horas). Os capilares eram então retirados da cuba, identificados e congelados a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da transferência para a segunda dimensão.

#### 2.2.5.2. Segunda dimensão (SDS-PAGE)

##### - *Confeção dos géis*

Para garantir uma idêntica composição dos géis de segunda dimensão, estes eram confeccionados em uma caixa de acrílico, onde era permitida a preparação de 8 géis simultaneamente. Oito pares de placas de vidro (16 cm x 14 cm) separadas por espaçadores (1 mm de espessura) eram utilizadas na

montagem da caixa. Cada par era formado por uma placa inteira e outra com bisel. O espaço entre as placas, deixado pelos espaçadores, era preenchido com gel de separação (composição: acrilamida/bis-acrilamida 39:1, 8%; tampão Tris-HCl pH 8.8, 373 mM; SDS 0,1%; glicerol 7,46%; TEMED 0,06% e persulfato de amônio 0,045% - volume total de 400 ml) até a altura de 2,5 cm da borda superior da placa com bisel. Após a polimerização do gel de separação era colocado sobre este o gel de entrada (composição: acrilamida/bis-acrilamida 39:1, 4%; tampão Tris-HCl pH 6.8, 123 mM; SDS 0,1%; TEMED 0,05% e persulfato de amônio 0,098% - volume total de 91,5 ml).

Após a polimerização dos géis, a caixa de acrílico era desmontada e as placas com o gel de segunda dimensão eram guardadas sob refrigeração, envolvidas em plástico. No momento do uso elas eram montadas nas cubas acrílicas de segunda dimensão.

#### *- Procedimento para transferência*

A transferência consistia na passagem dos géis da primeira dimensão (NEPHGE) para os géis da segunda dimensão (SDS-PAGE) e acontecia da seguinte forma: os géis provenientes da NEPHGE eram descongelados, expulsos dos capilares de vidro com auxílio de uma seringa e imersos por 15 minutos em 4 ml de uma solução conhecida como tampão de equilíbrio (composição: Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1% e azul de bromofenol). A seguir, cada placa de SDS-PAGE recebia 3 géis de primeira dimensão, sempre correspondendo a duas amostras teste colocadas nas extremidades da placa e uma amostra controle colocada no centro da placa. Os géis de primeira dimensão eram dispostos horizontalmente sobre o gel de entrada da segunda dimensão. Após a retirada de bolhas, os géis de primeira dimensão eram fixados com agarose 0,5% contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 1%.

Os tampões para a SDS-PAGE tinham as seguintes composições: tampão superior - colocado na parte superior da cuba (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% - pH 8,8); tampão inferior - colocado na parte inferior (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). A corrida eletroforética era conduzida com voltagem máxima fixada em 150 V, intensidade de corrente em 45 mA/cuba e era interrompida quando a frente de corrida (azul de bromofenol) atingia aproximadamente 3 cm do final do gel (6-7 horas).

#### 2.2.6. Fixação, secagem e exposição autorradiográfica dos géis

Finalizada a corrida eletroforética, os géis de entrada das placas de SDS-PAGE eram descartados e os géis de separação colocados em solução fixadora (composição: ácido acético 7% e metanol 53%) em um volume de 100 ml/gel, onde eram mantidos durante a noite. Após a fixação das proteínas, a solução fixadora era substituída pela solução de secagem (composição: glicerol 1% e metanol 50%) em um volume de 100 ml/gel, onde os géis eram mantidos sob agitação por aproximadamente 1-2 horas. A seguir, cada gel era seco entre duas folhas de papel celofane (Juang *et al.*, 1984) apoiado em uma placa de vidro. A secagem dos géis era acelerada com auxílio de lâmpadas de infravermelho, que incidiam sobre a placa de vidro, no lado oposto do gel. Depois de secos, os géis eram colocados sobre placas de "eucatex" e expostos a filmes autorradiográficos. Cada gel era exposto a um filme de raio X (X-Omat, 13 x 18 cm, Kodak), acompanhado por uma placa intensificadora de impressão (Cronex, DuPont). O conjunto era então empacotado em plástico preto e colocado a  $-70^{\circ}\text{C}$  por tempos variáveis, de acordo com a atividade do isótopo radioativo.

Para a revelação dos filmes eram utilizados revelador e fixador Kodak e o procedimento era o seguinte: os filmes permaneciam por 3 minutos na

solução reveladora, eram rapidamente lavados em ácido acético 10% e permaneciam por 5 minutos na solução fixadora.

#### 2.2.7. Quantificação e estatística

A análise quantitativa dos resultados era realizada a partir das autorradiografias procedentes dos géis submetidos à eletroforese bidimensional. As autorradiografias eram examinadas por um leitor de imagens (“scanner”) (Hewlet-Packard Scanjet 6100C) e após eram determinadas as densidades ópticas de cada autorradiografia, utilizando um programa de computador (Optiquant, versão 02.00, Packard Instrument Company). As densidades ópticas eram analisadas da seguinte forma: cada amostra tinha uma quantificação para a GFAP e uma para o total das fosfoproteínas da amostra. A análise era feita comparando-se cada valor para a GFAP em relação à amostra total. O valor da GFAP de cada amostra teste era comparado com o valor obtido em cada amostra controle (considerada 100%). A análise estatística utilizada era o teste t pareado de Student (Nichols *et al.*, 1990; Sladeczek *et al.*, 1985) e ANOVA.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efeito da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD em hipocampo de ratos jovens

Inicialmente confirmamos o efeito do 1S,3R-ACPD em estimular a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens (Wofchuk & Rodnight, 1994). Neste conjunto de experimentos analisou-se o efeito da cafeína em diferentes concentrações (1 mM e 10 mM) sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo agonista glutamatérgico metabotrópico 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em hipocampo de ratos jovens. A cafeína é um agente que atua em diferentes sistemas e sua ação é dependente da concentração utilizada (Figura 4. 1).

É importante salientar que em hipocampo o perfil de fosforilação da GFAP na presença de agonistas glutamatérgicos está bem descrito pelo nosso grupo de pesquisa (Wofchuk & Rodnight, 1994; 1995; Kommers *et al.*, 1999). Desta forma, o nível de fosforilação da GFAP obtido com o 1S,3R-ACPD 100 $\mu$ M serviu sempre como controle positivo a ser comparado com o efeito das demais drogas utilizadas, uma vez que este agonista estimula significativamente a fosforilação da GFAP no mesmo nível que o glutamato (principal aminoácido excitatório do SNC).

As figuras 3. 1 e 3. 2 apresentam, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito da cafeína 1 mM e 10 mM sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada por 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocampais de ratos jovens e o histograma com os dados estatísticos da reversão total ou parcial do efeito do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M por cafeína 10 mM e 1mM, respectivamente, sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens.

Pode-se observar que o agonista glutamatérgico metabotrópico 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M reproduziu seu efeito em aumentar significativamente o nível de fosforilação da GFAP em relação ao controle ( $\text{Ca}^{2+}$  1 mM) (Wofchuk & Rodnight, 1994).

A cafeína, quando administrada sozinha nas concentrações de 1 mM e 10 mM, não apresentou efeito sobre a fosforilação da GFAP. No entanto, quando administrada na presença do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M, reverteu totalmente o efeito estimulatório do agonista sobre a fosforilação da GFAP na concentração de 10 mM e parcialmente na concentração de 1 mM. Por outro lado, cafeína 0,1 mM não alterou a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M (dados não mostrados). Estes resultados indicam um possível envolvimento de reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por receptores rianodina (RyRs), uma vez que somente em concentrações elevadas (em torno de 10 mM) a cafeína atua estimulando RyRs e, conseqüentemente, liberando  $\text{Ca}^{2+}$  destas reservas. Em menores concentrações, a cafeína atua em outros sítios, inibindo fosfodiesterases e antagonizando receptores de adenosina (Fredholm, 1995).

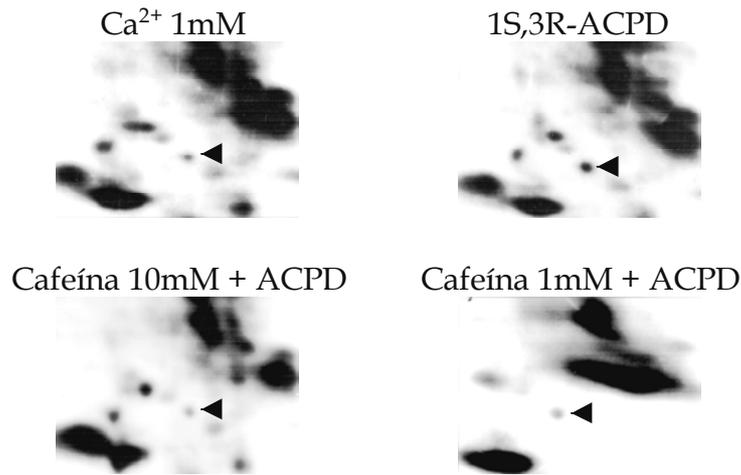


Figura 3. 1: Autorradiografias representativas do efeito da cafeína (1 mM e 10 mM) sobre a estimulação do 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

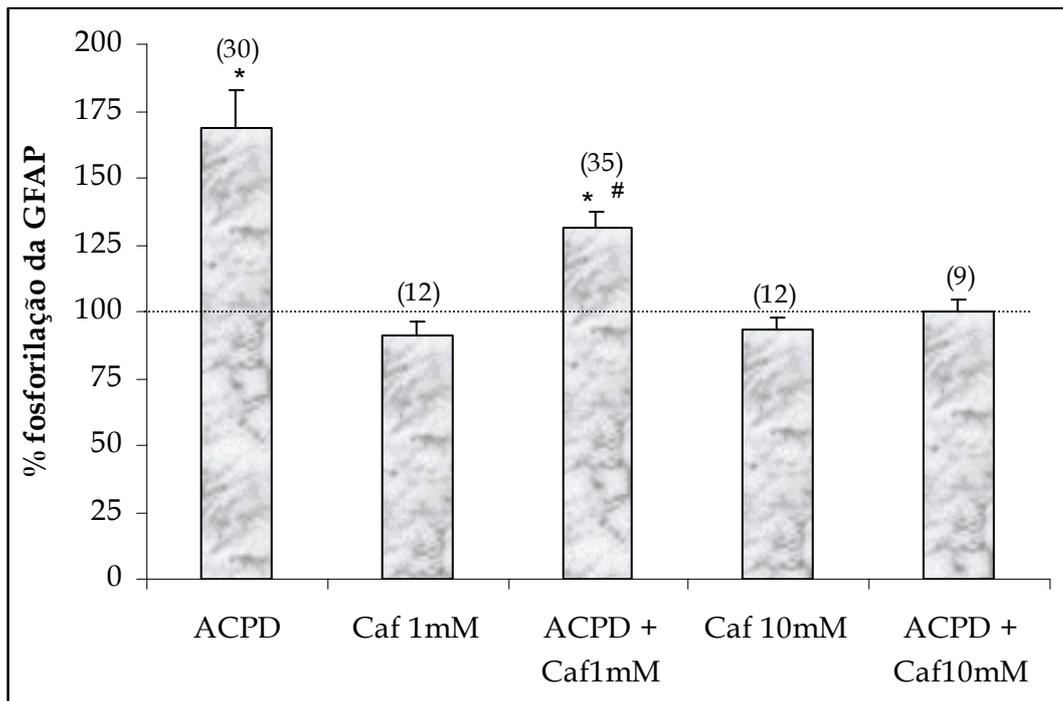


Figura 3. 2: Efeito da cafeína (Caf) em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,002$  em relação ao controle (100%).

# ANOVA:  $p < 0,05$  em relação ao 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M.

### **3.2. Papel das reservas intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ sobre o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens**

Nestes experimentos buscou-se observar o efeito de diferentes drogas que agem sobre as reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por receptores rianodina (RyRs), uma vez que a estimulação da fosforilação da GFAP em fatias hipocampais de ratos jovens é mediada por receptor glutamatérgico metabotrópico de propriedades farmacológicas do grupo II (mGluR II), o qual não envolve hidrólise de fosfoinositídeos (Kommers *et al.*, 1999). Desta forma, o mecanismo de modulação da fosforilação da GFAP aparentemente não depende de estoques internos de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por receptores de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). Estes experimentos objetivaram verificar se o efeito obtido com cafeína (item 1) era via estimulação de RyRs, pois um dos sítios de ação da cafeína é atuar como agonista destes receptores.

Para tanto, utilizou-se rianodina nas concentrações de 10 nM, 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ; foi usado dantrolene na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e tapsigargina nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ .

A rianodina é um modulador específico dos RyRs, que em concentrações elevadas ( $\mu\text{M}$ ) inibe o receptor e em concentrações baixas (nM) o estimula (Simpson *et al.*, 1998). O dantrolene age como antagonista seletivo de RyRs; desta forma, inibe a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir destas reservas presentes tanto no retículo sarcoplasmático quanto no retículo endoplasmático (Wei, & Perry, 1996). A tapsigargina é um antagonista seletivo das bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, as quais seqüestram o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico às custas de ATP, estando presentes nos retículos sarcoplasmático e endoplasmático (Simpson *et al.*, 1998).

As figuras 3. 3 e 3. 4 apresentam, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito da rianodina 10 nM, 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada por 1S,3R-ACPD

100  $\mu\text{M}$  em fatias hipocâmpais de ratos jovens e o histograma com os dados estatísticos mostrando reversão total do efeito do 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$  por rianodina 10nM sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens. As concentrações maiores de rianodina não tiveram efeito.

As figuras 3. 4 e 3. 6 mostram, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito do dantrolene 50  $\mu\text{M}$  sobre a ação da cafeína 10 mM e sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$  e o histograma com os dados estatísticos mostrando reversão induzida por dantrolene da ação da cafeína sobre o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP em fatias hipocâmpais de ratos jovens.

As figuras 3. 7 e 3. 8 apresentam, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito da tapsigargina 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$  e o histograma com os dados estatísticos mostrando a ação da tapsigargina 10  $\mu\text{M}$  revertendo o efeito estimulatório do agonista glutamatérgico.

Quando administrada na presença do 1S,3R-ACPD, a rianodina reverteu totalmente o efeito estimulatório do agonista sobre a fosforilação da GFAP somente na concentração de 10 nM, justamente a concentração onde esta atua como agonista dos RyRs (figura 3. 4). O dantrolene, quando administrado na presença da cafeína não alterou o nível de fosforilação da GFAP; entretanto, quando administrado simultaneamente com a cafeína e com o 1S,3R-ACPD, dantrolene reverteu totalmente o efeito inibitório da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD (figura 3. 6). Tapsigargina, quando administrada juntamente com o agonista glutamatérgico, reverteu totalmente o efeito estimulatório deste sobre a fosforilação da GFAP somente na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , sugerindo um efeito dose-dependente (figura 3. 8).

Pode-se observar em todos os resultados citados até aqui que o 1S,3R-ACPD estimulou significativamente o nível de fosforilação da GFAP, reproduzindo dados prévios (Wofchuk & Rodnight, 1994)

Tanto a rianodina, quanto o dantrolene e a tapsigargina, quando administrados sozinhos nas concentrações testadas não apresentaram efeito sobre a fosforilação da GFAP.

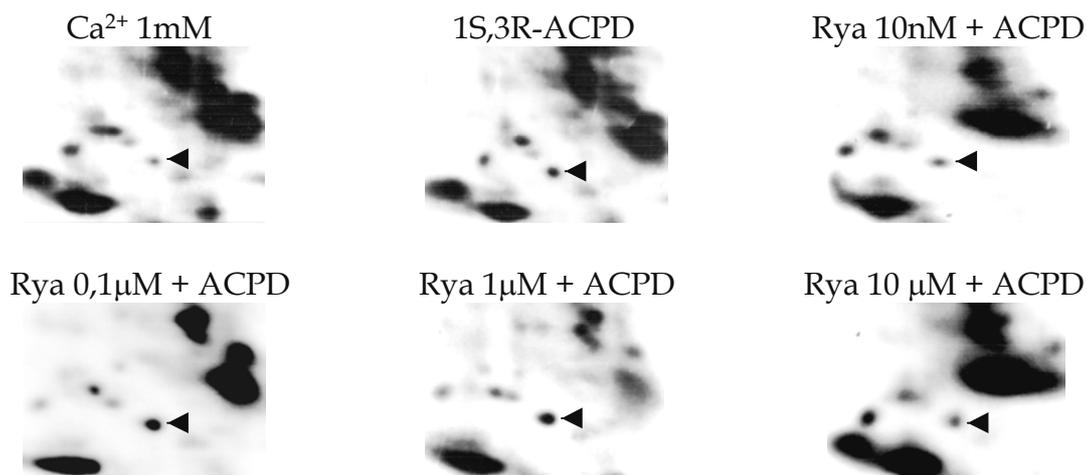


Figura 3. 3: Autorradiografias representativas do efeito da rianodina (Rya) (10 nM, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) sobre a estimulação do 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

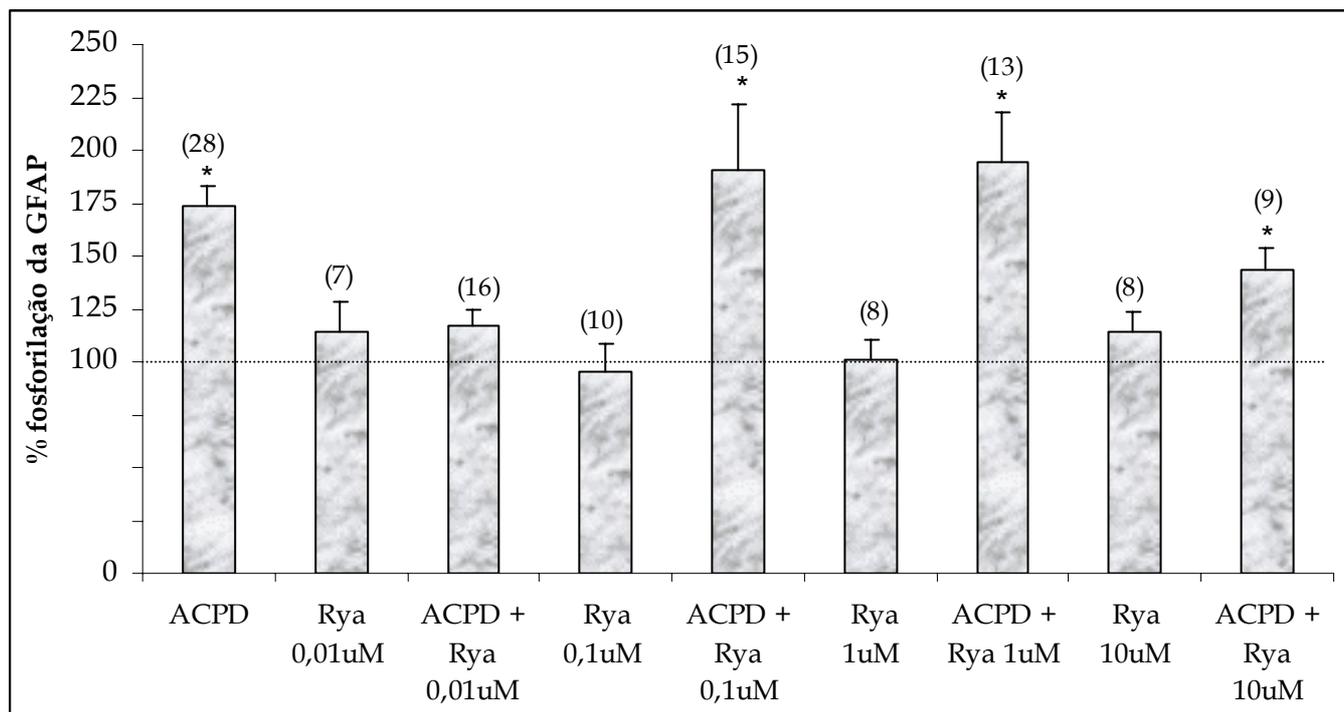


Figura 3. 4: Efeito da rianodina (Rya) em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,02$  em relação ao controle (100%).

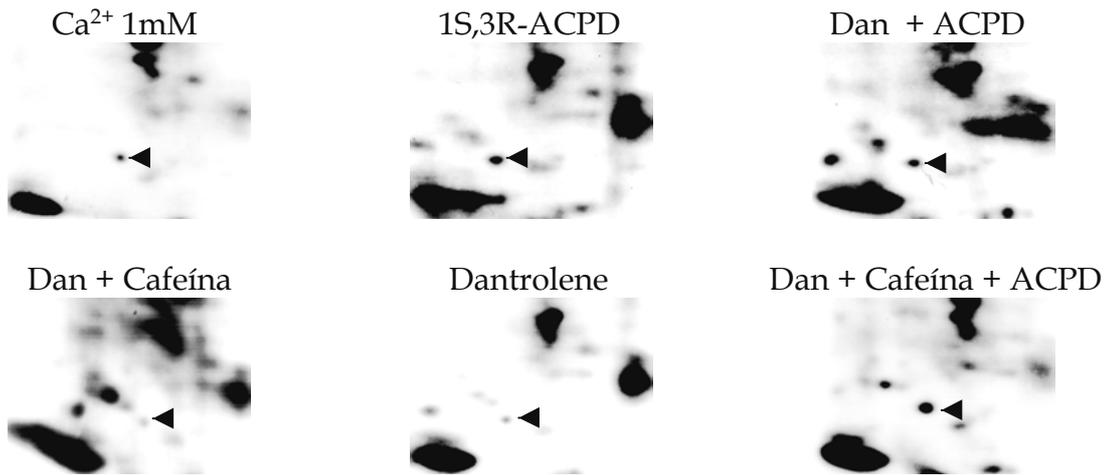


Figura 3. 5: Autorradiografias representativas do efeito do dantrolene (Dan) (50  $\mu$ M) sobre a ação da cafeína (10 mM) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

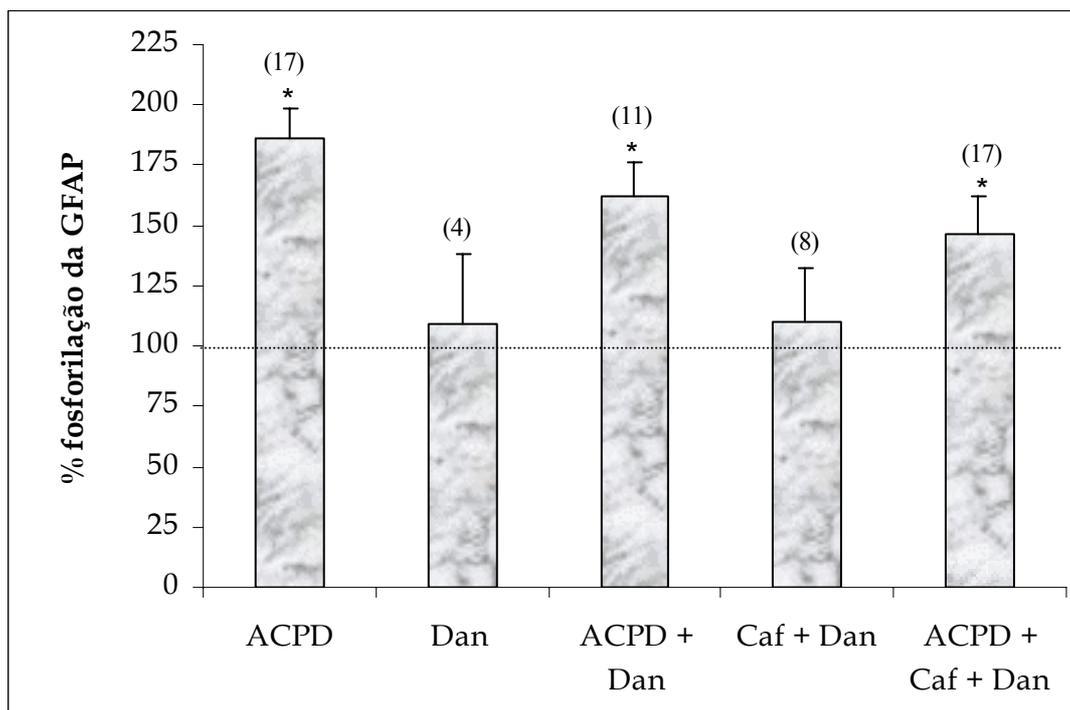


Figura 3. 6: Efeito do dantrolene 50  $\mu$ M (Dan) sobre a ação da cafeína 10 mM (Caf) na estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle Ca<sup>2+</sup> 1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,02$  em relação ao controle (100%).

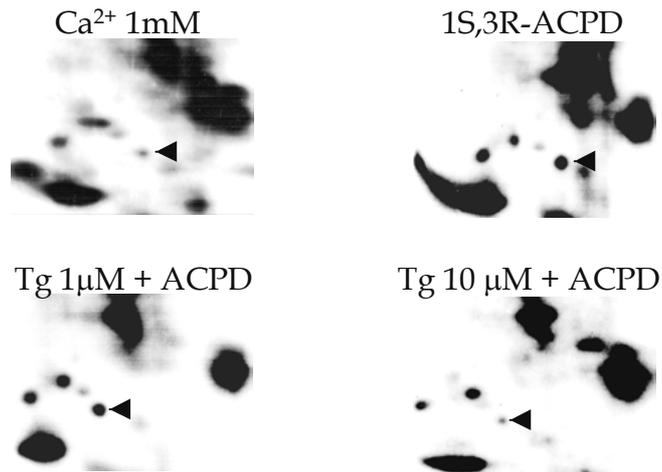


Figura 3. 7: Autorradiografias representativas do efeito da taspigargina (Tg) (1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) sobre a estimulação do 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

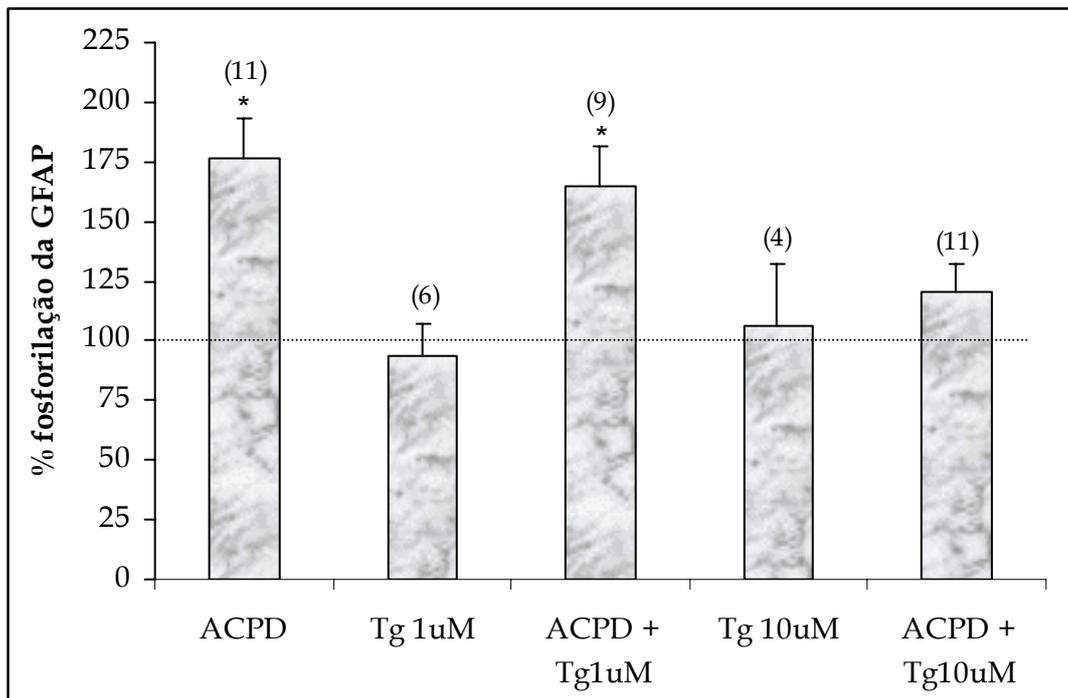


Figura 3. 8: Efeito da taspigargina (Tg) em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,006$  em relação ao controle (100%).

### **3.3. Efeito da ausência e presença de íons $\text{Ca}^{2+}$ provenientes dos “pools” extracelular e intracelular sobre a modulação da fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens**

Dados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram um interessante perfil de modulação da fosforilação da GFAP pelo  $\text{Ca}^{2+}$  em fatias de hipocampo (Wofchuk & Rodnight, 1994; 1995): (1) na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo e presença de EGTA 1 mM, o nível de fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens (P12-P16), encontra-se significativamente aumentado em relação ao controle com  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM; (2) o aumento no nível de fosforilação da GFAP na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo e na presença de glutamato, provavelmente ocorre pelo mesmo mecanismo, uma vez que, quando associados, seus efeitos não são sinérgicos; (3) em hipocampo de ratos adultos o glutamato não tem efeito sobre a fosforilação da GFAP e (4) em hipocampo de ratos adultos a fosforilação da GFAP é completamente dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além destes dados, observamos aqui, conforme descrito no item 1, que a cafeína 10 mM reverteu totalmente o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$ , talvez por liberar  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas reguladas por RyRs (figura 3. 2).

A partir destes resultados buscou-se avaliar o efeito da cafeína 10 mM sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pela ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (EGTA 1 mM) em fatias hipocámpais de ratos jovens, comparado ao efeito desta na presença do 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$ . Também verificou-se o efeito do Bay K 8644 nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$ , o qual age como um seletivo agonista de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L de uma maneira dose-dependente (Barger, 1999).

As figuras 3. 9 e 3. 10 apresentam, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito da cafeína 10 mM sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$  e pelo EGTA 1 mM (ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo) em fatias hipocámpais de ratos jovens

e os dados estatísticos da reversão total ou parcial, pela cafeína, da estimulação da fosforilação da GFAP pelo 1S,3R-ACPD e pelo EGTA, respectivamente.

Observa-se, pela análise dos dados, que a cafeína reproduziu o seu efeito em reverter totalmente a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD e reverteu parcialmente a estimulação da fosforilação da proteína induzida pelo EGTA (figura 3. 10).

As figuras 3. 11 e 3. 12 mostram, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito do Bay K 8644 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 300  $\mu$ M sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em hipocampo de ratos jovens e o histograma com os dados estatísticos mostrando o não efeito do Bay K 8644, em nenhuma das concentrações utilizadas, sobre a modulação da fosforilação da GFAP.

Em relação ao Bay K 8644, pode-se notar que não houve alteração significativa no nível de fosforilação da GFAP quando este agente foi administrado sozinho ou na presença do 1S,3R-ACPD (figura 3. 12). O Bay K 8644 não foi capaz de reverter a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD, o qual age provavelmente inibindo a entrada de  $Ca^{2+}$  (Rodnight *et al.*, 1997). Talvez o 1S,3R-ACPD seja muito potente em bloquear a entrada de  $Ca^{2+}$  via canais tipo L, até mesmo estando na presença de um agonista destes canais.

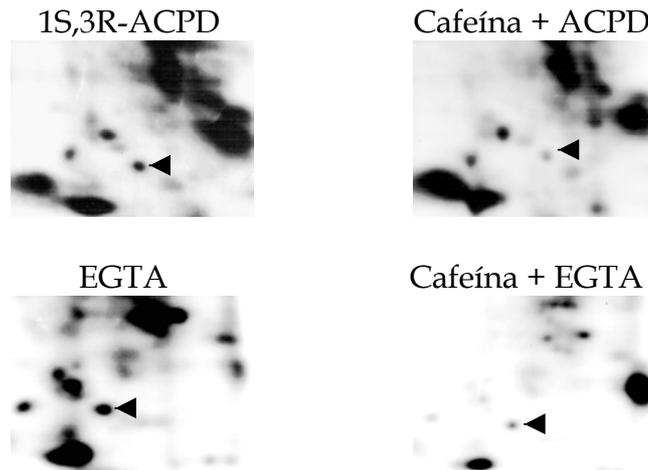


Figura 3. 9: Autorradiografias representativas do efeito da cafeína (10 mM) sobre a estimulação causada pelo 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) e pelo EGTA (1 mM) na fosforilação de proteínas hipocampais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

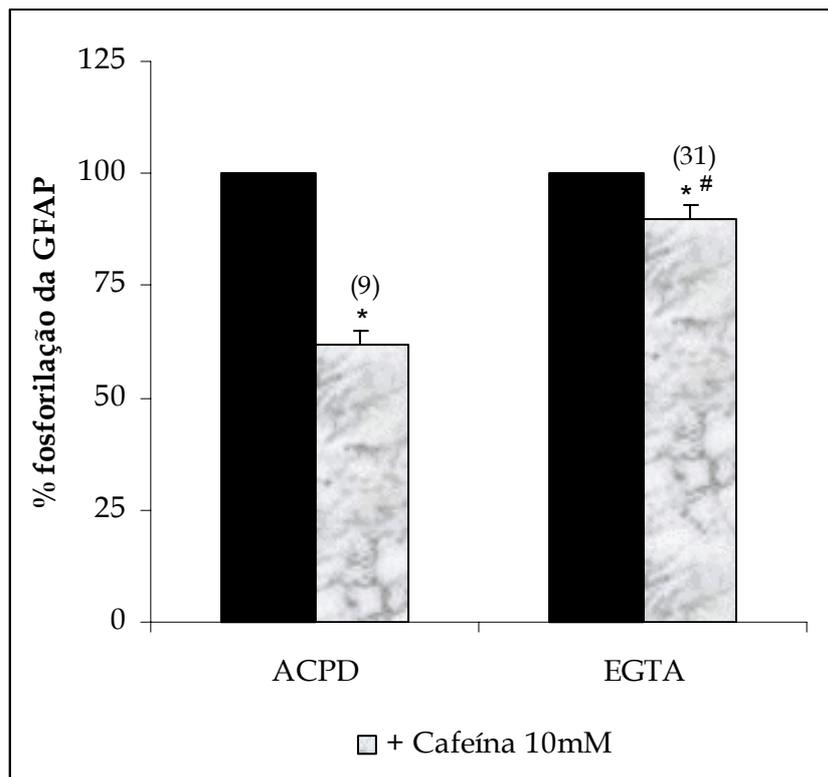


Figura 3. 10: Efeito da cafeína 10 mM sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M e pelo EGTA 1 mM em fatias hipocampais de ratos jovens, comparado aos respectivos controles 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M e EGTA 1 mM =100%. O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,004$  em relação aos controles (100%).

# ANOVA:  $p < 0,001$  em relação ao 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M com cafeína 10 mM.

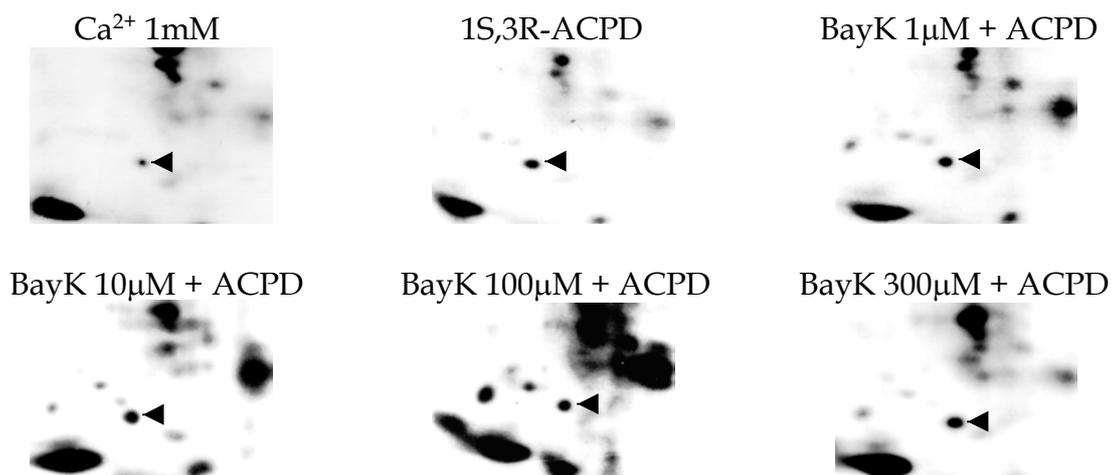


Figura 3. 11: Autorradiografias representativas do efeito do Bay K 8644 (BayK) (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 300  $\mu$ M) sobre a estimulação causada pelo 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

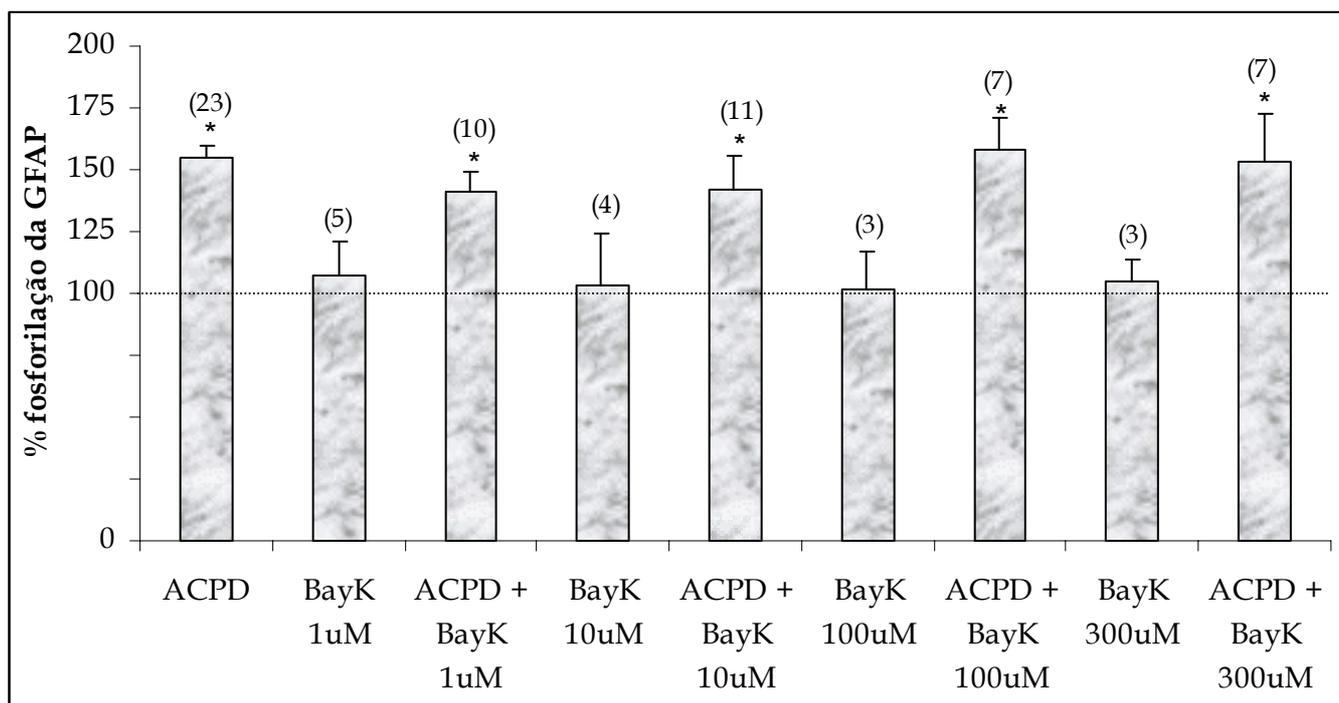


Figura 3. 12: Efeito do Bay K 8644 (BayK) em diferentes concentrações sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,04$  em relação ao controle (100%).

### **3.4. Papel do Ca<sup>2+</sup> intracelular livre sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD em hipocampo de ratos jovens**

Conforme resultados anteriores apresentados neste estudo, se sugere uma forte participação do Ca<sup>2+</sup> liberado das reservas intracelulares no mecanismo de modulação da fosforilação da GFAP, via ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Por isso buscou-se, nos experimentos seguintes, verificar o efeito do BAPTA-AM, um quelante de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Lee *et al.*, 2000), sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD em fatias hipocampais de ratos jovens.

As figuras 3. 13 e 3. 14 mostram, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito do BAPTA-AM nas concentrações de 5 µM e 50 µM sobre o efeito inibitório da cafeína 10 mM em reverter a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100 µM em hipocampo de ratos jovens e o histograma com os dados estatísticos acerca da reversão, causada pelo BAPTA-AM, do efeito inibitório da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD.

Pode-se verificar que o agonista 1S,3R-ACPD 100 µM reproduziu seu efeito em aumentar significativamente o nível de fosforilação da GFAP em relação ao controle (Ca<sup>2+</sup> 1 mM).

A diminuição no nível de Ca<sup>2+</sup> intracelular livre pela presença do quelante BAPTA-AM não alterou a modulação da fosforilação da GFAP, tanto na presença quanto na ausência do agonista 1S,3R-ACPD; entretanto, o quelante intracelular de Ca<sup>2+</sup> foi capaz de reverter o efeito da cafeína sobre a estimulação induzida pelo 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP. Estes dados indicam que, em relação a modulação da fosforilação da proteína via mGluRs, a cafeína atua sobre as reservas rianodina liberando Ca<sup>2+</sup> das mesmas e, provavelmente, este íon esteja atuando de forma semelhante ao Ca<sup>2+</sup>

proveniente do espaço extracelular, ou seja, desencadeando a cascata de desfosforilação associada à GFAP (Rodnight *et al.*, 1997).

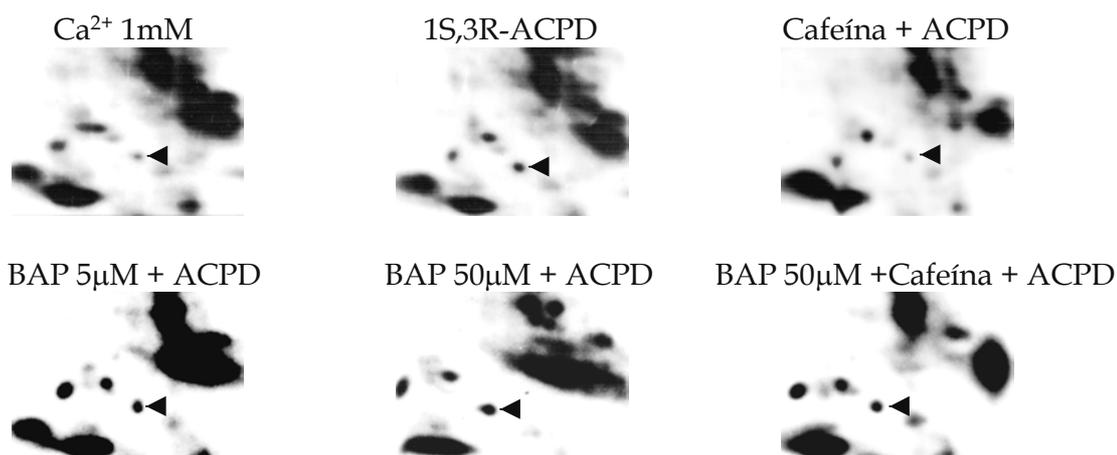


Figura 3. 13: Autorradiografias representativas do efeito do BAPTA-AM (BAP) (5  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) sobre a ação da cafeína (10 mM) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

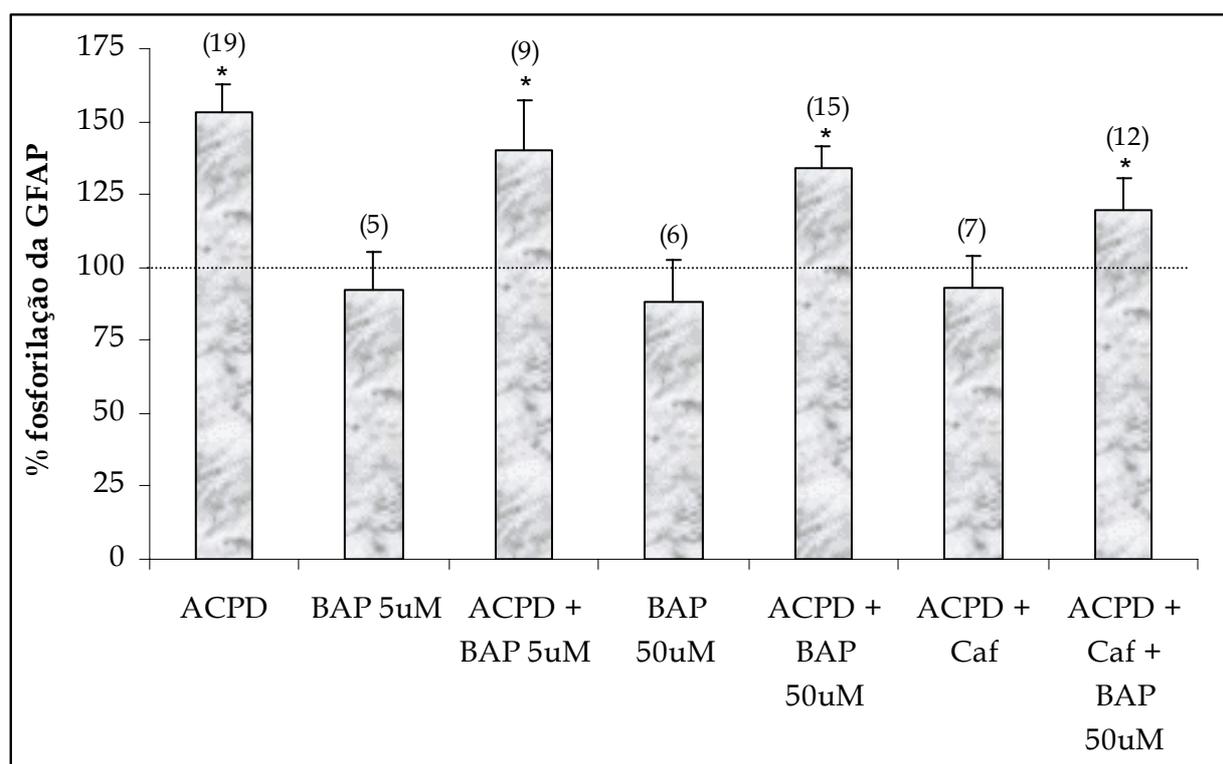


Figura 3. 14: Efeito do BAPTA-AM (BAP) sobre a ação da cafeína 10 mM na estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,05$  em relação ao controle (100%).

### **3.5. Envolvimento dos receptores adenosina (AdoRs) e dos níveis de AMP cíclico (AMP<sub>c</sub>) sobre o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens**

Em função dos resultados obtidos com cafeína e sabendo que esta atua também como antagonista de AdoRs, especificamente do subtipo A<sub>2A</sub> (o qual estimula a enzima adenilato ciclase) (Daly, 2000), buscou-se verificar nestes experimentos o efeito da enzima adenosina deaminase (ADA) - a qual metaboliza a adenosina endógena - e o efeito da forskolina - a qual estimula a enzima adenilato ciclase (aumentando, desta forma, os níveis de AMP<sub>c</sub>), sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD.

As figuras 3. 15 e 3. 16 apresentam, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito da ADA 1 unidade/mL sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD 100 µM em fatias hipocampais de ratos jovens e o histograma com os dados estatísticos mostrando a estimulação da fosforilação da GFAP pela ADA e o não efeito desta sobre a estimulação causada pelo 1S,3R-ACPD.

As figuras 3. 17 e 3. 18 mostram, respectivamente, porções de autorradiografias representativas do efeito da forskolina na concentração de 30 µM sobre a ação da cafeína 10 mM em reverter a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD 100 µM em fatias hipocampais de ratos jovens e o histograma com os dados estatísticos mostrando a estimulação da fosforilação da GFAP pela forskolina e o efeito desta em reverter totalmente a ação inibitória da cafeína sobre o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD na fosforilação da GFAP.

Pela análise dos dados, observa-se que tanto a ADA quanto a forskolina, quando administradas sozinhas, aumentaram significativamente o nível de fosforilação da GFAP comparado ao controle Ca<sup>2+</sup> (100%). Este aumento, entretanto, foi menor do que o obtido com o 1S,3R-ACPD. Quando administradas simultaneamente com o agonista glutamatérgico, nenhum dos

agentes (ADA e forskolina) alterou o nível de estimulação da fosforilação da GFAP obtido com o 1S,3R-ACPD (figuras 3. 16 e 3. 18). Interessantemente, quando a forskolina foi administrada juntamente com a cafeína e com o 1S,3R-ACPD, esta reverteu a ação inibitória da cafeína sobre o efeito estimulatório do agonista glutamatérgico (figura 3. 18). Estes dados sugerem um possível envolvimento de AdoRs e do AMP<sub>c</sub> no mecanismo de transdução de sinal associado com a modulação da fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo de ratos jovens.

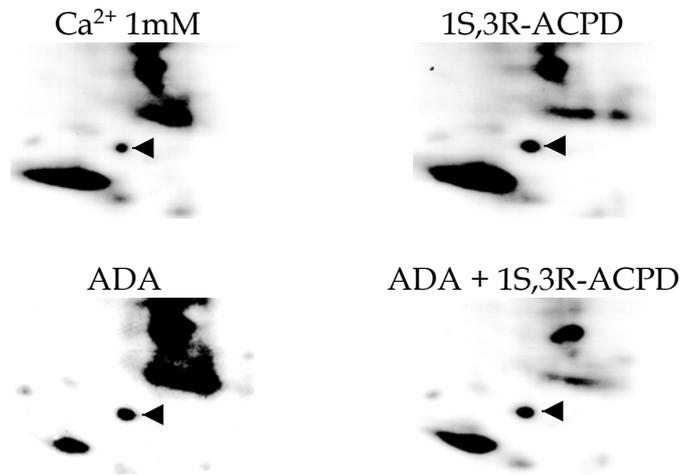


Figura 3. 15: Autorradiografias representativas do efeito da adenosina deaminase (ADA) (1 unidade/mL) sobre a estimulação causada pelo 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) na fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

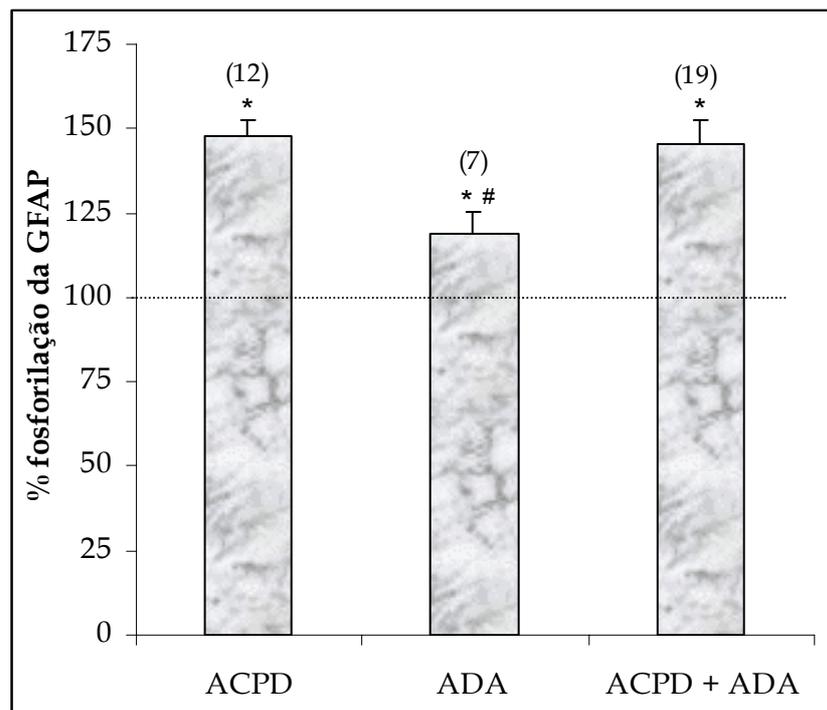


Figura 3. 16: Efeito da adenosina deaminase 1 unidade/mL (ADA) sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,04$  em relação ao controle (100%).

# ANOVA:  $p < 0,05$  em relação ao 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M com e sem ADA 1 unidade/mL.

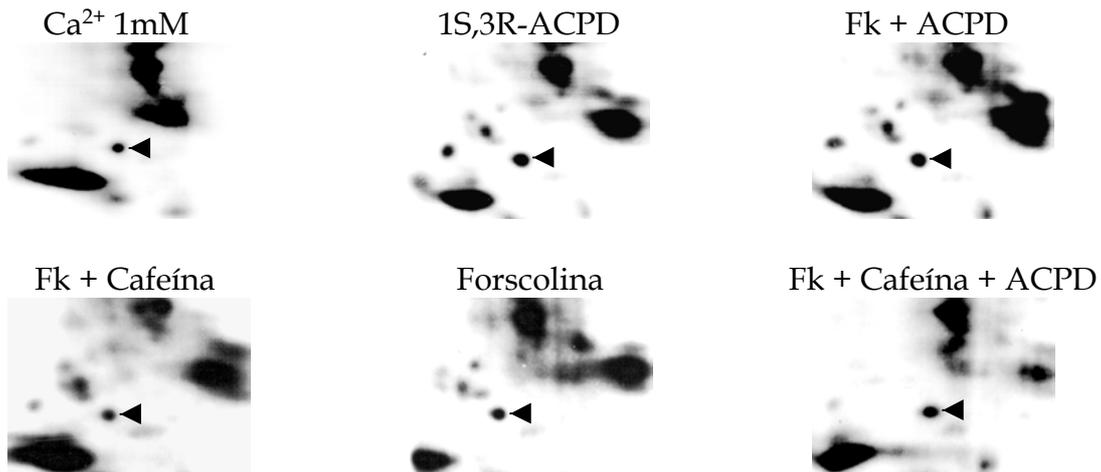


Figura 3. 17: Autorradiografias representativas do efeito da forskolina (Fk) (30  $\mu$ M) sobre a ação da cafeína (10 mM) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD (100  $\mu$ M) sobre a fosforilação de proteínas hipocâmpais de ratos jovens. As setas indicam a localização da GFAP.

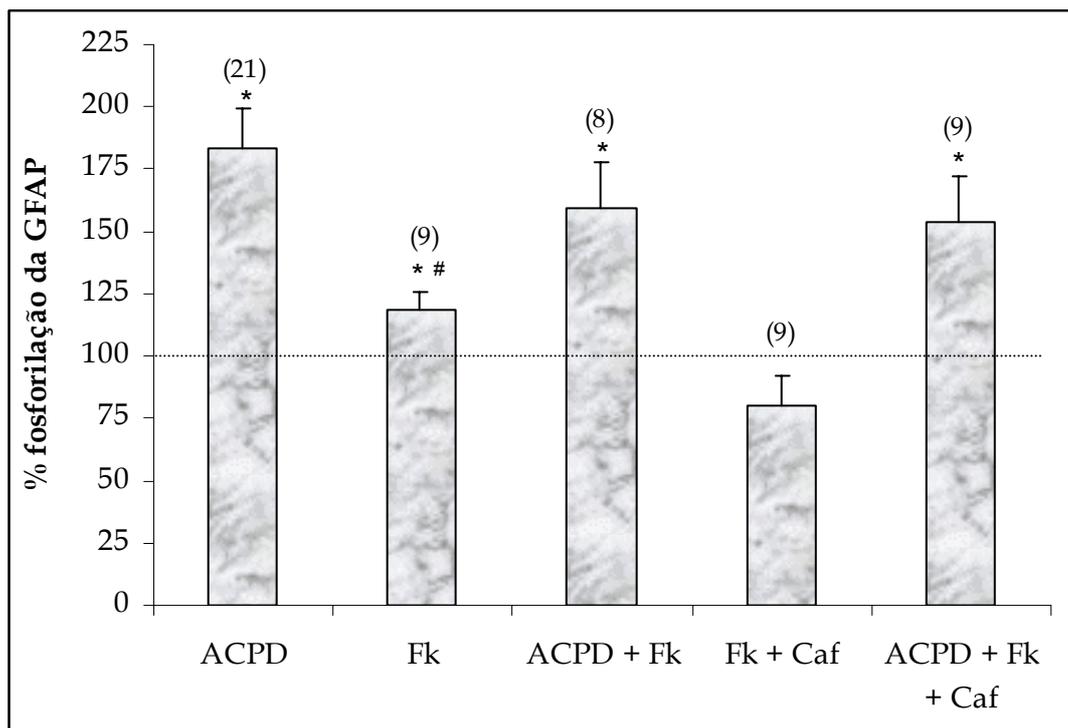


Figura 3. 18: Efeito da forskolina 30  $\mu$ M (Fk) sobre os efeitos da cafeína 10 mM (Caf) e do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M sobre a fosforilação da GFAP em fatias hipocâmpais de ratos jovens, comparado ao controle  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (100%). O número de determinações está entre parênteses.

\* Teste t pareado:  $p < 0,04$  em relação ao controle (100%).

# ANOVA:  $p < 0,05$  em relação ao 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M com e sem forskolina 30  $\mu$ M e/ou cafeína 10 mM.

#### 4. DISCUSSÃO

Muitos estudos envolvendo a diferenciação, o desenvolvimento e os processos plásticos dos astrócitos têm como alvo principal a proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Esta é uma proteína de filamento intermediário, sendo expressa no SNC exclusivamente em astrócitos. Sua caracterização está descrita no item 1.6 desta Dissertação.

Trabalhos anteriores mostraram uma grande variação regional no nível de fosforilação da GFAP e apontaram que em hipocampo esta proteína encontra-se mais fosforilada que em qualquer outra estrutura do SNC (Rodnight & Leal, 1990). Estudos relacionados com as propriedades do sistema fosforilante da GFAP mostraram que este é modulado de forma diferenciada de acordo com a localização regional e com o desenvolvimento. A análise comparativa entre o imunoconteúdo de GFAP e seu nível de fosforilação mostra que em corda espinhal a quantidade de GFAP imunodetectada é maior que àquela encontrada em hipocampo. Entretanto, em corda espinhal a quantidade de GFAP fosforilada é aproximadamente 2,5% da quantidade encontrada em hipocampo (Gonçalves & Rodnight, 1992), indicando que é incorreto correlacionar diretamente níveis de expressão com níveis de fosforilação. Além da variação regional, a GFAP possui variação ontogenética, apresentando níveis baixos nos primeiros dias de vida pós-natal, aumentando significativamente com o desenvolvimento (Nichols *et al.*, 1993). Em hipocampo de ratos a GFAP aparece fosforilada a partir do 9º dia pós-natal, tendo seu nível aumentado com o crescimento do animal, atingindo seu pico de fosforilação na idade adulta.

A partir destes dados e de outros trabalhos foram desenvolvidos vários estudos quanto ao sistema de fosforilação da GFAP presente em hipocampo.

Wofchuk & Rodnight (1994; 1995) mostraram que em fatias de hipocampo de animais jovens o nível de fosforilação da GFAP aumenta significativamente na presença de glutamato 1 mM, efeito mimetizado pelo agonista glutamatérgico metabotrópico 1S,3R-ACPD ou ainda pela ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (presença de EGTA 1 mM) e, por outro lado, em hipocampo de animais adultos a fosforilação da GFAP é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e não sofre estimulação na presença de glutamato ou de 1S,3R-ACPD. Estes resultados reforçam as evidências de que esta proteína é modulada ao longo do desenvolvimento.

Estudos indicam que, em hipocampo de ratos jovens, os efeitos do glutamato e da ausência de íons cálcio sobre a fosforilação da GFAP ocorrem por um mesmo mecanismo de ação, o qual pode envolver ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) e a posterior inibição da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais tipo L, impedindo que haja a desfosforilação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  associada à GFAP (Wofchuk & Rodnight, 1994; 1995; Rodnight *et al.*, 1997).

Kommers e colaboradores (1999) demonstraram que a estimulação da fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo de ratos jovens (P12-P16) ocorre via um mGluR de propriedades farmacológicas do grupo II (mGluR II), o qual está envolvido com o mecanismo de transdução de sinal via adenilato ciclase e não via hidrólise de fosfoinositídeos.

Com base nos dados citados anteriormente tornou-se importante caracterizar se a modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP envolve, além da reserva extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , as reservas intracelulares reguladas por receptores rianodina (RyRs). Estes receptores estão relacionados com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Chavis *et al.*, 1996). Esta possibilidade descarta o envolvimento de reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  associadas a inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) em função de que a modulação da fosforilação da GFAP por glutamato envolve um mGluR II.

#### **4.1. Papel das reservas intracelulares de Ca<sup>2+</sup> sobre a estimulação da fosforilação da GFAP causada pelo 1S,3R-ACPD em fatias hipocâmpais de ratos jovens**

O 1S,3R-ACPD tem sido largamente utilizado em estudos que objetivam avaliar as consequências da ativação de mGluRs devido a sua grande seletividade por estes receptores. Este agonista possui seletividade por mGluRs dos grupos I e II e sua concentração máxima efetiva em hipocampo é de 100 µM (Schoepp *et al.*, 1992; Wofchuk & Rodnight, 1994; Ozawa *et al.*, 1998).

É sabido que a estimulação da fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo de ratos jovens (P12-P16) ocorre via um mGluR de propriedades farmacológicas do grupo II (mGluR II) (Kommers *et al.*, 1999), o qual está envolvido com o mecanismo de transdução de sinal via adenilato ciclase e não via hidrólise de fosfoinosítídios. Portanto, utilizou-se o 1S,3R-ACPD como um controle positivo, uma vez que este agonista estimula significativamente o nível de fosforilação da GFAP via mGluR II no mesmo nível que o glutamato. E sobre este efeito observamos o papel dos agentes utilizados, de forma a avaliar a influência destes na estimulação da fosforilação da GFAP por ativação de mGluRs.

Os resultados obtidos com a cafeína nas concentrações utilizadas neste estudo (1 mM e 10 mM) estão de acordo com dados demonstrados na literatura, onde esta atua em diferentes sistemas de ação no SNC, de acordo com a concentração utilizada (Fredholm, 1995). Em concentrações elevadas, basicamente em torno de 10 mM, a cafeína atua estimulando receptores rianodina (RyRs) presentes nas reservas intracelulares de Ca<sup>2+</sup> reguladas por tais receptores. Em concentrações menores, a cafeína atua (em ordem decrescente) inibindo fosfodiesterases e antagonizando receptores de adenosina (AdoRs), especificamente o subtipo A<sub>2A</sub> (Daly, 2000) (Figura 4. 1). Outros efeitos da cafeína são: (1) inibir os sítios de ligação de

benzodiazepínicos em receptores GABA<sub>A</sub> (Nehlig *et al.*, 1992); (2) inibir a liberação de Ca<sup>2+</sup> via reservas associadas a receptores de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>Rs); (3) aumentar a captação de Ca<sup>2+</sup> para dentro das reservas associadas a IP<sub>3</sub>Rs; (4) inibir a formação de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e (5) inibir vários canais iônicos, incluindo canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L (Daly, 2000).

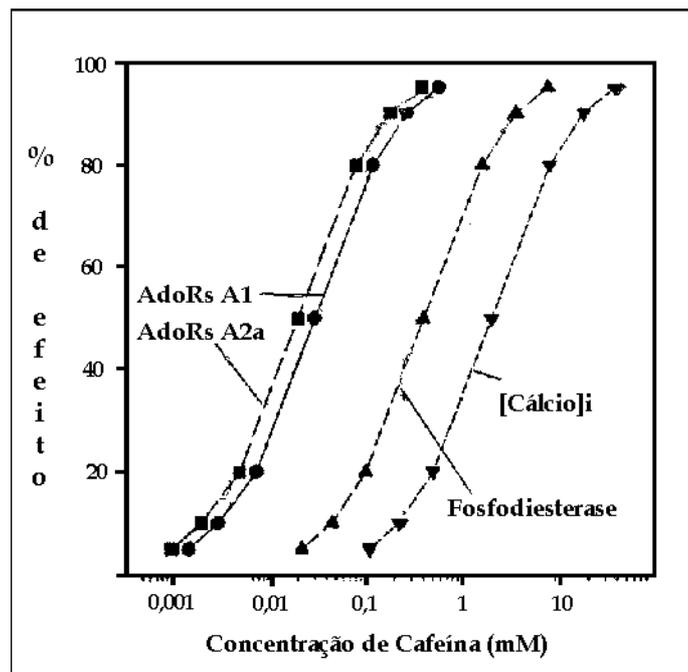


Figura 4. 1: Mecanismos de ação da cafeína. A cafeína atua, em ordem crescente de concentração, antagonizando receptores adenosina (AdoRs), inibindo fosfodiesterases e mobilizando cálcio intracelular. (Adaptado de Fredholm, 1995).

No presente trabalho mostramos que a cafeína, na concentração de 10 mM, reverteu totalmente o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M e reverteu parcialmente tal efeito na concentração de 1 mM. Estes resultados sugerem o envolvimento de reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$  reguladas por RyRs na modulação da fosforilação da GFAP via mGluRs em hipocampo de ratos jovens (Figura 3. 2), uma vez que na concentração de 10 mM a cafeína atua com aproximadamente 100% de efeito sobre RyRs, e na concentração de 1 mM atua parcialmente sobre estes receptores (aproximadamente 30%) (Figura 4. 1).

Para confirmar o envolvimento das reservas reguladas por RyRs na modulação da fosforilação da GFAP, utilizamos a rianodina nas concentrações de 10 nM, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. A rianodina é um agente específico dos RyRs e possui mecanismos de ação opostos, de acordo com a concentração utilizada: em baixas concentrações (em torno de nM) os estimula e em altas concentrações (em torno de  $\mu$ M) os inibe, modulando, desta maneira, a liberação ou não de  $Ca^{2+}$ , respectivamente (Simpson *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 1998). Em um conjunto de experimentos, observou-se que a rianodina reverteu totalmente o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP somente na concentração de 10 nM, justamente a concentração em que esta atua estimulando os RyRs liberando, desta forma,  $Ca^{2+}$  destas reservas (Figura 3. 4).

Como a cafeína atua sobre inúmeros sistemas, realizamos alguns experimentos para saber se o efeito obtido com este agente em reverter a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M era somente via RyRs. Para tanto, utilizamos o dantrolene na concentração de 50  $\mu$ M, o qual age como um antagonista seletivo de RyRs, inibindo assim a liberação de  $Ca^{2+}$  a partir destas reservas presentes nos retículos sarcoplasmático e endoplasmático (Wei & Perry, 1996). O dantrolene atua no mesmo sítio (RyRs) e de maneira contrária à cafeína; desta forma, realizamos

experimentos em que administrávamos num primeiro momento o dantrolene, para este ligar-se aos RyRs, após colocávamos a cafeína 10 mM (juntamente com o dantrolene) e, por fim, o 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M (juntamente com o dantrolene e a cafeína). Os resultados mostraram que o dantrolene, quando administrado simultaneamente com a cafeína e com o 1S,3R-ACPD, reverteu totalmente o efeito inibitório da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD, o que é observado na figura 3. 6. Estes resultados reforçam as evidências de que o efeito da cafeína é via RyRs e que o  $Ca^{2+}$  proveniente destas reservas modula o estado fosforilado/desfosforilado da GFAP.

Com o objetivo de verificar o envolvimento das bombas  $Ca^{2+}$ -ATPases (SERCAs), presentes nas reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$ , sobre a modulação da fosforilação da GFAP, utilizamos a tapsigargina. Este agente inibe as SERCAs presentes nos retículos sarcoplasmático e endoplasmático. Estas bombas seqüestram o  $Ca^{2+}$  citosólico às custas de 1 a 2 ATPs por íon transportado, auxiliando na manutenção da homeostase do  $Ca^{2+}$  (Simpson *et al.*, 1998). Observa-se pela análise da figura 3. 8 que a tapsigargina na concentração de 10  $\mu$ M reverteu totalmente o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M sobre a fosforilação da GFAP. Na concentração de 1  $\mu$ M, a tapsigargina não alterou o efeito do agonista, indicando uma ação dose-dependente para este agente. Como o efeito final da tapsigargina é o mesmo da cafeína, ou seja, aumentar a concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico por estimular sua liberação ou por inibir sua captação, respectivamente, confirma-se novamente o envolvimento do  $Ca^{2+}$ , proveniente das reservas intracelulares, na modulação da fosforilação da GFAP por ativação de mGluRs.

Uma hipótese proposta pelo nosso grupo de pesquisa é que a ativação de mGluRs inibe, de alguma forma, a entrada de  $Ca^{2+}$  na célula através de canais tipo L, impedindo que ocorra a desfosforilação dependente de  $Ca^{2+}$  associada à GFAP (Rodnight *et al.*, 1997). Como a liberação de  $Ca^{2+}$  proveniente

das reservas intracelulares reverte o efeito do 1S,3R-ACPD em estimular a fosforilação da GFAP via mGluRs, talvez o íon cálcio, independente da sua origem, atue sempre ativando o mecanismo de desfosforilação, via calcineurina, associado à GFAP. É importante salientar que os RyRs, presentes nas reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por rianodina, estão relacionados com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Chavis *et al.*, 1996), tornando cruciais os resultados obtidos neste estudo, os quais mostram o envolvimento de tais receptores na estimulação da fosforilação da GFAP via mGluRs.

Mesmo sabendo que o mGluR que está envolvido com a modulação da fosforilação da GFAP seja do grupo II (Kommers *et al.*, 1999), não se pode excluir o envolvimento de  $\text{IP}_3\text{Rs}$  neste mecanismo, uma vez que na literatura ainda permanece a dúvida de que estes receptores possam estar relacionados regional e funcionalmente aos RyRs, estando presentes na mesma reserva associada ao retículo endoplasmático (Simpson *et al.*, 1995).

Uma hipótese a ser discutida a respeito dos resultados abordados neste item é a de que exista uma associação física entre mGluRs e as reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (reguladas por RyRs ou associadas a  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) dentro da célula. Esta associação física pode ser desempenhada pelas proteínas “Homer”, as quais formam uma ponte entre estes dois sítios (Fagni *et al.*, 2000). Como é pouco sabido sobre as funções fisiológicas das proteínas “Homer”, esta hipótese ainda permanece a ser estudada.

Todos os resultados discutidos neste item confirmam o envolvimento das reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  no mecanismo de modulação do estado fosforilado/desfosforilado da GFAP por ativação de mGluRs em hipocampo de ratos jovens.

#### **4.2. Efeito de íons $\text{Ca}^{2+}$ sobre a modulação da fosforilação da GFAP em fatias hipocâmpais de ratos jovens**

Como mostrado no item 4. 1, o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado das reservas intracelulares possui uma evidente participação na modulação da fosforilação da GFAP por agonistas glutamatérgicos metabotrópicos. Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa descritos anteriormente indicam que em animais jovens o  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do espaço extracelular diminui o nível de fosforilação da GFAP enquanto que em animais adultos este efeito não só desaparece como a fosforilação da GFAP torna-se totalmente dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wofchuk & Rodnight, 1994; 1995). Com base nestes dados, de aumento da fosforilação da GFAP por glutamato e agonistas metabotrópicos e na hipótese proposta por Rodnight e colaboradores (1997) sobre o mecanismo de ação do  $\text{Ca}^{2+}$  externo sobre a modulação do estado fosforilado/desfosforilado da GFAP, tornou-se importante avaliar o papel do íon cálcio oriundo de diferentes populações, bem como o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre no mecanismo modulatório da fosforilação da GFAP.

Utilizamos primeiramente EGTA 1 mM (ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo), o qual reproduziu seu efeito em estimular significativamente a fosforilação da GFAP, no mesmo nível que o glutamato e que o agonista glutamatérgico metabotrópico 1S,3R-ACPD (Wofchuk & Rodnight, 1994; 1995). Como a cafeína 10 mM reverteu totalmente o efeito do agonista 1S,3R-ACPD (item 4. 1) e, provavelmente, a situação de ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo e de presença de glutamato (ou de 1S,3R-ACPD) ocorram pelo mesmo mecanismo (Rodnight *et al.*, 1997), administramos a cafeína juntamente com o EGTA. Observa-se pela análise da figura 3. 10 que a cafeína reverteu parcialmente o efeito de ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (presença de EGTA), diferente do observado com o 1S,3R-ACPD, onde a reversão foi total. Possivelmente, o efeito da cafeína em estimular receptores rianodina (RyRs) das reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por tais receptores seja dependente de cálcio extracelular. Esta

interpretação é possível uma vez que é citado na literatura que o efeito da cafeína sobre RyRs depende da concentração de íons cálcio nos espaços intra- e extracelulares (Nehlig, 1992) e envolve o mecanismo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) (Simpson *et al.*, 1995; Daly, 2000). Talvez com a situação de ausência total de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (presença de EGTA 1 mM) a cafeína seja incapaz de promover o seu efeito.

Em um segundo momento, analisamos uma situação contrária da observada anteriormente, em que utilizamos um agonista de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, o Bay K 8644, o qual age de maneira dose dependente sobre tais canais (Barger, 1999). Este agonista não alterou o efeito estimulatório do agonista 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$  sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens em nenhuma das concentrações testadas (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$ ), nem mesmo na concentração em que este atua com efeito máximo (300  $\mu\text{M}$ ) (Figura 3. 12). Como o 1S,3R-ACPD age, provavelmente, inibindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais tipo L e, conseqüentemente, aumentando o nível de fosforilação da GFAP, era esperada uma reversão do efeito do 1S,3R-ACPD pelo Bay K 8644. Entretanto, pode-se sugerir que o 1S,3R-ACPD seja muito potente em bloquear a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais tipo L, até mesmo estando na presença de um agonista destes canais, uma vez que a concentração utilizada de 1S,3R-ACPD (100  $\mu\text{M}$ ) é a concentração máxima efetiva deste agonista sobre mGluRs em hipocampo (Schoepp *et al.*, 1992; Wofchuk & Rodnight, 1994).

Para avaliar o envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre no efeito inibitório da cafeína 10 mM sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$  em fatias hipocâmpais de ratos jovens, utilizamos um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, o BAPTA-AM, juntamente com a cafeína e o 1S,3R-ACPD. O BAPTA-AM em concentrações  $\mu\text{M}$  quela efetivamente o  $\text{Ca}^{2+}$  existente dentro da célula (Lee *et al.*, 2000). Observa-se pela análise da figura 3. 14 que o BAPTA-AM nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  não altera o efeito do

1S,3R-ACPD em estimular a fosforilação da GFAP, entretanto, reverte o efeito inibitório da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da proteína induzida pelo agonista glutamatérgico. Pode-se confirmar com estes dados que o efeito observado com a cafeína sobre a modulação da fosforilação da GFAP via mGluRs é mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas reguladas por RyRs e, provavelmente, este  $\text{Ca}^{2+}$  esteja atuando de maneira semelhante ao íon cálcio proveniente do espaço extracelular; isto é, desencadeando a cascata de desfosforilação (via ativação da calcineurina) associada à GFAP (Rodnight *et al.*, 1997).

#### **4.3. Envolvimento de receptores adenosina (AdoRs) e de AMP cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) no efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD sobre a fosforilação da GFAP em fatias hipocâmpais de ratos jovens**

Em função dos resultados obtidos com a cafeína e sabendo-se que esta atua também como antagonista de AdoRs, basicamente do subtipo  $A_{2A}$ , o qual estimula a enzima adenilato ciclase (Daly, 2000), estudamos neste conjunto de experimentos os efeitos da enzima adenosina deaminase (ADA) e da forskolina sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD em hipocampo de ratos jovens. A ADA é uma enzima que metaboliza a adenosina endógena, retirando, desta forma, o agonista intracelular dos AdoRs. A forskolina, por sua vez, estimula a enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis intracelulares de  $\text{AMP}_c$ .

Pela análise das figuras 3. 16 e 3. 18 observa-se que tanto a ADA quanto a forskolina, aumentaram significativamente o nível de fosforilação da GFAP quando administradas sozinhas, nas concentrações de 1 unidade/mL e 30  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estes dados sugerem o envolvimento do  $\text{AMP}_c$  na modulação da fosforilação da GFAP, entretanto, os resultados são

preliminares e indicam efeitos antagônicos, uma vez que a presença da ADA não alteraria os níveis de AMP<sub>c</sub> e a forskolina aumentaria tais níveis.

Quando estes dois agentes (ADA e forskolina) eram administrados juntamente com 1S,3R-ACPD 100 μM, nenhum destes alterou o nível de fosforilação da GFAP obtido com o agonista glutamatérgico, indicando que o efeito do 1S,3R-ACPD sobre mGluRs em relação à modulação da fosforilação da GFAP não envolve AMP<sub>c</sub>.

Um dado interessante é que quando a forskolina foi administrada simultaneamente com a cafeína 10 mM e com o 1S,3R-ACPD, esta reverteu o efeito inibitório da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo agonista glutamatérgico (Figura 3. 18). Isto sugere um possível envolvimento de AdoRs e de AMP<sub>c</sub> no efeito da cafeína sobre a modulação da fosforilação da GFAP via mGluRs. É sabido que, em ratos jovens, mGluRs aumentam a formação de AMP<sub>c</sub> potenciando o efeito de outros receptores, como os AdoRs e, provavelmente, isto é mediado por mGluRs do grupo II (Schoepp & Johnson, 1993; Winder & Conn, 1996), justamente o tipo de receptor metabotrópico associado com a modulação da fosforilação da GFAP (Kommers *et al.*, 1999).

## 5. CONCLUSÕES

- O agonista glutamatérgico metabotrópico 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M reproduziu dados prévios estimulando significativamente o nível de fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em fatias de hipocampo de ratos jovens;
- A cafeína, quando administrada na presença do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M, reverteu totalmente o efeito estimulatório do agonista sobre a fosforilação da GFAP na concentração de 10 mM e parcialmente na concentração de 1 mM, provavelmente por liberar íons cálcio das reservas intracelulares reguladas por receptores rianodina (RyRs);
- A rianodina reverteu totalmente o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M sobre a fosforilação da GFAP somente na concentração de 10 nM, justamente a concentração em que esta atua como agonista dos RyRs, liberando  $\text{Ca}^{2+}$  destas reservas intracelulares;
- O dantrolene 50  $\mu$ M, quando administrado simultaneamente com a cafeína 10 mM e com o 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M, reverteu totalmente o efeito inibitório da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD, reforçando as evidências do envolvimento das reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reguladas por RyRs;
- A taspigargina, na concentração de 10  $\mu$ M, reverteu totalmente o efeito estimulatório do 1S,3R-ACPD 100  $\mu$ M sobre a fosforilação da GFAP, indicando novamente o envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no mecanismo modulatório do estado fosforilado/desfosforilado da proteína;

- O efeito estimulatório da ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (presença de EGTA 1 mM) sobre a fosforilação da GFAP foi parcialmente revertido por cafeína 10 mM, diferentemente do observado com o 1S,3R-ACPD, onde obtivemos reversão total;
- A estimulação da fosforilação da GFAP induzida por 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$  não foi alterada pelo agonista de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K 8644, sugerindo que o 1S,3R-ACPD esteja agindo com efeito máximo na concentração utilizada ou seu efeito em bloquear a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais tipo L seja muito potente e se sobreponha àquele do Bay K 8644;
- O quelante intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , BAPTA-AM, nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , não alterou o nível de fosforilação da GFAP quando administrado sozinho e também quando administrado na presença do 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$ ; entretanto, na concentração de 50  $\mu\text{M}$  o BAPTA-AM reverteu o efeito inibitório da cafeína sobre a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD, indicando que o efeito da cafeína sobre a modulação do estado fosforilado/desfosforilado da GFAP via mGluRs envolve mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas reguladas por RyRs;
- Resultados preliminares sobre o envolvimento de receptores adenosina (AdoRs) e dos níveis de AMP cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) sobre a fosforilação da GFAP mostraram que a adenosina deaminase (1 unidade/mL) e a forskolina (30 $\mu\text{M}$ ) aumentaram significativamente o nível de fosforilação da GFAP quando administradas sozinhas, nível este menor do que àquele obtido com o 1S,3R-ACPD; porém, na presença deste agonista glutamatérgico nenhum dos dois agentes alterou o nível de estimulação da fosforilação da proteína;

- A forskolina 30  $\mu\text{M}$ , quando administrada juntamente com a cafeína 10 mM e com o 1S,3R-ACPD 100  $\mu\text{M}$ , reverteu a ação inibitória da cafeína sobre o efeito estimulatório do agonista glutamatérgico; isto sugere que parte do efeito da cafeína em reverter a estimulação da fosforilação da GFAP induzida pelo 1S,3R-ACPD envolva  $\text{AMP}_c$ , uma vez que a cafeína altera os níveis intracelulares deste segundo mensageiro por inibir AdoRs do tipo  $A_{2A}$ .

## 6. CONCLUSÃO FINAL

O  $\text{Ca}^{2+}$ , independente da sua origem, está envolvido com o mecanismo de transdução de sinal que modula o estado de fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) mediado pela ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs). Neste estudo observou-se uma evidente participação do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente das reservas intracelulares reguladas por receptores rianodina (RyRs) no mecanismo modulatório da fosforilação da GFAP via ativação de mGluRs em fatias de hipocampo de ratos jovens. Talvez o  $\text{Ca}^{2+}$  oriundo destas reservas tenha o mesmo papel do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do espaço extracelular, ou seja, desencadeie uma cascata de desfosforilação associada à GFAP mediada pela calcineurina, uma vez que quelando o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre após uma mobilização das reservas reguladas por RyRs tal efeito não ocorre.

A participação de receptores adenosina (AdoRs) e do AMP cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) ainda permanece a ser estudado. Neste trabalho mostrou-se justamente o possível envolvimento de tais mecanismos de transdução de sinal na modulação da fosforilação da GFAP.

## 7. CONSIDERAÇÃO FINAL

Este trabalho faz parte de uma longa história a respeito da fosforilação de proteínas no Sistema Nervoso Central (SNC) e, mais especificamente, da fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Foi baseado em resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa que, ao longo de alguns anos, demonstrou vários aspectos funcionais e farmacológicos sobre o mecanismo modulatório da fosforilação da GFAP em diferentes estruturas do SNC e, também, de outras proteínas cerebrais. O principal enfoque deste estudo consistiu em avaliar o envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente tanto das reservas intracelulares reguladas por receptores rianodina (RyRs) quanto da reserva extracelular sobre a modulação da fosforilação de GFAP em fatias de hipocampo de ratos jovens. Nossos resultados mostram que a fosforilação da GFAP sofre uma semelhante modulação pelo  $\text{Ca}^{2+}$  liberado das reservas intracelulares e pelo  $\text{Ca}^{2+}$  oriundo do espaço extracelular. Esta modulação é específica sobre a ação de agonistas glutamatérgicos metabotrópicos estimulando os respectivos receptores. Além disso, outros mecanismos de transdução de sinal estão envolvidos na regulação do estado fosforilado/desfosforilado da GFAP, como os receptores adenosina e o AMP cíclico. Estes dados, associados a resultados anteriores, permitirão uma explanação mais detalhada do perfil de fosforilação da GFAP, assim como verificar as funções exercidas por esta proteína no SNC.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; SUGIHARA, H.; NAWA, H.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N. and NAKANISHI, S. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *Journal Biological Chemistry*, 267: 13361-13368, 1992.
- ADAMS, J. P.; ROBERSON, E. D.; ENGLISH, J. D.; SELCHER, J. C. and SWEATT, J. D. MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. *Acta Experimental Neurobiology*, 60(3): 377-394, 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WATSON, J. D. In: *Molecular Biology of the Cell* ed. by B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, Garland Publishing, Inc. New York, 1994.
- ATTWELL, D. Glia and neurons in dialogue. *Nature*, 369: 707-708, 1994.
- BARGER, S.W. Complex influence of the L-type calcium-channel agonist Bay K 8644(±) on N-methyl-D-aspartate responses and neuronal survival. *Neuroscience*, 89(1): 101-108, 1999.
- BASKYS, A. Metabotropic receptors and 'slow' excitatory actions of glutamate agonists in the hippocampus. *Trends in Neurochemical Science*, 15(3): 92-96, 1992.
- BERRIDGE, M. J. and IRVINE, R. F. Inositol phosphate and cell signaling. *Nature*, 341: 315-325, 1989.
- BIANCHIN, M. M.; DA SILVA, R. C. R.; SCHIMITZ, P. K. P.; MEDINA, J. H. and IZQUIERDO, I. I. Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behavioural Pharmacology*, 5: 356-359, 1994.
- BRONSTEIN, J. M.; FARBER, D. B. and WASTERLANIN, C. G. Regulation of type II calmodulin kinase: Functional implications. *Brain Research Reviews*, 18: 135-147, 1993.
- BRUNO, V.; BONANNO, L.; KNOEPFEL, T.; KUHN, R.; ROBERTS, P. J. and NICOLETTI, F. Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures. *European Journal of Pharmacology*, 310: 61-66, 1996.

- CARMIGNOTO, G. Reciprocal communication system between astrocytes and neurones. *Progress in Neurobiology*, 62: 561-581, 2000.
- CARMIGNOTO, G.; PASTI, L. and POZZAN, T. On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes *in situ*. *Journal of Neuroscience*, 18: 4637-4645, 1998.
- CATTABENI, F. Protein kinase C in synaptic plasticity: a molecular target of cognitive disorders. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 8(suppl 1): 6-11, 1997.
- CHARLES, A. C.; MERRILL, J. E.; DIRKSEN, E. R. and SANDERSON, M. J. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, 6: 983-992, 1991.
- CHAVIS, P.; FAGNI, L.; LANSMAN, J. B. and BOCKAERT, J. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature*, 382: 719-722, 1996.
- CHEN, W. J.; MARTIN, B. L. and BRAUTIGAN, D. L. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*, 257: 1261-1264, 1992.
- CHOI, D. W.; MAULUCCI-GEDDE, M. and KRIEGSTEIN, A. R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Journal of Neuroscience*, 7: 357-368, 1987.
- CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. *Cell*, 80: 259-268, 1995.
- COHEN, P.; HOLMES, C. F. B. and TSUKITANI, Y. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Letters*, 250: 590-600, 1989.
- COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends in Biochemical Science*, 17: 408-413, 1992.
- COHEN, P. Important roles for novel protein phosphatases dephosphorylating serine and threonine residues. *Biochemistry Society*, 21(4): 884-888, 1993.

- COLLINGRIDGE, G. L. and WATKINS, J. C. *The NMDA receptor*, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, Oxford University Press, pp 1-30, 1994.
- CONN, P. J. and PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 37: 205-237, 1997.
- CONTI, F.; DEBIASI, S.; MINELLI, A. and MELONE, M. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia*, 17: 254-258, 1996.
- CONTI, F.; MINELLI, A.; DEBIASI, S. and MELONE, M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Molecular Neurobiology*, 14(1-2): 1-18, 1997.
- CONTI, F.; BARBARESI, P.; MELONE, M. and DUCATI, A. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in human cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 9: 110-120, 1999.
- CORNELL-BELL, A. H.; FINKBEINER, S. M.; COOPER, M. S. and SMITH, S. J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247: 470-473, 1990.
- COTMAN, C. W.; KAHLE, J. S.; MILLER, S. E.; ULAS, J. and BRIDGES, R. J. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacology*, ch7: 75-85, 1995.
- DALY, J. W. Alkylxanthines as research tools. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81: 44-52, 2000.
- DUVOISIN, R. M.; ZHANG, C. and RAMONELL, K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *Journal Neuroscience*, 15: 3075-3083, 1995.
- ERIKSSON, J. E.; OPAL, P. and GOLDMAN, R. D. Intermediate filament dynamics. *Current Opinion Cell Biology*, 4: 99-104, 1992.
- ENG, L. F. and GHIRNIKAR, R. S. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology*, 4: 229-237, 1994.
- ENG, L. F.; YU, A. C. H. and LEE, Y. L. Astrocytic response to injury. *Progress in Brain Research*, 94: 353-365, 1992.

- FAGNI, L.; CHAVIS, P.; ANGO, F. and BOCKAERT, J. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends in Neuroscience*, 23: 80-88, 2000.
- FEINSTEIN, D. L.; WEINMASTER, G. A. and MILNER, R. J. Isolation of cDNA clones encoding glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. *Journal of Neuroscience Research*, 32: 1-14, 1992.
- FREDHOLM, B. B. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacology & Toxicology*, 76: 93-101, 1995.
- FUCHS, E. and WEBER, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 63: 345-382, 1994.
- GIRAULT, J. A.; HEMMING, H. C.; WILLIAMS, K. R.; NAIRN, A. C. and GREENGARD, P. Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 25; 264(36): 21748-21759, 1989.
- GIULIAN, D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia*, 7: 102-110, 1993.
- GIULIAN, D.; YOUNG, D. G.; WOODWARD, J.; BROWN, D. C. and LACHMAN, L. B. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in developing brain. *The Journal of Neuroscience*, 8: 709-714, 1988.
- GONÇALVES, C. A.; SALBEGO, C.; WOFCHUK, S.; ROCHA, E. and RODNIGHT, R. Properties of a protein phosphorylating system that labels a 47 KDa phosphoprotein (ppH-47) in slices of rat hippocampus. *Neuroscience Research Communications*, 6(3): 129-133, 1990.
- GONÇALVES, C. A. and RODNIGHT, R. Apparent identity of ppH-47, a protein highly phosphorylated in the hippocampus, with a form of Glial Fibrillary Acidic Protein. *Neuroscience Research Communications*, 11(2): 109-117, 1992.
- GOTTLIEB, M. and MATUTE, C. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17: 290-300, 1997.
- GREENGARD, P. Neuronal phosphoproteins: Mediators of signal transduction. *Molecular Neurobiology*, 1: 81-118, 1987.

- HANSSON, E. and RÖNNBÄCK, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *The FASEB Journal*, 9: 343-350, 1995.
- HOLLMANN, M. and HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 7: 31-108, 1994.
- HONKANEN, R. E.; ZWILLER, J.; DAILY, S. L.; KHATRA, B. S.; DUKELOW, M. and BOYNTON, A. L. Identification, purification, and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase from bovine brain. *Journal of Biological Chemistry* 5; 266(10): 6614-6619, 1991.
- HOUAMED, K. M.; KUIJPER, J. L.; GILBERT, T. L.; HALDEMAN, P. J.; O'HARA, P. J.; MULVIHILL, E. R.; ALMERS, W. and HAGEN, F. S. Cloning, expression, and gene structure of G protein-coupled glutamate receptor from brain. *Science*, 252: 1318-1321, 1991.
- HUBBARD, M. and COHEN, P. On the target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 18: 172-177, 1993.
- HUI, A.; ELLINOR, P. T.; KRIZANOVA, O.; WANG, J. J.; DIEBOLD, R. J. and SCWARTZ, A. Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the  $\alpha 1$  subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron*, 7: 35-44, 1991.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80: 225-236, 1995.
- INAGAKI, N.; ITO, M.; NAKANO, T. and INAGAKI, M. Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends in Biochemical Science*, 19: 448-452, 1994a.
- INAGAKI, M.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T. and INAGAKI, N. Glial fibrillary acidic protein: Dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathology*, 4: 239-243, 1994b.
- INAGAKI, M.; MATSUOKA, Y.; TSUJIMURA, K.; ANDO, S.; TOKUI, T.; TAKAHASHI, T. and NAOYUKI, I. Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. *BioEssays*, 18(6): 481-487, 1996.
- IZQUIERDO, I. I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB Journal*, 8: 1139-1145, 1994.

- IZQUIERDO, I. I. and MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology Learn and Memory*, 68: 285-316, 1997.
- JACOBSON, M. Neuroglial Ontogeny. In: *Developmental Neurobiology*, 3<sup>rd</sup>, Plenum Press, New York, 1991.
- JIA, Z. Protein phosphatases: structures and implications. *Biochemistry Cell Biology*, 75: 17-26, 1997.
- JUANG, R.H.; CHANG, Y. D. SUNG, H. and SU, J. C. Oven-drying method for polyacrilamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Analytical Biochemistry*, 141: 348-350, 1984.
- KILMELBERG, H. K. *Glial Cell Receptors*, Raven, New York, 1988.
- KILMEBERG, H. K. and NORENBERG, M. D. Astrocytes. *Scientific American*, 4: 66-76, 1989.
- KILMEBERG, H. K.; SANKAR, P.; O'CONNOR, JALONEN, T. and GODERIE, S. K. Functional consequences of astrocytic swelling. *Progress in Brain Research*, 94: 57-68, 1992.
- KOMMERS, T.; RODNIGHT, R.; OPPELT, D.; OLIVEIRA, D. and WOFCHUK, S. The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor. *NeuroReport*, 10: 2119-2123, 1999.
- LEAL, R. B.; Estudo do sistema fosforilante da ppH47/GFAP em cérebro de ratos: distribuição regional das quinases envolvidas e mapeamento fosfopeptídico. Tese Ph.D., Universidade Federal do Paraná, 1995.
- LEE, Y. B.; DU, S.; RHIM, H.; LEE, E. B.; MARKELONIS, G. J. and OH, T. H. Rapid increase in immunoreactivity to GFAP in astrocytes *in vitro* induced by acidic pH is mediated by calcium influx and calpain I. *Brain Research*, 864: 220-229, 2000.
- MAGISTRETTI, P. J.; HOF, P. R. and MARTIN, J-L. Adenosine stimulates glycogenolysis in mouse cerebral cortex: a possible coupling mechanism between neuronal activity and energy metabolism. *The Journal of Neuroscience*, 6: 2558-2562, 1986.

- MACKINTOSH, C. and MACKINTOSH, R. W. Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends in Biochemical Science*, 19: 444-448, 1994.
- MASU, M.; YASUTO, T.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R. and NAKANISHI, S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 349: 760-765, 1991.
- McDONALD, J. W. and JOHNSTON, M. V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Progress in Neurobiology*, 28: 197-276, 1990.
- MELDRUM, B. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*, 130: 1007-1015, 2000.
- MORI, F.; FUKAYA, M.; ABE, H.; WAKABAYASHI, K. and WATANABE, M. Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neuroscience Letters*, 285: 57-60, 2000.
- MULKEY, R. M.; ENDO, S.; SHENOLIKAR, S. and MALENKA, R. C. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369: 453-508, 1994.
- NAIRN, A. C. and SHENOLIKAR, S. The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. *Current Opinion in Neurobiology*, 2: 296-301, 1992.
- NAKAJIMA, Y.; IWAKABE, H.; AKAZAWA, C.; NAWA, H.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N. and NAKANISHI, S. Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutanoic acid. *Journal Biological Chemistry*, 268: 11868-11867, 1993.
- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions. *Science* 258: 597-603, 1992.
- NEHLIG, A.; DAVAL, J-L. and DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17: 139-170, 1992.
- NEKI, A.; OHISHI, H.; KANEKO, T.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S. and MIZUNO, N. Pre- postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neuroscience Letters*, 202: 197-200, 1996.

- NESTLER, E. J. and GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. In: *Basic Neurochemistry*, ed. by Siegel, G.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B., Raven Press, New York, 1994.
- NICHOLS, N. R.; DAY, J. R.; LAPING, N. J.; JOHNSON, S. A. and FINCH, C. E. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of Aging*, 14: 421-429, 1993.
- NICHOLS, R. A.; SIHRA, T. S.; CZERNIK, A. J.; NAIRN, A. C. and GREENGARD, P. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. *Nature*, 343: 647-651, 1990.
- NICOLETTI, F.; BRUNO, V.; CATANIA, M. V.; BATTAGLIA, G.; COPANI, A.; BARBAGALLO, G.; CENA, V.; SANCHEZ-PRIETO, J.; SPANO, P. F. and PIZZI, M. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology*, 38(10): 1477-1484, 1999.
- NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annual Review Biochemistry*, 58: 31-48, 1989.
- NIXON, R. A. and SIHAG, R. K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends in Neurochemical Science*, 14(11): 501-506, 1991.
- O'CALLAGHAN, J. P. A potential role for altered protein phosphorylation in the mediation of developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 15(1): 29-40, 1994.
- O'FARREL, P. Z.; GOODMAN, H. M. and OFARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12: 1133-1142, 1977.
- OHISHI, H.; OGAWA-MEGURO, R.; SHIGEMOTO, R.; KANEKO, T.; NAKANISHI, S. and MIZUNO, N. Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, in rat cerebellar cortex. *Neuron*, 13: 55-66, 1994.
- OKAMOTO, N.; HORI, S.; AKAZAWA, C.; HAYASHI, Y.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N. and NAKANISHI, S. Molecular characterization of a new metabotropic receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP transduction. *Journal Biological Chemistry*, 269: 1231-1236, 1994.

- OZAWA, S.; KAMIYA, H. and TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54: 581-618, 1998.
- PASQUALOTTO, B. A. and SHAW, C. A. Regulation of ionotropic receptors by protein phosphorylation. *Biochemical Pharmacology*, 51: 1417-1425, 1996.
- PASTI, L.; POZZAN, T. and CARMIGNOTO, G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurones and astrocytes *in situ*. *Journal of Neuroscience*, 17: 7817-7830, 1997.
- PIN, J. P. and DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34: 1-26, 1995.
- POPE, A. Neuroglia: quantitative aspects. In: *Dynamic Properties of Glia Cells* (Schoffeniels, E.; Franck, G.; Hertz, L. and Tower, D. B.; eds) Pergamond, London pp.13-20, 1978.
- PORTER, J. T. and McCARTHY, K. D. GFAP-positive hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamatergic neuroligands with increases in  $[Ca^{2+}]_i$ . *Glia*, 3: 101-112, 1995.
- POZZAN, T.; RIZZUTO, R.; VOLPE, P. and MELDOLESI, J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiology Review*, 74: 595-636, 1994.
- PRADO, W. A. . Involvement of calcium in pain and antinociception. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 449-461, 2001.
- RAINE, C. S. Neurocellular anatomy. In: *Basic Neurochemistry*, ed. by G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, P. B. Molinoff, Chapter 1, pp. 3-32, Raven Press, New York, 1993.
- RAKIC, P. and KOMURO, H. The role of receptor/channel activity in neuronal migration. *Journal Neurobiology*, 26: 299-315, 1995.
- RÉCASENS, M. and VIGNES, M. Excitatory amino acid metabotropic receptor subtypes and calcium regulation. *Annals New York Academy of Sciences*, 418-429, 1994.

- RIZZUTO, R.; BRINI, M.; MURGIA, M. and POZAN, T. Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262: 744-747, 1993.
- RODNIGHT, R.; ZAMANI, R. and TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two dimensional electrophoresis. *Journal of Neuroscience Methods*, 24: 27-38, 1988.
- RODNIGHT, R. and LEAL, R. B. Regional variations in protein phosphorylating activity in rat brain studied in micro-slices labeled with [ $^{32}\text{P}$ ]phosphate. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2: 115-122, 1990.
- RODNIGHT, R. and WOFCHUK, S. T. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. *Essays in Biochemistry*, 27: 91-100, 1992.
- RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S. and LEAL, R. Control of the phosphorylation of astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 325-338, 1997.
- ROMANO, C.; SESMA, M.; McDONALD, C.; O'MALLEY, A.; VAN DEN POL, A. and OLNEY, J. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 355: 455-469, 1995.
- SAUGSTAD, J. A.; KINZIE, J. M.; MULVIHILL, E. R.; SEGERSON, T. P. and WESTBROOK, G. L. Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-fosfanobutírico acidi-sensitive class of metabotropic receptors. *Molecular Pharmacology*, 45: 367-372, 1994.
- SCHLICHTER D. J., DETRE, J. A., ASWAD, D. W., CHEHRAZI, B., GREENGARD, P. Localization of  $\gamma$ -GMP dependent protein kinase and substrate in cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 77: 5537-5541, 1980.
- SCHOEPP, D.; JOHNSON, B. and MONN, J. Inhibition of cyclic AMP formation by selective metabotropic glutamate receptor agonist. *Journal of Neurochemistry*, 58: 1184-1186, 1992.
- SCHOEPP, D. and CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors in brain: function and pathology. *Trends in Pharmacology Science*, 14: 13-20, 1993.

- SCHOEPP, D. and JOHNSON, B. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. *Neurochemistry International*, 22(3): 277-283, 1993.
- SCHOEPP, D. Novel functions for subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neurochemistry International*, 24(5): 439- 449,1994.
- SCHOEPP, D. D.; JOHNSON, B. G.; SALHOFF, C. R.; WRIGHT, R.A.; GOLDSWORTHY, J. S. and BAKER, S.R. Second-messenger responses in brain slices to elucidate to novel glutamate receptors. *Journal Neuroscience Methods*, 59: 105-110, 1995.
- SCHULMAN, H. Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(3): 375-381, 1995.
- SEEBURG, P. H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacology Science*, 16: 359-365, 1993.
- SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A. and MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122(1): 1-29, 2001.
- SERRANO, L.; HERNANDEZ, M. A.; DIAZ-NIDO, J. and AVILA, J. Association of casein kinase II with microtubules. *Experimental Cell Research* 181(1): 263-272, 1989.
- SHAO, Y.; ENKVIST, K. and McCARTHY, K. D. Glutamate blocks astroglial stellation: effect of glutamate uptake and volume changes. *Glia*, 11: 1-10, 1994.
- SIM, A. T. The regulation and function of protein phosphatases in the brain. *Molecular Neurobiology*, 5(2-4): 229-246, 1994.
- SIMPSON, P. B.; CHALLISS, R. A. J. and NAHORSKI, S. R. Neuronal Ca<sup>2+</sup> stores: activation and function. *Trends in Neuroscience*, 18: 299-306, 1995.
- SIMPSON, P. B.; HOLTZCLAW, L. A.; LANGLEY, D. V. and RUSSELL, J. T. Characterization of ryanodine receptors in oligodendrocytes, type 2 astrocytes, and O-2A progenitors. *Journal of Neuroscience Research*, 52: 468-482, 1998.

- SLADDECZEK, F.; PIN, J. P., RÉCASSENS, M.; BOCKAERT, J. and WEISS, S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, 317: 717-719, 1985.
- SMITH, S. J. Neuromodulatory astrocytes. *Curr. Biology*, 4: 807-810, 1994.
- SORRENTINO V. and VOLPE, P. Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends in Pharmacology Science*, 14: 98-102, 1993.
- STEINERT, P. M. and ROOP, D. R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual Review of Biochemistry*, 57: 593-625, 1988.
- STOCKLI, K. A.; LOTTSPREICH, F.; SENDTNER, M.; MASIAKOWSKI, P.; CAROLL, P.; GOTZ, R.; LINDHOLM, D. and THOENEN, H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature*, 342: 920-923, 1989.
- STRACK, S.; WADZINSKY, B. E. and EBNER, F. F. Localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the hinbrain and spinalcord of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 375: 66-76, 1996.
- SWANSON, G. T.; FELDMEYER, D.; KANEDA, M. and CULL-CANDY, S. G. Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *Journal of Physiology* 1; 492 (Pt 1): 129-142, 1996.
- SWANSON, G. T.; KAMBOJ, S. K. and CULL-CANDY, S. G. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation and subunit composition. *Journal of Neuroscience* 1; 17(1)1: 58-69, 1997.
- TANABE, Y.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R. and NAKANISHI, S. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, 8: 169-179, 1992.
- TANABE, Y.;NOMURA, A.; MASU, M.; SHIGEMOTO, R. and MIZUNO, N. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *Journal Neuroscience*, 13: 1372-1378, 1993.
- TOWER, D. B. Acentury of neuronal and neuroglial interactions, and their pathological implications: an overview. *Progress in Brain Research*, 94: 3-17, 1992.

- TSUJIMURA, K.; TANAKA, J.; ANDO, S.; MATSUOKA, Y.; KUSUBATA, M.; SUGIURA, H.; YAMAUCHI, T. and INAGAKI, M. Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein of cdc-2 kinase and Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinaseII. *Journal of Biochemistry*, 116: 426-434, 1994.
- TYLER , E. C. and LOVINGER, D. M. Metabotropic glutamate receptor modulation of synaptic transmission in corticostriatal co-cultures: role of calcium influx. *Neuropharmacology*, 34(8): 939-952, 1995.
- VECIL, G. G.; LI, P. P. and WARSH, J. J. Evidence for metabotropic excitatory amino acid receptor heterogeneity: Developmental and brain regional studies. *Journal of Neurochemistry*, 59: 252-258, 1992.
- VENANCE, L.; STELLA, N.; GLOWINSKI, J. and GIAUME, C. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in culture rat astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 17(6): 1981-1992, 1997.
- VINADÉ, L. and RODNIGHT, R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. *Brain Research*, 732: 195-200, 1996.
- VINADÉ, L.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S.; GOTTFRIED, C. and RODNIGHT, R. Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and astrocyte cultures from the rat. *Development Brain Research*, 104: 11-17, 1997.
- VIOLA, H.; FURMAN, M.; IZQUIERDO, L. A .; ALONSO, M.; BARROS, D. M.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, I. I. and MEDINA, J. H. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *Journal of Neuroscience*, 1, 20(23)RC 112, 2000.
- WALAAS, S. I. and GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews*, 43: 299-349, 1991.
- WALZ, W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in Neurobiology*, 33: 309-333, 1989.

- WATKINS, J; KROGSGAARD-LARSEN, P. and HONORÉ, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in Pharmacology Science*, 11: 25-33, 1990.
- WEI, H. and PERRY, D. C. Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *Journal of Neurochemistry*, 67: 2390-2398, 1996.
- WERA, S. and HEMMING, B. A. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemistry Journal* 1, 311: 17-29, 1995.
- WINDER, D. and CONN, J. Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial-neuronal communication. *Journal of Neuroscience Research*, 46: 131-137, 1996.
- WOFCHUK, S. and RODNIGHT, R. Stimulation by glutamate of the phosphorylation of two substrates of protein kinase C, B-50 and MARCKS, and of ppH-47, a protein highly labelled in incubated slices from the hippocampus. *Neuroscience Research Communications*, 6: 135-140, 1990.
- WOFCHUK, S. T. and RODNIGHT, R. Glutamate stimulates the phosphorylation of glia fibrillary acidic protein in slices of immature rat hippocampus via a metabotropic receptor. *Neurochemistry International*, 24: 517-523, 1994.
- WOFCHUK, S. T. and RODNIGHT, R. Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glia fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Developmental Brain Research*, 85: 181-186, 1995.
- YOUNG, J. Z. The concept of neuroglia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 633: 1-18, 1991.
- YUSTE, R.; NELSON, D.; RUBIN, W. and KATZ, L. C. Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron*, 14: 7-17, 1995.