UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

JENNIFER DINIZ SOARES GUIMARÃES

Mecanismos biofísicos do efeito excitatório de receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I em neurônios do Locus Coeruleus

Belo Horizonte
2022

JENNIFER DINIZ SOARES GUIMARÃES

Mecanismos biofísicos do efeito excitatório de receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I em neurônios do Locus Coeruleus

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Doutora em Fisiologia. Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Christopher Kushmerick

Belo Horizonte
2022

043 Guimarães, Jennifer Diniz Soares.
Mecanismos biofísicos do efeito excitatório de receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I em neurônios do Locus Coeruleus [manuscrito] / Jennifer Diniz Soares Guimarães. – 2022.
75 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Christopher Kushmerick.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Receptores de Glutamato Metabotrópico. 3. Locus Cerúleo. 4. Canais de Cálcio. 5. Trocador de Sódio e Cálcio. 6. Técnicas de Patch-Clamp. I. Kushmerick, Christopher. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C. M. Reis – CRB 6/2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO N° 359 DE JENNIFER DINIZ SOARES GUIMARÃES

Às 14:00 horas do dia 10 do mês de agosto de 2022, de forma semi-presencial: Sala de Seminários G4 e transmi da via Google Meet, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Jennifer Diniz Soares Guimarães.** A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Christopher Kushmerick,** orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim cons tuída: **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz,** ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva,** ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão,** Universidade Estadual Paulista, **Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva,** Universidade Estadual Vale do Acaraú, e **Prof. Dr. Christopher Kushmerick,** ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que cons tui sua **Tese de Doutorado**, in tulada: **"Mecanismos Bio sicos do Efeito Excitatório de Receptores Metabotrópicos de Glutamato do Grupo I Em Neurônios do Locus Coeruleus".** Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de agosto de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Luciane Helena Gargaglioni Batalhão**, **Usuária Externa**, em 17/08/2022, às 08:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Christopher Kushmerick**, **Diretor(a) de orgão complementar**, em 17/08/2022, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Jader dos Santos Cruz**, **Chefe de departamento**, em 17/08/2022, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Glauber dos Santos Ferreira da Silva**, **Professor do Magistério Superior**, em 17/08/2022, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Francisco Walber Ferreira da Silva**, **Usuário Externo**, em

Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 202

https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0

Referência: Processo nº 23072.245742/2022-38 SEI nº 1646601

Agradecimentos

Para começar, minha trajetória não seria possível sem o apoio e ajuda da minha família. Minhas queridas mãe, **Nathalie Christine Diniz** e vó, **Elizabeth Diniz**. Obrigada por todo o apoio e compreensão. Não tem como deixar de mencionar também a tia **Lucia Teresinha** e o **Rubens Meireles**, que guardo memórias com tanto carinho. A pessoa que sou hoje é um reflexo de tudo que vocês me ensinaram.

Ao meu marido, **Maximilian Carvalho**, que acompanhou de perto durante todo este caminho. Eu sei que não foi fácil, mas eu agradeço muito pelo apoio e o suporte que você me oferece. Esse trabalho não seria possível sem você. Te amo!!

Ao **Prof. Dr. Christopher Kushmerick**, por me aceitar no laboratório, por acreditar em mim e pelo suporte e ensinamentos durante todo esse período. Agradeço pela paciência também. Pelas aulas de programação e por cada reunião ou discussão. Eu agradeço profundamente por me ajudar nesta jornada.

Aos professores do laboratório, **Prof.ª Dr.ª Ligia Naves**, **Prof. Dr. Miguel José**, **Prof.ª Dr.ª Silvia Guatimosim**, por todos os ensinamentos e pela convivência do dia a dia no laboratório. Agradeço a disposição para tirar dúvidas e pedir ajuda.

Agradeço tbm ao **Prof. Dr. Philipe Ribeiro**, mesmo com uma breve presença suas discussões e ensinamentos também contribuíram para minha formação.

Aos colegas de laboratório, **Ana Maria Bernal**, **André Monteiro, Éverton dos Santos**, **Wallace Camargo**, **Aline Medrado**, **Rafaela Coelho, Karina Fiaux**, **Rafael Almendra**, **Matheus Ruas**, **Sérgio Scalzo**, **Vanessa Pereira, Kiany Miranda, Itamar Couto, Matheus Hofner** e **Matheus Grossi**, pelos papos diversos, pela troca de experiências ou simplesmente por oferecer um ombro amigo acolhedor nos momentos difíceis. Vocês nunca me permitiram sentir que eu estava sozinha.

A todos os meus amigos da LOG, com menção especial para **Gleison Oliveira, Filipe Molinari, Állef Luziano, Klécio Sousa, Carol Louzada e Luiza Ribeiro** que se doaram esses últimos anos pra ouvir sobre as dificuldades da vida acadêmica. Vocês tornaram isso viável, sem sombra de dúvidas. Não posso deixar de citar o **Jonatas Abel** aqui. Sempre falando que eu ia conseguir. Obrigada mesmo!!

A CAPES, CNPQ e a FAPEMIG, que contribuíram financeiramente para a construção deste trabalho.

RESUMO

Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) exercem papel importante na modulação da excitabilidade celular e da plasticidade neuronal em diferentes núcleos do Sistema Nervoso Central (SNC). A ativação destes receptores pode envolver canais iônicos e proteínas de transporte, porém os perfis de proteínas reguladas por esta ativação são diversos e não completamente entendidos. Estudos prévios descreveram a ação de receptores mGluR dos grupos II e III em neurônios do Locus Coeruleus (LC), mas não exploraram os impactos da ativação do grupo I. Recentemente, nós identificamos que a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I (mGluR-I) nos neurônios do LC promove a despolarização do potencial de membrana e o aumento da frequência de disparos espontâneos. Neste estudo, investigamos as alterações no transporte de membrana responsáveis pelas alterações na excitabilidade. Experimentos *Whole-cell voltage clamp* (V_m =-60 mV) foram realizados em fatias horizontais de 200 µm do tronco encefálico de ratos Wistar neonatos. A ativação de mGluR-I, utilizando pulsos locais e breves (10 ms) do agonista seletivo (S)-3,5-dihidroxyphenylglicina (DHPG) gerou uma corrente de entrada transiente de -24.0 ± 7.6 pA (n=39). Esta corrente não foi bloqueada pela presença conjunta de inibidores para os receptores AMPA (CNQX, 10 µM), NMDA (MK-801, 10 µM), GABAérgicos (picrotoxina, 25 µM) e glicinérgicos (estricnina, 5 µM), nem tampouco pelo bloqueio de canais NaV sensíveis a tetrodotoxina (1 µM). Investigamos a base iônica da corrente mGluR-I através de protocolos de rampa em voltage clamp e calculamos a corrente resultante como a diferença (DHPG-Controle). A relação I-V para esta corrente exibiu pouca dependência de voltagem na faixa entre -100 mV e -50 mV, não sendo observada a redução na corrente para valores de V_m próximos do potencial de equilíbrio para K^+. Em experimento complementar, utilizamos Cs^+ como cátion principal da solução de pipeta ao invés do K^+ e não foram observadas diferenças significativas na amplitude da corrente promovida por DHPG. A participação de canais TRPC foi investigada utilizando o antagonista seletivo SKF-96365 (50 µM) que não reduziu de forma significativa a corrente promovida por DHPG.

O envolvimento de canais de Ca^{2+} do tipo LVA, canais de Ca^{2+} do tipo HVA e do trocador Na^{+}/Ca^{2+} foi testado observando a amplitude da corrente mGluR-I em diferentes concentrações de Ni^{2+}. A inibição foi concentração dependente com o valor de IC_{50}= 0.9 ± 0.09 mM. Concentrações menores, suficientes para bloquear canais de Ca^{2+} do tipo LVA, exibiram pouco ou nenhum efeito na amplitude da corrente gerada pelo DHPG. Enquanto que, concentrações maiores, que adicionalmente bloqueiam canais de Ca^{2+} do tipo HVA e o trocador Na^{+}/Ca^{2+}, inibiram quase completamente a corrente observada. A participação de canais de Ca^{2+} do tipo HVA e especificamente a família dos canais de Ca^{2+} do tipo L foi testada utilizando Cd^{2+} (100 µM) e diidropiridinas (nifedipina, 100 µM e nimodipina, 5 µM), respectivamente. Na presença destes bloqueadores a corrente gerada pelo DHPG foi inibida parcialmente. A contribuição do trocador Na^{+}/Ca^{2+} foi investigada com a substituição do Na^{+} pela colina na solução extracelular. A alteração no gradiente químico do Na^{+} também reduziu a amplitude da corrente observada. Juntos, esses dados indicam que: i) A intensidade da corrente observada pela aplicação local de DHPG corresponde ao efeito excitatório destes receptores observado nos estudos anteriores, tendo em vista a amplitude gerada pelo agonista; ii) A ativação dos receptores mGluR-I ocorre diretamente nos neurônios LC, promovendo uma corrente de entrada no potencial de repouso; iii) Diferente de outros sistemas como células de purkinje e neurônios do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB) onde receptores mGluR-I podem agir através de canais KIR, BK ou SK, nos neurônios LC a ativação com agonista DHPG não modula condutâncias seletivas para K^{+}; iv) O mecanismo biofísico envolvido corresponde a uma combinação da ação em canais Ca^{2+} do tipo L e a corrente eletrogênica do trocador Na^{+}/Ca^{2+}. Este trabalho estende o conhecimento do mecanismo de atuação do mGluR no LC, complementando os dados da literatura e mostrando que a ativação deste receptor atua de maneira distinta comparado com outros neurônios do tronco encefálico.

Palavras-chave: mGluR ,Locus coeruleus , canal para cálcio, trocador sódio-cálcio, patch clamp

ABSTRACT

Metabotropic glutamate receptors (mGluR) mediate important roles in cellular excitability and plasticity in several regions of the nervous system. The activation of these receptors may involve ion channels and membrane transporters however the protein profile behind these changes are diverse and remain incompletely understood. In Locus Coeruleus neurons (LC), previous studies have shown the impact of group II and III mGluR activation, but the impact of activation of group I remains unclear. Recently, we identified that activation of group I metabolic glutamate receptors (mGluR-I) in Locus Coeruleus neurons causes an inward current and increases firing rate of pre-existing spontaneous action potentials. The present study investigates the membrane transport mechanisms behind these changes in excitability. Experiments under whole-cell voltage clamp (Vm = -60 mV) were conducted in horizontal slices (200 µM) of brainstem from Wistar rats. The activation of mGluR-I with the selective agonist (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) by local and brief (10 ms) pulsatile application generated transient inward currents of -24.0 ± 7.6 pA (n=39). This current was not inhibited by the combined presence of inhibitors for AMPA (CNQX, 10 µM), NMDA (MK801, 10 µM), GABAergic (picrotoxin, 25 µM) and glycinergic (strychnine, 10 µM) receptors, nor by the neuronal NaV blocker, tetrodotoxin (1 µM). We investigated the ionic basis of the mGluR-I current through ramp protocols under voltage clamp and calculated the mGluR-I current from the difference (DHPG - Control). The I-V relation for this current exhibited little voltage dependence in the range -100 mV to -50 mV, with no decrease as V_m approached the K^+ equilibrium potential. In related experiments, we used Cs^+ as the principal cation in the pipette solution instead of K^+ and we did not observe a significant difference in the amplitude of the current evoked by DHPG. The participation of TRPC channels was tested using the selective antagonist SKF-96365 (50 µM), which did not significantly reduce the mGluR-I current. The involvement of the Na^+/Ca^{2+} exchanger and, LVA and HVA Ca^{2+} channels were

tested by observing the reduction of DHPG current in the presence of different concentrations of Ni^{2+}. The inhibition of DHPG current by Ni^{2+} was concentration dependent with IC_{50}= 0.9 ± 0.09 mM. Lower concentrations of Ni^{2+}, which selectively inhibit LVA Ca^{2+} channels, exhibited little or no effect. In contrast, higher concentrations of Ni^{2+}, which additionally inhibit HVA Ca^{2+} channels and the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger, blocked almost all of the DHPG current. The involvement of HVA Ca^{2+} channels and specifically L-type Ca^{2+} channels were tested with Cd^{2+} (100 µM) and dyhidropirydines (nifedipine, 100 µM and nimodipine, 5 µM), respectively. With these blockers the mGluR-I current was partially inhibited. The Na^{+}/Ca^{2+} exchanger was tested replacing extracellular Na^{+} by choline. The changes in gradient reduced the amplitude of DHPG current. Taking together, these data indicate: i)The intensity of the current observed with local application of DHPG, matches the depolarization effects of these receptors reported in our previous study, considering the current amplitude; ii) Activation of group I mGluR receptors occurs directly on LC neurons, generating an inward current at the resting potential; iii) Unlike other neuronal systems in which Group I mGluR may act through KIR, BK or SK channels, in the LC activation with DHPG did not require changes in K^{+} conductance; iv) The biophysical mechanism probably involved the combination of L-Type Ca^{2+} channels and the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger. Our findings extend the knowledge about mGluR-I action on LC neurons complementing the existing literature and shows that activation of mGluR-I in the LC acts distinctly compared to other neurons in the brainstem.

Keywords: mGluR ,Locus coeruleus , calcium channels, sodium-calcium exchanger, patch clamp

Lista de Figuras

Figura 1. Locus Coeruleus _____ 14
Figura 2. Teoria do ganho adaptativo_____ 15
Figura 3. Relação das aferências e eferências dos neurônios LC _____ 18
Figura 4. Esquema representativo da via clássica dos receptores mGluR do Grupo 1 _____ 24
Figura 5. Corrente promovida por DHPG no LC _____ 25
Figura 6. Aumento dos disparos espontâneos na presença de DHPG _____ 26
Figura 7. Metodologia para aplicação por pulsos locais de DHPG _____ 33
Figura 8. Aplicação local de DHPG evita a dessensibilização dos receptores 35
Figura 9. Inibição da corrente IDHPG pelo antagonista mGlu1 _____ 36
Figura 10. A geração da corrente IDHPG independe de atividade sináptica _37
Figura 11. A relação I-V da corrente evocada por DHPG descarta o envolvimento de canais seletivos para K+ na modulação mediada por receptores mgluR-I_39
Figura 12. A substituição de K+ por Cs+ na solução intracelular não afeta a amplitude da corrente evocada por DHPG_____ 40
Figura 13. Inibição dos canais TRPC por SKF96365 não afeta a corrente DHPG _____ 41
Figura 14. Ni2+ reduz a amplitude da corrente IDHPG _____ 43
Figura 15. Bloqueio da corrente DHPG por Cd2+ _____ 44
Figura 16. Bloqueio de canais de cálcio tipo L por dihidropiridinas reduz a amplitude da corrente DHPG _____ 45
Figura 17. Substituição do sódio extracelular por colina reduz a amplitude da corrente DHPG _____ 46
Figura 18. Resumo gráfico dos resultados do estudo _____ 59

Lista de abreviações e siglas

ACC	córtex cingulado anterior
aCSF	Artificial cerebral spinal fluid
ACPD	1-Amino-1,3-dicarboxiciclopentano
AD	Doença de Alzheimer
AGT	Teoria do ganho adaptativo
AMPA	a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DHPG	3,5-dihidroxifenilglicina
IP_3	Inositol 1,4,5-trisfosfato
KIR	Canal retificador de entrada de K^+
LC	Locus Coeruleus
LY367385	(S)-(+)-α-Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid
mGluR-I	Receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride
NMDA	N-methyl-D-aspartate
OFC	Córtex orbitofrontal
PD	Doença de parkinson
PGi	Núcleo paragigantocelular
$PI(4,5)P_2$	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PLC	Fosfolipase C
PrH	Núcleo prepositus hipoglossi
RAS	Sistema reticular ativador ascendente
REM	Movimento Rápido dos Olhos – (“Rapid Eye Movement”)
SNC	Sistema Nervoso central
TRPC	Receptor de potencial transiente canônico
TTX	Tetrodotoxina

Sumário

1. Introdução 13
1.1 Locus Coeruleus 13
1.2 Receptores para glutamato 20
2. Justificativa 27
3. Objetivo Geral 28
3.1 Objetivos específicos 28
4. Metodologia 29
4.1 Animais 29
4.2 Fármacos, reagentes e soluções 29
4.3 Eletrofisiologia 29
4.4 Análise dos dados e estatística 31
5. Resultados 33
5.1 Ativação local e breve de DHPG gera corrente de entrada transiente 34
5.2 Bloqueio da isoforma mGlu1 com LY367385 reduz a amplitude da corrente DHPG 36
5.3 Inibição das principais vias de neurotransmissão não reduz a corrente evocada por DHPG 37
5.4 Ativação dos receptores mGluR-I não envolve canais seletivos para K^+ 38
5.5 Ativação dos receptores mGluR-I não envolve participação de canais TRPC sensíveis ao bloqueador SKF-96365 41
5.6 Bloqueio da corrente DHPG por $Ni2^+$ indica participação de canais de Ca^{2+} 42
5.7 Bloqueio de canais HVA resulta em redução na corrente DHPG 44
5.8 Substituição do Na+ pela colina na solução extracelular 45
6. Discussão 47
6.1 Uso do OpenSpritzer como alternativa para coibir a dessensibilização 48
6.2 Modulação mGluR-I presente nos neurônios LC 51
6.3 Regulação da condutância de K^+ por mgluR-I 52
6.4 Participação de canais não- seletivos 53
6.5 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} 54
6.6 Relevância fisiológica 56
7. Conclusões e perspectivas futuras 58

1. Introdução

1.1 Locus Coeruleus

O Locus coeruleus (LC; do latim *caeruleus,* “azul”) é uma das principais estruturas noradrenérgicas do Sistema Nervoso Central (SNC) (Swanson e Hartman, 1975; revisado por Foote, Bloom e Aston-Jones, 1983). Primeiramente descrito em 1786 por Félix Vicq-d'Azyr, a estrutura recebeu o nome pelos irmãos Wenzel como referência a coloração azulada observada na região devido à forte pigmentação por grânulos de melanina (Maeda, 2000; Tubbs et al., 2011). O núcleo é localizado bilateralmente à borda ventro-lateral do quarto ventrículo na porção da ponte no tronco encefálico (Figura 1) (Foote, Bloom e Aston-Jones, 1983). Mesmo sendo quantitativamente pequeno, com cerca de 3.000 neurônios em roedores e aproximadamente 50.000 em humanos, o LC é considerado a principal fonte noradrenérgica, com projeções para virtualmente todo o SNC (Loughlin, Foote, Bloom, 1986; Sharma et al., 2010). Tais projeções apresentam perfil modular com diferentes subpopulações dos neurônios LC responsáveis por inervar regiões distintas como córtex, cerebelo e medula espinhal (Chandler, Gao e Waterhouse, 2014; Schwarz et al., 2015; revisado por Chandler et al, 2019). Estas características conferem ao LC influência em diversas funções fisiológicas. Além disso, disfunções no núcleo são associadas com distúrbios psiquiátricos e doenças neurodegenerativas incluindo Doença de Parkinson e Alzheimer (McCall et al., 2015; Naegeli et al., 2018; revisado por Chandler et al, 2019).

Os neurônios do LC possuem a capacidade de gerar potenciais de ação espontâneos e esta atividade pode ser observada inclusive em neurônios dissociados mantidos em cultura (Williams et al., 1984; Masuko et al., 1986). Primariamente, esta atividade pode ser categorizada de acordo com o modo dos disparos dos potenciais de ação (PA). Disparos em baixa frequência (entre 1-6 PA/s) por longos períodos configuram a atividade tônica enquanto que pequenos trechos com disparos em alta frequência (10-15 PA/s) seguidos do breve silenciamento dos neurônios correspondem como a atividade fásica (Figura 1) (Foote, Aston-Jones e Bloom, 1980; Akaike, 1982).

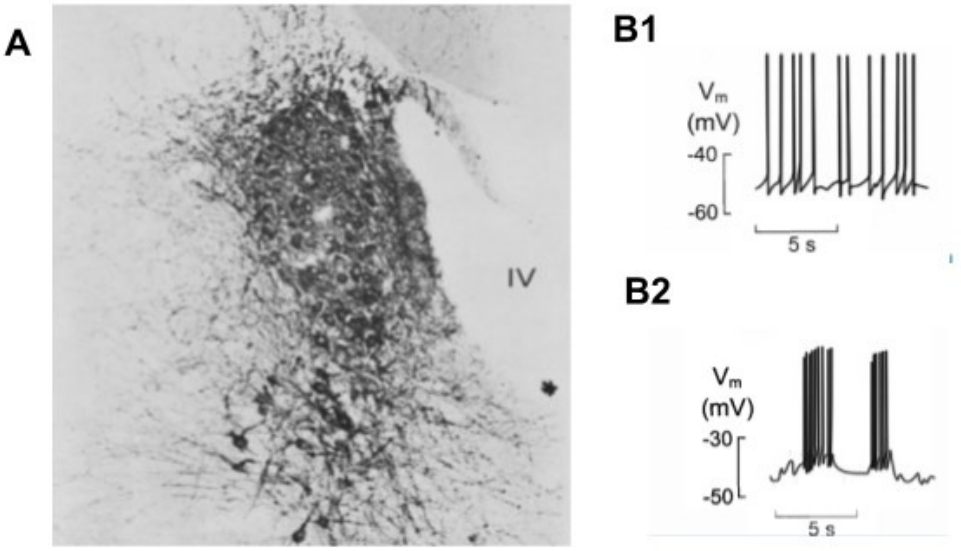
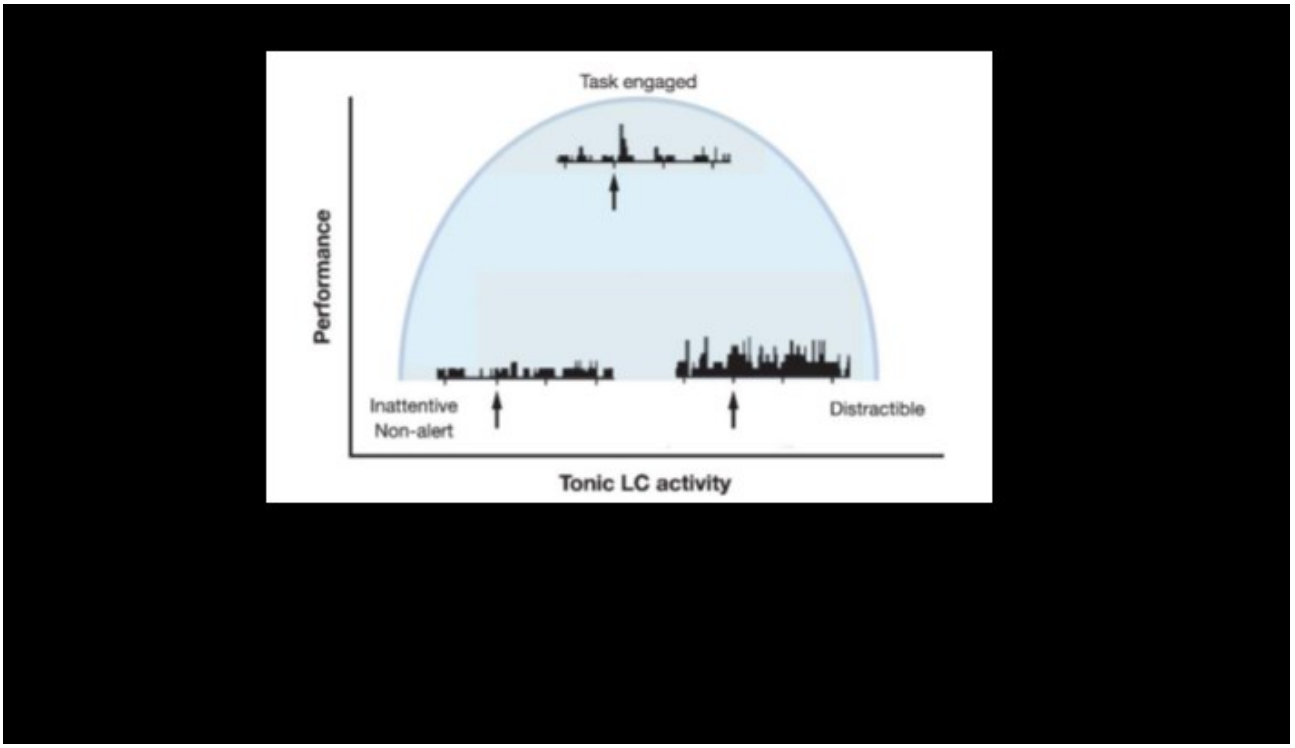


Figura 1. **Locus Coeruleus. A)** Imunohistoquímica evidenciando os neurônios do Locus Coeruleus através da marcação por dopamina β-hidroxylase. IV- 4th ventrículo (Grzanna and Molliver 1980). **B)** Registro em whole-cell representando a atividade espontânea dos neurônios do LC **B1)** Atividade tônica **B2)** Atividade fásica (Adaptado de: Andrzejewski, M et al 2001).

Registros in vivo indicam que a atividade do LC alterna entre estes dois modos de acordo com o estado de vigília e a percepção de estímulos sensoriais (Hayat et al., 2020). Embora os mecanismos que compreendem a transição entre a atividade tônica e fásica não sejam completamente esclarecidos, alguns estudos apontam predominância dos diferentes modos de atividade do LC de acordo com determinados estímulos. Por exemplo, a atividade tônica está presente nas diferentes fases do ciclo sono-vigília com exceção do estado de sono REM onde os neurônios do LC permanecem silenciado (Takahashi et al.,2010; Hayat et al., 2020). A modulação da atividade tônica do núcleo compõe parte do sistema reticular ativador ascendente (RAS), responsável pela promoção da vigília (Jones, 2011). Além disso, no estado acordado, a atividade tônica está relacionada com o engajamento para realização de tarefas (Aston-Jones et al., 1994; Carter et al. 2010; Kane et al., 2017). Enquanto isso, a atividade fásica é reportada como um regulador da performance, agindo em resposta

a determinados estímulos ou para alterar o foco do indivíduo (Clayton, 2004; Sara, Vankov e Hérve, 1994).

O balanço entre estes dois modos de disparo forma a base da Teoria de Ganho Adaptativo proposta como um mecanismo que determina a relação entre a tarefa e o foco, através da atividade dos neurônios LC, permitindo flexibilidade no comportamento (Aston-Jones e Cohen, 2005) (Figura 2). De acordo com essa teoria, a relação entre a atividade do LC e o desempenho na realização de tarefas compreende uma curva em U invertida, ou seja, o aumento da atividade do núcleo promove ganho no estado de alerta e melhora no desempenho para realização de tarefas. No "ponto ótimo", ambas a atividade tônica e a fásica estão presentes e são distinguíveis diante da apresentação de um estímulo. O aumento da atividade do locus coeruleus para além deste ponto, por exemplo em resposta a presença do fator liberador de corticotropina (CRH) durante um evento estressante ou mesmo por estimulação optogenética, resulta no prejuízo do desempenho (McCall et al., 2015; Naegeli et al., 2018). De fato, estudos com manipulação da atividade do núcleo



sugerem que o aumento da atividade do núcleo promove a distração durante a realização de tarefas (Rajkowski et al., 2004; Carter et al. 2010; Kane et al., 2017).

A atividade intrínseca dos neurônios LC envolve a combinação de diferentes correntes de membrana que resultam na despolarização do potencial de membrana. Em estudo seminal sobre as características biofísicas dos neurônios LC, Williams et al. (1984) reportaram a atividade espontânea como sendo a consequência de uma corrente de entrada de Ca^{2+} e Na^{+} que se sobrepõe às correntes de saída, descritas como diferentes correntes de K^{+}, despolarizando o neurônio até alcançar o limiar de excitação e gerando um potencial de ação dependente de canais de Na^{+} e K^{+} voltagem-dependentes. Posteriormente, estudos farmacológicos confirmaram a presença de correntes de saída no LC como as correntes transientes e persistentes de K^{+} (I_A, I_K), correntes de K^{+} ativadas por Ca^{2+} (I_{SK}, I_{BK}), correntes de K^{+} retificadoras de entrada (I_{Kir}) e correntes de K^{+} dependentes de ATP (I_{KATP}) (Osmanović e Shefner, 1993; Nieber, Sevic e Illes, 1995; Koyama, Jin e Akaike, 1999; Torecilla et al., 2002; Min et al, 2010; de Oliveira et al., 2011; Imber et al., 2018; Matschke et al., 2018). Correntes de entrada compreendem as correntes de Na^{+} sensíveis a TTX (I_{Na}) (de Oliveira et al., 2011;) e condutâncias de Ca^{2+} promovida pelos canais do tipo L, T, N e P/Q e R (Connor, Borgland e Christie, 1999; Matschke et al., 2015; Ver Tabela 1). Apesar dos achados, a exata composição dos canais responsáveis pela geração da atividade marca-passo ainda não é completamente elucidada. Alguns estudos demonstram que determinadas condutâncias participam como moduladoras diretas da atividade espontânea enquanto outras tem papel na manutenção de determinado modo de atividade, mas não influenciam na geração do marca-passo. Por exemplo, Matschke et al. (2015) identificou a participação de canais de Ca^{2+} dos tipos T e L como reguladores da corrente AHP, reduzindo sua duração quando bloqueados de modo conjunto e aumentando a taxa de disparos. Em estudo posterior, foi identificado que o influxo de Ca^{2+} promovido por estes canais ativa canais SK para produzir as alterações observadas (Matschke, et al..2018). Em outro estudo, os canais do tipo L foram identificados como participadores das oscilações de cálcio presentes na

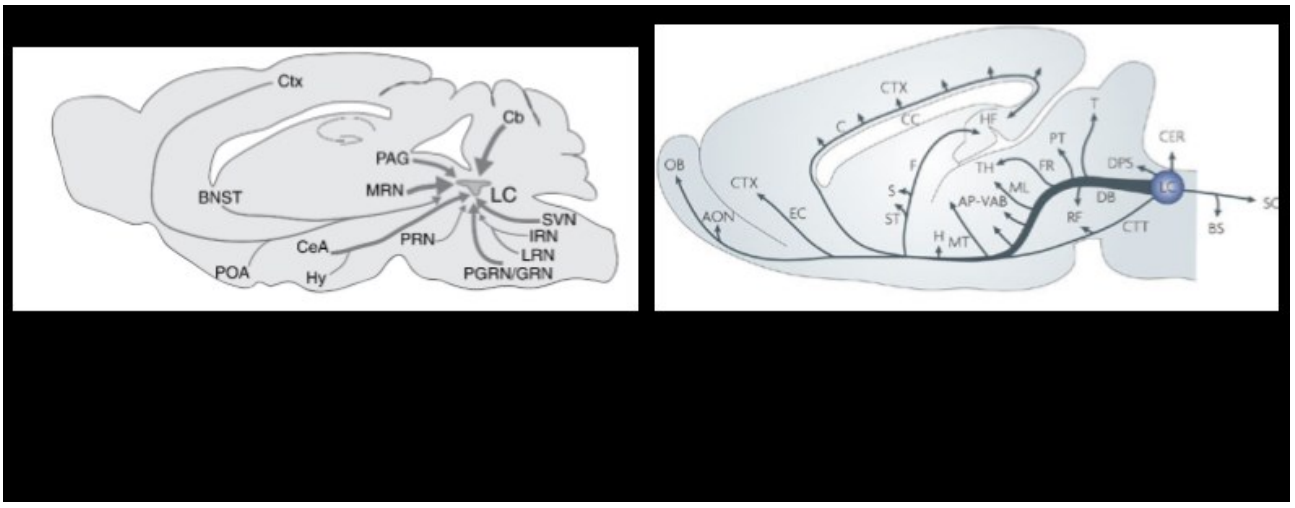
atividade marca-passo, contudo seu papel envolve a manutenção da atividade espontânea e a sinalização em condições específicas como a hipercapnia (Sanchez-Padilla et al., 2014; Imber et al., 2018).

Corrente	Efeito nos neurônios LC	Geração do marcapasso	Referência
I_A	Prolongamento do intervalo entre potenciais	Sim	Min et al.(2010) Williams et al. (1984)
I_K	Repolarização do potencial de membrana	Sim	De Oliveira et al. (2011) Williams et al. (1984)
I_{BK}, I_{BK}	Acomodação da frequência de disparo	Não	
I_{Kir}	Hiperpolarização do potencial de membrana	Não	
I_{KATP}	Redução na atividade espontânea	Não	
I_{Na}	Disparo do potencial de ação	Sim	) Williams et al. (1984)
I_{Ca}	Oscilação no potencial de membrana Sinalização $[Ca^{2+}]_i$	Sim	Matschke et al. (2015)

De modo geral, o LC projeta de forma ampla pelo SNC sendo considerado fonte noradrenérgica exclusiva em vastas regiões como o córtex e o hipocampo (Loughlin, Foote, Bloom, 1986, revisado por Chandler et al, 2019) (Figura 3). As projeções podem ser segregadas em três diferentes vias: (i) Projeções ascendentes que rumam para o córtex e tálamo modulando o estado de vigília e o comportamento, (ii) projeções descendentes que influenciam no controle da nocicepção e função autônomica e (iii) projeções cerebelares cujas funções não são completamente esclarecidas, mas

apresentam impacto na função motora (revisado por Szabadi, 2013, Breton-Provencher, Drummond e Sur, 2021). Na sua totalidade estes neurônios são noradrenérgicos, uma vez que estudos com imunohistoquímica para dopamine-β-hydroxylase permitem identificar a localização do núcleo (Grzanna e molliver, 1980). Porém, foram identificadas subpopulações com a co-expressão de diferentes neuromoduladores como a galanina e neuropeptídeo Y (Holets et al., 1988, revisado por Schwarz e Luo, 2015). Ademais, diversas estruturas que recebem projeções do núcleo apresentam vias de feedback recíprocas (Loughlin, Foote, Bloom, 1986; Szabadi, 2013; Berridge e Waterhouse, 2003). Em conjunto, tais características conferem ao LC uma complexidade na transmissão noradrenérgica permitindo um amplo espectro nas respostas para diferentes estímulos.

O LC recebe aferências de diversas regiões (Figura 3). Schwarz et al. (2015), através da combinação de marcações retrógradas e anterógradas, identificou mais de 100 estruturas distintas que projetam diretamente para os neurônios LC. As maiores regiões compreendem o tronco encefálico, a medula e o cerebelo. Dentre estas, se destacam as vias aferentes GABAérgicas que advêm do núcleo prepositus hipoglossus (PrH) e glutamatérgicas do núcleo paragiganto cellularis (PGi) (Ennis e Aston-Jones, 1989; Aston-Jones et al., 1991). A ação do núcleo PrH inibe os neurônios do LC durante o sono REM (Kaur, Saxena e Mallick, 2001). Outras regiões como



neurônios próximos do LC e o hipotálamo também agregam aferências GABAérgicas

para o núcleo (Steininger et al., 2001; Aston-Jones, Zhu e Card 2004). Além da influência externa, recentemente foi identificado a presença e o impacto de interneurônios GABAérgicos dentro do LC, com a capacidade de inibir a atividade espontânea na região e consequentemente modular o nível de alerta (Jin et al., 2016; Breton-Provencher e Sur, 2019). As projeções glutamatérgicas do núcleo PGi são relacionadas principalmente com a via ascendente da dor e possuem papel central na síndrome de abstinência por opióides conduzindo o LC ao estado de hiperatividade via receptores ionotrópicos (Ennis e Aston-Jones, 1992; Kaeidi et al., 2015). Outro estudo investigando a consolidação da memória na região CA1 do hipocampo, identificou que a liberação de glutamato pelo núcleo PGi nos neurônios LC era necessária para o reconhecimento de objetos (Mello-Carpes e Izquerdo, 2013). Além deste, regiões como o córtex orbitofrontal (OFC) e o córtex cingulado anterior (ACC) também liberam glutamato no LC. Estudos em primatas apontam que a função destas áreas está relacionada com a otimização da recompensa sugerida na Teoria de Ganho Adaptativo (ver acima; Aston-Jones e Cohen, 2005; Moorman e Aston-Jones, 2014). Além dos neurotransmissores clássicos, dado a ampla variedade de aferências presente na região, os neurônios LC podem ser modulados por uma gama de neuromoduladores e inclusive hormônios (Rajkowski, Kubiak e Aston-Jones, 1994; Hagan et al. 1999, Szawka et al. 2009, Szabadi, 2013).

A modulação do SNC pelas projeções no LC pode ser determinada pelo tipo dos receptores expressos no núcleo-alvo. Os adrenoceptores α1 e β1-β3 são acoplados à proteína Gαq e Gαs, respectivamente, promovendo efeitos excitatórios enquanto que adrenoceptores α2 agem via proteína Gαi e podem ser encontrados em diversas áreas do SNC assim como em células da glia, contudo, a afinidade da noradrenalina é diferente para cada tipo de receptor (α1, ≈50 nM, α2 ≈0.3 μM e β ≈0.7 μM; revisado por Ramos e Arnsten, 2007). A quantidade de noradrenalina liberada pelos neurônios do LC em regiões como o córtex pré-frontal está relacionada com a frequência de disparos da atividade tônica (Florin-Lechner et al., 1996; Berridge e Abercrombie, 1999). Além disso, o aumento expressivo da atividade tônica prejudica

na realização de tarefas (Rajkowski et al., 2004, Cope et al., 2019). Sendo assim, as consequências da ativação dos adrenoceptores são resultado da expressão dos receptores nas regiões alvo e dos níveis de noradrenalina liberados pelos neurônios LC.

De modo geral, a ativação de adrenoceptores α_1 é relacionada com a promoção da vigília e o controle emocional, acordando o indivíduo ou regulando a resposta ao estresse quando ativados (Yang et al., 2012; Schmeichel e Berridge, 2013). Receptores α_2 possuem mais impacto no desempenho da memória de trabalho e na cognição, reduzindo a atividade na região do córtex pré-frontal ou promovendo a atividade de ondas tetas na região do hipocampo (Kitchigina, Kutyreva e Brazhnik, 2003; Wang et al., 2010). Receptores β agem como mediadores do estresse induzindo comportamentos do tipo-ansioso e regulando a neuroinflamação nas células da glia (Gyoneva e Traynelis, 2013; Siuda et al., 2015). Sendo assim, a diferença da concentração de NE e consequentemente o perfil dos receptores ativados resulta em diversos processos que quando mal adaptados podem ser prejudiciais (revisado por Atzori et al., 2016). Atualmente, sabemos que a atividade dos neurônios LC está relacionada, direta ou indiretamente, a funções fisiológicas como a formação de memória, respiração, nocicepção e reprodução (Zong-yuan, Bao-Lu e Cheng-Jun, 1992; Chiang e Aston-Jones, 1993; Kaur, Saxena e Mallick, 2001; Biancardi et al, 2008; Howells, Stein e Russell, 2012; Mello-Carpes e Izquerdo, 2013; Szawka et al., 2013; Hansen, 2017).

1.2 Receptores para glutamato

Glutamato é conhecidamente o neurotransmissor excitatório mais abundante do SNC (Perry et al. 1971). A manutenção da concentração do aminoácido no ambiente extracelular é constantemente regulada por sistemas de recaptação de modo a coibir processos como excitotoxicidade (Zhou, Y., 2014). Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato interage com duas grandes famílias de receptores, os receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos. A relação entre os subtipos

e isoformas de cada família pode ser observada na Tabela 2. A ativação destes receptores tem importância em diferentes aspectos do SNC. Além de serem responsáveis pela neurotransmissão excitatória rápida, processos como a formação de novas espinhas dendríticas e a poda neuronal envolvem a sinalização de receptores glutamatérgicos (Zito et al., 2009; Rabacchi et al. 1992).

No LC, estudos reportam a relação entre os receptores ionotrópicos e diferentes funções. O aumento dos disparos espontâneos pela estimulação elétrica das fibras

Receptores ionotrópicos			
Subtipo	**Agonista Seletivo**	**Isoformas do receptor**	
NMDA	N-methyl-D-aspartate	GluN1; GluN2(A-D); GluN3(A-B)	
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	GluA1; GluA2; GluA3; GluA4	
Kainato	Kainato	GluK1; GluK2; GluK3; GluK4; GluK5	
Delta (δ)	-	GluD1;GluD2	
Receptores metabotrópicos			
Grupos	**Isoformas do receptor**	**Proteína Gα**	**Via de sinalização**
Grupo I	$mGlu_1$; $mGlu_5$	$G\alpha_{q/11}$	Hidrólise de fosfoinositídeos
Grupo II	$mGlu_2$; $mGlu_3$	$G\alpha_{i/o}$	Redução de AMP cíclico
Grupo III	$mGlu_4$; $mGlu_6$; $mGlu_7$; $mGlu_8$	$G\alpha_{i/o}$	Redução de AMP cíclico
Fonte: (Collingridge et al. 2009; Krieger et al. 2015; Nakanishi 1992)			

Tabela 2. Tipos de receptores para glutamato e suas características.

aferentes glutamatérgicas ou pela abstinência de morfina podem ser inibidos com

bloqueadores para receptores AMPA e Kainato (Ennis e Aston-Jones, 1988, Rasmussen, 1996). Na respiração, aplicação de ácido quinurênico, antagonista para receptores ionotrópicos, altera a resposta ventilatória a hipóxia (Ferreira, de Paula e Branco, 2004; Taxini et al, 2013).

A outra grande família de receptores para glutamato são os receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR). Estes receptores foram descobertos uma vez que o glutamato causava certos efeitos que não podiam ser explicados com base nas propriedades dos receptores iGluR então conhecidos. (Sladeczek et al., 1985; Nakanishi 1992). O receptor mGlu1 foi o primeiro a ser isolado e caracterizado (Houamed et al., 1991; Masu et al., 1991). As investigações que seguiram identificaram oito isoformas de receptores para glutamato acoplados à proteína G que medeiam cascatas de sinalização mais lentas e duradouras comparado aos receptores ionotrópicos. Baseado em diferenças tanto farmacológicas quanto na sequência de aminoácidos e nas vias de sinalização ativadas, estes receptores podem ser classificados em três grupos diferentes denominados grupo I (mGlu1 e mGlu5), grupo II (mGlu2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Tabela 1) (Nakanishi 1992; Anwyl 1999).

Os receptores metabotrópicos do grupo I (mGluR-I) correspondem às isoformas mGlu1 e mGlu5 (Nakanishi et al. 1998). Estes receptores possuem uma similaridade de 60% quando comparadas as suas sequências de aminoácidos (Abe et al. 1992). Os mGluR-I são classificados como receptores acoplados à proteína G da Classe C. Este tipo de receptor possui como característica um domínio de interação com agonista localizado na porção N-terminal denominado *vênus fly-trap* (Beqollari e Kammermeier, 2010; Chun, Zhang e Liu 2012). Nesta estrutura ocorre a interação do receptor aos ligantes ortostéricos. Outra característica é a formação de dímeros. A estrutura do receptor revelada por cristalografia de raio-X indica a existência de pontes de cisteína que conectam os pares receptores, adquirindo forma de concha (Romano, Yang e Malley, 1996; Jingami, Nakanishi e Morikawa, 2003).

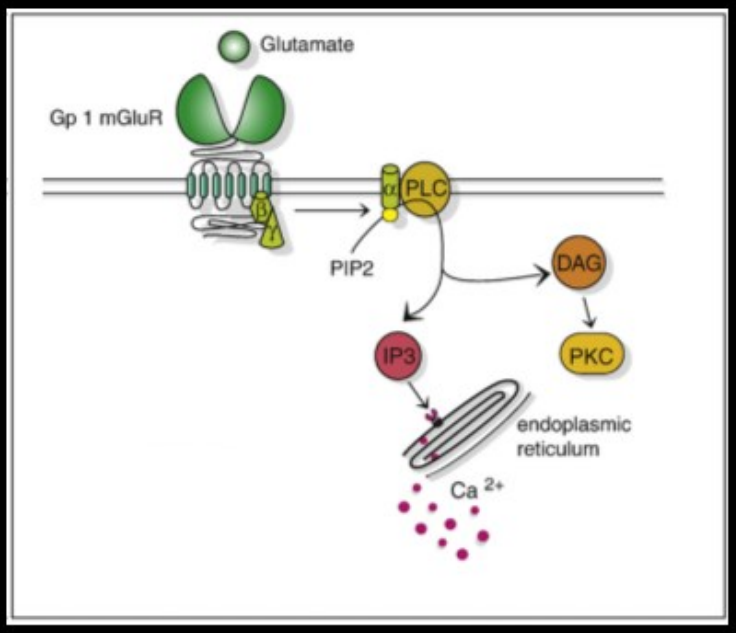
No sítio de ligação ortostérico, além do aminoácido glutamato, outros agonistas como o quisqualato, DHPG e ACPD também podem ativar os receptores mGluR-I. Entre estes, o quisqualato é um agonista potente, com valor de EC_{50} próximo de 0.2 μM (Masu et al., 1991; Conn e Pin 1997). Porém, este agonista também promove potente ativação de receptores iGluR AMPA, o que impacta de modo negativo no uso de quisqualato para estudar os receptores mGluR (Horne e Simmonds 1989). O agonista ACPD possui seletividade maior para os receptores mGluR-I do que para receptores ionotrópicos, porém ele não discerne na ativação de receptores mGluR os grupos I e II (Schoepp e Conn 1993), invalidando seu uso para ativar seletivamente os receptores do grupo I.

Portanto, neste estudo, utilizamos o DHPG como agonista seletivo para os receptores mGluR do grupo I. É um composto com ação seletiva para receptores metabotrópicos de glutamato das isoformas mGlu1 e mGlu5 possuindo valores de EC_{50} próximos de 10 μM e valores acima de 100 μM para os receptores dos grupos II e III (Wiśniewski e Car 2002). Por se tratar de um agonista ortostérico, o DHPG ativa o receptor pelo mesmo sítio que o glutamato na estrutura *"vênus fly-trap"* anteriormente mencionada (Takahashi et al. 1993).

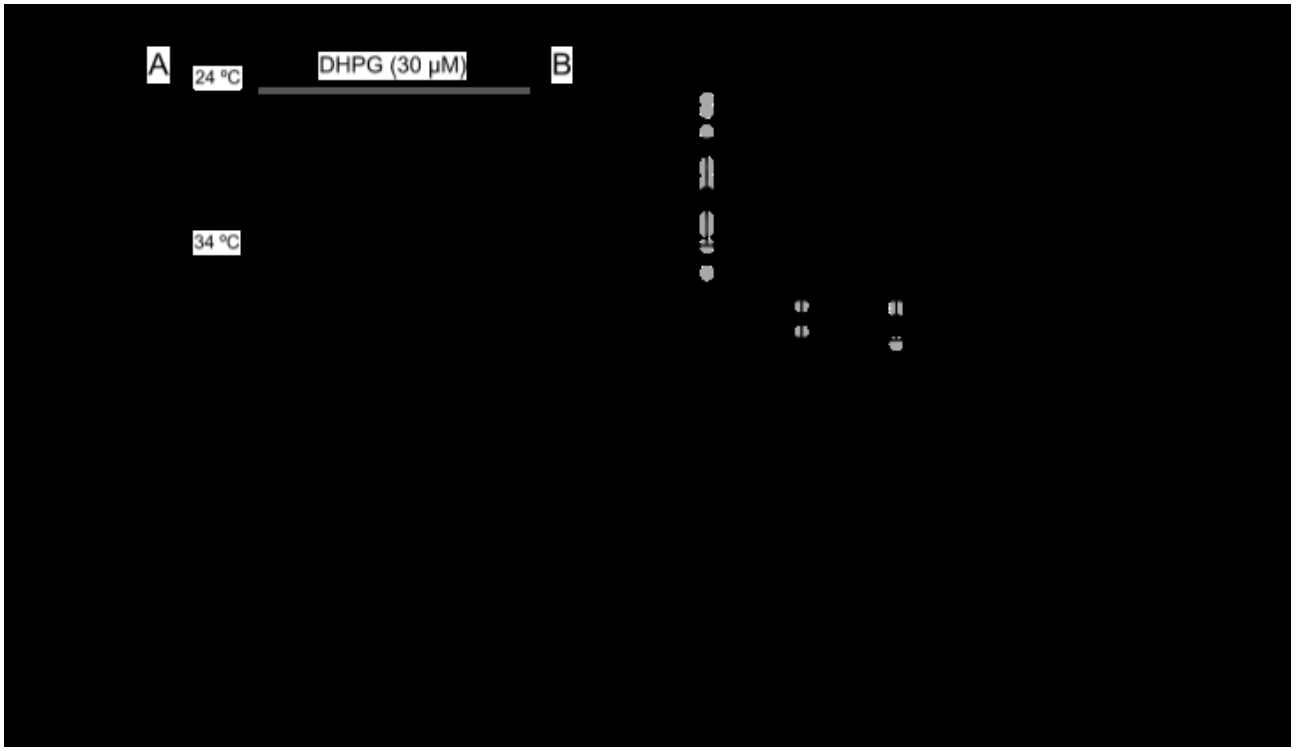
As isoformas mGlu1 e mGlu5 que compõem o grupo I (mGluR-I) são receptores acoplados preferencialmente à proteína Gαq/11. A ativação desencadeia a isoforma beta da fosfolipase C (PLC-β) e a produção de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) a partir da hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) (Sladeczek et al., 1985) (Figura 4). Como consequência, IP_3 migra para o retículo endoplasmático e interage com o receptor específico, liberando Ca^{2+} dos estoques intracelulares e resultando em efeitos mais complexos (Nakanishi et al., 1998). Estudos envolvendo outros núcleos demonstraram que a ativação destes receptores promove a modulação de canais iônicos ou transportadores eletrogênicos através de segundo mensageiro ou proteínas de suporte como HOMER e SHANK (Tu et al., 1998). Esses efeitos podem ser excitatórios ou inibitórios. Em neurônios

dopaminérgicos do mesencéfalo ventral e em células de purkinje cerebelares a ativação de mGluR-I ativa canais SK gerando um potencial pós-sináptico inibitório (Fiorillo and Williams, 1998; Netzeband e Gruol, 2008; revisado por Correa et al., 2017). Em neurônios dopaminérgicos do bulbo olfatório, o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ estimula a atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} resultando em uma corrente de entrada e aumento da taxa de disparos de potenciais de ação (Jian et al. 2010). Neurônios do hipocampo apresentaram modulação por mGluR-I independente da ativação da proteína G, ativando canais TRPC via participação de proteínas da família Src quinase (Guérineau et al. 1995; Heuss and Gerber 2000). Outros exemplos descritos na literatura envolvem os canais HCN, canais Kir e canais de Ca^{2+} (Johnstons e Delaney, 2010; revisado por Correa et al., 2017).

Estudos com LC de macacos rhesus mostram a expressão de receptores pertencentes aos três grupos da família mGluR (Noriega et al., 2007). A participação



de receptores dos grupos II e III tem relação com a regulação da função sináptica (Dubé e Marshall, 2000). Recentemente, demonstramos que a ativação de receptores mGluR do grupo I com DHPG aumenta a frequência de disparos espontâneos dos neurônios LC (Figura 5). Sob voltage clamp, observamos que o mesmo tratamento gera uma corrente de entrada transiente (Figura 6) (Guimarães, 2017). Contudo, a base iônica da corrente e as estruturas de membrana responsáveis pelos fenômenos observados são desconhecidos.


A
24 °C
DHPG (30 µM)
B
34 °C

2. Justificativa

O Locus coeruleus é o principal núcleo noradrenérgico do Sistema Nervoso Central, concentrando mais da metade dos neurônios noradrenérgicos (Foote et al., 1983). Sua atividade está relacionada a diversas funções fisiológicas como controle da atenção, nocicepção, consolidação da memória, ciclo sono- vigília e regulação do estresse (Szabadi, 2013). Esta atividade pode ser regulada por diferentes neurotransmissores e neuromoduladores. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no SNC, exerce forte excitação nos neurônios LC (Olpe et al., 1989; Ennis e Aston-Jones, 1989) e consequentemente influencia na liberação de noradrenalina para as regiões eferentes. Esta via de transmissão é importante para nocicepção, abstinência de opióides, respiração e memória (Ennis e Aston-Jones, 1992; Ferreira, de Paula e Branco, 2004; Mello-Carpes e Izquerdo, 2013; Rasmussen, 1996). Além disso, a hiperatividade dos neurônios LC consequente da transmissão glutamatérgica é reportada em condições como estado depressivo e síndrome de abstinência (Chandler et al, 2019). Diferentes estudos caracterizaram o impacto da ativação de receptores para glutamato ionotrópicos (NMDA, AMPA e Kainato) e metabotrópicos (grupos II e III) no LC (Ennis e Aston-Jones, 1992, Rasmussen, 1996; Dubé e Marshall, 2000), contudo a ativação dos receptores pertencentes ao grupo I ainda não foi investigada. Nosso estudo evidencia, através de técnicas eletrofisiológicas, o impacto da ativação dos receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I com foco no perfil dos canais e transportadores envolvidos. Esperamos com estes dados elucidar sobre o papel dos mGluR-I na modulação do LC complementando os achados sobre a transmissão glutamatérgica na excitabilidade dos neurônios.

3. Objetivo Geral

Caracterizar a corrente produzida pela ativação dos receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I nos neurônios LC

3.1 Objetivos específicos

A partir de registros Whole-cell em fatias do tronco encefálico de ratos Wistar contendo neurônios do LC nós investigamos:

- Padronizar e caracterizar a corrente gerada pela aplicação pulsátil e local do agonista DHPG, com intuito de minimizar a dessensibilização da resposta

- Determinar se o agonista DHPG age diretamente nos neurônios do LC ou se seu efeito depende de aferências sinápticas

- Avaliar a contribuição de canais seletivos a K^+ para a corrente gerada pelo DHPG

- Avaliar a participação de canais TRPC na corrente promovida através do bloqueio por SKF-96365

- Avaliar a participação de canais de $Ca2^+$ do tipo LVA e HVA na corrente gerada pelo DHPG

- Avaliar a participação do trocador Na^+/Ca^{2+} na corrente gerada pelo DHPG

4. Metodologia

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, sem distinção, com idade entre 6 e 8 dias. Os animais foram fornecidos pelo CEBIO, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Instituição (CEUA-UFMG, protocolos 159 / 2015 e 89/2022).

4.2 Fármacos, reagentes e soluções

Todos os sais utilizados tinham pureza analítica e foram obtidos das empresas TOCRIS Bioscience (Bristol, UK) e Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

4.3 Eletrofisiologia

Preparo das fatias

Os animais foram sacrificados sem anestesia por decapitação. A caixa craniana foi exposta com auxílio de uma tesoura e o tronco encefálico foi separado e extraído com uma espátula. Todo o processo foi realizado em solução ACSF para corte (em mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 $NaHCO_3$, 25 D-glucose, 0.4 Na-ascorbate, 2 Na-pyruvate, 1.25 NaH2PO4, 3 $MgCl_2$ e 0.1 $CaCl_2$), pH 7,3 quando borbulhado com mistura gasosa “carbogênio” (5% CO_2, 95% O_2) e temperatura ~0 ºC. O tecido foi fixado na plataforma circular de *inox* do vibrátomo Leica VT1000S com cola a base de éster de cianoacrilato. A presença do quarto ventrículo foi utilizada como referência para selecionar as fatias horizontais de 200 µm que continham os neurônios do LC. Em seguida, as fatias foram incubadas em solução ACSF para registro por 30 a 40 minutos a 37°C para recuperação do trauma mecânico do fatiamento. Finalmente, mantivemos a fatia em temperatura ambiente onde permaneceram por até 4 horas antes de transferirmos para a câmara de registro. O ACSF para registro possui a

mesma composição que o ACSF para corte com exceção do $CaCl_2$ e do $MgCl_2$ que correspondem a 2 mM e 1 mM, respectivamente.

Whole-Cell Patch Clamp

As fatias foram perfundidas (1.2 – 2 ml/min) com ACSF a 31 ± 1°C. Os experimentos foram realizados usando eletrodos formados por micropipeta de vidro borosilicato (PG52151-4, World Precision Instruments) com resistência entre 2-3 MΩ preenchidos com solução de pipeta (em mM: 125 K-Gluconato, 20 KCl, 10 Na_2-Fosfocreatina, 0.5 EGTA, 10 HEPES, 4 MgATP, 0.3 Na_2 ATP, pH 7.2, 300 mOsm). O potencial de junção líquida, calculado em -9 mV, foi corrigido antes de obter o gigaselo. Em alguns experimentos foi realizada a substituição do K^+ pelo Cs^+ como cátion principal. Para estes o potencial de junção líquida foi calculado como -5,5 mV.

Depois de formado o gigaselo, o potencial de comando do amplificador foi ajustado em -60 mV. Após o rompimento da membrana, a corrente foi registrada por 5 minutos. Células que apresentaram variação de até 30 pA na corrente basal durante este período foram consideradas estáveis e aceitas para o experimento. Para medir a resistência de acesso, utilizamos pulsos hiperpolarizantes de -5 mV. A partir da intensidade da corrente medido no pico do transiente capacitivo, utilizamos a lei de Ohm (V=RI) para avaliação da resistência em série. Foram aceitos experimentos com até 25 MΩ de resistência em série durante o período de avaliação.

Na maioria dos experimentos, a corrente evocada por DHPG foi medida utilizando um potencial de comando de -60 mV. Para medir a relação I-V da corrente, protocolos de rampas lentas variaram o potencial de comando de -110 mV a -40 mV com uma taxa de 35 mV/s.

Com os dados sobre a resistência em série, obtidos durante todo o experimento, corrigimos o potencial de membrana dos protocolos seguindo a relação:

$$V_m' = V_m – Rs\ I_m$$

onde V_m' corresponde ao potencial de membrana corrigido, V_m ao potencial de membrana configurado (i.e., o potencial de comando), Rs a resistência em série medida e I_m a corrente de membrana registrada.

Aplicação das drogas

Todas as soluções de estoque dos fármacos utilizados tinham concentração de 1000 vezes a concentração final. A adição de fármacos na perfusão de banho foi realizada pela troca da entrada da linha de perfusão ou acréscimo direto na solução em percurso. O tempo morto da linha foi medido e nas figuras a barra correspondente ao tempo de aplicação das drogas indica o momento em que a droga efetivamente entrou na câmara de registro.

A aplicação local de DHPG utilizou micropipeta de perfusão de vidro borosilicato preenchidas com solução isosmótica (em mM: 140 NaCl, 20 HEPES, pH 7.4) e DHPG (100 µM). Esta foi conectada à um sistema “OpenSpritzer” (Forman et al., 2017). Em resumo, a pipeta foi conectada à saída de uma válvula solenoide rápida (Festo MHE2-MS1H-3/2G-M7, tempo de resposta <2 ms). A entrada da válvula foi conectada à saída de um regulador de pressão de precisão que foi alimentado por N_2 a 4 atm. A válvula foi controlada por pulsos de 5V enviados pelo computador e a pressão da aplicação (~0,2 atm) bem como o tempo de aplicação (10 – 20 ms) foi ajustado para gerar respostas adequadas. Nosso protocolo padrão consistiu em ativar a válvula por 10 ms a cada 50 s enquanto monitoramos a corrente de membrana em voltage clamp. As pipetas de perfusão foram posicionadas a uma distância de ~24 µm da célula-alvo (Figura 7).

4.4 Análise dos dados e estatística

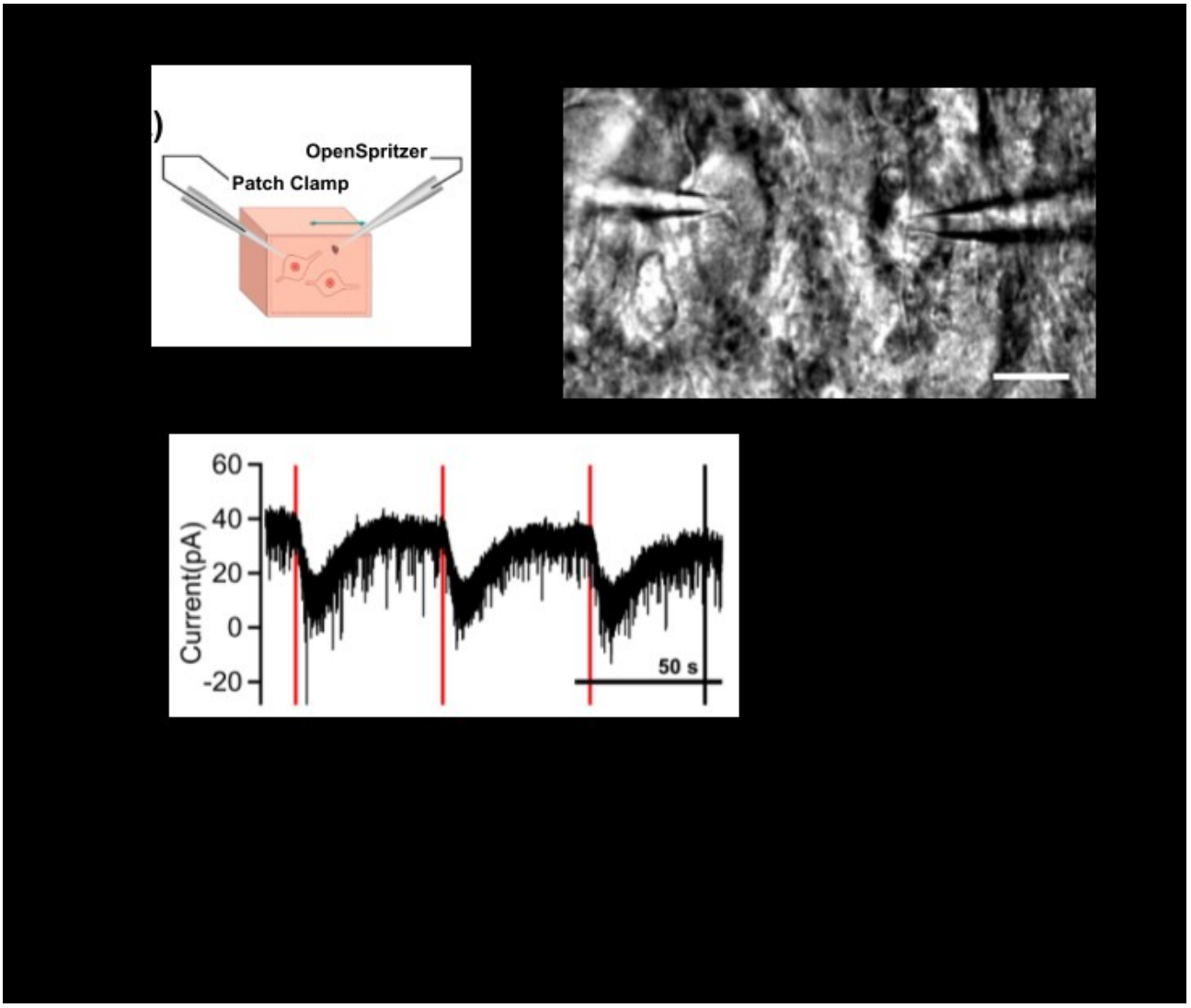
Todos os dados foram analisados utilizando programas desenvolvidos em nosso laboratório, escritos para o software IgorPro (Wavemetrics). Os experimentos

foram delineados para que cada célula pudesse ser observada nas fases de controle, teste e lavagem.

Para determinar o pico da corrente promovida por DHPG, observamos múltiplas aplicações e calculamos o tempo para a corrente alcançar o seu maior efeito. Em média, esse pico ocorreu 2 s após o pulso de DHPG. O valor da amplitude da corrente evocada pelo DHPG foi calculado como a diferença entre o valor da corrente no pico do seu efeito e sua respectiva linha de base. Para minimizar o impacto de ruído, o pico foi medido como valor médio de um intervalo de 0,3 s centralizado no pico. Para determinar o valor da corrente em cada fase do registro (controle, tratamento e lavagem) foi realizada a resposta média de pelo menos 3 aplicações de DHPG.

Para medir a relação I-V da corrente ativada por DHPG, utilizamos protocolos de rampa de voltagem. Para esse protocolo, as rampas foram aplicadas em grupos de três: um anterior a aplicação de DHPG, um no momento do pico da corrente DHPG e um 25 s após a aplicação de DHPG. Desta forma, a corrente evocada por DHPG foi medida como a diferença entre a corrente da segunda rampa e a primeira rampa. Esse ciclo foi repetido pelo menos 5 vezes em cada experimento.

Todos os resultados estão representados como a média ± desvio padrão. Efeitos de tratamentos foram testados com a versão do teste t de Student para dados pareados ou não-pareados, dependendo da natureza dos grupos experimentais. Valores de $p<0.05$ foram considerados como significativo.


OpenSpritzer
Patch Clamp
60
40
20
0
-20
Current(pA)
50 s

5. Resultados

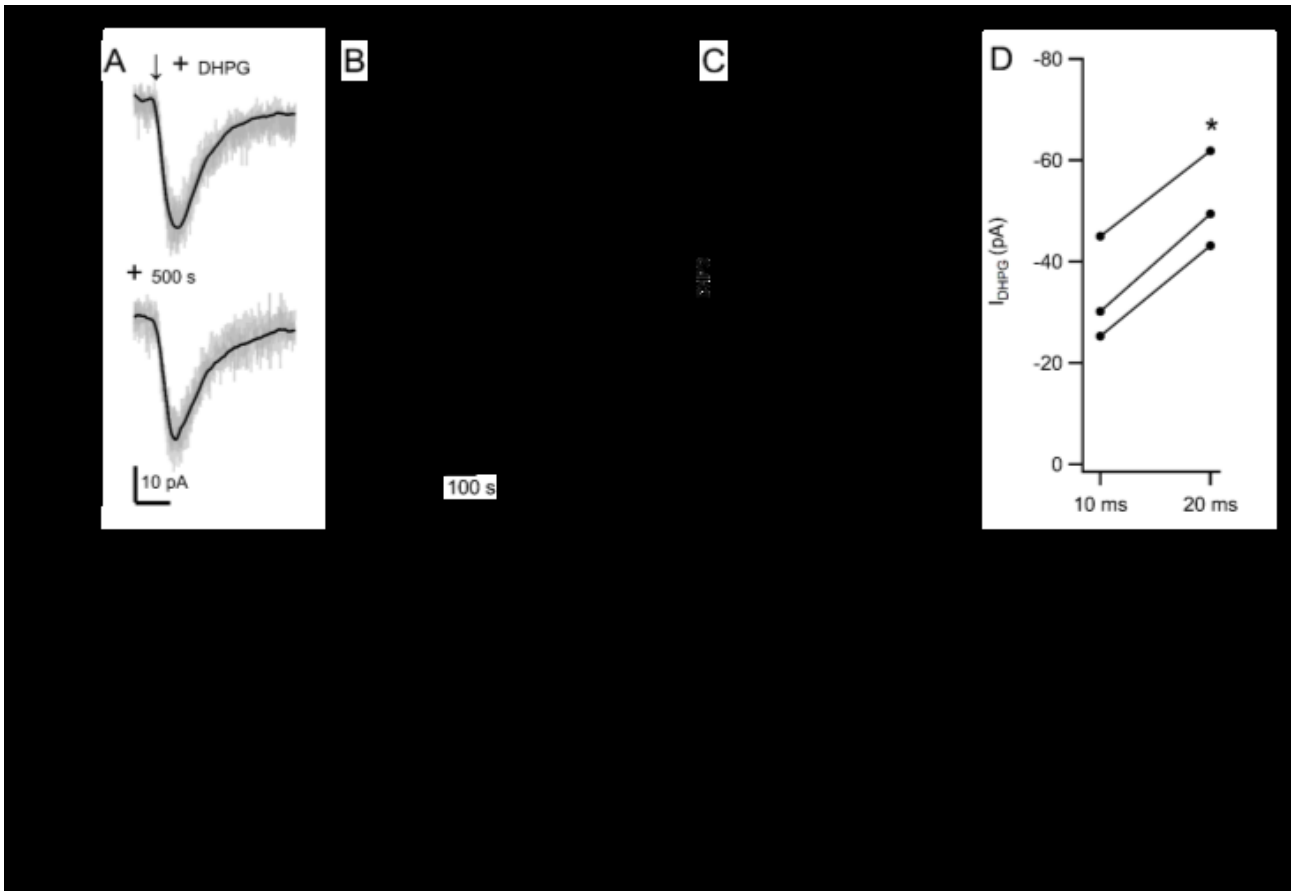
5.1 Ativação local e breve de DHPG gera corrente de entrada transiente

Nós mostramos anteriormente que o agonista seletivo para o grupo I dos mGluR, DHPG, promove corrente de entrada e aumento na frequência de disparos dos potenciais de ação nos neurônios LC. Contudo, nesses estudos aplicamos DHPG na solução de banho por cerca de 5 minutos. A resposta observada foi rapidamente dessensibilizada, com o retorno da corrente de membrana ou da frequência de disparos para níveis semelhantes aos registrados em controle ainda durante a exposição do agonista.

Como alternativa para evitar a dessensibilização nós utilizamos uma pipeta de perfusão para realizar aplicação rápida e local de DHPG usando o equipamento “OpenSpritzer”, construído como descrito por Forman et al. (2017). Testes iniciais foram realizados com a pipeta de perfusão preenchida com apenas solução isosmótica ou com solução isosmótica contendo L-glutamato (1,5 mM). Esses resultados demonstraram uma clara corrente de entrada evocada pela aplicação de glutamato que foi ausente quando a pipeta continha apenas a solução isosmótica.

Em seguida padronizamos a aplicação do agonista seletivo para os receptores mGluR-I, o DHPG. Observamos que o uso de 100 μM de DHPG na pipeta de perfusão e aplicações de 10 ms geraram uma corrente de entrada (Figura 8). Para avaliar a estabilidade da amplitude da corrente, pulsos de DHPG foram aplicados a cada 50 s (Figura 7B). Na figura 8A, podemos observar traços da corrente evocada pelo DHPG logo no início do registro e após o período de 500 s, durante os quais o DHPG foi aplicado 11 vezes. O registro representativo demonstra estabilidade na amplitude da corrente, não sendo possível observar alterações na amplitude. Para confirmar este achado, normalizamos o valor da amplitude de cada aplicação com o valor médio obtido pelas 3 primeiras

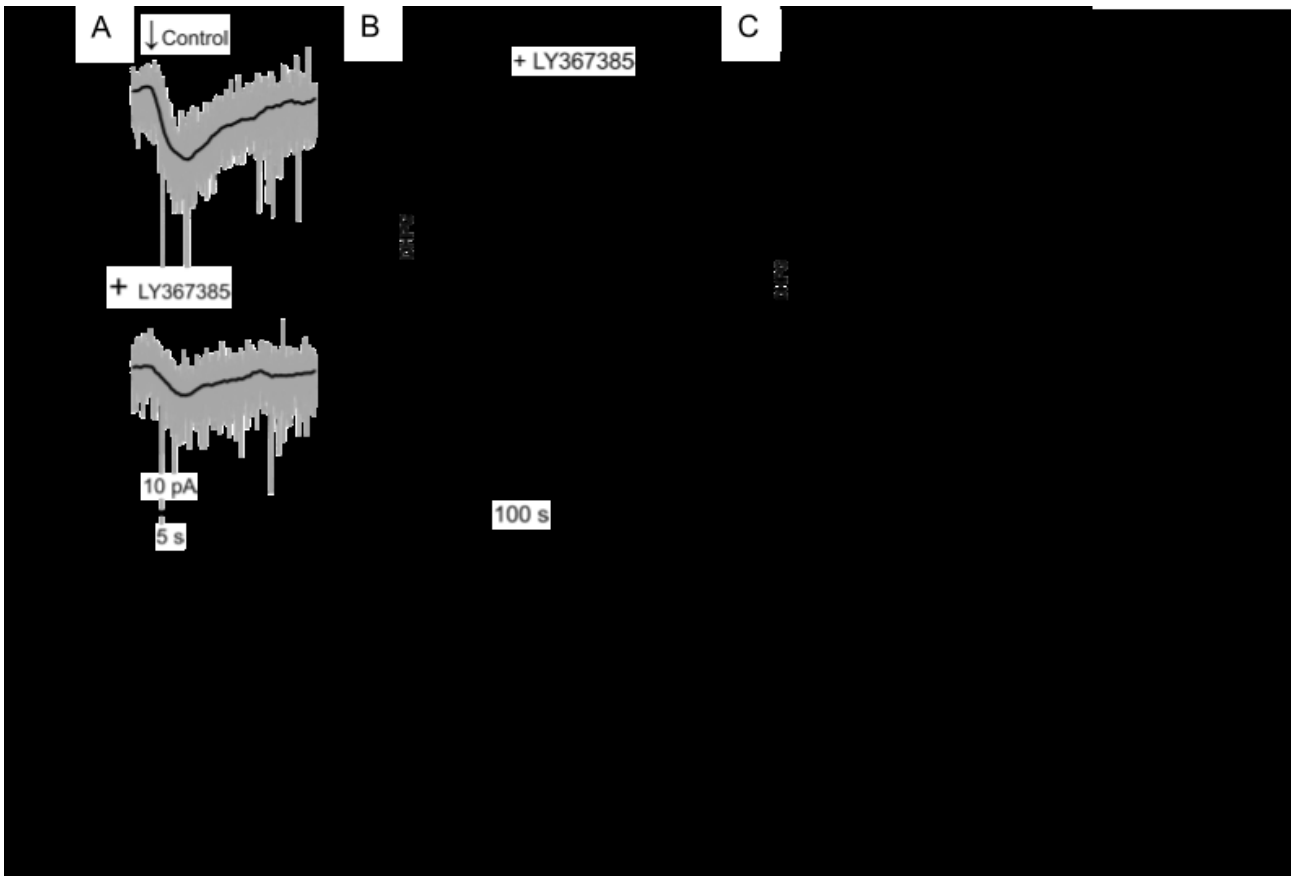
aplicações. A Figura 8B compreende o gráfico temporal correspondente ao registro mostrado em A e confirma que a aplicação local e curta reproduziu correntes com amplitude semelhante durante o tempo do registro (~1500 s) sendo eficaz como alternativa para coibir a dessensibilização. Em grupo de 7 células testadas, a amplitude da resposta ao DHPG após 500 s de registro e 11 aplicações foi 109±11% da resposta inicial (Figura 8C; p= 0.09). Além disso, quando variamos a duração do pulso, a resposta foi dose-dependente (Figura 8D). O aumento na corrente quando DHPG foi aplicado por pulsos 20 ms foi de 57 ± 17% (p=0.0015) comparado com a aplicação de pulsos de 10 ms.



5.2 Bloqueio da isoforma mGlu1 com LY367385 reduz a amplitude da corrente DHPG

Uma vez confirmada a estabilidade da corrente DHPG, nossa próxima questão envolvia confirmar se, de fato, a corrente se deve a ativação dos receptores mGluR-I. Em estudos anteriores identificamos que nos neurônios LC a isoforma mGlu1 é a principal responsável pela corrente promovida pela aplicação de DHPG (Guimarães, 2017). Portanto, para confirmar que a corrente observada via aplicação curta e local é resultado da ativação destes receptores utilizamos o antagonista seletivo LY367385 (160 µM).

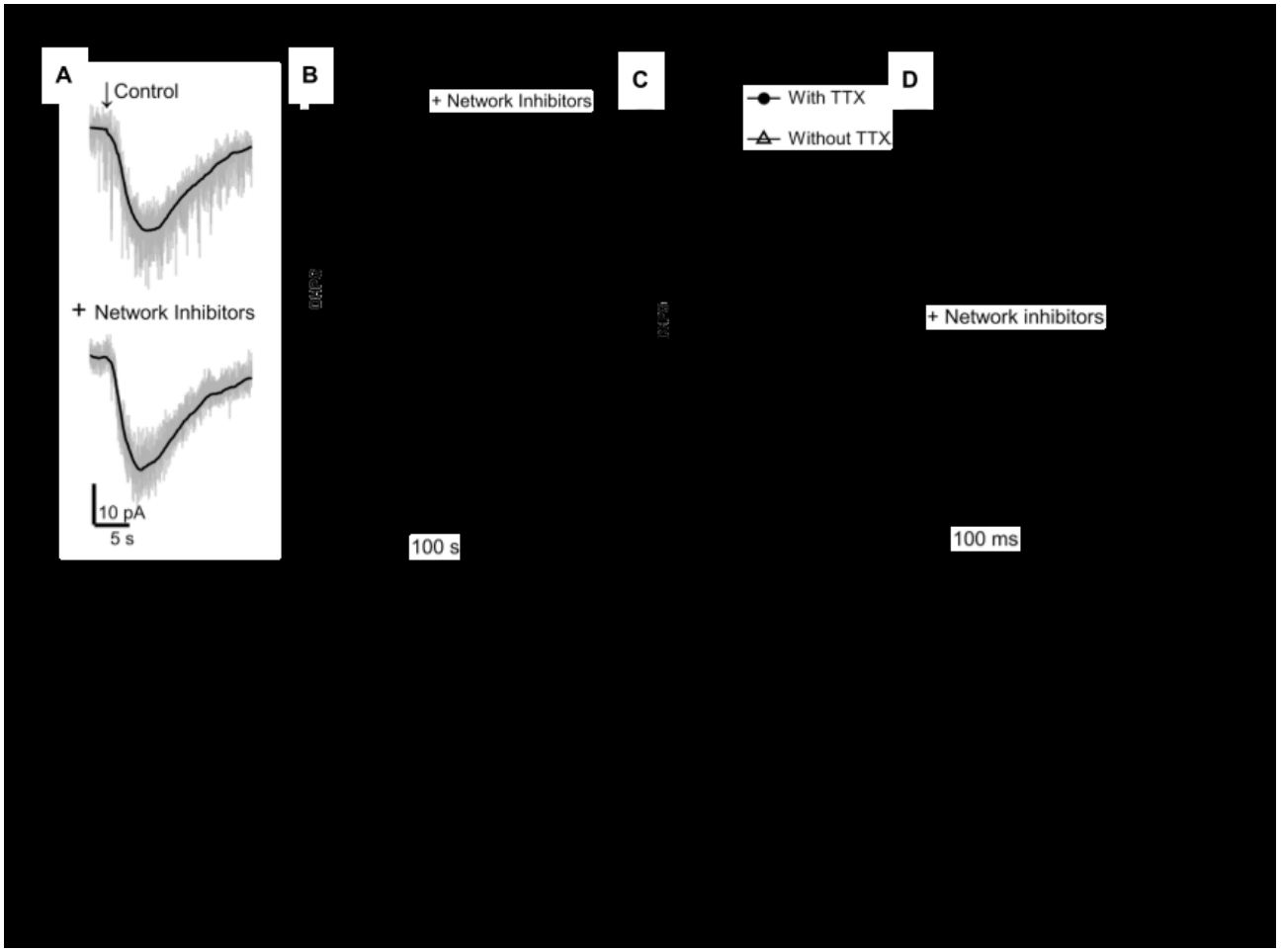
Na Figura 9, estão representados os resultados deste experimento. Os traços da corrente demonstrada em A ilustram que a aplicação do antagonista na perfusão do banho impactou na amplitude da corrente DHPG. O gráfico temporal da figura 9B revela uma redução de ~70% quando comparado com a amplitude da corrente na condição controle. O final do registro aponta um retorno parcial da amplitude da



corrente após lavagem do antagonista. Em média, o tratamento com LY367385 (160 μM) inibiu a corrente em 69 ± 19% (Figura 9C, n=4, p=0.002).

5.3 Inibição das principais vias de neurotransmissão não reduz a corrente evocada por DHPG

Embora a aplicação local de DHPG evite a dessensibilização do seu efeito, a localidade dos receptores metabotrópicos ativados permanecia incerta, pois a sua ação poderia ocorrer no LC ou em outro neurônio da região que projeta para o LC. Para determinar se a corrente da aplicação de DHPG foi causada por uma ação diretamente no neurônio do LC, realizamos o tratamento com antagonistas para os principais tipos de receptores sinápticos: NMDA (MK-801 10 μM), AMPA (CNQX, 10 μM), GABA (Picrotoxina, 10 μM) e Glicina (Estricnina, 5 μM).



A figura 10 nos mostra que o uso do coquetel de bloqueadores não teve impacto na I_{DHPG}. Na figura 10A, podemos observar que a adição dos inibidores não alterou a amplitude da corrente. Quando comparados com o valor médio das primeiras aplicações é possível observar que a amplitude da corrente se manteve constante. Ao final do registro a célula ainda apresentava ~90% da amplitude da corrente inicial. Quando analisados quantitativamente, não foram encontradas diferenças significativas (Figura 10C, n=5, p= 0.25). Experimentos complementares realizados com aplicação adicional do bloqueador de canais de Na^+ voltagem-dependentes, tetrodotoxina (1μM), reproduziram o mesmo resultado (n=4, p=0.51). Como forma de controle positivo dos efeitos dos antagonistas sinápticos, observamos a presença de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas durante o início do registro e após exposição dos bloqueadores. A figura 10D mostra o silenciamento das correntes sinápticas, como esperado, na presença dos inibidores. Estes dados, portanto, comprovam que a ativação de mGluR-I por DHPG ocorre de fato nos neurônios do LC.

5.4 Ativação dos receptores mGluR-I não envolve canais seletivos para K^+

Estudos anteriores em outras regiões do SNC indicam que aumento da excitabilidade por receptores mGluR-I pode envolver a modulação das correntes de K^+ (Chemin J et al., 2003; revisado por Correa et al., 2017). Para verificar o envolvimento de canais seletivos para K^+ na corrente observada, examinamos a relação corrente-voltagem da corrente evocada por DHPG com protocolo de rampa lenta (Figura 11). O tempo de cada rampa foi ajustado em referência à aplicação de DHPG (Figura 11A), sendo que a rampa na presença do agonista ocorreu com intervalo de 2 s após o pulso para coincidir com o pico da corrente evocada (Figura 11B). A relação entre corrente-voltagem mostra que DHPG promoveu o deslocamento da corrente de forma quase uniforme para valores mais negativos (Figura 11C). Quando observada a curva I-V de DHPG, resultante da subtração das correntes obtidas por rampas na presença de DHPG e seu

respectivo controle, evidenciou-se que na faixa entre -100 mV até -50 mV não existe dependência de voltagem mensurável, e o valor médio da corrente corresponde a -26 ± 2.7 pA (Figura 11C-D). Ou seja, a corrente ativada por DHPG não demonstrou caráter seletivo para K^+. Considerando que nas condições do nosso experimento o potencial de equilíbrio para K^+ é calculado em -105 mV, caso a modulação envolvesse a participação de canais seletivos para K^+ era esperado uma convergência entre as rampas de controle e na presença de DHPG até se encontrarem no potencial de equilíbrio de K^+. O resultado apresentado aponta duas possíveis interpretações; (i) os canais de K^+ não estão envolvidos na corrente promovida por DHPG ou (ii) os canais de K^+ não são os principais

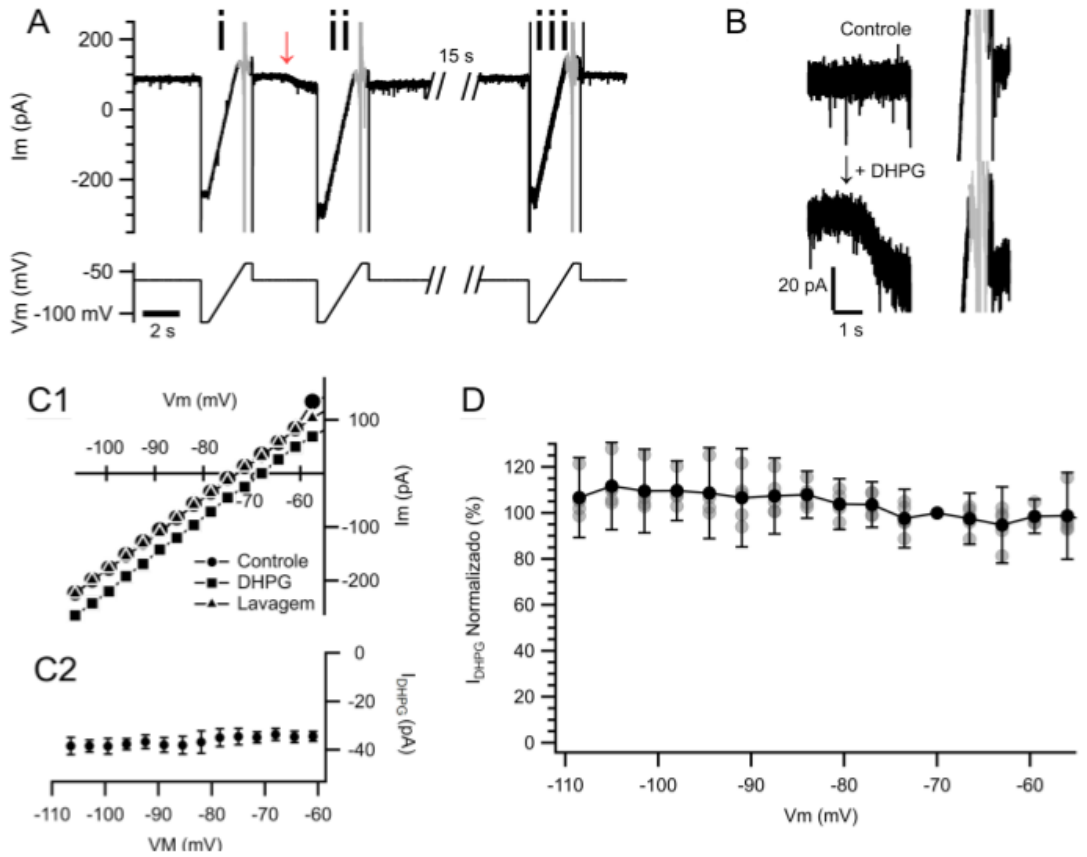
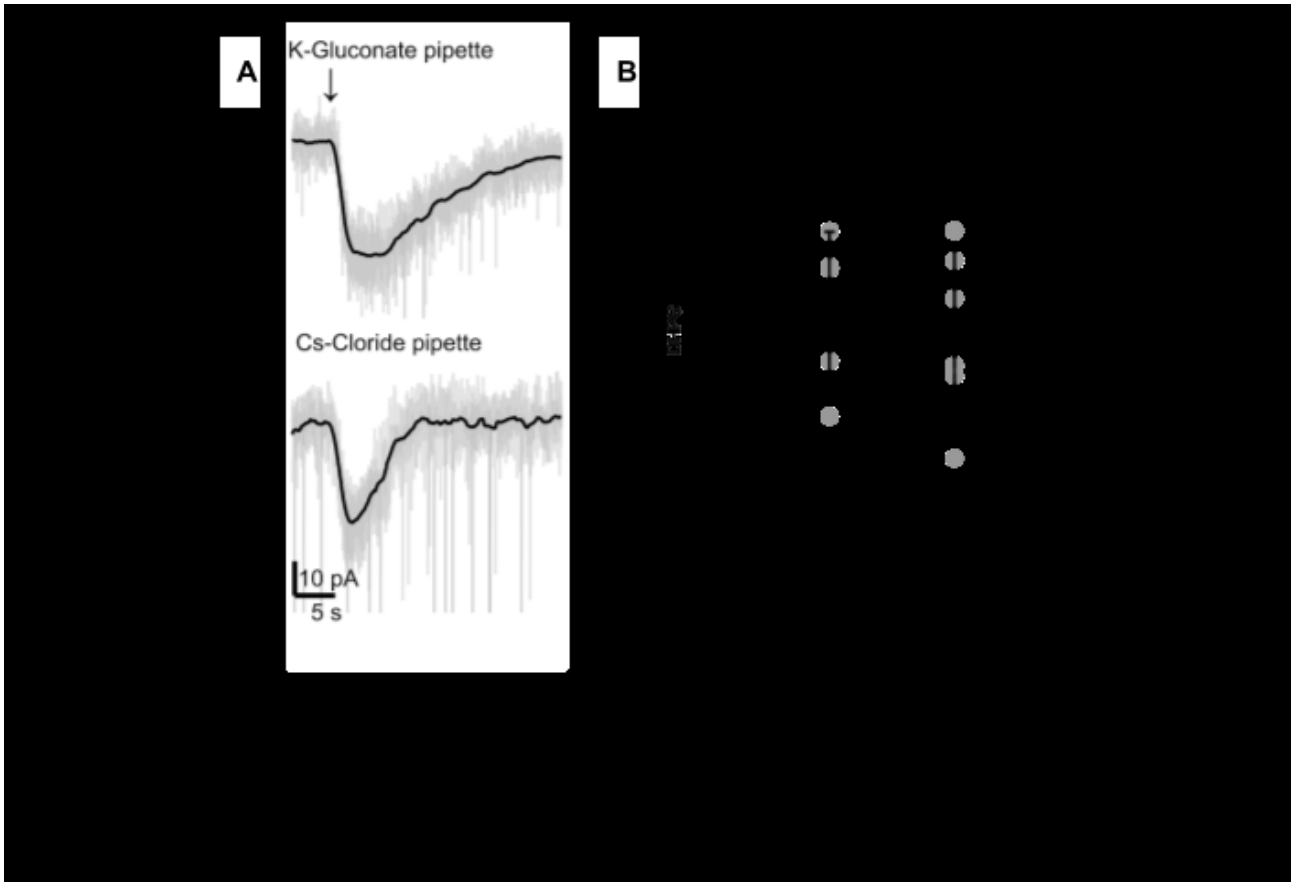


Figura 11. A relação I-V da corrente evocada por DHPG descarta o envolvimento de canais seletivos para potássio na modulação mediados por receptores mGluR-I. A) Esquema do protocolo de rampas em whole-cell voltage clamp. **Acima:** Corrente de membrana **Abaixo:** Valores do potencial de comando. **i**-controle, **ii**-DHPG, **iii**- Lavagem **B)** Trecho de registro na condição controle e com a aplicação do pulso de DHPG evidenciando que o início da rampa coincide com o pico da corrente I_{DHPG}. **C)** Exemplo representativo de um experimento **C1)** Relação corrente-voltagem das correntes geradas pelo protocolo de rampa nas condições controle, na presença de DHPG e depois da lavagem do efeito da DHPG **C2)** Corrente resultante da subtração (DHPG- controle) dos dados mostrados em C1 **D)** Valor médio da corrente normalizado obtidos em 5 experimentos independentes. Para a normalização, utilizamos o valor da corrente medido em -70 mV .

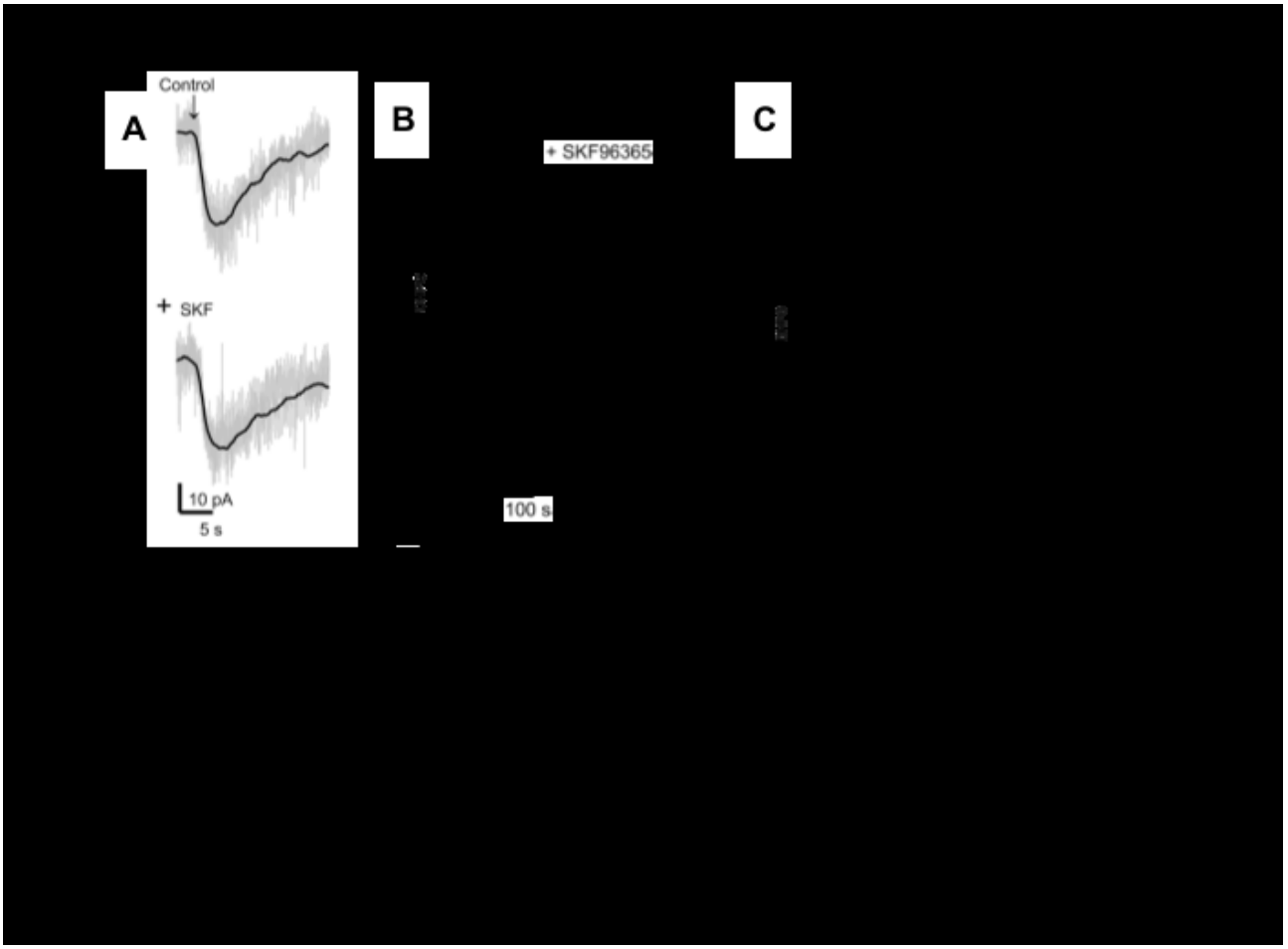
efetores da corrente promovida por DHPG, sendo a corrente evocada uma mistura de diferentes condutâncias.

Para distinguir entre estas duas opções realizamos experimentos com a substituição do K^+ pelo Cs^+ como principal cátion na solução intracelular e investigamos a amplitude das correntes evocadas por DHPG. Como pode ser observado na Figura 12, a substituição do cátion não afetou na amplitude da corrente DHPG. Os valores encontrados para pipetas preenchidas com solução intracelular de gluconato de K^+ ou CsCl correspondem a –25 ± 7.6 pA e –23 ± 8.3 pA, respectivamente (Figura 12B, n= 5 e n=6 respectivamente, p= 0.65). Com esses achados nós concluímos que os canais seletivos para K^+ não participam da modulação dos mGluR-I nos neurônios LC.



5.5 Ativação dos receptores mGluR-I não envolve participação de canais TRPC sensíveis ao bloqueador SKF-96365

Os canais TRPC (do inglês “Transient Receptor Potential Canonical”) podem ser modulados por mGluR-I via componentes da cascata de sinalização canônica da Proteína $G\alpha_q$ (revisado por WANG, 2017). No LC, a expressão destes canais foi previamente identificada por Cui et al. (2011), sendo a isoforma TRPC5 a mais abundante. Para avaliar se estes canais eram ativados pela aplicação local de DHPG utilizamos o agonista SKF-96365 (50 μM). A figura 13A mostra que a amplitude da corrente evocada por DHPG não apresentou redução com a presença do bloqueador. No gráfico temporal da figura 13B, durante a presença de SKF-96365 a amplitude de DHPG permaneceu com ~93% do seu valor medido nas primeiras aplicações. A análise quantitativa dos experimentos não encontrou diferenças significativas (Figura 13C, n=3, p=0.66). Portanto, nós concluímos que no LC os canais TRPC não são responsáveis pela corrente promovida pela ativação de mGluR-I.

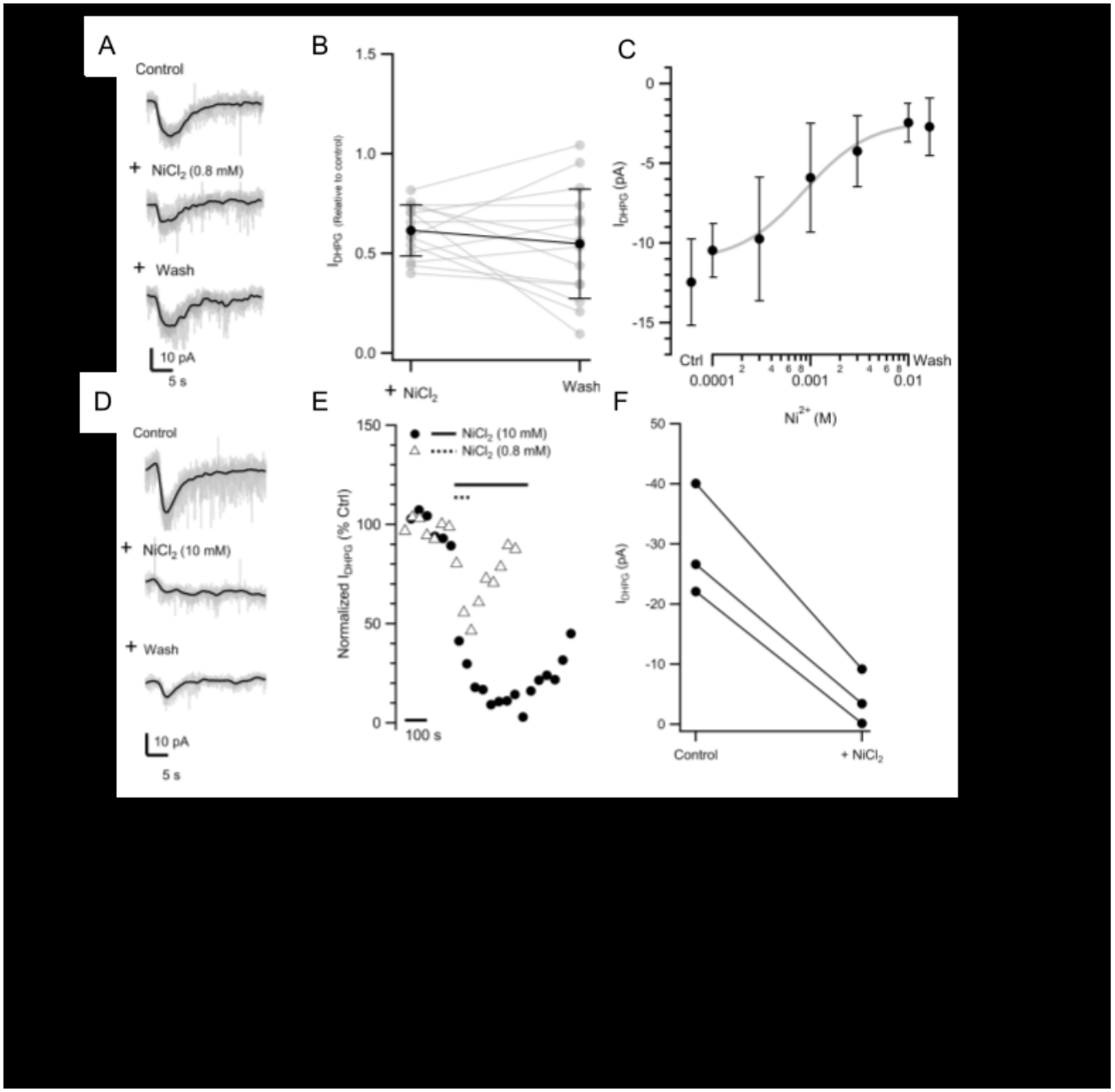


5.6 Bloqueio da corrente DHPG por $Ni2^{+}$ indica participação de canais de Ca^{2+}

Estudos realizados em neurônios do bulbo olfatório e da medula espinhal demonstram que a ativação de receptores mGluR-I pode ativar canais de Ca^{2+} do tipo T e L (Johnstons e Delaney, 2010; Radwani et al., 2017; Govindaiah et al., 2018). Respectivamente, esses tipos de canais pertencem ao grupo dos canais de Ca^{2+} do tipo LVA (do inglês, *Low Voltage Activated*) e HVA (do inglês, High Voltage Activated). Em baixas concentrações, Ni^{2+} é descrito como um bloqueador seletivo de canais de Ca^{2+} do tipo LVA, porém em concentrações maiores também bloqueiam canais para Ca^{2+} do tipo HVA (Lee et al., 1999, revisado por Hille, 2001). Além disso, a partir de 2mM, Ni^{2+} é capaz de bloquear proteínas de transporte como o trocador Na^{+}/Ca^{2+} (revisado por Blaustein e Lederer, 1999; revisado por Hille, 2001). Sendo assim, avaliar a amplitude da corrente DHPG frente as diferentes concentrações de Ni^{2+} nos permite discernir entre essas diferentes proteínas. A adição cumulativa de diferentes concentrações de Ni^{2+} demonstrou uma inibição concentração- dependente, com efeito máximo de 90.4 ± 10.5% e IC_{50} = 0.9 ± 0.09 mM (Figura 14C). As menores concentrações não apresentaram redução na amplitude da corrente, tornando incoerente a participação de canais de Ca^{2+} LVA. Contudo, o valor do IC_{50} da inibição da corrente DHPG pelo Ni^{2+} também está abaixo do esperado para o bloqueio do trocador Na^{+}/Ca^{2+}. Estes dados sugerem que a ativação de receptores mGluR-I envolve a participação de canais para Ca^{2+} do tipo HVA e do trocador Na^{+}/Ca^{2+} além de tornar improvável a participação de canais para Ca^{2+} LVA. No entanto, não observamos retorno da corrente após a lavagem do Ni^{2+}.

Para verificar se a inibição observada era resultante somente do bloqueio das proteínas pelo Ni^{2+} e descartar a possibilidade de efeito mediante a longa exposição de altas concentrações de Ni^{2+}, utilizamos um protocolo mais curto, com aplicação única de Ni^{2+} na concentração próxima do IC_{50} (0.8 mM) e na concentração máxima (10 mM). Como esperado, ambas as concentrações

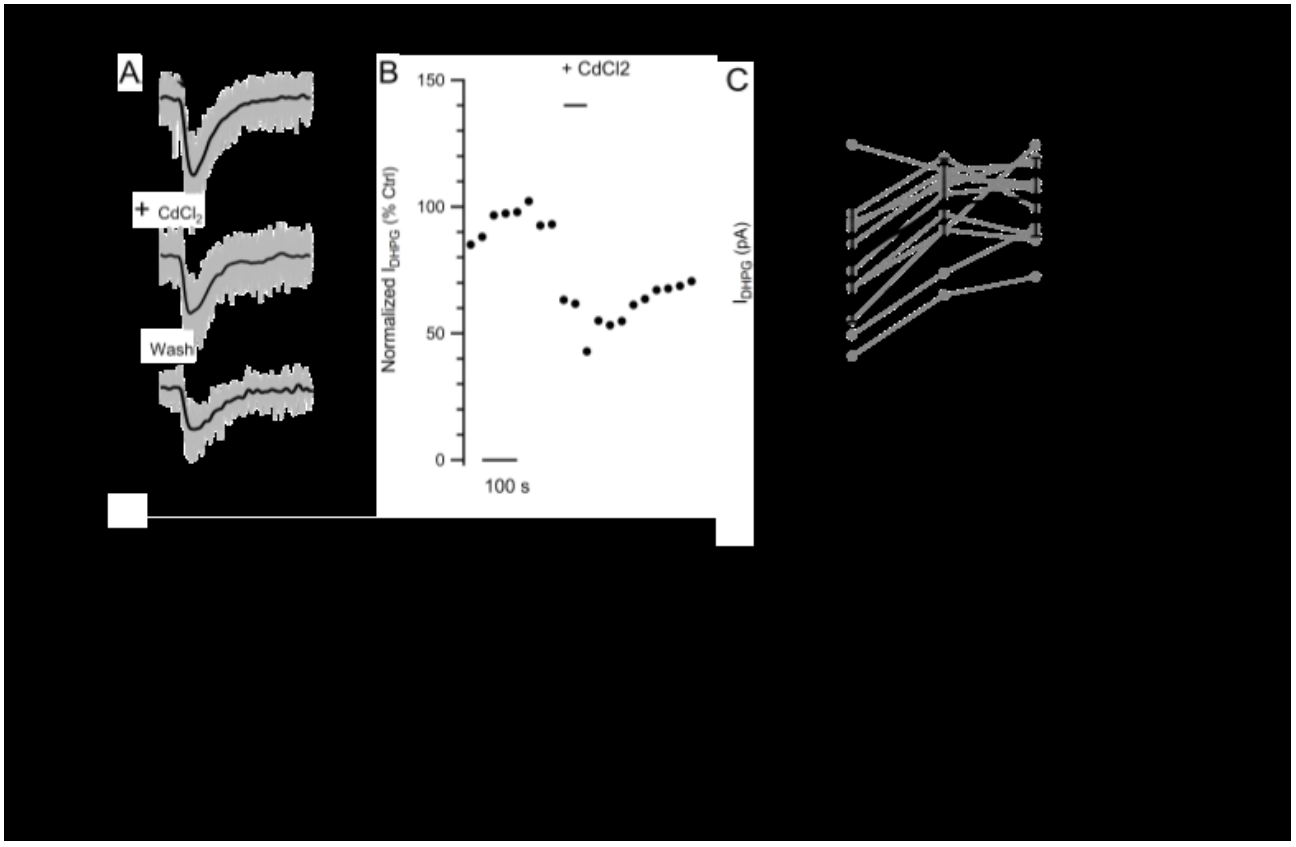
apresentaram uma redução significativa na amplitude da corrente DHPG. Respectivamente, a aplicação única dessas concentrações inibiu 40 ± 12.8% e 88 ± 11.9 % da amplitude da corrente, corroborando com os dados da adição cumulativa (Figura 14A-F). Contudo, mesmo com este protocolo mais curto, o bloqueio pelo Ni^{2+} ainda permanece irreversível para a maior parte dos neurônios LC testados (Figura 14B). Portanto, nossos resultados apontam a participação de canais HVA e o trocador Na^{+}/Ca^{2+} na corrente promovida pelos receptores mGluR-I, porém, devido à natureza irreversível do bloqueio do Ni^{2+}, e a sua baixa



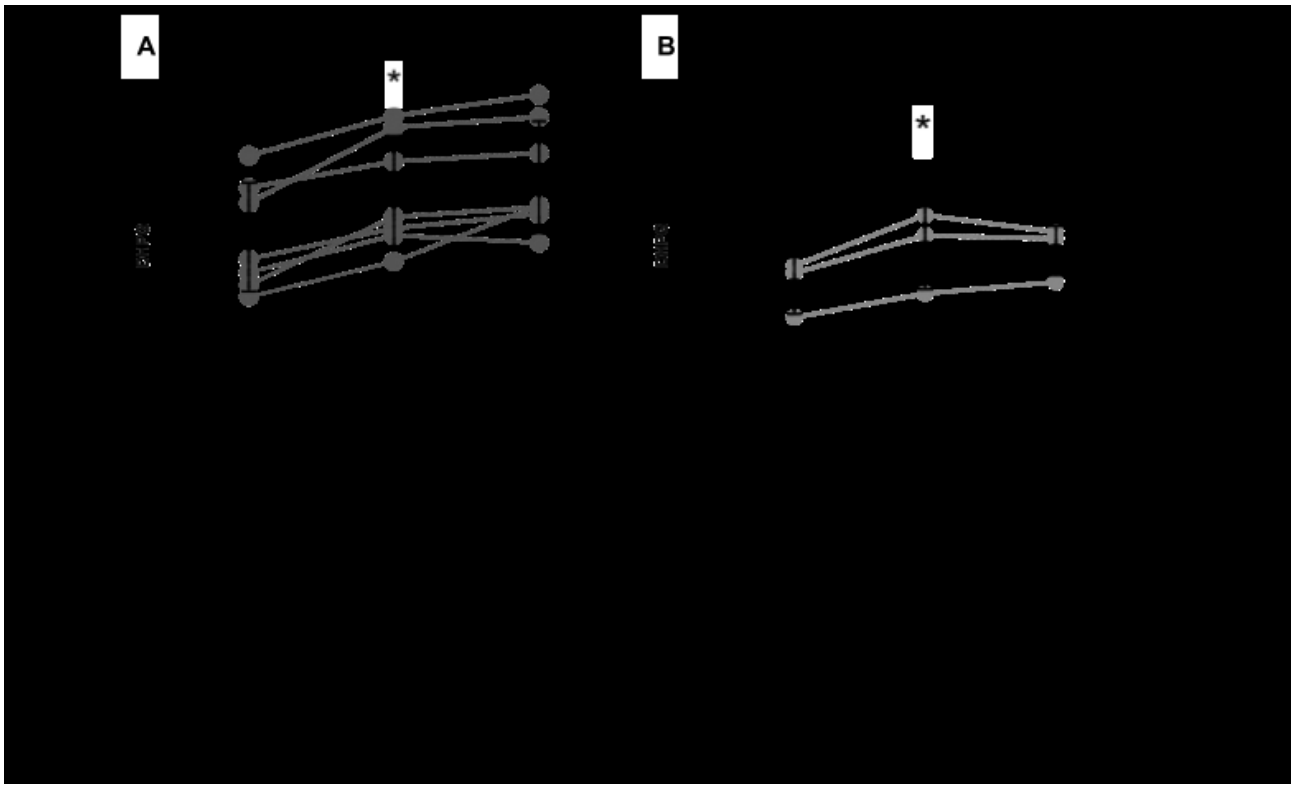
seletividade decidimos confirmar o envolvimento destes canais através de outros bloqueadores.

5.7 Bloqueio de canais HVA resulta em redução na corrente DHPG

Os canais de Ca^{2+} do tipo HVA possuem maior sensibilidade ao bloqueio por Cd^{2+} comparado ao Ni^{2+} (revisado por Tsien et al., 1988). Observamos que Cd^{2+} (100 µM) reduziu a amplitude da corrente DHPG (Figura 15). O gráfico temporal da figura 15B aponta uma redução de ~45% quando comparado com a amplitude das aplicações durante o controle. Em média o tratamento com Cd^{2+} inibiu a corrente evocada por DHPG em 45 ± 10% (Figura 15C, n=11, p=<0.01). Este resultado é próximo da inibição por Ni^{2+} (0,8 mM) e novamente indica a participação de canais HVA na corrente DHPG. O Cd^{2+} bloqueia do modo não seletivo entre os canais de Ca^{2+} do tipo HVA incluindo famílias de canais de Ca^{2+} do tipo L, N, P/Q e R (revisado por Hille, 2001).



No LC, diferentes famílias de canais de Ca^{2+} foram anteriormente identificados (Connor, Borgland e Christie, 1999; Matschke et al., 2015). Os canais para Ca^{2+} do tipo L, sensíveis a diidropiridinas, participam das oscilações de cálcio presentes na atividade marca-passo e tem papel relevante na resposta a hipercapnia (Sanchez-Padilla et al., 2014; Imber et al., 2018). Além disso, como dito anteriormente estes canais são possíveis alvos para as alterações de curto-prazo promovidas pela ativação de receptores mGluR-I. Para averiguar a participação destes canais na corrente DHPG, testamos duas diidropiridinas, nifedipina (100 µM) e nimodipina (5 µM). A figura 16 mostra a relação entre o valor médio de cada condição. O resultado aponta que tanto a nifedipina (Figura 16A) quanto a nimodipina (Fig 16B) reduzem a amplitude da corrente DHPG. Em média a redução observada foi de 30.5 ± 14.2% e 20.7 ± 7.5% na presença dos respectivos bloqueadores (n=7 e n=3; p= 0.0005 e p=0.03, respectivamente). Portanto, canais de Ca^{2+} da família HVA, e especificamente do tipo L são responsáveis por parte da corrente promovida pela ativação dos receptores mGluR-I nos neurônios do LC.



5.8 Substituição do Na+ pela colina na solução extracelular

Na sua concentração máxima, Ni^{2+} foi capaz de inibir mais de 80% da amplitude da corrente promovida por DHPG. Apesar dos experimentos confirmarem o envolvimento de canais para Ca^{2+} do tipo HVA, o uso de bloqueadores mais seletivos apresentou redução parcial na corrente DHPG. Levando em conta estas informações investigamos a contribuição da corrente eletrogênica do trocador Na^{+}/Ca^{2+} na amplitude da corrente promovida pelo DHPG.

Para avaliar a participação dessa proteína, realizamos a substituição do Na^{+} pelo íon colina na solução extracelular. A figura 17 demonstra que a alteração no gradiente para Na^{+} reduziu a amplitude da corrente DHPG. O gráfico temporal da figura 17B aponta uma redução de ~70% quando comparado com a amplitude das aplicações durante o controle e um retorno de ~50% na condição de lavagem. Em média, a substituição de Na^{+} por colina inibiu a corrente evocada por DHPG em 70 ± 10% (Figura 17C, n=5, p=<0.05). Este resultado é próximo da inibição observada com Ni^{2+} na concentração de 10 mM, corroborando com a participação do trocador Na^{+}/Ca^{2+} nas alterações de curto-prazo promovidas pelos receptores mGluR-I.

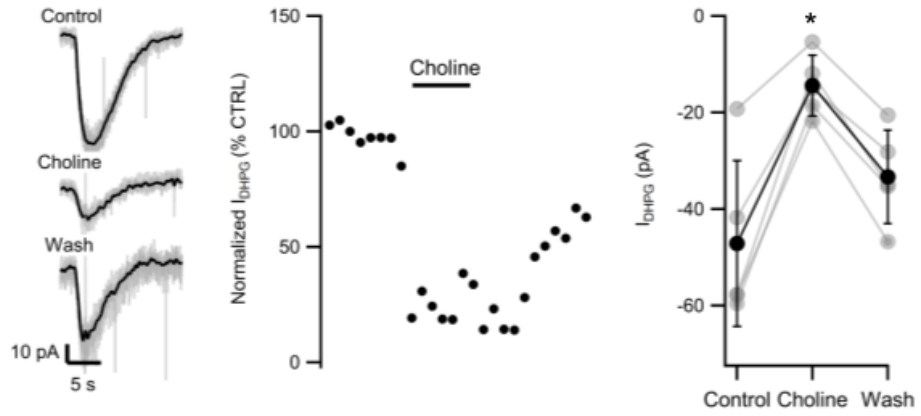


Figura 17. Substituição do sódio extracelular por colina reduz a amplitude da corrente DHPG . A) Registro whole-cell voltage clamp mostrando a corrente de entrada evocada por DHPG antes, durante e após a substituição de NaCl (125 mM) por cloreto de colina (125 mM) **B)** Gráfico temporal do registro em A, mostrando a porcentaem da amplitude de IDHPG comparado ao valor médio das 3 primeiras aplicações. **C)** Valor da corrente evocada por DHPG na condição controle, durante a substituição por colina e na lavagem em 5 experimentos independentes. Em **C,** cada dado representa o valor médio de três aplicações de DHPG.

6. Discussão

A ativação da família dos receptores mGluR do Grupo I contribui com diversos processos de excitabilidade neuronal e transmissão sináptica no SNC. No hipocampo, esses receptores têm papel importante na plasticidade sináptica de longo prazo (LTP e LTD; Gladding, Fitzjoohn e Molnár, 2009). Sua ativação está relacionada com aprendizado e envolve modulação de AMP cíclico e participação de canais HCN (Brager e Jonston, 2007). Outro estudo no núcleo medial do corpo trapezoide demonstrou que os mGluR-I inibem influxo de Ca^{2+} pré-sináptico e aumentam a excitabilidade pós-sináptica (Kushmerick et al., 2004; dos Santos e Alhadas et al., 2019). No geral, a ativação destes receptores promove diferentes respostas neuronais consequentes da modulação de canais iônicos ou mesmo regulação da expressão gênica (revisado por Wang e Zhuo, 2012; Correa et al., 2017).

Através de experimentos eletrofisiológicos e diferentes abordagens farmacológicas, este estudo apresentou evidências acerca da caracterização dos mecanismos de transporte de membrana envolvidos na modulação da excitabilidade de neurônios do Locus Coeruleus mediada por receptores mGluR do grupo I. Demonstramos que os receptores mGluR-I responsáveis pela corrente provocada pela aplicação de DHPG residem de fato nos neurônios LC. Além disso, os resultados obtidos descartam a participação de canais seletivos para K^+ e canais TRPC, e identificamos a participação de canais de Ca^{2+} do tipo L e o trocador Na^+/Ca^{2+}. A seguir discutimos as possíveis implicações e limitações associadas aos nossos achados.

Vários estudos apontam a modulação dos neurônios LC por receptores glutamatérgicos. Olpe et al. (1989) verificou que a aplicação via perfusão no banho de diferentes agonistas glutamatérgicos (NMDA, quisqualato, glutamato e kainato) promovia o aumento da atividade espontânea. Outro estudo com os neurônios dissociados evidenciou a despolarização do potencial de membrana

em resposta à aplicação de glutamato (Masuko et al., 1986). No contexto dos receptores metabotrópicos, Dubé e Marshall (1997) investigaram a contribuição na modulação da transmissão sináptica avaliando a amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios e identificaram a inibição da resposta a partir da ativação de receptores mGluR dos grupos II e III. Embora estes dois receptores compartilhem o mesmo efeito e a mesma cascata de sinalização, os autores mostraram que as condições nas quais cada grupo é ativado são diferentes (Dubé e Marshall, 2000). A partir de experimentos com imunohistoquimica, sabemos que os neurônios do LC apresentam a expressão de receptores mGluR dos três grupos, incluindo as isoformas mGluR1 e mGluR5 (Noriega et al., 2007). Entretanto, o efeito da ativação destes receptores assim como a sua funcionalidade ainda precisam ser esclarecidos.

Em estudo anterior, investigamos a funcionalidade deste grupo de receptores no LC (Guimarães, 2017). Entre nossos achados mostramos que a frequência de disparos espontâneos destes neurônios aumentava com a ativação de mGluR-I pelo agonista seletivo e observamos uma corrente de entrada em registro com potencial de membrana clampeado. Além disso, experimentos com antagonistas seletivos indicaram que o efeito excitatório era majoritariamente resultante da ativação da isoforma mGlu1. Apesar do dimorfismo sexual presente no LC (Pinos et al. 2001; Bangasser et al. 2016), nossos dados indicaram que a ativação destes receptores não apresenta distinção por gênero. No presente trabalho focamos na identificação das estruturas de membrana responsáveis por promover este efeito.

6.1 Uso do OpenSpritzer como alternativa para coibir a dessensibilização

A dessensibilização de receptores acoplados a proteína G é um importante mecanismo de adaptação frente a um estímulo prolongado ou repetitivo. Este processo pode envolver a fosforilação de sítios específicos, mobilização de

quinases de receptores acoplados a proteína G (GRK) e a endocitose do receptor dependente de arrestinas (Dhami e Ferguson, 2006). No caso dos receptores mGluR-I, componentes da cascata de sinalização como proteína Kinase A e C (PKA, PKC) também são capazes de regular o processo de dessensibilização (Mao e Wang, 2016).

Estudos anteriores com aplicação de DHPG na linha de perfusão do banho resultaram em uma corrente de entrada que manifestou forte dessensibilização. Ou seja, ainda na presença do agonista, ocorreu o retorno dos valores da corrente para o nível basal registrado em controle (Guimarães, 2017). Aplicações posteriores resultavam em correntes de entrada com menor amplitude ou mesmo ausência de resposta da célula em questão (dados não-mostrados). Esse grau de dessensibilização prejudicou na investigação farmacológica da corrente observada, uma vez que não foi possível comparar de forma equivalente a condição controle com a condição de teste.

Na tentativa de coibir a dessensibilização, neste estudo, utilizamos a aplicação via pipeta de perfusão contendo DHPG nos neurônios LC (Figura 7). A estabilidade das respostas produzidas por esta técnica permitiu a comparação da corrente observada na presença de diferentes fármacos com seu valor em condições controle da mesma célula. Registros por longos períodos (500 s) não apresentaram tendência de redução na amplitude da corrente, sugerindo que a internalização destes receptores não ocorre com esta metodologia. Em neurônios dopaminérgicos da Substancia Nigra, um estudo que investigou a relação da amplitude das correntes em diferentes intervalos e a manutenção do $[Ca^{2+}]_i$ identificou que foram necessários ~180 segundos entre os pulsos para produzir uma resposta equivalente (Guatteo et al., 1999). No LC, durante a padronização do protocolo, observamos que foi necessário o intervalo de apenas 50 s entre os pulsos para reproduzir o mesmo efeito. Essa diferença, pode ser consequência de diferentes mecanismos de dessensibilização. A dependência da $[Ca^{2+}]_i$ na

dessensibilização da corrente DHPG dos neurônios LC ainda é desconhecida. Investigações utilizando quelantes de Ca^{2+} como o BAPTA na solução intracelular e diferentes intervalos entre as aplicações podem esclarecer se a corrente DHPG sofre dessensibilização por este mecanismo. Além disso, registros utilizando sondas fluorescentes de Ca^{2+} podem investigar qual o impacto do clearance da $[Ca^{2+}]_i$ na amplitude da corrente DHPG em neurônios do LC.

A concentração de DHPG utilizada nos experimentos descritos neste trabalho foi fixada em 100 µM. Este valor foi escolhido com base nos dados do estudo anterior que identificou a concentração de 30 µM como suficiente para obtenção do efeito máximo quando DHPG foi aplicado na linha de perfusão (Guimarães, 2017). Apesar do sistema de pulsos locais utilizado em nossos experimentos reduzir o impacto da droga no banho e permitir múltiplas respostas da mesma célula, a quantificação da entrega de fármacos permanece como uma limitação. Consideramos que a concentração de DHPG na pipeta de perfusão não reflete a concentração de fato entregue na membrana celular devido a processos de difusão. Com base nessa visão, o uso de uma concentração mais alta na pipeta de perfusão foi uma alteração necessária para garantir a promoção do efeito máximo de DHPG nos nossos experimentos. De fato, os valores da amplitude da corrente DHPG produzidos pelos pulsos breves foram semelhantes aos observados pela concentração de 30 µM via perfusão de banho relatados no estudo anterior.

A aplicação de DHPG gerou uma corrente de entrada na faixa dos 25 pA. Levando em consideração o estudo anterior, podemos concluir que esta corrente promoveria um aumento de cerca de 100% na taxa de disparos dos potenciais de ação (Guimarães, 2017). Outros tratamentos, que sabidamente aumentam a frequência de potenciais de ação dos neurônios do LC, também estão associados a uma corrente de entrada e despolarização do potencial de membrana. Por exemplo, a presença do hormônio estimulador de tireotrofina (TRH) no LC

promove uma corrente de entrada na faixa dos 20 pA e uma despolarização de próxima de 15mV (Ishibashi et al., 2009). A ativação de receptores mGluR-I não parece seguir este padrão. De acordo com o estudo anterior, a presença de DHPG despolariza os neurônios em cerca de apenas 2 mV e quando investigada a relação entre a taxa de disparos e o potencial de membrana no LC identificou-se um aumento de 0.7 Hz/mV (Guimarães, 2017). Ou seja, apenas a despolarização dos neurônios pela ativação dos receptores mGluR-I não é suficiente para justificar a alteração na taxa de disparos observada.

6.2 Modulação mGluR-I presente nos neurônios LC

Os receptores mGluR do grupo I são amplamente encontrados no SNC, incluindo núcleos no nível do tronco encefálico que possuem eferências para o LC (Schwarz et al., 2015). Em estudo com ratos Sprague-Dawley, a expressão de receptores mGluR-I foi reportada em neurônios do núcleo mesencefálico trigeminal, uma região vizinha que projeta para os neurônios do LC (Turman et al. 2001; Luo et al., 1991). Por outro lado, existem evidências sobre a expressão de receptores mGluR no LC de macacos rhesus (Noriega et al., 2007). Nosso estudo utiliza fatias de tronco encefálico com cortes na orientação horizontal. Neste sentido, de acordo com Travagli et al. (1996), ocorre uma maior preservação da arborização dendrítica quando comparado a cortes com orientação coronal. Considerando que tanto a aplicação no banho quanto a aplicação via pipeta de perfusão de DHPG são capazes de produzir uma corrente de entrada podemos inferir a presença de mGluR-I na região. Porém, devida a dispersão de DHPG depois de sair da pipeta de perfusão, a localidade exata destes receptores é incerta, no sentido de que os receptores mGluR ativados poderiam estar localizados nos neurônios do LC, em neurônios localizados em regiões vizinhas ou mesmo uma mistura entre estas duas condições. Além disso, um estudo realizado em células HEK aponta que o DHPG é capaz de atuar como coagonista

de receptores NMDA, quando presente concomitantemente com determinadas concentrações de glicina (Contractor et al. 1998).

Para avaliar a possível participação de receptores sinápticos não-mGluR na corrente gerada por DHPG, testamos um coquetel de bloqueadores para receptores NMDA (MK-801), AMPA (CNQX), GABAérgicos (picrotoxina) e glicinérgicos (estriquinina). O fato destes antagonistas não reduzirem a amplitude da corrente sugere que os receptores ativados pelo DHPG estão presentes nos neurônios do LC e que os efeitos observados não dependem de comunicação sináptica entre o LC e regiões vizinhas. Além disso, o fato de que na presença de MK-801 a corrente ativada por DHPG não apresenta redução na amplitude descarta a possibilidade de um eventual efeito direto em receptores NMDA.

6.3 Regulação da condutância de K^+ por mgluR-I

Os receptores mGluR-I são preferencialmente acoplados à proteína $G\alpha_{q/11}$ (Sladeczek et al., 1985). Nos neurônios do LC, receptores para hormônio estimulador de tireotrofina (TRH-R1 e TRH-R2) e os receptores para orexina (OX1) também são preferencialmente acoplados à proteína Gαq/11 e sua ativação promove o aumento da frequência de disparos espontâneos (Ishibashi et al., 2009, Hagan et al., 1999; Murai e Akaike, 2005). Para estes casos, foram identificados como os efetores finais uma mistura de condutâncias não-específicas e condutâncias de K^+. Com base nessas informações consideramos relevante avaliar o impacto das condutâncias de K^+ nas consequências da corrente ativada por DHPG. De modo contrário ao esperado, nosso estudo demonstrou que a corrente DHPG não apresenta a participação de canais seletivos para K^+. Os resultados com rampas de voltagem indicam que a presença de DHPG promove o deslocamento uniforme da corrente (Figura 11), ou seja, uma relação I-V sem retificação e com nenhuma inclinação detectável na faixa entre -100 mV e -50 mV. Além disso, a substituição de K^+ por Cs^+ na solução de pipeta não apresentou impacto na corrente observada.

A sinalização de receptores acoplados a proteína G depende dos subtipos que compõem o complexo trimérico. Para a subclasse das proteínas $G\alpha_{q/11}$ é bem estabelecido que sua a ativação promove mobilização de PLC (Nakamura et al., 1991; Wettschureck, 2005). De fato, para os receptores TRH-R1, TRH-R2 e OX1 a inibição da via PLC utilizando U-73122 impacta negativamente nas correntes observadas (Ishibashi et al., 2009; Kargar et al. 2018). Em outros estudos, que envolvem a ativação de mGluR-I em neurônios cerebelares também ocorre a modulação de canais para K^+ através e uma via dependente de PLC (Chemin et al., 2003). Dadas estas evidências, perguntamos como a ativação dos receptores mGluR-I, também acoplados à proteína $G\alpha_{q/11}$, ter efeitos excitatórios sem envolver condutâncias de K^+. Além da via clássica, na sua porção C-terminal, os receptores mGluR-I possuem sítios de ligação para proteínas de ancoragem, como por exemplo a Homer (Brakeman et al., 1997). Alguns estudos identificaram alteração na sinalização dos receptores mGluR-I de acordo a isoforma da proteína Homer associada (Kammermeier, 2008; Tu et al., 1998). A distinção entre a cascata de sinalização e os efetores finais responsáveis pela corrente observada pode ser consequência da presença de proteínas de ancoramento e da proximidade espacial entre o receptor mGluR-I e o canal modulado. Portanto uma questão importante seria avaliar a dependência da resposta da ativação de mGluR-I a cascata de sinalização por PLC no LC. Isto permitirá compreender se a diferença na consequência da ativação da proteína G é resultante da propriedade das proteínas de ancoramento presentes no mGluR-I.

6.4 Participação de canais não- seletivos

Como descrito acima, a relação I-V da corrente DHPG não é coerente com uma corrente seletiva de K^+. Por esta razão consideramos outros candidatos. Existem várias evidências demonstrando canais TRPC como alvos de modulação dos receptores mGluR-I (Berg, Sen e Bayliss, 2007; Faber et al., 2006; Kim et al. 2003). Para estes canais a ativação pode ser regulada por diferentes

componentes da cascata de sinalização da proteína $G\alpha_{q/11}$ como o diacilglicerol (DAG) e PLC (Wang, 2017). No LC, a ativação de canais TRPC estão relacionados com a resposta do núcleo ao aumento da concentração de CO_2 (Cui et al., 2011). Esta característica, junto com a sua permeabilidade mista entre íons de Na^+ e Ca^{2+} nos motivaram a questionar a respeito do envolvimento destes nos efeitos observados pela ativação de mGluR-I. Contudo, o uso de SKF-96365 não impactou na amplitude da corrente gerada pelo DHPG. Portanto nos descartamos estes canais como participadores do efeito excitatório promovido pela ativação de receptores mGluR-I.

6.5 Envolvimento dos canais de Ca^{2+}

Outro possível mecanismo para o efeito excitatório promovido pela ativação dos mGluR-I envolve a participação de canais de Ca^{2+}. Em células mitrais do bulbo olfatório, a ativação de mGluR-I promove uma despolarização mediada principalmente por canais de Ca^{2+} do tipo T (Johnstons e Delaney, 2010). Em outros estudos, os canais de Ca^{2+} do tipo L são ativados por receptores mGluR-I presentes no hipocampo e na medula espinhal (Radwani et al., 2017; Govindaiah et al., 2018). Para ambos os casos a identificação envolveu o uso de diferentes combinações de bloqueadores seletivos e não-seletivos. Nosso estudo utilizou os cátions Ni^{2+} e Cd^{2+} como estratégia inicial para identificar o perfil dos canais de Ca^{2+} envolvidos pela ativação mGluR-I.

Inicialmente avaliamos a participação de canais de Ca^{2+} ativados por baixa voltagem (LVA) ou ativados por alta voltagem (HVA). Os canais de Ca^{2+} LVA podem ser bloqueados por concentrações baixas de Ni^{2+}, na faixa de 1-10μM (isoforma α1H) ou até 250μM (isoformas α1G e α1I, Lee et al, 1999). A partir da faixa de concentração milimolar o Ni^{2+} também inibe os canais de Ca^{2+} HVA (revisado por Hille, 2001). O distanciamento entre as concentrações necessárias para efetivamente inibir cada família de canais nos permite utilizar dados da curva de concentração-resposta como forma de segregar a participação destes canais

na ativação de mGluR-I. De fato, a resposta da corrente DHPG apresentou pouco ou quase nenhum bloqueio com concentrações de Ni^{2+} abaixo de 300 µM, tornando pouco provável a participação de canais de Ca^{2+} do tipo T como contribuintes da corrente observada. Nossos dados determinaram que IC_{50} para a inibição da corrente DHPG por Ni^{2+} era próximo de 0,9 mM tornando plausível a participação de canais de Ca^{2+} do tipo HVA. Esta possibilidade foi testada usando outros inibidores. O bloqueio parcial da corrente DHPG por por Cd^{2+}, nifedipina e nimodipina confirma a participação especificamente de canais de Ca^{2+} do tipo L.

Na concentração máxima de Ni^{2+} utilizada (10 mM) foi possível inibir quase completamente a corrente DHPG. Diferentes estudos reportam que o uso de Ni^{2+} a partir da concentração de 2 mM bloqueia efetivamente a corrente gerada pela ação eletrogênica do trocador Na^{+}/Ca^{2+} (Sampieri et al., 2019; Reppel et al., 2007; Song, chen e Yu, 2014; Blaustein e Lederer, 1999). As três isoformas do trocador Na^{+}/Ca^{2+} são expressas no sistema nervoso, e estudos prévios tem mostrado que estes podem ser modulados pela ativação de receptores mGluR-I (Yu e colvin, 1997, Keele et al. 1997; Sekizawa e Bonham, 2006; Hirono e yoshihoka,, 1998).

Considerando estas informações avaliamos a participação do trocador Na^{+}/Ca^{2+} na corrente observada. A atividade deste trocador depende dos gradientes de concentração destes íons e do potencial de membrana. Isso permite que a proteína tenha dois modos de funcionamento, permitindo a entrada de Na^{2+} pela saída de Ca^{2+} ou vice-versa (Blaustein e Lederer, 1999). Sendo assim, testamos a participação do trocador a partir da alteração do gradiente químico de um dos íons carreados, no caso o Na+. Nossos dados mostram que a corrente promovida por DHPG reduz significativamente durante a substituição do Na+ por colina na solução extracelular, corroborando com a participação do trocador na corrente.

Levando em conta a via clássica de sinalização dos receptores mGluR-I, uma possibilidade é que o aumento do $[Ca2^{+}]_i$ serve como gatilho estimulando a atividade do trocador Na^{+}/Ca^{2+}. Do mesmo modo, a participação de canais de Ca^{2+} do tipo L

evidenciada pelos nossos resultados também contribui para o aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Este ponto abre espaço para a questão da dependência entre estas proteínas. Ou seja, considerando a participação dos canais de Ca^{2+} do tipo L no aumento da $[Ca2^{+}]_i$, existe o ganho de função da atividade do trocador Na^{+}/Ca^{2+}? Novamente, registros em neurônios LC utilizando sondas florescentes para Ca^{2+}, como por exemplo o Fluo-3, podem elucidar sobre o impacto da participação dos canais Ca^{2+} do tipo L na corrente eletrogênica gerada pelo trocador Na^{+}/Ca^{2+}.

6.6 Relevância fisiológica

Os neurônios do LC representam uma das principais fontes de noradrenalina e o amplo espectro de suas projeções fornece o neurotransmissor virtualmente para todo o SNC (Sharma et al., 2010). Os níveis de noradrenalina no córtex pré-frontal são associados com a frequência de disparos de potencial de ação destes neurônios (Berridge e Abercrombie, 1999). Estimulações excitatórias nos neurônios LC podem ser compreendidas como um aumento na taxa de disparos espontâneos. No estudo anterior reportamos que a ativação dos receptores mGluR-I aumentou de modo expressivo a taxa de disparos destes neurônios.

Fisiologicamente, a elevação da atividade tônica está relacionada com o aumento da distração e redução do desempenho de tarefas (Aston-Jones e Cohen, 2005). Condições como estresse e ansiedade apresentam o aumento da atividade tônica e a persistência desta atividade elevada é reportada em desordens como o transtorno do estresse pós-traumático (revisado por Chandler et al, 2019). A estimulação elétrica do núcleo paragigantocelularis (PGi), que projeta densa inervação glutamatérgica para o LC, ocasiona no aumento na atividade espontânea dos neurônios (Ennis e Aston-Jones, 1988). Em baixa frequência (0.5 Hz), a estimulação pode ser inibida pelo bloqueio de receptores ionotrópicos, no entanto, ainda não se sabe se a estimulação em alta frequência poderia recrutar receptores metabotrópicos.

Alguns estudos apontam que o receptor mGluR1 se posiciona na periferia da região pós-sináptica, o que sugere que só poderiam ser ativados pela difusão extrasináptica de glutamato consequente do aumento da concentração na fenda sináptica (Luján et al., 1996; Bodzeta, Scheefhals e MacGillavry, 2021). Esta possibilidade poderia ser testada utilizando estimulação elétrica das fibras PGi para investigar a frequência de estímulos necessário para a ativação dos receptores mGluR-I e esclarecer acerca da localidade dos receptores mGluR-I na área sináptica. Posteriormente, esta mesma estimulação pode ser utilizada para registrar o impacto da liberação de noradrenalina pelas eferências dos neurônios LC.

7. Conclusões e perspectivas futuras

A ativação seletiva do grupo I dos receptores metabotrópicos de glutamato pelo agonista DHPG em neurônios LC promove uma corrente de entrada de perfil transiente sensível à Ni^{2+}, Cd^{2+}, Nifedipina e Nimodipina (Figura 18). A corrente não é bloqueada por antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato, receptores GABA, receptores glicinérgicos, canais de Na^+ voltagem-dependentes ou canais TRPC. Também foi descartada a participação de correntes mediadas por canais seletivos para K^+, uma vez que a relação I-V não indicou uma tendência para redução da corrente em potenciais de membrana próximos do potencial de reversão para K^+ (E_K) e a amplitude da corrente não foi alterada com a substituição do K^+ pelo Cs^+ na solução intracelular. O IC_{50} da inibição por Ni^{2+} indicou a participação de canais de Ca^{2+} do tipo HVA bloqueando parcialmente a corrente DHPG. O resultado foi corroborado com o bloqueio dos canais de Ca^{2+} por Cd^{2+} e dihidropiridinas contudo a participação destes canais justifica menos da metade da corrente observada. Na sua concentração máxima, o Ni^{2+} resultou na inibição quase completa da corrente DHPG, sugerindo a participação do trocador Na^+/Ca^{2+}. Além disso, a substituição do Na^+ extracelular por colina reduziu em mais da metade a amplitude da corrente DHPG, corroborando com o envolvimento do trocador na corrente promovida por DHPG. As vias de sinalização que resultam nesta modulação ainda restam ser esclarecidas. Investigações acerca da ativação endógena dos receptores mGluR-I serão relevantes para identificar as condições fisiológicas necessárias para o seu funcionamento, bem como os impactos na transmissão noradrenérgica. Nós concluímos que o grupo I dos receptores metabotrópicos de glutamato estimulam os neurônios do Locus Coeruleus através da ativação de uma corrente de entrada mediada por canais de Ca^{2+} do tipo L e do trocador de Na^+/Ca^{2+}.

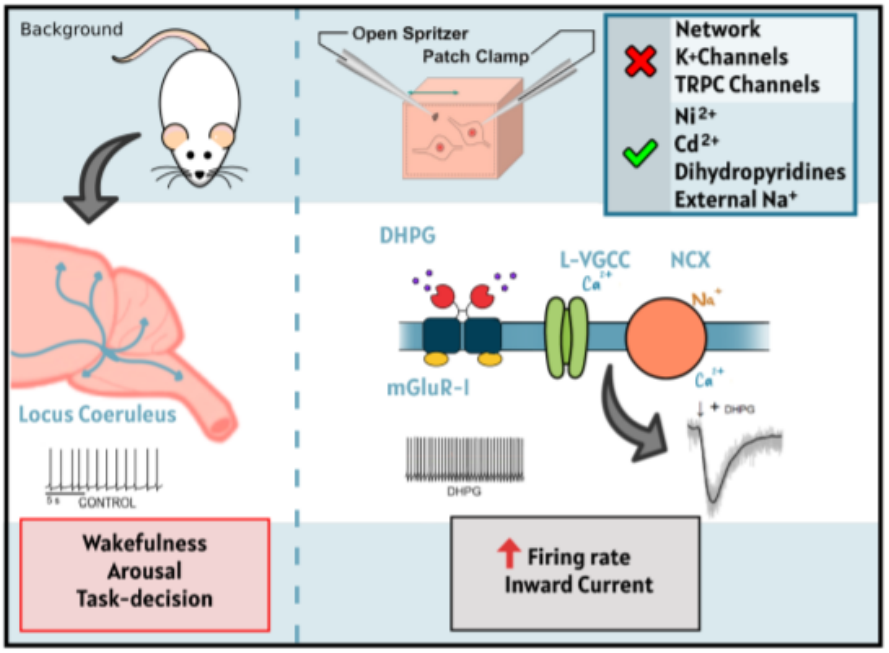


Figura 18. Resumo gráfico dos resultados do estudo. Identificamos a modulação de receptores mGluR do grupo 1 em neurônios do Locus coeruleus de ratos wistar. Através de aplicações curtas e locais identificamos que a corrente promovida pelo agonista mGluR-I (DHPG, 100 µM) é sensível a Ni2+, Cd2+, dihidropiridinas e ao gradiente de Na+. Os dados suportam que a corrente promovida por estes receptores depende da ação conjunta de canais de Ca2+ do tipo L e do trocador Na+/Ca2+.

8. Referências

ABE, T.; SUGIHARA, H.; NAWA, H.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/$Ca2^{+}$ signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13361–13368, jul. 1992. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)42219-3

AKAIKE, T. Periodic bursting activities of locus coeruleus neurons in the rat. **Brain Research**, v. 239, n. 2, p. 629–633, maio 1982. DOI: 10.1016/0006-8993(82)90540-6

ANDRZEJEWSKI, M.; MÜCKENHOFF, K.; SCHEID, P.; BALLANTYNE, D. Synchronized rhythms in chemosensitive neurons of the locus coeruleus in the absence of chemical synaptic transmission. **Respiration Physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 123–140, dez. 2001. DOI: 10.1016/S0034-5687(01)00300-0

ANWYL, R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–120, jan. 1999. DOI: 10.1016/S0165-0173(98)00050-2

ASTIER, B.; VAN BOCKSTAELE, E. J.; ASTON-JONES, G.; PIERIBONE, V. A. Anatomical evidence for multiple pathways leading from the rostral ventrolateral medulla (nucleus paragigantocellularis) to the locus coeruleus in rat. **Neuroscience Letters**, v. 118, n. 2, p. 141–146, out. 1990. DOI: 10.1016/0304-3940(90)90612-D

ASTON-JONES, G.; RAJKOWSKI, J.; KUBIAK, P.; ALEXINSKY, T. Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 4467–4480, 1 jul. 1994. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-07-04467.1994

ASTON-JONES, G.; COHEN, J. D. AN INTEGRATIVE THEORY OF LOCUS COERULEUS-NOREPINEPHRINE FUNCTION: Adaptive Gain and Optimal Performance. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 403–450, 21 jul. 2005.DOI: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135709

ASTON-JONES, G.; SHIPLEY, M. T.; CHOUVET, G.; ENNIS, M.; VAN BOCKSTAELE, E.; PIERIBONE, V.; SHIEKHATTAR, R.; AKAOKA, H.; DROLET, G.; ASTIER, B.; CHARLÉTY, P.; VALENTINO, R. J.; WILLIAMS, J. T. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. **Progress in Brain Research** , v. 18, p 47- 75, 1991. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)63799-1

ASTON-JONES, G.; Zhu, Y.; Card, J.P. Numerous GABAergic Afferents to Locus Ceruleus in the Pericerulear Dendritic Zone: Possible Interneuronal Pool. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2313–2321, 3 mar. 2004. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5339-03.2004

BANGASSER, D. A.; WIERSIELIS, K. R.; KHANTSIS, S. Sex differences in the locus coeruleus-norepinephrine system and its regulation by stress. **Brain Research**, v. 1641, p. 177–188, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.021

BEQOLLARI, D.; KAMMERMEIER, P. J. Venus Fly Trap Domain of mGluR1 Functions as a Dominant Negative Against Group I mGluR Signaling. **Journal of Neurophysiology**, v. 104, n. 1, p. 439–448, jul. 2010. DOI: 10.1152/jn.00799.2009

BERRIDGE, C. .; ABERCROMBIE, E. . Relationship between locus coeruleus discharge rates and rates of norepinephrine release within neocortex as assessed by in vivo microdialysis. **Neuroscience**, v. 93, n. 4, p. 1263–1270, ago. 1999. DOI: 10.1016/S0306-4522(99)00276-6

BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 33–84, abr. 2003. DOI: 10.1016/S0165-0173(03)00143-7

BIANCARDI, V.; BÍCEGO, K. C.; ALMEIDA, M. C.; GARGAGLIONI, L. H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 455, n. 6, p. 1119–1128, 13 mar. 2008. DOI: 10.1007/s00424-007-0338-8

BLAUSTEIN, M. P.; LEDERER, W. J. Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 763–854, 1 jul. 1999. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.3.763

BODZĘTA, A.; SCHEEFHALS, N.; MACGILLAVRY, H. D. Membrane trafficking and positioning of mGluRs at presynaptic and postsynaptic sites of excitatory synapses. **Neuropharmacology**, v. 200, p. 108799, dez. 2021. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108799

BRAGER, D. H.; JOHNSTON, D. Plasticity of Intrinsic Excitability during Long-Term Depression Is Mediated through mGluR-Dependent Changes in Ih in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 51, p. 13926–13937, 19 dez. 2007. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3520-07.2007

BRAKEMAN, P. R.; LANAHAN, A. A.; O'BRIEN, R.; ROCHE, K.; BARNES, C. A.; HUGANIR, R. L.; WORLEY, P. F. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. **Nature**, v. 386, n. 6622, p. 284–288, mar. 1997. DOI: 10.1038/386284a0

BRETON-PROVENCHER, V.; DRUMMOND, G. T.; SUR, M. Locus Coeruleus Norepinephrine in Learned Behavior: Anatomical Modularity and Spatiotemporal Integration in Targets. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 15, 7 jun. 2021. DOI: 10.3389/fncir.2021.638007

BRETON-PROVENCHER, V.; SUR, M. Active control of arousal by a locus coeruleus GABAergic circuit. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 218–228, 14 fev. 2019. DOI: 10.1038/s41593-018-0305-z

CARTER, M. E.; YIZHAR, O.; CHIKAHISA, S.; NGUYEN, H.; ADAMANTIDIS, A.; NISHINO, S.; DEISSEROTH, K.; DE LECEA, L. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 1526–1533, 31 dez. 2010. DOI: 10.1038/nn.2682

CHANDLER, D. J.; GAO, W. J.; WATERHOUSE, B. D. Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 18, p. 6816–6821, 6 maio 2014. DOI: 10.1073/pnas.1320827111

CHANDLER, D. J.; JENSEN, P.; MCCALL, J. G.; PICKERING, A. E.; SCHWARZ, L. A.; TOTAH, N. K. Redefining Noradrenergic Neuromodulation of Behavior: Impacts of a Modular Locus Coeruleus Architecture. **The Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 42, p. 8239–8249, 16 out. 2019. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1164-19.2019

CHEMIN, J. Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K^+ channels. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 20, p. 5403–5411, 15 out. 2003. DOI: 10.1093/emboj/cdg528

CHIANG, C.; ASTON-JONES, G. Response of locus coeruleus neurons to footshock stimulation is mediated by neurons in the rostral ventral medulla. **Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 705–715, abr. 1993. DOI: 10.1016/0306-4522(93)90618-P

CHUN, L.; ZHANG, W.; LIU, J. Structure and ligand recognition of class C GPCRs. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 3, p. 312–323, 30 mar. 2012. DOI: 10.1038/aps.2011.186

CLAYTON, E. C. Phasic Activation of Monkey Locus Ceruleus Neurons by Simple Decisions in a Forced-Choice Task. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9914–9920, 3 nov. 2004. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2446-04.2004

CONN, P. J.; PIN, J.-P. PHARMACOLOGY AND FUNCTIONS OF METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 205–237, abr. 1997. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205

CONNOR, M.; BORGLAND, S. L.; CHRISTIE, M. J. Continued morphine modulation of calcium channel currents in acutely isolated locus coeruleus neurons from morphine-dependent rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1561–1569, dez. 1999. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702922

CONTRACTOR, A.; GEREAU, R. W.; GREEN, T.; HEINEMANN, S. F. Direct effects of metabotropic glutamate receptor compounds on native and recombinant N -methyl- d -aspartate receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 8969–8974, 21 jul. 1998. DOI: 10.1073/pnas.95.15.8969

CORREA, A. M. B.; GUIMARÃES, J. D. S.; DOS SANTOS E ALHADAS, E.; KUSHMERICK, C. Control of neuronal excitability by Group I metabotropic glutamate receptors. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 835–845, 23 out. 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0301-7

COPE, Z. A.; VAZEY, E. M.; FLORESCO, S. B.; ASTON JONES, G. S. DREADD-mediated modulation of locus coeruleus inputs to mPFC improves strategy set-shifting. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 161, p. 1–11, maio 2019. DOI: 10.1016/j.nlm.2019.02.009

CUI, N.; ZHANG, X.; TADEPALLI, J. S.; YU, L.; GAI, H.; PETIT, J.; PAMULAPATI, R. T.; JIN, X.; JIANG, C. Involvement of TRP channels in the CO 2 chemosensitivity of locus coeruleus neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 105, n. 6, p. 2791–2801, jun. 2011. DOI: 10.1152/jn.00759.2010

CURTIS, A. L.; BELLO, N. T.; CONNOLLY, K. R.; VALENTINO, R. J. Corticotropin-Releasing Factor Neurones of the Central Nucleus of the Amygdala Mediate Locus Coeruleus Activation by Cardiovascular Stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 14, n. 8, p. 667–682, ago. 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2826.2002.00821.x

DE OLIVEIRA, R. B.; HOWLETT, M. C. H.; GRAVINA, F. S.; IMTIAZ, M. S.; CALLISTER, R. J.; BRICHTA, A. M.; VAN HELDEN, D. F. Pacemaker currents in mouse locus coeruleus neurons. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 166–177, set. 2010. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.028

DHAMI, G. K.; FERGUSON, S. S. G. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 260–271, jul. 2006. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.01.008

SANTOS E ALHADAS, É.; CORREA, A. M. B.; NAVES, L. A.; KUSHMERICK, C. Mechanisms and functional impact of Group I metabotropic glutamate receptor modulation of excitability in mouse MNTB neurons. **Synapse**, v. 74, n. 3, 14 mar. 2020. DOI: 10.1002/syn.22137

DUBÉ, G. R.; MARSHALL, K. C. Activity-Dependent Activation of Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptors in Locus Coeruleus. **Journal of Neurophysiology**, v. 83, n. 3, p. 1141–1149, 1 mar. 2000. DOI: 10.1152/jn.2000.83.3.1141

ENNIS, M.; ASTON-JONES, G. Potent inhibitory input to locus coeruleus from the nucleus prepositus hypoglossi. **Brain Research Bulletin**, v. 22, n. 5, p. 793–803, maio 1989. DOI: 10.1016/0361-9230(89)90022-1

ENNIS, M.; ASTON-JONES, G.; SHIEKHATTAR, R. Activation of locus coeruleus neurons by nucleus paragigantocellularis or noxious sensory stimulation is mediated by intracoerulear excitatory amino acid neurotransmission. **Brain Research**, v. 598, n. 1–2, p. 185–195, dez. 1992. DOI: 10.1016/0006-8993(92)90182-9

FERREIRA, C. M.; DE PAULA, P. M.; BRANCO, L. G. S. Role of l-glutamate in the locus coeruleus of rats in hypoxia-induced hyperventilation and anapyrexia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 139, n. 2, p. 157–166, jan. 2004. DOI: 10.1016/j.resp.2003.10.001

FIORILLO, C. D.; WILLIAMS, J. T. Selective Inhibition by Adenosine of mGluR IPSPs in Dopamine Neurons After Cocaine Treatment. **Journal of Neurophysiology**, v. 83, n. 3, p. 1307–1314, 1 mar. 2000. DOI: 10.1152/jn.2000.83.3.1307

FLORIN-LECHNER, S. M.; DRUHAN, J. P.; ASTON-JONES, G.; VALENTINO, R. J. Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. **Brain Research**, v. 742, n. 1–2, p. 89–97, dez. 1996. DOI: 10.1016/S0006-8993(96)00967-5

FORMAN, C. J.; TOMES, H.; MBOBO, B.; BURMAN, R. J.; JACOBS, M.; BADEN, T.; RAIMONDO, J. V. Openspritzer: an open hardware pressure ejection system for reliably delivering picolitre volumes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2188, 19 dez. 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02301-2

FOOTE, S. L.; BLOOM, F. E.; ASTON-JONES, G. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. **Physiological Reviews**, v. 63, n. 3, p. 844–914, 1 jul. 1983. DOI: 10.1152/physrev.1983.63.3.844

GOVINDAIAH, G.; KANG, Y.-J.; LEWIS, H. E. S.; CHUNG, L.; CLEMENT, E. M.; GREENFIELD, L. J.; GARCIA-RILL, E.; LEE, S.-H. Group I metabotropic glutamate receptors generate two types of intrinsic membrane oscillations in hippocampal oriens/alveus interneurons. **Neuropharmacology**, v. 139, p. 150–162, set. 2018. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.06.035

GLADDING, C. M.; FITZJOHN, S. M.; MOLNÁR, E. Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Long-Term Depression: Molecular Mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 4, p. 395–412, dez. 2009. DOI: 10.1124/pr.109.001735

GRZANNA, R.; MOLLIVER, M. E. The locus coeruleus in the rat: An immunohistochemical delineation. **Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 21–40, jan. 1980. DOI: 10.1016/0306-4522(80)90068-8

GUATTEO, E.; MERCURI, N. B.; BERNARDI, G.; KNÖPFEL, T. Group I Metabotropic Glutamate Receptors Mediate an Inward Current in Rat Substantia Nigra Dopamine Neurons That Is Independent From Calcium Mobilization. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, n. 4, p. 1974–1981, 1 out. 1999. DOI: 10.1152/jn.1999.82.4.1974

GUERINEAU, N.; BOSSU, J.; GAHWILER, B.; GERBER, U. Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 4395–4407, 1 jun. 1995. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.15-06-04395.1995

GUIMARÃES, J. D. **Modulação da excitabilidade dos neurônios do Locus Coeruleus por receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I**. 2017. 66p. Dissertação (Mestrado em fisiologia e farcamologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2017.

GYONEVA, S.; TRAYNELIS, S. F. Norepinephrine Modulates the Motility of Resting and Activated Microglia via Different Adrenergic Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 15291–15302, maio 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.458901

HAGAN, J. J.; LESLIE, R. A.; PATEL, S.; EVANS, M. L.; WATTAM, T. A.; HOLMES, S.; BENHAM, C. D.; TAYLOR, S. G.; ROUTLEDGE, C.; HEMMATI, P.; MUNTON, R. P.; ASHMEADE, T. E.; SHAH, A. S.; HATCHER, J. P.; HATCHER, P. D.; JONES, D. N. C.; SMITH, M. I.; PIPER, D. C.; HUNTER, A. J.; PORTER, R. A.; UPTON, N. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 19, p. 10911–10916, 14 set. 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.19.10911

HANSEN, N. The Longevity of Hippocampus-Dependent Memory Is Orchestrated by the Locus Coeruleus-Noradrenergic System. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1155/2017/2727602

HAYAT, H.; REGEV, N.; MATOSEVICH, N.; SALES, A.; PAREDES-RODRIGUEZ, E.; KROM, A. J.; BERGMAN, L.; LI, Y.; LAVIGNE, M.; KREMER, E. J.; YIZHAR, O.; PICKERING, A. E.; NIR, Y. Locus coeruleus norepinephrine activity mediates sensory-evoked awakenings from sleep. **Science Advances**, v. 6, n. 15, 10 abr. 2020. DOI: 10.1126/sciadv.aaz4232

HEUSS, C.; SCANZIANI, M.; GÄHWILER, B. H.; GERBER, U. G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 12, p. 1070–1077, dez. 1999. DOI: 10.1038/15996

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes.** 3ª Edição, Sinauer Associates Inc., Sunderland, 2001

HIRONO, M.; KONISHI, S.; YOSHIOKA, T. Phospholipase C-Independent Group I Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Inward Current in Mouse Purkinje Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 3, p. 753–758, out. 1998. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9465

HOLETS, V. R.; HÖKFELT, T.; RÖKAEUS, Å.; TERENIUS, L.; GOLDSTEIN, M. Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. **Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 893–906, mar. 1988. DOI: 10.1016/0306-4522(88)90076-0

HORNE, A. L.; SIMMONDS, M. A. The pharmacology of quisqualate and ampa in the cerebral cortex of the rat in vitro. **Neuropharmacology**, v. 28, n. 10, p. 1113–1118, out. 1989. DOI: 10.1016/0028-3908(89)90125-1

HOUAMED, K. M.; KUIJPER, J. L.; GILBERT, T. L.; HALDEMAN, B. A.; O'HARA, P. J.; MULVIHILL, E. R.; ALMERS, W.; HAGEN, F. S. Cloning, Expression, and Gene Structure of a G Protein-Coupled Glutamate Receptor from Rat Brain. **Science**, v. 252, n. 5010, p. 1318–1321, 31 maio 1991. DOI: 10.1126/science.1656524

HOWELLS, F. M.; STEIN, D. J.; RUSSELL, V. A. Synergistic tonic and phasic activity of the locus coeruleus norepinephrine (LC-NE) arousal system is required for optimal attentional performance. **Metabolic Brain Disease**, v. 27, n. 3, p. 267–274, 8 set. 2012. DOI: 10.1007/s11011-012-9287-9

IMBER, A. N.; PATRONE, L. G. A.; LI, K.-Y.; GARGAGLIONI, L. H.; PUTNAM, R. W. The Role of Ca^{2+} and BK Channels of Locus Coeruleus (LC) Neurons as a Brake to the CO2 Chemosensitivity Response of Rats. **Neuroscience**, v. 381, p. 59–78, jun. 2018. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.03.031

ISHIBASHI, H.; NAKAHATA, Y.; ETO, K.; NABEKURA, J. Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 23, p. 5709–5722, 1 dez. 2009. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.181420

JIAN, K.; CIFELLI, P.; PIGNATELLI, A.; FRIGATO, E.; BELLUZZI, O. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. **Brain Research**, v. 1354, p. 47–63, out. 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.07.104

JIN, X.; LI, S.; BONDY, B.; ZHONG, W.; OGINSKY, M. F.; WU, Y.; JOHNSON, C. M.; ZHANG, S.; CUI, N.; JIANG, C. Identification of a Group of GABAergic Neurons in the Dorsomedial Area of the Locus Coeruleus. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146470, 19 jan. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0146470

JINGAMI, H.; NAKANISHI, S.; MORIKAWA, K. Structure of the metabotropic glutamate receptor. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, n. 3, p. 271–278, jun. 2003. DOI: 10.1016/S0959-4388(03)00067-9

JOHNSTON, J.; DELANEY, K. R. Synaptic Activation of T-Type Ca^{2+} Channels Via mGluR Activation in the Primary Dendrite of Mitral Cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 103, n. 5, p. 2557–2569, maio 2010. DOI: 10.1152/jn.00796.2009

JONES, B. E. Chapter 9 - Neurobiology of waking and sleeping. *In*: **Sleep Disorders Part I**. Elsevier Scientific Publishing Company, 2011. p. 131–149.

KAEIDI, A.; AZIZI, H.; JAVAN, M.; AHMADI SOLEIMANI, S. M.; FATHOLLAHI, Y.; SEMNANIAN, S. Direct Facilitatory Role of Paragigantocellularis Neurons in Opiate Withdrawal-Induced Hyperactivity of Rat Locus Coeruleus Neurons: An In Vitro Study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0134873, 31 jul. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0134873

KARGAR, H. M.-P.; AZIZI, H.; MIRNAJAFI-ZADEH, J.; MANI, A. R.; SEMNANIAN, S. Orexin A presynaptically decreases inhibitory synaptic transmission in rat locus coeruleus neurons. **Neuroscience Letters**, v. 683, p. 89–93, set. 2018. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.06.022

KAUR, S.; SAXENA, R. N.; MALLICK, B. N. GABAergic neurons in prepositus hypoglossi regulate REM sleep by its action on locus coeruleus in freely moving rats. **Synapse**, v. 42, n. 3, p. 141–150, 1 dez. 2001. DOI: 10.1002/syn.1109

KAMMERMEIER, P. J. Endogenous Homer Proteins Regulate Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 34, p. 8560–8567, 20 ago. 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1830-08.2008

KANE, G. A.; VAZEY, E. M.; WILSON, R. C.; SHENHAV, A.; DAW, N. D.; ASTON-JONES, G.; COHEN, J. D. Increased locus coeruleus tonic activity causes disengagement from a patch-foraging task. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 1073–1083, 12 dez. 2017. DOI: 10.3758/s13415-017-0531-y

KEELE, N. B.; ARVANOV, V. L.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Quisqualate-preferring metabotropic glutamate receptor activates Na(+)-Ca2+ exchange in rat basolateral amygdala neurones. **The Journal of Physiology**, v. 499, n. 1, p. 87–104, 15 fev. 1997. DOI: 10.1113/jphysiol.1997.sp021913

KOYAMA, S.; JIN, Y.-H.; AKAIKE, N. ATP-sensitive and Ca2+-activated K+ channel activities in the rat locus coeruleus neurons during metabolic inhibition. **Brain Research**, v. 828, n. 1–2, p. 189–192, maio 1999. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01303-7

KUSHMERICK, C.; Price G.D.; Taschenberger H.; Puente N.; Renden R.; Wadiche J.I.; Duvoisin R.M.; Grandes P.; von Gersdorff H. Retroinhibition of Presynaptic Ca2+ Currents by Endocannabinoids Released via Postsynaptic mGluR Activation at a Calyx Synapse. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 26, p. 5955–5965, 30 jun. 2004. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0768-04.2004

LEE, J.-H.; GOMORA, J. C.; CRIBBS, L. L.; PEREZ-REYES, E. Nickel Block of Three Cloned T-Type Calcium Channels: Low Concentrations Selectively

Block α1H. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 6, p. 3034–3042, dez. 1999. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77134-1

LUJÁN, R.; NUSSER, Z.; ROBERTS, J. D. B.; SHIGEMOTO, R.; SOMOGYI, P. Perisynaptic Location of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 1488–1500, jul. 1996. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01611.x

LUO, P. F.; WANG, B. R.; PENG, Z. Z.; LI, J. S. Morphological characteristics and terminating patterns of masseteric neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus in the rat: An intracellular horseradish peroxidase labeling study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 303, n. 2, p. 286–299, 8 jan. 1991. DOI: 10.1002/cne.903030210

LOUGHLIN, S. E.; FOOTE, S. L.; BLOOM, F. E. Efferent projections of nucleus locus coeruleus: Topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. **Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 291–306, jun. 1986. DOI: 10.1016/0306-4522(86)90155-7

MAEDA, T. The locus coeruleus: history. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 18, n. 1–2, p. 57–64, fev. 2000. DOI: 10.1016/S0891-0618(99)00051-4

MASU, M.; TANABE, Y.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. **Nature**, v. 349, n. 6312, p. 760–765, fev. 1991. DOI: 10.1038/349760a0

MASUKO, S.; NAKAJIMA, Y.; NAKAJIMA, S.; YAMAGUCHI, K. Noradrenergic neurons from the locus ceruleus in dissociated cell culture: culture methods, morphology, and electrophysiology. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 3229–3241, 1 nov. 1986. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.06-11-03229.1986

MATSCHKE, L. A.; BERTOUNE, M.; ROEPER, J.; SNUTCH, T. P.; OERTEL, W. H.; RINNÉ, S.; DECHER, N. A concerted action of L- and T-type Ca2+ channels regulates locus coeruleus pacemaking. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 68, p. 293–302, set. 2015. DOI: 10.1016/j.mcn.2015.08.012

MATSCHKE, L. A.; RINNÉ, S.; SNUTCH, T. P.; OERTEL, W. H.; DOLGA, A. M.; DECHER, N. Calcium-activated SK potassium channels are key modulators of the pacemaker frequency in locus coeruleus neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 88, p. 330–341, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.03.002

MCCALL, J. G.; AL-HASANI, R.; SIUDA, E. R.; HONG, D. Y.; NORRIS, A. J.; FORD, C. P.; BRUCHAS, M. R. CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 605–620, ago. 2015. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.07.002

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The Nucleus of the Solitary Tract→Nucleus Paragigantocellularis→Locus Coeruleus→CA1 region of

dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56–63, fev. 2013. DOI: 10.1016/j.nlm.2012.12.002

MIN, M. Y.; WU, Y. W.; SHIH, P. Y.; LU, H. W.; WU, Y.; HSU, C. L.; LI, M. J.; YANG, H. W. Roles of A-type potassium currents in tuning spike frequency and integrating synaptic transmission in noradrenergic neurons of the A7 catecholamine cell group in rats. **Neuroscience**, v. 168, n. 3, p. 633–645, jul. 2010. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.063

MOORMAN, D. E.; ASTON-JONES, G. Orbitofrontal Cortical Neurons Encode Expectation-Driven Initiation of Reward-Seeking. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 31, p. 10234–10246, 30 jul. 2014. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3216-13.2014

MURAI, Y.; AKAIKE, T. Orexins cause depolarization via nonselective cationic and K+ channels in isolated locus coeruleus neurons. **Neuroscience Research**, v. 51, n. 1, p. 55–65, jan. 2005. DOI: 10.1016/j.neures.2004.09.005

NAEGELI, C.; ZEFFIRO, T.; PICCIRELLI, M.; JAILLARD, A.; WEILENMANN, A.; HASSANPOUR, K.; SCHICK, M.; RUFER, M.; ORR, S. P.; MUELLER-PFEIFFER, C. Locus Coeruleus Activity Mediates Hyperresponsiveness in Posttraumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 3, p. 254–262, fev. 2018. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.08.021Get

NAKAMURA, F.; OGATA, K.; SHIOZAKI, K.; KAMEYAMA, K.; OHARA, K.; HAGA, T.; NUKADA, T. Identification of two novel GTP-binding protein alpha-subunits that lack apparent ADP-ribosylation sites for pertussis toxin. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 19, p. 12676–81, 5 jul. 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1905731>.

NAKANISHI, S. Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. **Science**, v. 258, n. 5082, p. 597–603, 23 out. 1992. DOI: 10.1126/science.1329206

NAKANISHI, S.; NAKAJIMA, Y.; MASU, M.; YOSHIKI UEDA; NAKAHARA, K.; WATANABE, D.; YAMAGUCHI, S.; KAWABATA, S.; OKADA, M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction1Published on the World Wide Web on 21 October 1998.1. **Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2–3, p. 230–235, maio 1998. DOI: 10.1016/S0165-0173(97)00033-7

NETZEBAND, J. G.; GRUOL, D. L. mGluR1 agonists elicit a Ca2+ signal and membrane hyperpolarization mediated by apamin-sensitive potassium channels in immature rat purkinje neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 2, p. 293–305, 1 fev. 2008. DOI: 10.1002/jnr.21493

NIEBER, K.; SEVCIK, J.; ILLES, P. Hypoxic changes in rat locus coeruleus neurons in vitro. **The Journal of Physiology**, v. 486, n. 1, p. 33–46, 1 jul. 1995. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020788

NORIEGA, N. C.; GARYFALLOU, V. T.; KOHAMA, S. G.; URBANSKI, H. F. Glutamate receptor subunit expression in the rhesus macaque locus coeruleus. **Brain Research**, v. 1173, p. 53–65, out. 2007. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.08.007

OLPE, H.-R.; STEINMANN, M.; BRUGGER, F.; POZZA, M. Excitatory amino acid receptors in rat locus coeruleus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 339, n. 3, mar. 1989. DOI: 10.1007/BF00173584

OSMANOVIĆ, S. S.; SHEFNER, S. A. Calcium-activated hyperpolarizations in rat locus coeruleus neurons in vitro. **The Journal of Physiology**, v. 469, n. 1, p. 89–109, 1 set. 1993. DOI: 10.1113/jphysiol.1993.sp019806

PERRY, T. L.; BERRY, K.; HANSEN, S.; DIAMOND, S.; MOK, C. REGIONAL DISTRIBUTION OF AMINO ACIDS IN HUMAN BRAIN OBTAINED AT AUTOPSY. **Journal of Neurochemistry**, v. 18, n. 3, p. 513–519, mar. 1971. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1971.tb11979.x

PINOS, H.; COLLADO, P.; RODRÍGUEZ-ZAFRA, M.; RODRÍGUEZ, C.; SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 73–78, set. 2001. DOI: 10.1016/S0361-9230(01)00540-8

RABACCHI, S.; BAILLY, Y.; DELHAYE-BOUCHAUD, N.; MARIANI, J. Involvement of the N -Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor in Synapse Elimination During Cerebellar Development. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1823–1825, 26 jun. 1992. DOI: 10.1126/science.1352066

RADWANI, H.; ROCA-LAPIROT, O.; ABY, F.; LOPEZ-GONZALEZ, M. J.; BOUALI-BENAZZOUZ, R.; FAVEREAUX, A.; ERRAMI, M.; LANDRY, M.; FOSSAT, P. Group I metabotropic glutamate receptor plasticity after peripheral inflammation alters nociceptive transmission in the dorsal horn of the spinal cord in adult rats. **Molecular Pain**, v. 13, p. 174480691773793, 26 jan. 2017. DOI: 10.1177/1744806917737934

RAJKOWSKI, J.; MAJCZYNSKI, H.; CLAYTON, E.; ASTON-JONES, G. Activation of Monkey Locus Coeruleus Neurons Varies With Difficulty and Performance in a Target Detection Task. **Journal of Neurophysiology**, v. 92, n. 1, p. 361–371, jul. 2004. DOI: 10.1152/jn.00673.2003

RAJKOWSKI, J.; KUBIAK, P.; ASTON-JONES, G. Locus coeruleus activity in monkey: Phasic and tonic changes are associated with altered vigilance. **Brain Research Bulletin**, v. 35, n. 5–6, p. 607–616, jan. 1994. DOI: 10.1016/0361-9230(94)90175-9

RAMOS, B. P.; ARNSTEN, A. F. T. Adrenergic pharmacology and cognition: Focus on the prefrontal cortex. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 3, p. 523–536, mar. 2007. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.11.006

RASMUSSEN, K. A Selective AMPA Antagonist, LY293558, Suppresses Morphine Withdrawal-Induced Activation of Locus Coeruleus Neurons and

Behavioral Signs of Morphine Withdrawal. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 497–505, nov. 1996. DOI: 10.1016/S0893-133X(96)00094-2

REPPEL, M.; FLEISCHMANN, B.; REUTER, H.; SASSE, P.; SCHUNKERT, H.; HESCHELER, J. Regulation of the Na+/Ca2+ exchanger (NCX) in the murine embryonic heart. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 1, p. 99–108, 1 jul. 2007. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.03.018

ROMANO, C.; YANG, W.-L.; O'MALLEY, K. L. Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-linked Dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 45, p. 28612–28616, nov. 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.45.28612

SAMPIERI, R.; FUENTES, E.; CARRILLO, E. D.; HERNÁNDEZ, A.; GARCÍA, M. C.; SÁNCHEZ, J. A. Pharmacological Preconditioning Using Diazoxide Regulates Store-Operated Ca2 + Channels in Adult Rat Cardiomyocytes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 14 jan. 2020. DOI: 10.3389/fphys.2019.01589

SANCHEZ-PADILLA, J.; GUZMAN, J. N.; ILIJIC, E.; KONDAPALLI, J.; GALTIERI, D. J.; YANG, B.; SCHIEBER, S.; OERTEL, W.; WOKOSIN, D.; SCHUMACKER, P. T.; SURMEIER, D. J. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 832–840, 11 jun. 2014. DOI: 10.1038/nn.3717

SARA, S. J.; VANKOV, A.; HERVÉ, A. Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: A clue to the role of noradrenaline in memory. **Brain Research Bulletin**, v. 35, n. 5–6, p. 457–465, jan. 1994. DOI: 10.1016/0361-9230(94)90159-7

SARA, S. J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 211–223, 4 mar. 2009. DOI: 10.1038/nrn2573

SCHMEICHEL, B. E.; BERRIDGE, C. W. Wake-promoting actions of noradrenergic α 1 - and β-receptors within the lateral hypothalamic area. **European Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 6, p. 891–900, mar. 2013. DOI: 10.1111/ejn.12084

SCHOEPP, D. D.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 1, p. 13–20, jan. 1993. DOI: 10.1016/0165-6147(93)90107-U

SCHWARZ, L. A.; LUO, L. Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. R1051–R1056, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.cub.2015.09.039

SCHWARZ, L. A.; MIYAMICHI, K.; GAO, X. J.; BEIER, K. T.; WEISSBOURD, B.; DELOACH, K. E.; REN, J.; IBANES, S.; MALENKA, R. C.; KREMER, E. J.; LUO, L. Viral-genetic tracing of the input–output organization of a central noradrenaline circuit. **Nature**, v. 524, n. 7563, p. 88–92, 1 ago. 2015. DOI: 10.1038/nature14600

SEKIZAWA, S.; BONHAM, A. C. Group I Metabotropic Glutamate Receptors on Second-Order Baroreceptor Neurons Are Tonically Activated and Induce a Na + –Ca 2+ Exchange Current. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 2, p. 882–892, fev. 2006. DOI: 10.1152/jn.00772.2005

SHARMA, Y.; XU, T.; GRAF, W. M.; FOBBS, A.; SHERWOOD, C. C.; HOF, P. R.; ALLMAN, J. M.; MANAYE, K. F. Comparative anatomy of the locus coeruleus in humans and nonhuman primates. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 7, p. 963–971, 1 abr. 2010. DOI: 10.1002/cne.22249

SLADECZEK, F.; PIN, J.-P.; RÉCASENS, M.; BOCKAERT, J.; WEISS, S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. **Nature**, v. 317, n. 6039, p. 717–719, out. 1985. DOI: 10.1038/317717a0

STEININGER, T. L.; GONG, H.; MCGINTY, D.; SZYMUSIAK, R. Subregional organization of preoptic area /anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 429, n. 4, p. 638–653, 22 jan. 2001. DOI: 10.1002/1096-9861(20010122)429:4<638::AID-CNE10>3.0.CO;2-Y

SONG, M.; CHEN, D.; YU, S. P. The TRPC channel blocker SKF 96365 inhibits glioblastoma cell growth by enhancing reverse mode of the Na + /Ca 2+ exchanger and increasing intracellular Ca 2+. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 14, p. 3432–3447, jul. 2014. DOI: 10.1111/bph.12691

SWANSON, L. W.; HARTMAN, B. K. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-B-hydroxylase as a marker. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 163, n. 4, p. 467–505, 15 out. 1975. DOI: 10.1002/cne.901630406

SZABADI, E. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 8, p. 659–693, 12 ago. 2013. DOI: 10.1177/0269881113490326

SZAWKA, R. E.; POLETINI, M. O.; LEITE, C. M.; BERNUCI, M. P.; KALIL, B.; MENDONÇA, L. B. D.; CAROLINO, R. O. G.; HELENA, C. V. V.; BERTRAM, R.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Release of Norepinephrine in the Preoptic Area Activates Anteroventral Periventricular Nucleus Neurons and Stimulates the Surge of Luteinizing Hormone. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 363–374, 1 jan. 2013. DOI: 10.1210/en.2012-1302

TAKAHASHI, K.; TSUCHIDA, K.; TANABE, Y.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19341–19345, set. 1993. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)36519-6

TAKAHASHI, K.; KAYAMA, Y.; LIN, J. S.; SAKAI, K. Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. **Neuroscience**, v. 169, n. 3, p. 1115–1126, set. 2010. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.009

TAXINI, C. L.; PUGA, C. C. I.; DIAS, M. B.; BÍCEGO, K. C.; GARGAGLIONI, L. H. Ionotropic but not metabotropic glutamatergic receptors in the locus coeruleus modulate the hypercapnic ventilatory response in unanaesthetized rats. **Acta Physiologica**, v. 208, n. 1, p. 125–135, maio 2013. DOI: 10.1111/apha.12082

TORRECILLA, M.; MARKER, C. L.; CINTORA, S. C.; STOFFEL, M.; WILLIAMS, J. T.; WICKMAN, K. G-Protein-Gated Potassium Channels Containing Kir3.2 and Kir3.3 Subunits Mediate the Acute Inhibitory Effects of Opioids on Locus Ceruleus Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 4328–4334, 1 jun. 2002. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-11-04328.2002

TRAVAGLI, R. A.; WESSENDORF, M.; WILLIAMS, J. T. Dendritic arbor of locus coeruleus neurons contributes to opioid inhibition. **Journal of Neurophysiology**, v. 75, n. 5, p. 2029–2035, 1 maio 1996. DOI: 10.1152/jn.1996.75.5.2029

TSIEN, R. W.; LIPSCOMBE, D.; MADISON, D. V.; BLEY, K. R.; FOX, A. P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. **Trends in Neurosciences**, v. 11, n. 10, p. 431–438, jan. 1988. DOI: 10.1016/0166-2236(88)90194-4

TU, J. C.; XIAO, B.; YUAN, J. P.; LANAHAN, A. A.; LEOFFERT, K.; LI, M.; LINDEN, D. J.; WORLEY, P. F. Homer Binds a Novel Proline-Rich Motif and Links Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors with IP3 Receptors. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 717–726, out. 1998. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80589-9

TURMAN JR., J. E.; HIYAMA, L.; CASTILLO, M.; CHANDLER, S. H. Expression of Group I and II Metabotropic Glutamate Receptors in Trigeminal Neurons during Postnatal Development. **Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 41–54, 2001. DOI: 10.1159/000048695

TUBBS, R. S.; LOUKAS, M.; SHOJA, M. M.; MORTAZAVI, M. M.; COHEN-GADOL, A. A. Félix Vicq d'Azyr (1746–1794): early founder of neuroanatomy and royal French physician. **Child's Nervous System**, v. 27, n. 7, p. 1031–1034, 29 jul. 2011. DOI: 10.1007/s00381-011-1424-y

WANG, Y. (ed.). Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases. Dordrecht: **Springer Netherlands**, 2017. v. 976

WANG, Y.; ZHANG, Q. J.; LIU, J.; ALI, U.; GUI, Z. H.; HUI, Y. P.; WANG, T.; CHEN, L.; LI, Q. Noradrenergic lesion of the locus coeruleus increases the firing activity of the medial prefrontal cortex pyramidal neurons and the role of α2-adrenoceptors in normal and medial forebrain bundle lesioned rats. **Brain Research**, v. 1324, p. 64–74, abr. 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.02.009

WANG, H.; ZHUO, M. Group I Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Gene Transcription and Implications for Synaptic Plasticity and Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, 2012. DOI: 10.3389/fphar.2012.00189

WETTSCHURECK, N.; OFFERMANNS, S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1159–1204, out. 2005. DOI: 10.1152/physrev.00003.2005

WILLIAMS, J. T.; NORTH, R. A.; SHEFNER, S. A.; NISHI, S.; EGAN, T. M. Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. **Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 137–156, set. 1984. DOI: 10.1016/0306-4522(84)90265-3

WIŚNIEWSKI, K.; CAR, H. (S)-3,5-DHPG: A Review. **CNS Drug Reviews**, v. 8, n. 1, p. 101–116, 7 jun. 2006. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2002.tb00218.x

YANG, L. J.; LIU, X.; LIU, D. X.; JIANG, H.; MAO, X. Q.; WANG, C.; PAN, F. Effects of different adrenergic blockades on the stress resistance of Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 511, n. 2, p. 95–100, mar. 2012. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.01.046

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821–870, out. 2015. DOI: 10.1124/pr.114.009654

ZITO, K.; SCHEUSS, V.; KNOTT, G.; HILL, T.; SVOBODA, K. Rapid Functional Maturation of Nascent Dendritic Spines. **Neuron**, v. 61, n. 2, p. 247–258, jan. 2009. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.10.054

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 799–817, 1 ago. 2014. DOI: 10.1007/s00702-014-1180-8

ZONG-YUAN, L.; BAO-LU, X.; CHENG-JUN, H. Effects of microinjection of L-glutamate into locus coeruleus complex area on respiration. **Journal of Tongji Medical University**, v. 12, n. 4, p. 205–208, dez. 1992. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF02887850>.