



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica

## **Dissertação de Mestrado**

Éverton dos Santos e Alhadas

**Ativação de Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos do Grupo I  
despolariza e aumenta a excitabilidade dos neurônios do Corpo Trapezoide de  
camundongos neonatos.**

Belo Horizonte

2014

Éverton dos Santos e Alhadas

**Ativação de Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos do Grupo I despolariza e aumenta a excitabilidade dos neurônios do Corpo Trapezoide de camundongos neonatos.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick

Belo Horizonte  
2014

INCIPIT VITA NOVA



043

Alhadas, Éverton dos Santos e.

Ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I despolariza e aumenta a excitabilidade dos neurônios do corpo trapezóide de camundongos neonatos [manuscrito] / Éverton dos Santos e Alhadas. – 2014.

64 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Christopher Kushmerick.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Receptores metabotrópicos de glutamato. 2. Corpo trapezóide. 3. Aparelho auditivo – Teses. 4. Registros intracelulares. 5. Fisiologia – Teses. I. Kushmerick, Christopher. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

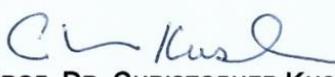
**"ATIVAÇÃO DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS  
METABOTRÓPICOS DO GRUPO I DESPOLARIZA E AUMENTA A  
EXCITABILIDADE DOS NEURÔNIOS DO CORPO TRAPEZOIDE  
DE CAMUNDONGOS NEONATOS"**

**ÉVERTON DOS SANTOS E ALHADAS**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **30 de julho de 2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. DR. MÁRCIO FLÁVIO DUTRA MORAES**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. STEYNER DE FRANÇA CÔRTE**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. CHRISTOPHER KUSHMERICK**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 30 de julho de 2014**

## DEDICATÓRIA

A Deus, por dar tudo que fundamentou minha aprendizagem. Às pessoas que não mais estão conosco, mas que em algum momento da vida torceram por mim e agora, de algum lugar, ainda torcem. À minha família, por toda atenção e carinho que minimizaram a distância. Aos meus pais, Luiz e Dulcinéia, por todo o esforço e atenção dedicados a mim durante os vários anos de estudo em minha vida.

Sem vocês nada disso teria sido possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Professor Doutor Christopher Kushmerick, por toda atenção, presteza, disponibilidade inigualável e conhecimento dedicados a mim durante esses anos. Obrigado ainda, por toda a compreensão e sensibilidade em todas as situações, demonstrando que a Sabedoria e a Humildade podem caminhar juntas.

À Professora Lígia Naves, por toda atenção e pelos constantes ensinamentos.

Ao amigo Adriano de Jesus da Silva por todo o auxílio, com as técnicas de registro eletrofisiológico.

Aos meus professores, pelos ensinamentos, dentro e fora de sala, durante todos os anos da minha vida escolar.

Aos meus amigos de laboratório, por todo apoio, companheirismo, discussões de futebol, sorrisos e claro pelas companhias até altas horas de pesquisa.

À Roseli Martins Rezende, técnica do Eletrocel, por todo carinho e cuidado comigo e no auxílio dos meus experimentos.

Aos meus antigos amigos que sempre se preocuparam e torceram por mim.

Aos animais que contribuíram indubitavelmente para a obtenção deste trabalho.

À UFMG pela excelência no ensino.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que, embora não citados, sabem, no seu íntimo, o quanto contribuíram.

*Nada é suficientemente bom.  
Então vamos fazer o que é certo,  
dedicar o melhor de nossos esforços para atingir o inatingível,  
desenvolver ao máximo os dons que Deus nos concedeu,  
e nunca parar de aprender.*

*Ludwig Van Beethoven*

## RESUMO

Alhadas, Éverton dos Santos e. *Ativação de Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos do Grupo I despolariza e aumenta a excitabilidade dos neurônios do Corpo Trapezoide de camundongos neonatos*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Fisiologia e Biofísica – Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais - 2014.

Receptores Metabotrópicos para Glutamato do Grupo I (mGluR-I) são receptores acoplados à proteína Gq, envolvida em vias de formação de PLC/IP3 e na liberação de Ca<sup>2+</sup> de estoques intracelulares. Estudos prévios mostraram que a ativação de receptores mGluR-I no Núcleo Medial do Corpo Trapezoide, gera uma corrente de entrada em potenciais próximos ao potencial de repouso, o que sugere um papel excitatório para esses receptores. Afim de testar essa hipótese, nós realizamos experimentos em fatias de tronco cerebral contendo regiões do corpo trapezoide obtidos em camundongos C57BL, com 6-9 dias de idade, de ambos os sexos. Técnicas de gravações intracelulares, já bem padronizadas, foram realizadas usando pipetas de vidro, preenchidas com 2 M KCl, produzindo resistências de 110-160 MOhm, com intuito de medir o potencial da membrana e potenciais de ação. Registros foram realizados nas situações de controle, durante a aplicação do agonista seletivo para mGluR-I, DHPG (100 µM) e, novamente, após a lavagem do DHPG do banho. A aplicação de DHPG gerou uma despolarização de  $5,5 \pm 0,55$  mV (N=13). A despolarização induzida pela DHPG foi parcialmente inibida pelo MPEP (10 µM), um antagonista seletivo para mGluR5. Essa inibição foi significativamente maior quando MPEP foi aplicado junto com LY367385 (240 µM) uma antagonista seletivo para mGluR1. Durante a aplicação de DHPG, o limiar de excitabilidade foi reduzido por  $186,4 \pm 54$  pA (N=11), e os neurônios dispararam potenciais de ação em maior frequência. Ambos os efeitos de DHPG foram revertidos após a lavagem do tecido, com solução sem droga. Os efeitos de DHPG nos potenciais de ação poderiam ter sido consequência simplesmente da despolarização induzida, ou poderiam ser um reflexo de uma alteração na excitabilidade intrínseca dos neurônios. Para distinguir essas possibilidades, nós utilizamos protocolos que conjugam injeção de corrente despolarizante com a aplicação de agonista mGluR-I e, comparamos os efeitos de ambos na mesma célula. Observamos que uma despolarização de 5 mV não mimetizou completamente os efeitos de DHPG (N=3). Nós concluímos que, além de gerar uma despolarização, a ativação de receptores mGluR-I altera a excitabilidade dos neurônios do corpo trapezoide.

Palavras-chave: Corpo Trapezoide, Registros intracelulares, Receptor Metabotrópico Glutamatérgico, DHPG, Sistema auditivo

## ABSTRACT

Alhadas, Éverton dos Santos e. Activation of Metabotropic Glutamate Receptors Group I depolarizes and increases the excitability of neurons in the Trapezoid Body of newborn mice. Thesis (MS in Physiology) - Institute of Biological Sciences - Department of Physiology and Biophysics - Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais - 2014.

Group I metabotropic glutamate receptors (mGluR-I) are coupled to protein Gq which are involved in the formation of PLC / IP<sub>3</sub> and release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. Previous studies have shown that activation of mGluR-I receptors in the Medial Nucleus of the Trapezoid Body generates an inward current at membrane potentials near the resting potential, suggesting an excitatory role for these receptors. In order to test this hypothesis, we performed experiments in slices of brainstem regions containing the trapezoid body obtained from C57BL mice, 6-9 days old, of both sexes. Standard intracellular recordings were performed using glass pipettes filled with 2 M KCl, producing resistances of 110-160 MΩ, in order to measure the membrane potential and action potentials. Recordings were performed in control situations, during application of the selective agonist for mGluR-I, DHPG (100 μM), and again after washing DHPG from the bath. Application of DHPG generated a depolarization of  $5.5 \pm 0.55$  mV (n = 13). This DHPG-induced depolarization was partially inhibited by MPEP (10 μM), a selective mGluR5 antagonist. This inhibition was significantly greater when MPEP was applied together with LY367385 (240 μM) a selective antagonist for mGluR1. During application of DHPG, the threshold of excitability was reduced by  $186.4 \pm 54$  pA (n = 11), and the neurons fired action potentials at higher frequency. Both effects were reverted after washout of DHPG with drug-free solution. The effects of DHPG on action potentials could have been simply a consequence of the induced depolarization, or could be a reflection of a change in the intrinsic excitability of neurons. To distinguish these possibilities, we used protocols that combine injection of depolarizing current with the application of DHPG and compared the effects of both in the same cell. We observed that a depolarization of 5 mV did not completely mimick the effects of DHPG (N = 3). We conclude that, in addition to generating a depolarization, activation of mGluR-I receptors alter the excitability of trapezoid body neurons.

Keywords: Body Trapezoid, intracellular recordings, glutamatergic metabotropic receptor, DHPG.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Receptores mGluR-I.....	6
Figura 2 – Vias de sinalização intracelular mGluR-I.....	8
Figura 3 – Fórmula estrutural química DHPG .....	11
Figura 4 – Vias dos Sistema Nervoso Auditivo .....	13
Figura 5 – Processamento de informação auditiva no tronco encefálico .....	15
Figura 6 – Efeito da Ativação de mGluR-I em MNTB.....	18
Figura 7 – Corte coronal do tronco cerebral.....	24
Figura 8 – Corte sagital do tronco cerebral .....	24
Figura 9 – Fatia obtida de tronco cerebral.....	25
Figura 10 – Corte sagital esquemático.....	26
Figura 11 – Sistema de perfusão .....	28
Figura 12 – Experimentos controle com KCl.....	33
Figura 13 – Experimento completo.....	34
Figura 14 – Efeito do DHPG.....	36
Figura 15 – Dupla aplicação de DPHG .....	36
Figura 16 – Aplicação de DHPG e Antagonistas.....	38
Figura 17 – Efeito da ativação dos mGluR-I por DHPG .....	41
Figura 18 – Efeito da injeção de corrente positiva intracelular .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF - Artificial cerebrospinal fluid (Fluido artificial cerebral – Liquor)

CETEA - Comitê de ética e experimentação animal

CB1 - Receptor Canabinóide tipo I

COS - Complexo Olivar Superior

DHPG - (S)3,5 Dihidroxifenilglicina

GABA - Ácido gama aminobutírico

mGluR - Metabotropic Glutamate Receptor

MNTB - Corpo medial do Núcleo Trapezoide

NTB - Núcleos do Corpo Trapezoide

PLC - Fosfolipase C

PKC - Proteína cinase C

SNC - Sistema nervoso central

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Neurotransmissão .....	1
1.1.1 Estrutura da sinapse.....	1
1.1.2 Neurotransmissores .....	2
1.1.3 Glutamato.....	3
1.2 Receptores.....	4
1.2.1 Receptores Excitatórios x Inibitórios .....	4
1.2.2 Receptores Ionotrópicos x Metabotrópicos .....	5
1.2.2.1 Receptores Ionotrópicos.....	5
1.2.2.2 Receptores Metabotrópicos .....	5
1.2.2.2.1 Classificação farmacológica .....	7
1.2.2.2.2 mGluRs do Grupo I.....	8
1.2.2.2.2.1 Proteína Gq, IP3, Ca <sup>2+</sup> .....	9
1.2.2.2.2.2 DSI e DSE mediado por endocanabinoides .....	10
1.2.3 Agonista seletivo, DHPG .....	11
1.3 Vias auditivas .....	12
1.3.1 Audição, comentários gerais .....	12
1.3.2 Circuitos no tronco encefálico .....	14
1.3.2.1 Corpo Trapezoide .....	14
1.3.2.1.1 Núcleos do Corpo Trapezoide como modelo de sinapse glutamatérgica... 16	
1.3.2.1.2 Receptores Metabotrópicos para Glutamato nos NTB .....	16
1.3.2.1.3 Hipótese do papel dual dos mGluRs no Corpo Trapezoide .....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral .....	20
3.2 Objetivo específico .....	20
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Animais.....	21
4.2 Fármacos, Reagentes e Soluções .....	21
4.3 Preparação das fatias .....	21

4.4 Identificação das fatias de interesse .....	22
4.4.1 Referências anatômicas .....	22
4.4.2 Responsividade ao agonista DHPG .....	27
4.5 Comparação com achados na literatura.....	27
4.6 Sistema de perfusão .....	27
4.7 Estratégia experimental.....	29
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 Motagem da bancada experimental .....	30
5.1.1 Experimentos com KCl.....	30
5.2 Efeitos do agonista mGluR-I, DHPG, no potencial de membrana .....	34
5.3 Efeitos dos antagonistas para mGluR-I.....	37
5.4 Efeitos do DHPG nos potenciais de ação do NTB .....	39
5.5 Despolarização por 5 mV .....	42
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
6.1 Efeitos do DHPG .....	45
6.2 Efeitos do DHPG na presença de LY367385 e MPEP .....	47
6.3 Efeitos do DHPG na presença do MPEP .....	49
6.4 Efeitos do DHPG nos potenciais de ação.....	51
6.5 Efeitos Do DHPG na presença de Despolarização .....	53
6.6 Padronização .....	54
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Neurotransmissão

#### 1.1.1 Estrutura da sinapse

O termo sinapse foi introduzido no final do século XIX, com o propósito de designar a região de aposição de neurônios, já anteriormente descrita por Ramón y Cajal. Atualmente, considera-se a sinapse como região de transmissão de informação, codificada em sinais elétricos ou químicos, entre as células. Mais comumente observada entre células musculares estriadas ou lisas, cardíacas e neurônios.

Tratando-se de mamíferos, dois tipos de sinapses valem ser descritas: a primeira é a sinapse elétrica e a segunda, denominada sinapse química. Na sinapse elétrica, canais interligam as células, permitindo uma propagação eletrotônica de corrente entre as células adjacentes. A segunda e mais amplamente observada, a sinapse química, ao nível da microscopia eletrônica, consiste na terminação axonal, região de origem pré-sináptica, a zona dendrítica, que forma o lado pós-sináptico e ainda o espaço existente entre os dois, que no córtex cerebral separa os processos celulares em aparentes 200 Å (GRAY, 1959). Nela, o sinal de uma célula é transmitido ao neurônio ou célula subsequente, através de vesículas sinápticas, de origem nos processos pré-sinápticos, em regiões espessas da membrana, como citado por Gray de acordo com Palay, 1956 e Schultz et al, 1957, permitindo a modulação e continuidade da resposta. Hoje, essas regiões espessas são sabidamente regiões de maior acúmulo de vesículas e são chamadas de Zonas ativas, também conhecidas por conterem excesso de mitocôndrias, necessárias para o fornecimento de ATP envolvido nas reações de exocitose das vesículas no espaço sináptico (SCHNEGGENBURGER & FORSYTHE, 2006).

Algumas sinapses apresentam especializações estruturais em toda sua maquinaria, que as permitem transmitir adequadamente, em situações específicas, os impulsos nervosos. Os neurônios oriundos do Núcleo Coclear, em específico, formam grandes terminações nervosas, denominadas Cálice de Held, que comunicam-se, via sinapses únicas, com as células principais do Núcleo Medial do Corpo trapezoide, através de membrana espessa de alta densidade de zonas ativas e de mitocôndrias associadas, quando comparada com sinapses convencionais, posicionadas de frente para o terminal pós-sináptico (GERSDORFF AND BORST, 2002). Estas características asseguram a rápida transmissão do sinal desta sinapse, já que esse arranjo espacial se mostra ideal para um rápido fornecimento de ATP (BILLUPS E FORSYTHE 2002), de forma que, potenciais de ação pré-sinápticos desencadeiam confiáveis potenciais de ação no terminal pós-sináptico, mesmo em altas frequências de transmissão (GERSDORFF AND BORST, 2002; KOPPSCHNEINPFLUG ET AL., 2003; SCHNEGGENBURGER & FORSYTHE, 2006).

### **1.1.2 Neurotransmissores**

A ideia de que a informação poderia ser transferida a partir de um neurônio para o outro por meio de sinalização química foi intensamente debatida durante a primeira metade do século XX. Experimentos, como o realizado em 1926 pelo fisiologista alemão Otto Loewi, estudando a relação entre estimulação elétrica do nervo vago e a diminuição dos batimentos cardíacos através da liberação de sinal químico, foram essenciais para o entendimento de mecanismos envolvidos na neurotransmissão. Primeiramente chamado de “Sinal Químico”, as substâncias envolvidas na sinalização química, hoje, são coletivamente denominadas neurotransmissores e atuam interagindo com receptores específicos nos neurônios

pós-sinápticos (ou classes específicas de células-alvo), alterando as suas propriedades elétricas e, promovendo dessa forma, uma enorme variedade de efeitos que alteram o funcionamento, desde partes isoladas de um sistema até todo um organismo (JACOBSON AND MARCUS, 2008). Diversos subtipos de neurotransmissores regulam uma série de eventos no organismo, dentre tantos, é válido citarmos alguns como: aprendizagem e memória (NAKANISHI, 1992; REVISADO POR GERSDORFF AND BORST, 2002).

### **1.1.3 Glutamato**

O glutamato é comumente descrito como o principal neurotransmissor excitatório do SNC de vertebrados (MELDRUM, 2000). Sua ação excitatória é conhecida desde meados da década de 1950, porém, somente em 1970 foi amplamente estudado e reconhecido como principal neurotransmissor do SNC em vertebrados (MELDRUM, 2000, OLIVE, 2009). Se tratando de via auditiva o glutamato também é o principal neurotransmissor e facilmente identificado nos neurônios dos gânglios espirais, nos núcleos cocleares e no corpo trapezoide (GODFREY ET AL., 1978). Outros neurotransmissores também são encontrados nestas vias, como o Ácido G-Aminobutírico (GABA), Substância P e Somatostatina (WYNNE E ROBERTSON, 1997).

Como já mencionado, o glutamato é o neurotransmissor mais amplamente encontrado no SNC, porém, em totalidade, seus efeitos são ainda mal definidos já que sua ação se dá sobre uma diversidade de tipos de receptores incluindo receptores ionotrópicos dos tipos AMPA, kainato e NMDA e receptores metabotrópicos (mGluR), que são receptores acoplados à proteína G (WISNIEWSKI E CAR, 2002).

## **1.2 Receptores**

### **1.2.1 Receptores excitatórios x inibitórios**

Receptores sinápticos, quando ativados, podem, a partir de seu característico mecanismo de ação, promover a excitação ou inibição de neurônios pós-sinápticos. Essa maquinaria dá uma dimensão adicional ao funcionamento neural, permitindo um extenso controle sobre as ações neurais, restringido ou estimulando, dessa forma, inibindo ou excitando a via ou circuito em questão (GUYTON, 1996).

Mecanismos excitatórios incluem a abertura de canais para cátions, que permitem o fluxo de cargas positivas para o interior da célula pós-sináptica, alterando o potencial de membrana para valores mais próximos do limiar para a excitação, a inibição da condutibilidade dos canais de potássio ou cloreto, diminuindo a difusão de íons positivos ( $K^+$ ) para fora ou a difusão de íons carregados negativamente ( $Cl^-$ ), para dentro. Em ambos os casos, o potencial de membrana tende a se tornar mais positivo, obviamente mais excitado. Além dessas ações rápidas, a ativação de receptores glutamatérgicos pode ativar vias de sinalização intracelular, causando diversos efeitos, dos quais, aumento do número de receptores excitatórios da membrana ou diminuição do número de receptores inibitórios, da mesma (JACOBSON AND MARCUS, 2008).

Quanto aos mecanismos de inibição, o principal deles é a abertura de canais para cloreto, que hiperpolariza a membrana e opõe aos mecanismos excitatórios descritos acima. Além disso, ativação de receptores pode ativar mecanismos intracelulares via segundos mensageiros, que agem aumentando o número de receptores sinápticos inibitórios ou diminuindo o número de receptores sinápticos excitatórios, causando assim, a inibição de neurônios pós-sinápticos (JACOBSON AND MARCUS, 2008).

## **1.2.2 Receptores para glutamato Ionotrópicos x Metabotrópicos**

Os receptores para glutamato são divididos em dois grupos, de acordo com seu mecanismo de ação: Os Ionotrópicos (iGluR) e os Metabotrópicos (mGluR) (WATKINS et al., 1990).

### **1.2.2.1 Receptores Ionotrópicos**

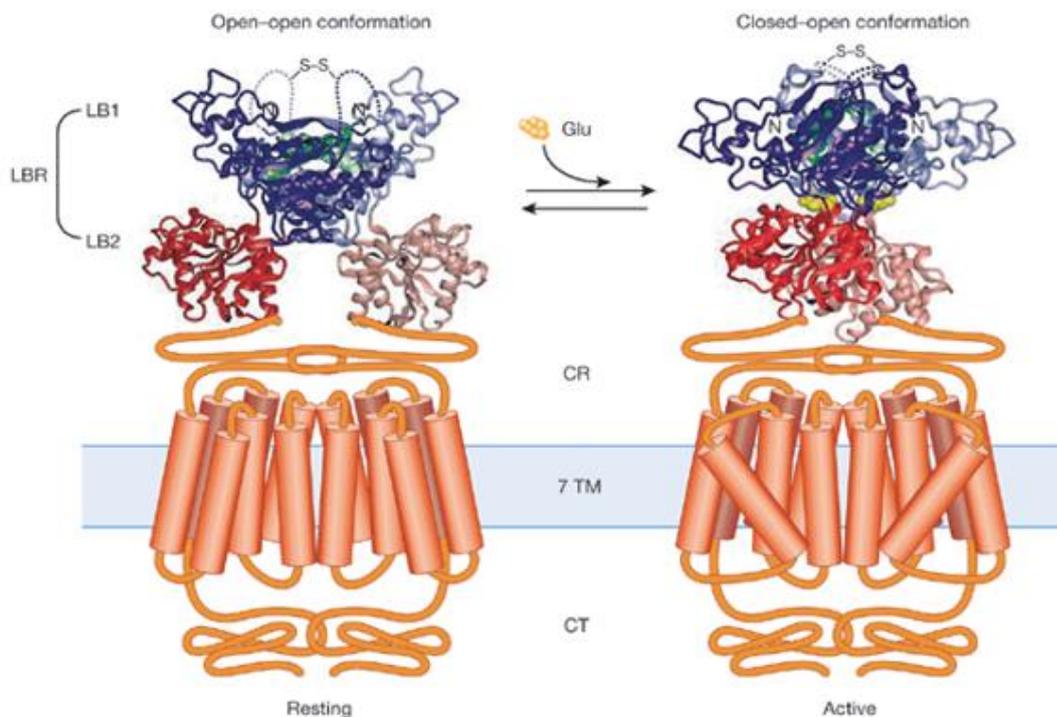
Os iGluRs medeiam as respostas sinápticas excitatórias rápidas, afetando diretamente o fluxo iônico (WATKINS et al., 1990). São divididos em três subtipos principais de canais de íons regulados pelo glutamato, classificados farmacologicamente de acordo com o agonista seletivo que os ativa: N-metil-D-aspartato (NMDA), permeável a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, e Ca<sup>2+</sup>, ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA), permeável a Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, mas não a Ca<sup>2+</sup> (NISWENDER E CONN, 2010) e cainato (KA), permeável ao Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (OLIVE, 2009).

### **1.2.2.2 Receptores Metabotrópicos**

Em meados dos anos 1980, estudos observaram que determinados eventos mediados por alterações bioquímicas via Glutamato não eram alterados mediante aplicação de antagonistas seletivos para os receptores para glutamato então conhecidos como o receptor para NMDA e o receptor para AMPA. Isso sugeriu a existência de outras famílias de receptores para glutamato (NAKANISHI, 1992). No início dos anos 1990, por meio de técnicas de biologia molecular, foi possível a identificação de famílias de proteínas de membrana que se comportavam de formas diferentes mediante presença do ligante glutamato, (receptores ionotrópicos (Iglu) e receptores metabotrópicos (mGlu)) (NAKANISHI, 1992). Subsequentemente, o

desenvolvimento de antagonistas com afinidade a isoformas específicas permitiu a identificação farmacológica de três subtipos de receptores atualmente denominados como Receptores Metabotrópicos Glutamatérgicos do grupo I, II, ou III (receptores mGluR-I, mGluR-II e mGluR-III) e técnicas de imuno-histoquímica indicaram que esses receptores são expressos amplamente no SNC e que regulam e atuam em vários processos sinápticos, dentre eles a plasticidade sináptica (WATKINS E JANE, 2006; CONN E PIN, DE 1997; ANWYL, 1999).

Os receptores metabotrópicos de glutamato, ou mGluRs, amplamente expressos no SNC, onde participam amplamente da neurotransmissão (CONN E PIN, 1997), são receptores ativados por glutamato que promovem ações intracelulares através de seu acoplamento com uma proteína G, sendo denominados, dessa forma, GPCRs (G protein-coupled receptor), responsáveis por



**Figura 1.** Estrutura de Receptores Metabotrópicos para Glutamato. Esses receptores são caracterizados por um grande domínio extracelular, dividido em sítio de ligação (LBR) e uma região rica em cisteína (CR). Estado "inativo" à esquerda e estado "ativo" à direita (Ligação de Glutamato). (Adaptado de Kunishima et al. 2000).

respostas pós-sinápticas mais lentas e duradouras. São considerados proteínas de grande tamanho, apresentando cerca 854 a 1179 aminoácidos, ancorados à membrana celular por sete domínios transmembranares, apresentando um domínio extracelular N-terminal hidrofílico de aproximadamente 600 aminoácidos, e um domínio citoplasmático C-terminal, com comprimento variando entre 32 a 377 aminoácidos de acordo com o subtipo (**Figura 1**) (NAKANISHI, 1992).

#### 1.2.2.2.1 Classificação farmacológica

A divisão em grupos I, II e III obedeceu a uma classificação farmacológica quando observadas características semelhantes entre os subtipos, até então, conhecidos. Dessa forma, mGluR1 e mGluR5, pertencentes ao Grupo I, estão acoplados a proteína Gq, relacionados com hidrólise de fosfoinosítídeos de membrana e ativados por quisqualato e 3,5-Dihidroxifenilglicina (DHPG) (OZAWA *et al.*, 1998). Já os receptores do Grupo II, mGluR2 e mGluR3, são ativados por agonistas seletivos como LY354740 e LY379268 (NICOLETTI *et al.*, 2008) e DCG-IV (OZAWA *et al.*, 1998). O grupo III, do qual fazem parte os receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8, é ativado por l-2-amino-4-phosphonobuanoate (L-APA) e pelo composto endógeno, Iserina- O-fosfato (NICOLETTI *et al.*, 2008). Os receptores do Grupo III, assim como os do Grupo II, estão ligados à proteína Gi (MOURA, 2011), envolvidas com a inibição da adenilato ciclase, inibição de canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem-dependentes e a ativação de canais de K<sup>+</sup>, que atuam inibindo a produção de AMPc (CONN E PIN, 1997; OZAWA ET AL., 1998; MELDRUM, 2000).

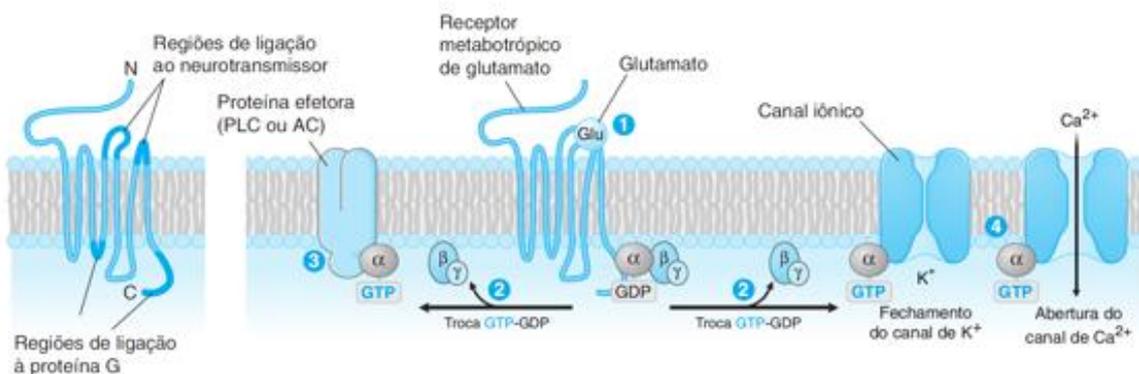
As sequências de aminoácidos dos mGluRs são altamente conservadas, não só nos sete segmentos transmembranares, como também, nos seus domínios extracelulares de forma que os membros do mesmo grupo apresentam homologia de

70% na sequência de aminoácidos, enquanto a homologia observada entre os diferentes grupos diminui para valores a cerca de 45%. (NAKANISHI, 1992).

### 1.2.2.2.2 mGluRs do Grupo I

O Grupo I dos mGluR-I, como mencionado anteriormente, reúne os receptores mGluR-1 e mGluR-5. Estes mGluRs, estimulam a formação de IP3 (Trifosfato de inositol) e promovem a mobilização e a liberação de ácido araquidônico e  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (**Figura 2**) (ABE et al., 1992; NAKANISHI, 1992).

Em vários lugares do SNC, inclusive nos núcleos do corpo trapezoide, Microscopia Confocal de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica evidenciaram a presença dos mGluRs do Grupo I no terminal pós-sináptico enquanto os mGluRs dos grupos II e III são encontrados predominantemente nos terminais pré-sinápticos (KUSHMERICK et al., 2004, CARTMELL E SCHOEPP, 2000; ELEZGARAI et al., 2003, NISWENDER E CONN, 2010).



**Figura 2.** Vias de sinalização intracelulares iniciadas pela ligação do agonista Glutamato ao sítio ativo do mGluR (Stuart A. Forman, Eng H. Lo).

#### 1.2.2.2.1 Proteína Gq, IP3, Ca<sup>2+</sup>

Os receptores do grupo I, mGluR-1 e mGluR-5 são acoplados a proteína Gq. A ativação desses receptores estimula a hidrólise de fosfatidilinosítídeos, como PIP<sub>2</sub>, gerando diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). Em sequência, o IP<sub>3</sub>, devido a sua estrutura hidrossolúvel, migra pelo citosol e se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático e promove a liberação de Ca<sup>2+</sup> de estoques intracelulares, enquanto que, paralelamente, o DAG, também gerado pela hidrólise dos fosfatidilinosítídeos, facilita a ativação de proteína quinase C (PKC) (NAKANISHI, 1992; MELDRUM, 2000; NISWENDER AND CONN, 2010).

O aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular, seja pela abertura de canais para Ca<sup>2+</sup> ou pela ação de IP<sub>3</sub>, agindo sobre IP<sub>3</sub>Rs no Retículo Sarcoplasmático, promovido pela ativação dos Receptores Metabotrópicos Glutamatérgicos, em questão, acoplados à proteína G, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, haja vista que, o íon cálcio funciona como um terceiro mensageiro que desencadeia respostas intracelulares, dentre as quais, contração muscular, plasticidade sináptica, processos endocitóticos e exocitóticos nas células endócrinas nos neurônios (NELSON E COX, 2006; MOURA, 2011). O aumento de Ca<sup>2+</sup>, também inicia a síntese de 2-AG a partir de Diacilglicerol (DAG) na membrana, pela via envolvendo fosfatidil-inositol-fosfolipase C (PI-PLC). O composto 2-AG, visto como principal endocanabinóide no hipocampo e neocórtex, produto da DAG-lipase agindo sobre a DAG em detrimento do aumento de Ca<sup>2+</sup> e, uma vez sintetizado, pode obter acesso ao exterior da célula (ALGER, 2002).

#### **1.2.2.2.2 DSI e DSE mediado por endocanabinóides**

Os primeiros relatos de sinalização retrógrada datam do início da década de 1990 (VINCENT E MARTY, 1992), onde achados sugeriram que a ativação de células do cerebelo e células piramidais de CA1, no hipocampo, eram responsáveis, quando estimuladas, por uma redução na amplitude de IPSCs de origem GABAérgica.

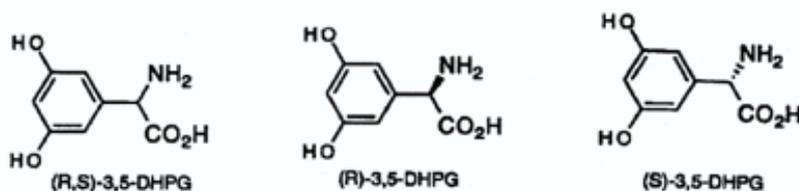
Avanços no conhecimento dessa sinalização indicaram que, a interação existente entre neurotransmissores e receptores se dava através de endocanabinóides, liberados no terminal pós-sináptico, e receptores CB1, localizados no terminal pré-sináptico, como descrito por Wilson e Nicoll, e por Ohno-Shosaku, em meados de 2001, segundo Alger, (2002), fazendo uso de antagonista seletivo de Receptores Canabinóides que inibiu os efeitos, até o momento observados, no hipocampo (OHNO-SHOSAKU, 2001; ALGER, 2002). Até então, o que se sabia era que o produto dessa interação era a alteração da liberação de neurotransmissores inibitórios, em vias GABAérgicas, em neurônios do cerebelo, hipocampo (GERSDORFF et al, 1997; OHNO-SHOSAKU, 2002). Hoje sabe-se que essa sinalização retrograda também altera a liberação de neurotransmissores excitatórios, em vias glutamatérgicas no Corpo Trapezoide (KUSHMERICK et al, 2004). A esses eventos de sinalização retrograda foram dados os nomes DSI e DSE, Inibição da Supressão por Despolarização e Excitação da Supressão por Despolarização, respectivamente e atualmente sabe-se que ao ser liberado, pelo terminal pós-sináptico, o endocanabinóides migra até o terminal pré-sináptico onde se liga a receptores CB1 de membrana, conhecidamente, de localização pré-sináptica, onde, através de mecanismos ligados a proteínas G, mais

especificamente, a isoforma Gi, acoplada a estes receptores CB1, inibe a atividade de vias GABAérgicas e Glutamatérgicas (OHNO-SHOSAKU, 2001, ALGER, 2002, KUSHMERICK et al, 2004). É válido, como forma de correlacionar o entendimento da DSI e DSE com o item anterior, o entendimento que o endocanabinóide 2-AG é visto como o principal endocanabinóide em regiões como hipocampo e neocórtex (ALGER, 2002).

### 1.2.3 Agonista seletivo, DHPG

É sabido que os primeiros agentes seletivos identificados eram análogos do glutamato (WISNIEWSKI E CAR, 2002, SHIPE et al., 2005). O agonista adotado em nossos experimentos foi o 3,5- Dihidroxifenilglicina (DHPG), um exemplo de agonista, análogo do Glutamato, que age sobre mGluR1 e mGluR5 se ligando ao sítio ortostérico destes receptores (KUSHMERICK et al, 2004).

Sua forma S-isômero (S)-3,5-dihidroxifenilglicina [(S)-3,5-DHPG] (**Figura 3**), seletiva para os receptores do grupo I, apresenta afinidades similares tanto para mGluR5 como para mGluR1 (WISNIEWSKI E CAR, 2002). Por sua vez, essa isoforma possui fraca ou mesmo nenhuma afinidade pelos receptores dos Grupos II e III (Y. TANABE AND NAKANISHI, 1991).



**Figura 3.** Fórmula estrutural química de três isômeros do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG.

Avaliação da atividade farmacológica do enantiômero 3,5-DHPG demonstrou que a isoforma (S)-3,5-DHPG era capaz de produzir efeitos dez vezes mais potentes do que (R)-3,5-DHPG na formação de IP3. (S)-3,5-DHPG é um componente de antibióticos oriundos de glicopeptídeos, como a Vancomicina (BAKER et al, 1995).

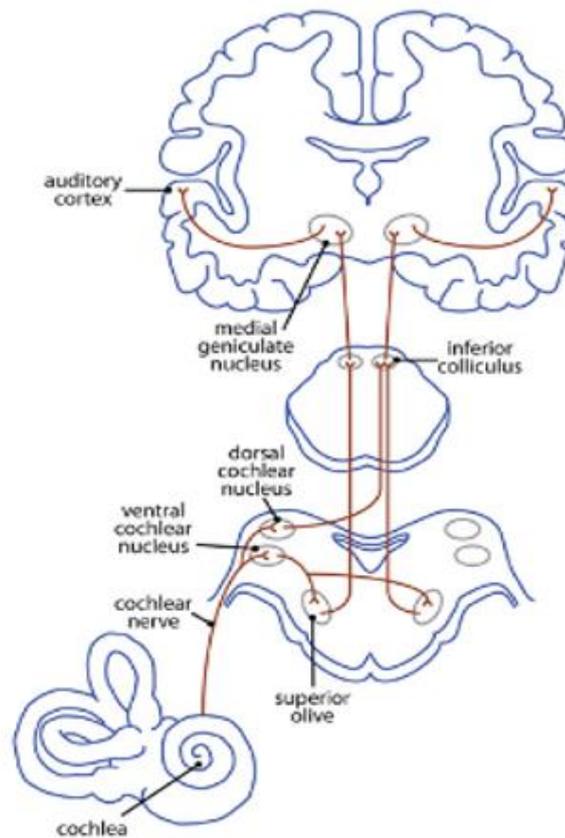
Vários agonistas foram caracterizados e ordenados de acordo com sua potência, descrita da seguinte forma: quisqualato > 3,5-dihidroxifenilglicina (3,5-DHPG) > glutamato > 1S, 3R - 1 - aminociclopentano - 1,3 - dicarboxílico (ACPD) = ibotenato > L- CCG- I > 3- HPG > t -ADA. Entre estes agonistas supracitados, 3,5-DHPG, 3 - HPG, e t-ADA possuem boa especificidade pelos receptores metabotrópicos do grupo I, mGluR-1 e mGluR-5.

### **1.3 As vias auditivas**

#### **1.3.1 Audição, comentários gerais**

O sistema auditivo é constituído de mecanismos capazes de captar os sons e fazer com que estes ruídos sejam percebidos e identificados pelo organismo. Células ciliadas, situadas na cóclea, parte de um sistema denominado Órgão de Corti, são capazes de produzirem potenciais de ação quando estimulados por diferentes e adequadas frequências sonoras (HOLT et al, 1997). Essas células dão origem, portanto, ao mecanismo de transdução mecanoelétrica que transforma o estímulo sonoro em estímulo elétrico através de potenciais de ação que se propagam até áreas específicas do Sistema Nervoso (**Figura 4**) (HACKNEY AND FURNESS, 2013). Após a transdução, os impulsos elétricos gerados se propagam por fibras aferentes auditivas de 1ª ordem, e integram o VIII par craniano (nervo vestibulococlear), indo em direção ao bulbo e projetando-se no núcleo coclear, por sua vez, dividido em núcleos cocleares dorsal, anteroventral e pósterio-ventral.

Dos núcleos cocleares ventrais originam-se neurônios de 2ª ordem que se dirigem para a ponte, tanto para o Núcleo Olivar Superior do mesmo lado como o núcleo contralateral. Já o núcleo coclear dorsal projeta fibras para o mesencéfalo, no colículo inferior contralateral.



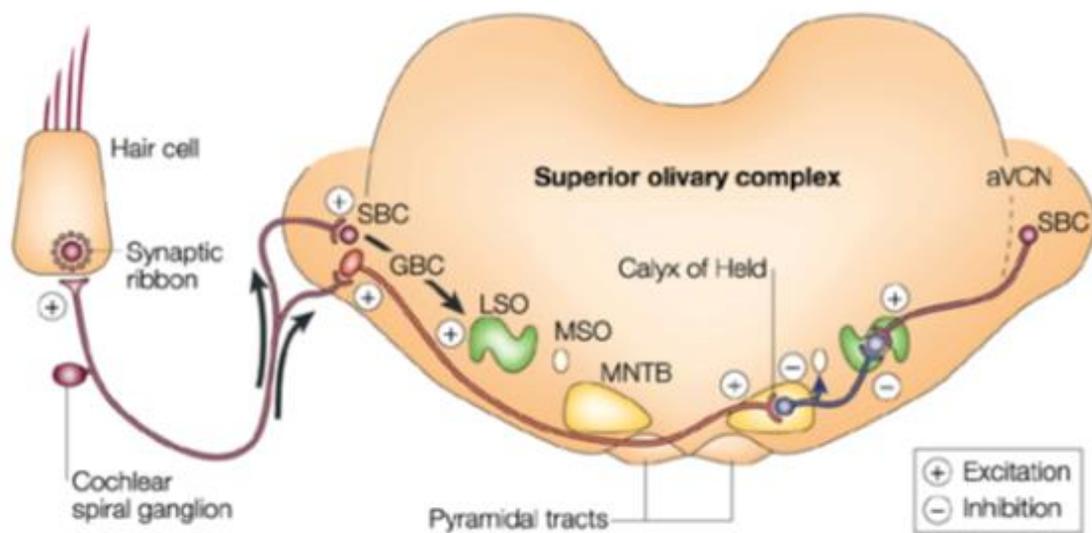
**Figura 4.** Vias do sistema nervoso auditivo. Os impulsos nervosos se iniciam no gânglio espiral e se dirigem até o Núcleo coclear ventral, seguindo até a o Complexo Olivar Superior, posteriormente, via Lemnisco lateral, fazem sinapses no Colículo inferior onde projetam conexões até o Núcleo Geniculado Medial e posteriormente Córtex auditivo, situado no giro temporal transverso do lobo temporal. Nestas regiões são identificados os córtices auditivos primário, secundários e a área auditiva associativa (área de Wernicke). Conforme percebido, a via auditiva tem projeção bilateral. (Blake E. Butler and Stephen G. Lomber, 2013).

### 1.3.2 Circuitos no tronco encefálico

#### 1.3.2.1 Corpo trapezoide

Localizado na porção anterior da ponte, o Corpo Trapezoide (TB) faz parte do Complexo Olivar Superior (COS), conhecido por comparar informações advindas dos Núcleos Cocleares, como parte do mecanismo para estimar a fonte de som no espaço (BARNES-DAVIES AND FORSYTHE, 1995) (**Figura 5**). Formado pelos núcleos Medial Superior da Oliva (MSO) e Lateral Superior da Oliva (LSO) e pelos núcleos Medial e Ventral do Corpo Trapezoide (NMTB e NVTB, respectivamente), além de grupos celulares periolivares (PAXINOS & WATSON, 1998), sua principal função é o processamento de informações auditivas binaurais envolvidas na localização sonora, que são, em sequência, enviados a centros superiores (HELFERT et al., 1991, WEBSTER 1995). De modo em particular, os Núcleos do Corpo Trapezoide, em especial, são importantes relés sinápticos nas vias ascendentes do Sistema Auditivo (BORST AND VAN HOEVE, 2011). Formado por fibras derivadas dos núcleos cocleares que cruzam transversalmente pela porção anterior ao tegmento e neurônios da porção medial do Corpo Trapezoide (MNTB) que recebem entrada sináptica excitatória dos “globular bushy cells” do Núcleo Coclear Anterior contralateral. As suas projeções fornecem grande parte da inibição glicinérgica para vários núcleos auditivos do tronco encefálico (THOMPSON AND SCHOFIELD, 2000; KADNER AND BERREBI, 2008). Esses axônios são mielinizados e de grande diâmetro (4-12 mm), o que permite uma rápida velocidade de condução (GERSDORFF AND BORST, 2002). In vivo, os neurônios do MNTB de roedores disparam potenciais de ação espontaneamente (i.e. na ausência de sons extracorpóreos) em frequências de até 100 Hz e, desta forma, fornecem inibição tônica para as vias auditivas. Na presença de sons, esta frequência de disparos

pode sofrer aumento de 2-3 vezes (ENGLITZ et al., 2009; LORTEIJE et al., 2009). Além desta notável capacidade de disparar potenciais de ação em alta frequência, o processamento de informação auditiva depende de um controle temporal preciso (GROTHER et al., 2010), que por sua vez demanda de uma minimização da dispersão temporal dos retardos sinápticos (isto é, o intervalo entre o potencial de ação pré-sináptico e o potencial de ação pós-sináptico). Em sequência, as fibras oriundas dos núcleos do Corpo Trazeoide infletem-se cranialmente para constituir o lemnisco lateral, terminando no colículo inferior no mesencéfalo (P.H. SMITH et al., 1991)



**Figura 5.** Processamento de informação auditiva no tronco encefálico. O diagrama mostra o circuito do Complexo Olivar Superior onde sinais auditivos, advindos das cócleas, são transmitidos para o Núcleo Coclear Ventral anterior ipsilateral (aVCN) por sinapses excitatórias das células globulares (GBC) e esféricas (SBC). A Oliva Superior Lateral (LSO) também recebe conexões excitatórias das SBCs do aVCN ipsilateral. Por fim, é possível observar que trens de descarga evocados pelo som nas duas cócleas, convergem para os neurônios do LSO promovendo excitação ipsilateral (através do aVCN) e inibição contralateral (através do MNTB).

### **1.3.2.1.1 Núcleos do corpo trapezoide como modelo de sinapse glutamatérgica**

O Cálice de Held, localizado no tronco encefálico, mais precisamente, nos núcleos do corpo trapezoide, formado por fibras oriundas dos núcleos cocleares, tem, recentemente, ganhado importância quando o intuito é o estudo de mecanismos sinápticos. Esta sinapse, primeiramente descrita por Hans Held no início do século XX (P. CONGAR AND TRUDEAU, 2002), não interessante por acaso, é característica pelo tamanho extraordinário de seu terminal pré-sináptico que permite o acesso eletrofisiológico simultâneo nos terminais pré-sinápticos e pós-sinápticos e, dessa forma, fornece condições para testar os efeitos de compostos farmacológicos na neurotransmissão. Outra característica importante dessa sinapse é a transmissão dos sinais desde poucos Hz a centenas deles, exibindo uma ampla e excelente faixa dinâmica de transmissão (GERSDORFF AND BORST, 2002). Esse tipo de sinapse, tem permitido a investigação de vários mecanismos envolvidos na neurotransmissão, com contribuições importantes, por exemplo, para o entendimento da plasticidade a curto prazo (GERSDORFF AND BORST, 2002).

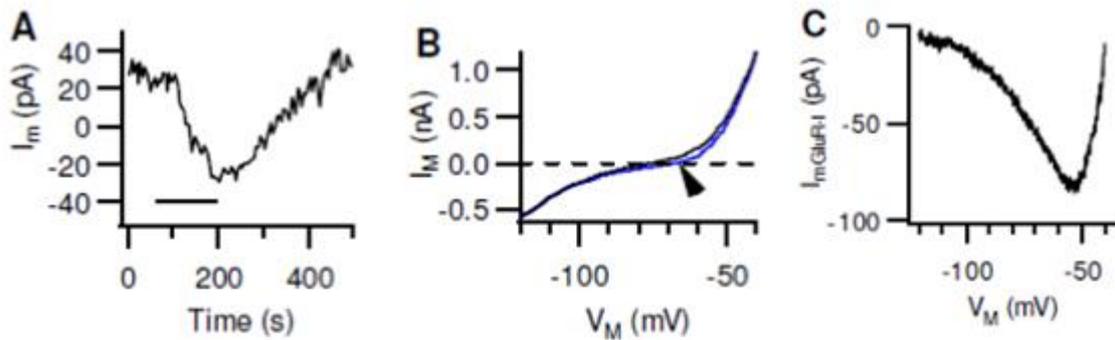
### **1.3.2.1.2 Receptores metabotrópicos para glutamato nos núcleos do Corpo Trapezoide**

Os mGluRs do Grupo I, como supracitado, apresentam localização pós-sináptica e sua ativação está ligada à liberação endocanabinóides (eCB), realizada por um aumento na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  nas células principais do Núcleo Medial do Corpo Trapezoide, que, através de receptores CB1, localizados no terminal nervoso pré-sináptico do cálice de Held, inibem a liberação de glutamato, neste terminal pré-sináptico (KUSHMERICK et al, 2004). O grupo II, que

compreende os mGluR-2 e mGluR3, e o grupo III, que reúne os mGluR-4, mGluR-6, mGluR-7 e mGluR-8, dos mGluRs, possuem localização pré-sináptica e são acoplados negativamente à proteína G, especificamente da isoforma Gi, que age regulando negativamente a liberação de neurotransmissores (BARNES-DAVIES E FORSYTHE, 1995; VON GERSDORFF et al, 1997; KUSHMERICK et al, 2004)

#### **1.3.2.1.3 Hipótese do papel dual dos mGluRs no corpo trapezoide**

Como já supracitado, os receptores metabotrópicos do glutamato (mGluRs) são amplamente expressos no SNC, onde regulam a neurotransmissão e exercem efeitos diversos, muitos dos quais ainda pouco conhecidos. Estudo prévio realizado por Kushmerick et al (2004) mostrou a presença de receptores mGluR do Grupo I no MNTB de ratos, como discorrido acima, evidenciando, também, que a ativação desses receptores foi capaz de desencadear dois efeitos, um inibitório e outro excitatório. O primeiro foi uma DSE, como previamente explanado. Uma inibição pré-sináptica da liberação de glutamato, mediado por uma via dependente de endocanabinóides, especialmente nesta situação, 2-AG, liberados do neurônio pós-sináptico, pela ativação de mGluR-I, via proteína Gi, agindo sob receptores CB1, acoplados negativamente a proteínas Gq, localizados no terminal pré-sináptico. Além deste efeito inibitório, um segundo efeito, advindo da ativação de receptores mGluR-I pós-sinápticos, foi a geração de uma corrente de entrada e, portanto, despolarizante, no terminal pós-sináptico, medida em potenciais próximos do potencial de repouso (**Figura 6**) (KUSHMERICK et al., 2004).



**Figura 6.** Ativação de Receptores Metabotrópicos para Glutamato do tipo I (mGluR-I). O Grupo I mGluR ativa corrente de entrada no neurônio MNTB. **A.** Corrente de membrana durante registros em whole-cell voltage clamp a  $-60$  mV. O agonista mGluR-I, s-DHPG ( $0,1$  mM), foi aplicado nos tempos indicados pela barra. **B.** A relação I-V obtida por um protocolo de rampa lenta a partir de  $120$  mV a  $40$  mV no controle (linha preta) e na presença de DHPG (linha azul). Observe a mudança na corrente de membrana próximo ao potencial de zero corrente (cabeça da seta). **C.** A relação I-V para  $I_{mGluR-I}$  definida pela subtração da curva obtida no controle daquela com DHPG. Observe que a corrente tende a zero para potenciais negativos (perto do potencial de reversão para o  $K^+$ ) e para potenciais positivos. (Baseado em dados publicados por Kushmerick et al., 2004).

Como citado por Chanda and Xu-Friedman, (2011), esse mecanismo de excitação de mGluRs pós-sinápticos pode, nas células espessas (BC) do Núcleo Coclear Anteroventral (AVCN), contrabalançar significativamente os efeitos inibitórios de receptores pré-sinápticos e, dessa forma, fornecer flexibilidade adicional para o ajuste fino do relé BC. Além disso, alternativamente, as duas vias podem ser coordenadas com o intuito de prolongarem o intervalo dinâmico da sinapse (CHANDA AND XU-FRIEDMAN, (2011).

Baseado nestes dados, nós desenvolvemos a hipótese de que existe um papel dual para receptores mGluR-I: uma redução do conteúdo quântico da liberação de glutamato (que reduz a depressão sináptica que pode acontecer durante atividade tônica) e, simultaneamente, a geração de uma corrente de

membrana excitatória no neurônio pós-sináptico que deve aumentar a sua excitabilidade.

## 2. JUSTIFICATIVA

Neurônios auditivos do NTB representam a principal fonte de inibição sináptica dos circuitos neuronais envolvidos na localização de fontes sonoras. Atualmente, muito pouco se sabe sob o controle a curto prazo da excitabilidade dos neurônios do NTB.

Em estudos prévios, descrevemos receptores mGluR-I pós-sinápticos no MNTB que, ao serem ativados, causavam uma inibição pré-sináptica por uma via dependente da liberação de endocanabinóides pós-sinápticos, ativando receptores CB1 localizados nos terminais pré-sinápticos. Além deste efeito inibitório, a ativação de receptores mGluR-I pós-sinápticos produziu uma corrente de entrada, dependente de  $Ca^{2+}$  (e, portanto, despolarizante) quando medida em potenciais de membrana perto do potencial de repouso, sugerindo uma importância fisiológica (KUSHMERICK et al., 2004). Baseado nestes achados, nós desenvolvemos a hipótese de que existe um papel dual para receptores mGluR-I nesses neurônios do NTB: Primeiro, uma redução do conteúdo quântico da liberação de glutamato (que reduz a depressão sináptica que pode eventualmente acontecer durante atividade tônica); Segundo, a geração de uma corrente de membrana excitatória que aumente a excitabilidade para garantir o desempenho do relé em termos de confiabilidade e precisão temporal. Chamamos a atenção ao fato de que efeitos eletrogênicos de receptores mGluR-I têm sido descritos em outros núcleos auditivos (CHANDA et al., 2011), que sugerem que a modulação da excitabilidade por mGluR-I pode ser de importância geral no processamento de informação auditiva.

Além de tudo o que foi descrito, o estudo do efeito do agonista DHPG no NTB ainda permite expandir o entendimento dos mecanismos de áreas não diretamente associados às funções auditivas, pois fornece uma excelente oportunidade para elucidação do papel de mecanismos dos mGluR-I, sabidamente envolvidos em processos fisiológicos e fisiopatológicos, dentre os quais, doenças neurodegenerativas como Huntington e Alzheimer (MAYER E WESTBROOK, 1987; MELDRUM, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o impacto da corrente pós-sináptica gerada pela ativação de receptores mGluR-I na excitabilidade de neurônios do corpo trapezoide.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Implantação de novas tecnologias e solidificação da técnica de registro com pipetas de alta resistência.
- Estudar o efeito da ativação dos receptores mGluR-I, sobre o potencial de membrana em neurônios do NTB via:
  - Agonista seletivo
  - Bloqueio por antagonistas seletivos para mGluR-1 e mGluR-5.
- Identificar o subtipo de receptor mGluR que medeia a ImGluR-I
- Estudar o efeito do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG, sobre os potenciais de ação em neurônios do NTB.
  - Via Agonista.

- Via Injeção Manual de Corrente positiva intracelular mimetizando o efeito do agonista.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57b neonatos, com idade entre 7 e 9 dias, mantidos em microisoladores sob ar filtrado, temperatura 23° e ciclo vigília de claro escuro 12h/12h, fornecidos pelo CEBIO –UFMG e mantido no Biotério de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA-UFMG (protocolo número 131/2009).

### **4.2 Fármacos, Reagentes e Soluções**

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

### **4.3 Preparação das fatias**

Os animais eram sacrificados por decapitação. A caixa craniana imediatamente aberta por meio de uma tesoura, e o cérebro removido e colocado imerso em solução de aCSF para corte gelado. O aCSF para corte continha (em mM) NaCl (125), KCl (2.5), CaCl<sub>2</sub> (2.0), MgCl<sub>2</sub> (1.0), NaCO<sub>3</sub> (25), Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.25), Glicose (25) ácido ascórbico (0.4), piruvato de Na<sup>+</sup> (2) e myo-inositol (3). Em seguida, o tronco encefálico era isolado e fixado, com cola a base de éster de cianoacrilato, na plataforma circular de aço inox do micrótomo de lâmina vibratório

(“vibrátomo”, modelo Leica VT1000S). O uso de baixo  $\text{Ca}^{2+}$  e alto  $\text{Mg}^{2+}$  na aCSF visa atenuar a transmissão sináptica, promovida pelo processo mecânico de obtenção das fatias, evitando assim os possíveis efeitos neurotóxicos promovidos pela liberação excessiva de neurotransmissores. O tecido era então, cortado em espessura de 0,3 mm e as fatias contendo o corpo trapezoide eram transferidas para uma câmara contendo solução aCSF normal. A solução aCSF de registro tinha a mesma composição do aCSF para corte exceto pela concentração fisiológica de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) e  $\text{Mg}^{2+}$  (1 mM). As fatias eram, então, incubadas a 35°C por 30 minutos visando a recuperação do trauma mecânico sofrida pelo tecido durante o fatiamento e em seguida mantidas a temperatura ambiente. Para o registro, uma fatia era transferida, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur adaptada, para a câmara de registro.

#### **4.4 Identificação das fatias de interesse**

##### **4.4.1 Referências anatômicas**

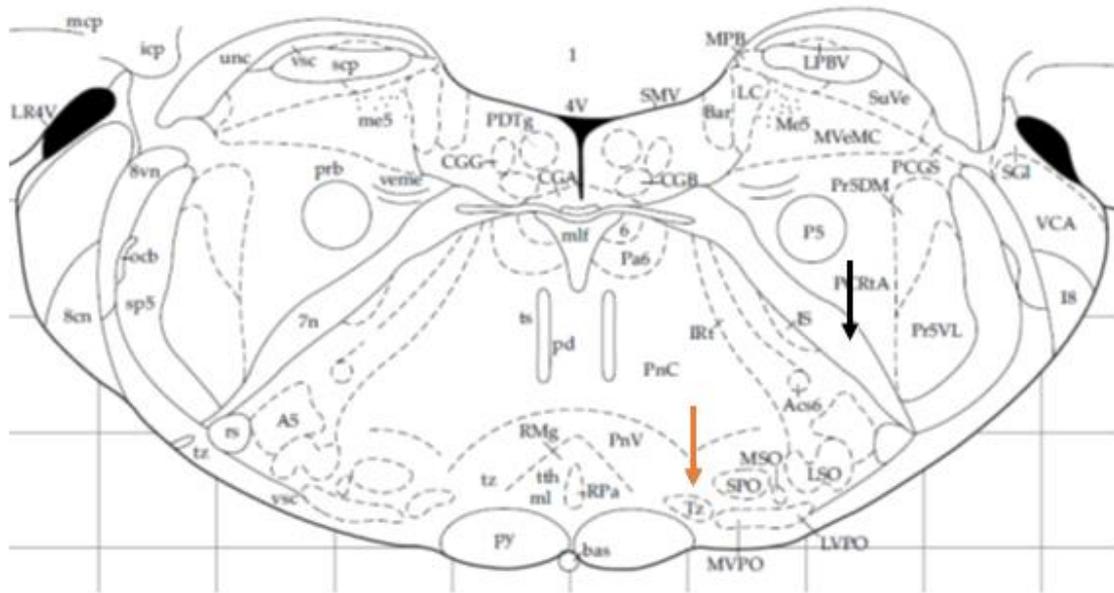
Devido à limitação instrumental de nosso sistema, onde as células não eram acessadas visualmente, e não tendo sido utilizado nenhum marcador neuronal que garantisse a precisa localização do NTB, características morfológicas do tecido bem como características fisiológicas das respostas elétricas advindas do tecido, eram igualmente importantes referências que permitiam a classificação das células, em questão, como pertencentes aos Núcleos do Corpo Trapezoide e, portanto, de nosso interesse.

A co-localização das células do NTB com o VII Par de nervos cranianos era a primeira referência por nós utilizada (**Figura 7**). Para tanto, cortes de 700  $\mu\text{m}$  eram realizados no tronco cerebral até que vestígios visuais do VII par craniano fossem

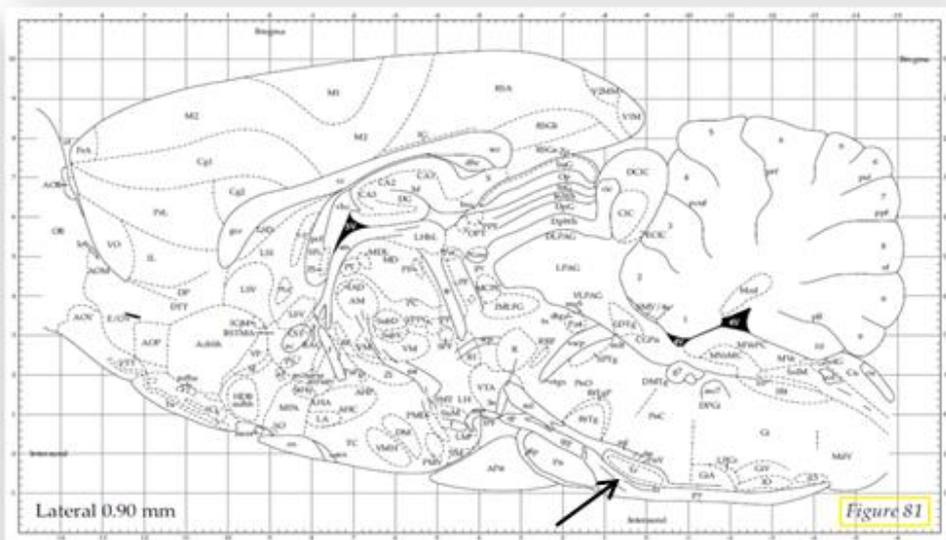
obtidos. A partir desse momento, cortes com espessuras de 300  $\mu\text{m}$  passavam a ser realizados para que fossem preservadas e extraídas fatias que contivessem o corpo trapezoide (BARNES-DAVIES AND FORSYTHE, 1995). Essa manobra nos permitia a obtenção de três (em animais p7) ou quatro (em animais p9) fatias por animal.

Num segundo momento, já de forma mais específica, uma segunda referência anatômica nos permitia, com maior precisão, identificar as regiões da fatia que poderiam conter células do NTB. Essa referência era o feixe de axônios oriundos dos Núcleos Cocleares que cruza a linha média e projeta-se para o NMTB contralateral (**Figura 9**). Esse feixe, sob iluminação infravermelho inferior, se apresentava bem visível e ajudava a demarcar a região anterior bilateral da fatia que possivelmente conteria os núcleos do Corpo Trapezoide de nosso interesse (**Figura 10**).

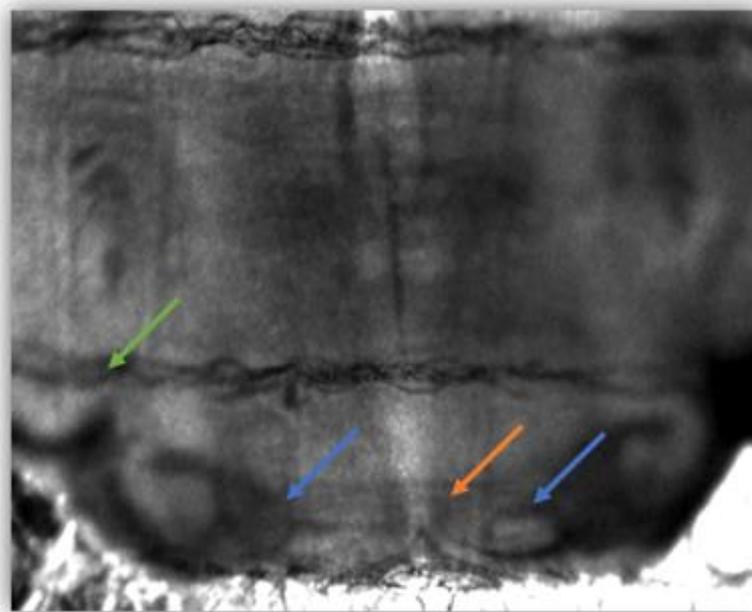
Uma observação importante diz respeito à necessidade de um perfeito processo de fatiamento, que mantivesse intactas as bordas ventrais, já que o NTB em camundongos, como mencionado acima, ocupa uma região anterior e medial no tronco cerebral (**Figuras 7 e 8**).



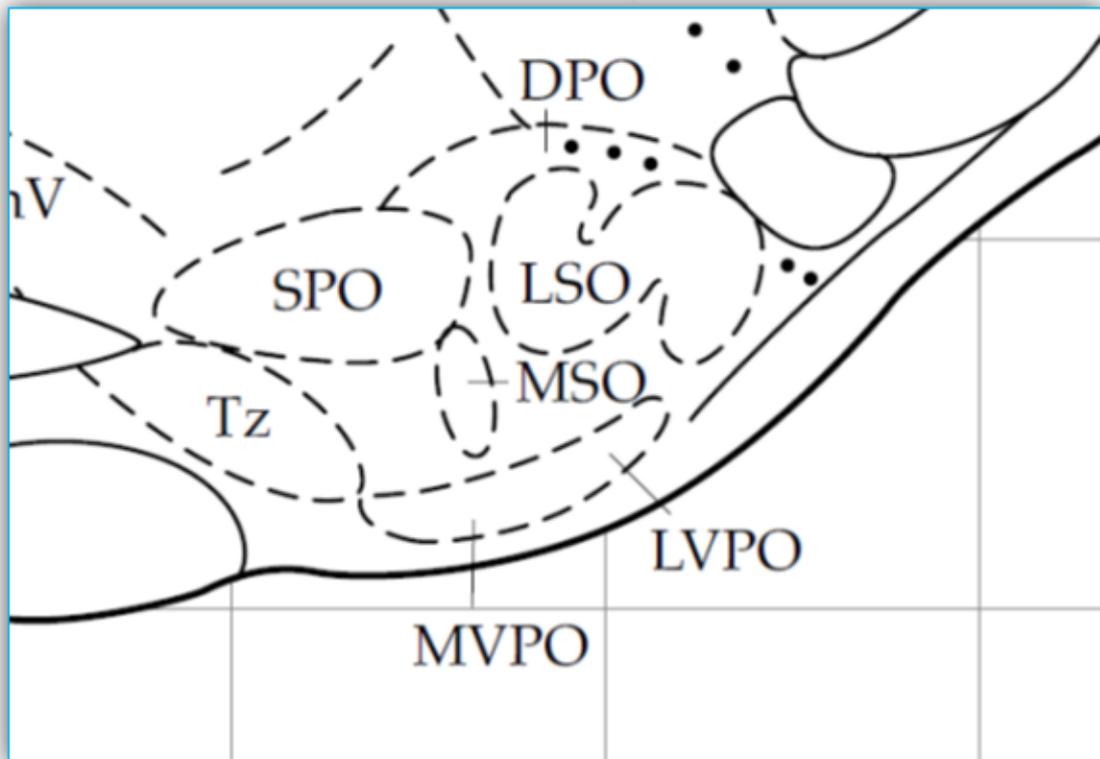
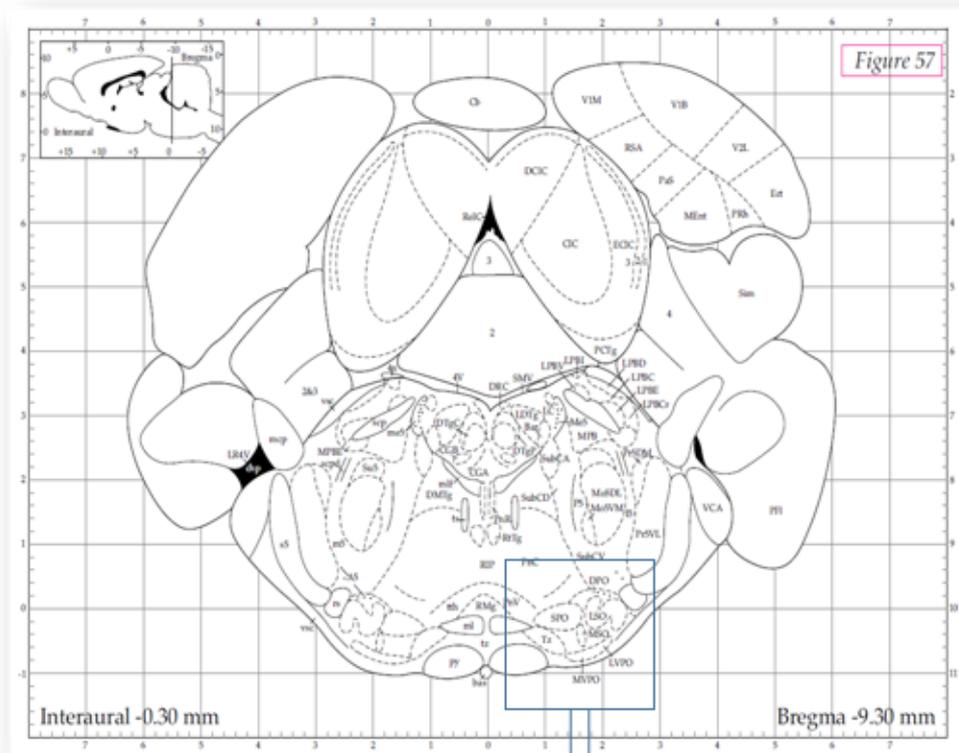
**Figura 7.** A Figura é um corte coronal do tronco cerebral de ratos e apresenta a região de interesse contendo os Núcleos do Corpo Trapezoide em co-localização com o VII par de nervos cranianos. Referência usada para a correta obtenção de fatias. Seta preta demonstrando a presença do VII Par de Nervos Cranianos. Seta laranja demonstrando a região contendo NTB.



**Figura 8.** Corte sagital do tronco cerebral de ratos. Observar a região de interesse contendo os Núcleos do Corpo Trapezoide e o seu formato ovalado de aproximadamente 1mm em camundongos neonatos p7-p9.



**Figura 9.** Fatia obtida de tronco cerebral de camundongos neonatos (8 dias) . Seta superior esquerda indicando fios de fixação da fatia ao fundo da câmara de registro. Seta inferior central indicando as fibras oriundas dos Núcleos Cocleares que cruzam a linha média e dão origem aos Núcleos do Complexo Olivar Superior e Corpo Trapezoide. Setas inferiores laterais indicando os Núcleos do complexo Olivar Superior e Núcleos do Corpo Trapezoide.



**Figura 10.** A Figura é um corte sagital do tronco cerebral de ratos e especifica a região de interesse contendo os Núcleos do Corpo Trapezoide, bem como os núcleos do Complexo Olivar Superior.

#### 4.4.2 Responsividade ao agonista DHPG

De modo igualmente importante aos critérios supracitados, para que fossem testadas as hipóteses, havia a necessidade de que as células fossem responsivas ao agonista em questão, DHPG. Sendo este um agonista seletivo para mGluR-1 e mGluR-5, e, sendo estes, receptores de localização pós-sináptica, como demonstrado por Kushmerick et al (2004) em neurônios do MNTB, os efeitos observados em detrimento da administração do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico nos garantiam que nossos achados advinham de terminais pós-sinápticos de neurônios do NTB.

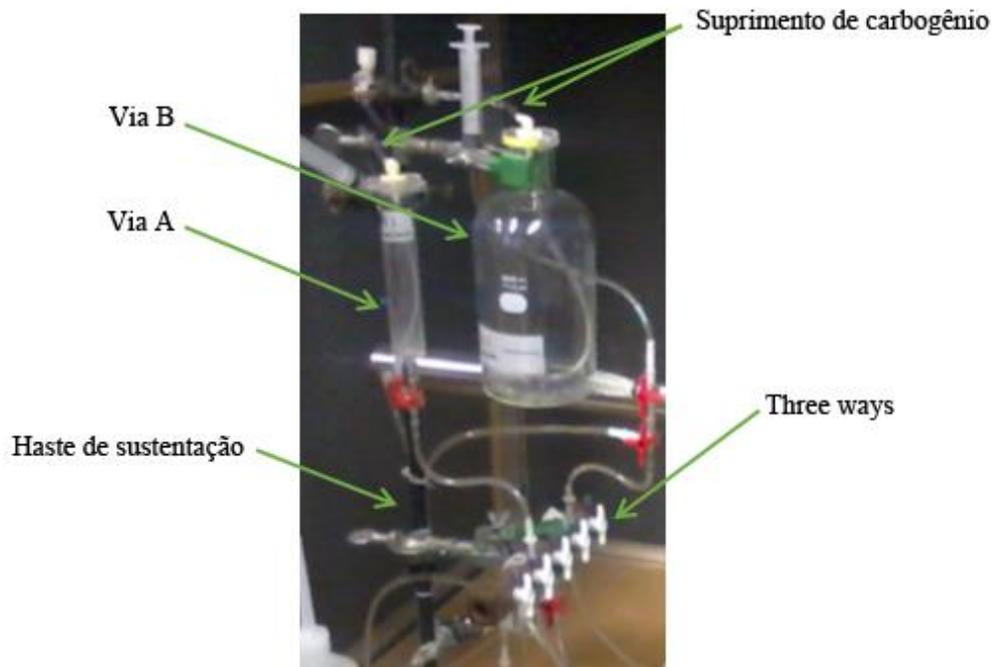
#### 4.5 Comparação com achados da literatura

Finalmente, o exato processo que nos permitia a identificação e a classificação da região de interesse eram as características das respostas desses neurônios, em termos de duração e amplitude, quando expostos aos protocolos de injeção de corrente. Dessa forma, nossos resultados eram sistematicamente comparados com dados bem definidos da literatura (LÖHRKE et al.,1998; BANKS AND SMITH, 1992), para que fossem minimizadas as chances de que a pesquisa estivesse sendo realizada em regiões que não as de interesse.

#### 4.6 Sistema de Perfusão

O sistema de perfusão era composto por um recipiente suspenso (**Via A**), com capacidade para 250ml, fixado a uma torre capaz de prover, via gravidade, um fluxo contínuo de aCSF na razão de 1.1ml/min. Um segundo recipiente (**Via B**), também fixado a torre de perfusão, com capacidade para 20ml, era preparado e, assim como a via A, em um primeiro momento, também continha apenas solução aCSF de

registro e também provinha um fluxo na razão de 1.1ml/min (**Figura 11**). Momentos antes da transferência da fatia incubada para a câmara de registro, ambas as linhas eram ativadas, afim de que fosse retirado todo o ar do sistema e as vias estivessem prontas quando solicitadas durante o protocolo. Com ambas as vias preenchidas por solução aCSF e notadas a ausência de ar no sistema, a Via B era então fechada e toda a perfusão controle ficava por conta da Via A. A fatia era transferida para a câmara de registro e um tempo, não inferior a 10 minutos, era aguardado para o início dos procedimentos eletrofisiológicos.



**Figura 11.** Figura demonstrando o sistema de perfusão usado em todos os experimentos. Observar os recipientes e suas respectivas vias, controladas por válvulas manuais (three ways). Chama-se atenção para o fato de que todo o sistema de perfusão fora montado fora da base antivibratória da mesa, afim de que fossem inibidas, na câmara de registro, todas as vibrações dos movimentos mecânicos advindos do manuseio da perfusão.

#### 4.7 Estratégia experimental

A análise estatística em todos os experimentos não foi fundamentada em um estudo de população e sim em grupos de registros onde todas as fases do experimento foram executadas em uma mesma célula. As sequências utilizadas foram: testes com DHPG (aCSF / ACSF+DHPG / lavagem), testes com as antagonistas MPEP e LY367385 (aCSF / aCSF + antagonistas / aCSF + antagonistas + DHPG / lavagem). Em cada fase dos testes foi medido o potencial de membrana bem como o limiar de excitabilidade e a relação entre a intensidade de corrente injetada versus o número de potenciais de ação gerado.

A obtenção de todos os dados experimentais foi realizada de forma a permitir que a análise fosse padronizada e, dessa forma, igualmente realizada em todos os registros em cada um dos grupos experimentais.

Sendo assim, as fases foram analisadas em trechos estáveis específicos, situados próximos às mudanças de válvula, contendo uma sequência de 10 pontos, distantes 2 segundos um do outro, extraídos de registros como o ilustrado na **Figura 14**.

O levantamento da resposta passiva dos neurônios foi feito através da aplicação de pulsos hiperpolarizantes de 50 pA com duração de 200 ms. Já as respostas evocadas eram obtidas pela realização de protocolos de injeção de corrente em degraus subsequentes de 50 pA com duração de 400 ms. Todos os experimentos tinham como padrão uma linha de base estável nunca inferior a trezentos segundos.

É válido ressaltar que toda essa organização permitiu que os registros e suas consequentes análises seguissem o mesmo padrão em todos os experimentos.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Montagem da bancada experimental**

Antes de iniciarmos os experimentos desenhados para testar as hipóteses levantadas nos objetivos específicos, um primeiro momento foi necessário para que fossem padronizados os parâmetros a serem usados durante todo o experimento e aperfeiçoadas as técnicas de fatiamento e obtenção de boas células.

Assim, foi especificada uma ótima organização, necessária a fim de permitir a otimização do sistema, observando menores gastos de solução, redução de ruídos mecânicos e elétricos, o que permitiria registros estáveis por longos períodos de tempo, necessários para a completa execução dos protocolos de testes. Também foi mensurado o sistema de perfusão para que durante todo o estudo e em cada experimento, a perfusão suprisse a câmara de registro e, conseqüentemente, as fatias contendo as células em questão com fluxo constante de 1.1 ml/min.

Dessa forma, o sistema foi testado sob a execução de experimentos envolvendo KCl 6mM, organizados com propósito de testar o funcionamento do sistema e, também, permitir o aperfeiçoamento de toda a técnica de fatiamento e registro eletrofisiológico. Foram padronizados os protocolos e definidos os métodos de análises. A intenção foi organizar um modelo de estudo que obrigatoriamente não variasse durante todo o trabalho. Isso permitiria uma melhor comparação e análise dos resultados obtidos em todas as células.

#### **5.1.1 Experimentos com KCl**

Antes de testarmos o efeito de drogas para os receptores mGluR, nós propusemos experimentos usando soluções mais simples e com efeitos já bem definidos na literatura. Dessa forma, foram realizados experimentos em que o

tratamento usado foi o KCl, sob concentração de 6 mM, adicionado ao banho através do sistema de perfusão. É válido ressaltar que toda essa parte inicial foi realizada nas mesmas condições em que seriam realizados os testes com o agonista de receptores mGluR, DHPG. Partindo do conhecimento de que nossa solução externa (aCSF) continha 2,5 mM de KCl e que um total de 6 mM foi acrescentado ao banho, para uma membrana permeável a vários íons (inclusive K<sup>+</sup>), o seu potencial de repouso ( $V_r$ ) pode ser calculado por:

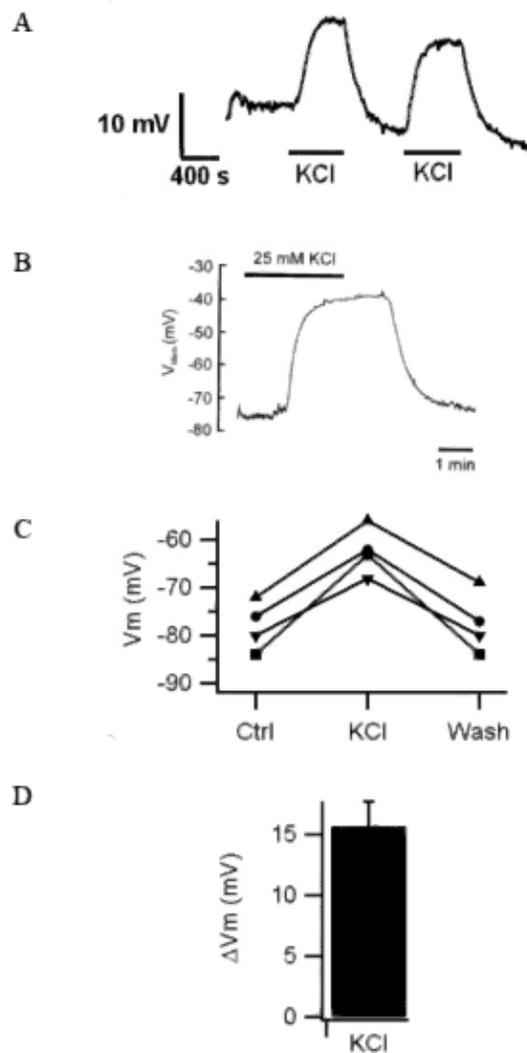
$$V_r = \frac{E_K G_K + E_o G_o}{G_K + G_o}$$

Onde  $E_K$  é o potencial de equilíbrio de K,  $G_K$  é a condutância para K,  $E_o$  é o potencial de reversão dos demais canais com exceção ao K e  $G_o$  é a condutância dos demais canais com exceção do K. Nesse caso, o delta  $V_r$  esperado por nós seria igual ao  $\Delta E_K \times G_K / (G_K + G_o)$ . Em outras palavras, o delta  $V_r$  pode ser calculado pelo  $\Delta E_K$  multiplicado pela fração da condutância da membrana para o K. No presente estudo, o valor médio de 15 mV foi encontrado para o delta  $V_r$  e um valor de 32 mV havia sido previsto pela equação de Nernst. Isso nos permitiu concluir que apenas pouco menos que metade da condutância da membrana em repouso é oriunda da condutância do K. Sendo ao restante dos demais íons, a responsabilidade pelo valor da alteração encontrado. Esse análise pressupõe que a despolarização induzida pelo K<sup>+</sup> é puramente passiva, isto é, não envolve abertura de canais, o que denominaria uma resposta ativa.

A **Figura 12** exemplifica o registro intracelular do potencial de membrana da célula pela técnica de current clamp, e o efeito do aumento da concentração de K<sup>+</sup>

no líquido extracelular de 2.5 mM para 8.5 mM sobre o potencial de membrana ( $V_m$ ). Uma longa (> 500 s) e estável linha de base foi registrada antes do início da aplicação do KCl. No momento da aplicação, observou-se uma rápida e reversível despolarização, embora inferior àquela esperada pela aplicação da equação de Nernst. Esses dados nos inclinam a pensar que a membrana pode não estar perfeitamente seletiva para íons  $K^+$ . Além disso, uma outra explicação é que a despolarização promovida pelo  $K^+$  pode ter aberto canais para  $K^+$  de baixo limiar (WANG et al., 1998) que, dessa forma, teriam tendido a repolarizar a membrana.

Outro fator relevante observado nesta figura é que uma dupla aplicação de KCl resulta em dupla resposta por parte do potencial de membrana da célula alvo. Isso garante que o sistema está apto a realizar aplicações e lavagens, de forma contínua, sem contudo interferir na estabilidade do registro, o que será importante para os experimentos com agonistas e antagonistas mGluR descrito a seguir.

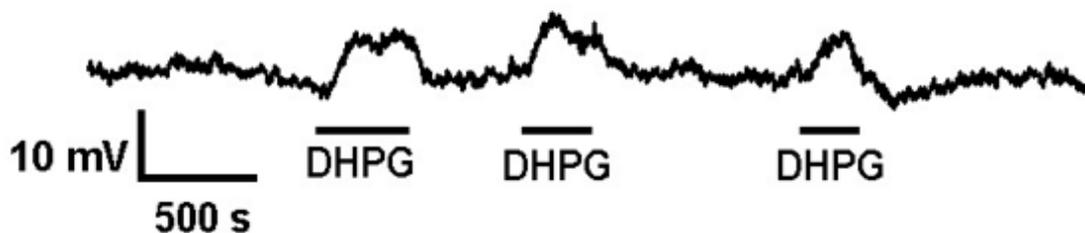


**Figura 12.** Experimentos de controle e padronização da técnica com KCl. **A.** Aplicações em sequência de KCl (6 mM) elicitando respostas subsequentes e semelhantes, ocasionando uma despolarização sustentada porém reversível do potencial de membrana em 14 mV (de -72 mV para -58 mV) (aplicação de KCl durante a *barra sólida*). **B.** Resposta obtida por Lohrke et al. (1998) utilizando um protocolo parecido, porém, solução de KCl sob a concentração de 25 mM ocasionando o deslocamento do potencial de membrana em 35 mV (de -75mV para -40mV). **C.** Efeitos do KCl sobre o potencial de membrana da célula alvo, para quatro experimentos independentes, utilizando o protocolo ilustrado em "A". **D.** Despolarização média observada na administração de KCl. Barras de erro são E.P.M.

A **Figura 12** ainda mostra os resultados de quatro experimentos independentes. As médias desses valores, foram obtidas pela média do potencial de membrana durante a análise de períodos de vinte segundos em cada uma das situações de controle, KCl e lavagem.

## 5.2 Efeitos do agonista mGluR-I, DHPG, no potencial de membrana em células do NTB

Um próximo passo, foi colocar em prática os experimentos com o agonista de receptores glutamatérgico metabotrópicos, o DHPG. Para tanto, utilizamos os mesmos procedimentos e cuidados descritos acima, durante os testes do efeito do KCl. Dessa forma, observamos na **Figura 13** um trecho selecionado em um experimento completo, correspondente à aproximadamente 80 minutos de gravação contínua em um neurônio do Corpo Trapezoide. Fica evidenciado a boa estabilidade da linha de base durante todo o trecho, necessária para a correta interpretação das variações provocadas pela DHPG.



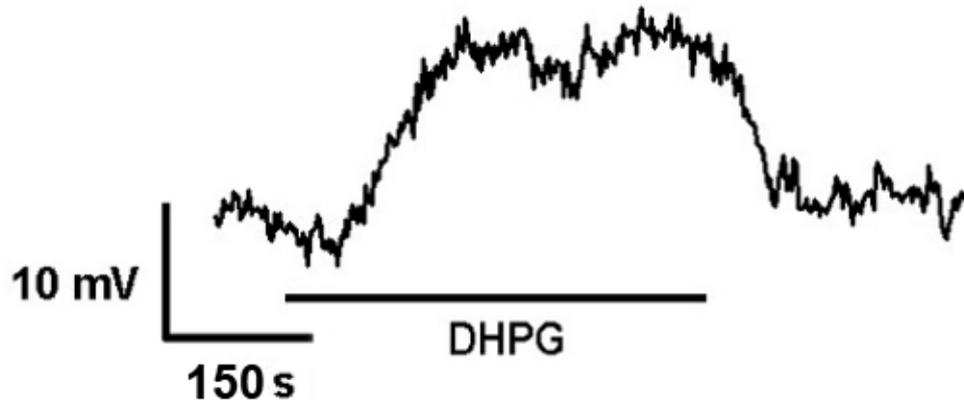
**Figura 13.** Experimento completo. Três aplicações de DHPG resultando em três seguidas respostas advindas da membrana da célula alvo. As barras sólidas indicam o local e o tempo de cada aplicação do agonista DHPG.

Após a obtenção de uma estável linha de base, nunca inferior a 5 minutos, a mesma linha de perfusão que conteria o DHPG era acionada, enquanto a linha contendo aCSF controle, interrompida. Aproximados 4 ou 5 minutos eram aguardados, para que 5 ml de solução da nova linha banhassem a célula, antes da adição do DHPG nesta mesma linha. Esse procedimento garantia que os efeitos observados, mediante aplicação do agonista, não advinham simplesmente da alternância entre as linhas da perfusão.

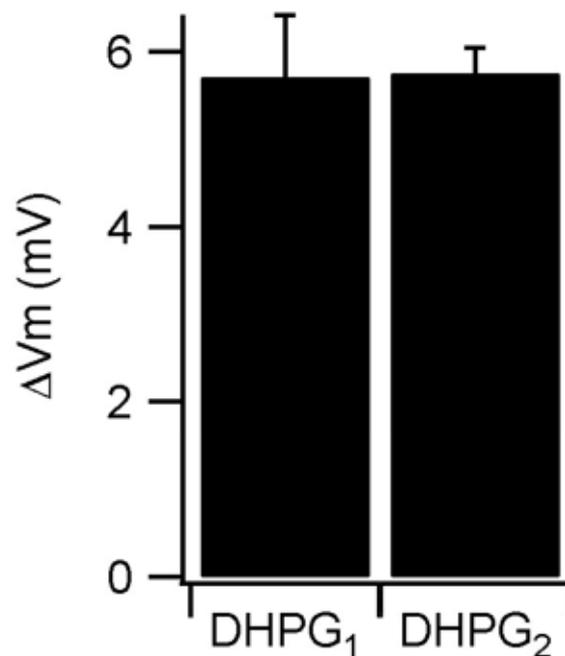
Devem ser observadas com atenção, ainda na **Figura 13**, as três linhas que demarcam as regiões no trecho selecionado, onde foram aplicados o agonista DHPG. O fato de três aplicações do agonista terem elicitado três respostas de igual amplitude, duração e reversibilidade, nos mostra que este protocolo não gera dessensibilização dos receptores mGluRs. Este é um fato importante para os estudos farmacológicos que serão descritos a seguir, haja vista que aplicações em sequência do agonista seguida de aplicações dos antagonistas foram necessárias.

A **figura 14** representa o trecho da primeira aplicação de DHPG e permitiu a identificação de conjuntos de pontos selecionados em regiões estáveis e padronizadas (em todos os registros) durante as situações de controle, presença do DHPG e lavagem.

Esses pontos permitiram a comparação entre as regiões e nos forneceram a média do efeito provocado pelo DHPG no potencial de membrana em um total de treze células (**Figura 15**). Foi possível, também, observar o efeito da retirada do agonista do banho, e o rápido retorno do potencial de membrana para valores próximos aos observados anteriormente à aplicação do agonista (**Figuras 14 e 17C**). Demonstrando o quão reversível é a interação entre o agonista e o sítio de ligação dos receptores de membrana das células do Corpo Trapezoide.



**Figura 14.** Efeito do DHPG sobre o potencial de membrana da célula alvo. A barra sólida indica o tempo de aplicação do agonista para Receptores Glutamatérgico Metabotrópico do Grupo I, DHPG (0.1 mM).



**Figura 15.** Efeito médio promovido pela dupla aplicação de DHPG sobre o potencial de membrana da célula alvo. Os efeitos foram obtidos e comparados entre si, separados por célula, em cada registro (n=13 experimentos independentes).

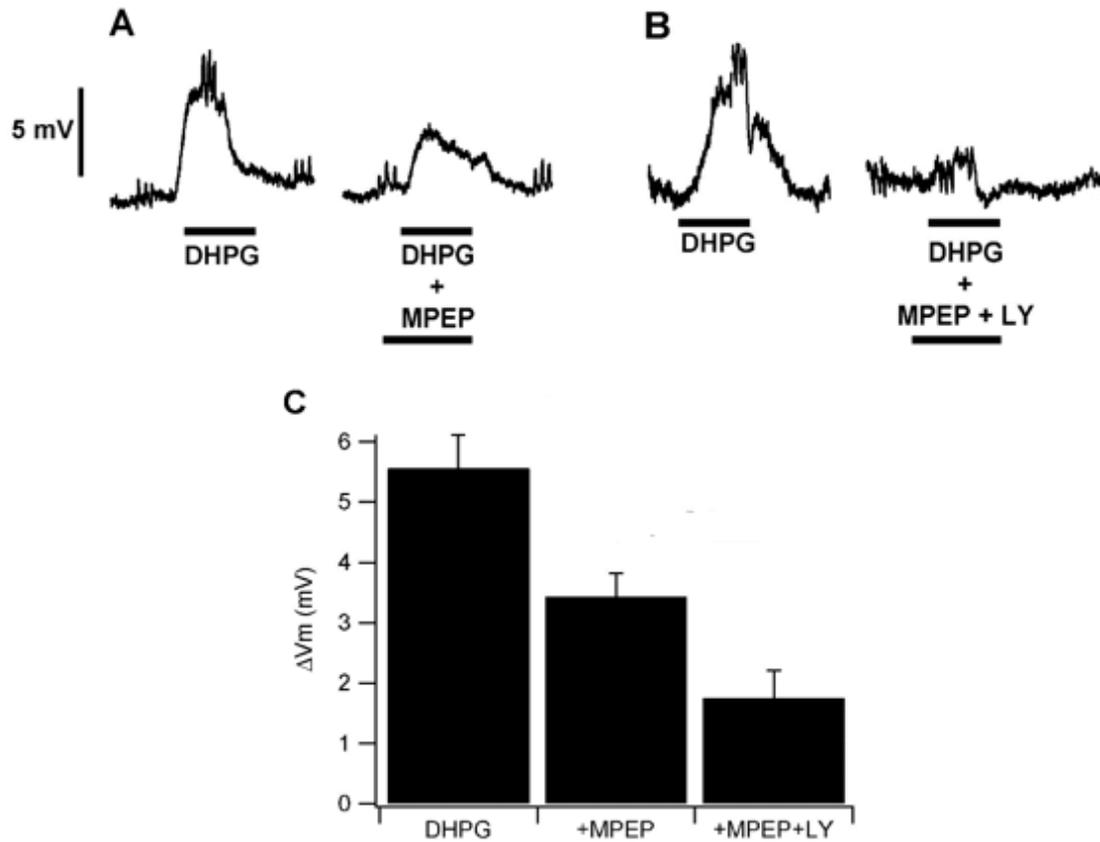
### **5.3 Efeitos dos antagonistas seletivos de receptores mGluR-1 e mGluR-5 sobre o efeito de DHPG, no potencial de membrana, em células do NTB**

Como já mencionado, o DHPG é agonista seletivo de receptores mGluR do Grupo I, que por sua vez é formado por duas isoformas, os receptores mGluR-1 e mGluR-5, e o DHPG não distingue um do outro. Afim de comprovarem-se os efeitos do DHPG sobre o potencial de membrana das células do Corpo Trapezoide, e para determinar qual isoforma de mGluR é o responsável pelos efeitos observados, nós propusemos o uso de bloqueadores seletivos para os mGluRs do Grupo I, LY367385 e MPEP, respectivamente agindo sobre mGluR-1 e mGluR-5.

A **Figura 16**, parte superior, exhibe trechos brutos de registros contendo aplicações de DHPG seguida de aplicações de DHPG na presença de um ou ambos antagonistas, sempre na mesma célula onde o efeito de DHPG foi primeiro medido. Sendo assim, na **Figura 16A**, é possível observar o efeito de uma aplicação de DHPG sobre o potencial de membrana e logo em seguida, realizado na mesma célula, o efeito de DHPG na presença do antagonista mGluR-5, MPEP. Vale-se ressaltar que os registros se encontram na mesma escala, dessa forma, facilitando a percepção de um menor efeito do DHPG sobre o potencial de membrana da célula alvo, quando na presença do antagonista MPEP. Isso porque, presumivelmente, o DHPG age agora, somente, sobre o mGluR-1 e não mais sobre mGluR-5.

Ainda na **Figura 16**, agora na porção direita, **16B**, observamos o efeito da aplicação do agonista DHPG sobre o potencial de membrana, seguido pela aplicação do antagonista específico para mGluR-1, LY367385, aplicado junto com MPEP. Como descrito para a porção esquerda, a escala em que se encontram os registros é a mesma, logo, fica evidente que, quando administrado de forma

concomitante aos antagonistas MPEP e LY367385, o efeito do agonista DHPG fica severamente reduzido.



Grupos comparados	Tipo de teste t	P
DHPG x DHPG+MPEP	Pareado	.043
DHPG x DHPG+MPEP+Ly367385	Pareado	.024
DHPG+MPEP x DHPG+MPEP+Ly367385	Não pareado	.029

**Figura 16.** Respostas de três células representativas a aplicações isoladas de DHPG seguidas de aplicações de DHPG na presença dos antagonistas MPEP e LY367385. **A.** Resposta de uma célula representativa a aplicação de DHPG isolado ou, na mesma célula, após pré-tratamento por 5 min com MPEP, indicado pela barra sólida inferior. **B.** Resposta, de uma outra célula representativa, a aplicação isolada de DHPG, ou na mesma célula, após tratamento por 5 min com MPEP e LY367385, indicado pela barra sólida inferior. **C.** Efeito médio produzido pelo DHPG quando aplicado isoladamente no banho ou quando aplicado de forma concomitante ao antagonista para mGluR-1, LY367385 e ao antagonista para mGluR-5, MPEP. A análise estatística foi feita com o teste t de Student pareado afim de se comparar o efeito de DHPG aplicado de forma conjunta aos antagonistas com o efeito de DHPG aplicado isoladamente, pois, esses foram sempre feitos na mesma célula, e não pareado afim de se comparar o efeito de MPEP com MPEP+LY, aja visto que essas foram feitas em células distintas.

A tabela inferior, da **Figura 16**, ainda resume, em termos estatísticos, os dados dos registros exemplificados na parte superior da figura. Observando a **Figura 16C**, verificamos um bloqueio médio de 38% quando somente o MPEP foi administrado e um bloqueio médio de 68% quando ambos os antagonistas foram administrados.

#### **5.4 Efeitos do DHPG nos potenciais de ação de células do NTB**

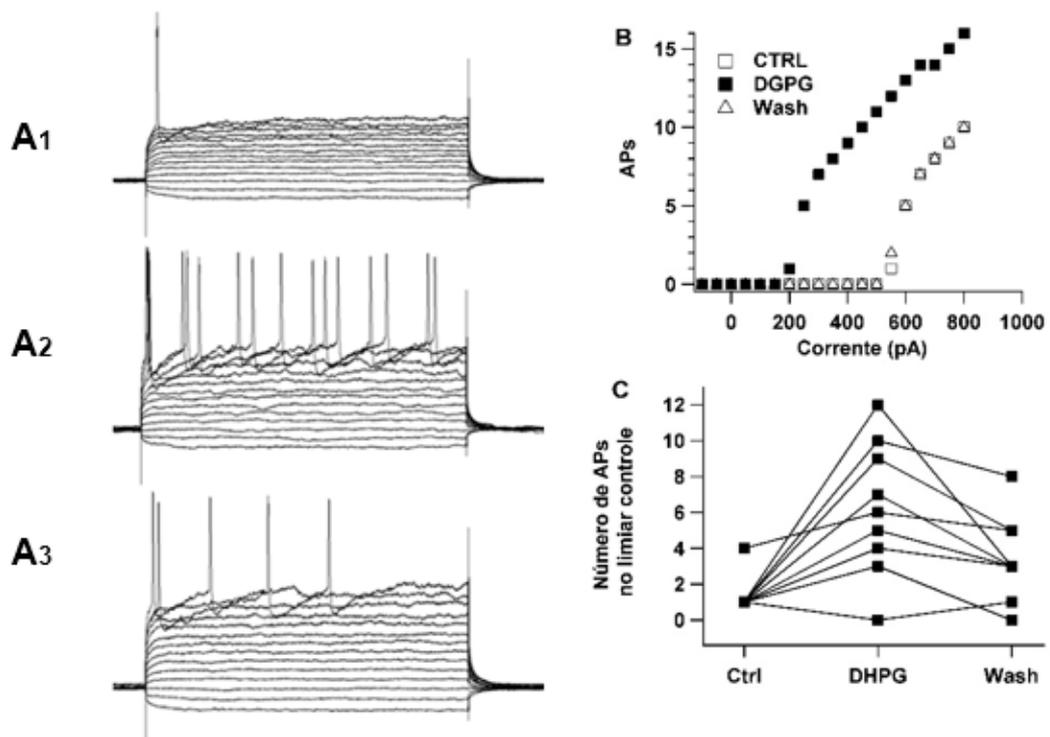
Mediante a observação dos efeitos do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG sobre o potencial de membrana das células do Corpo Trapezoide, nosso questionamento subsequente foi sobre os possíveis efeitos que o mesmo agonista teria sobre os potenciais de ação, influenciando também, dessa forma, a excitabilidade neuronal.

Para estas averiguações, protocolos de injeção intracelular de corrente positiva foram utilizados. A intensidade da corrente foi aumentada em degraus de 50 pA para que o limiar e o número de potenciais de ação fossem registrados. O protocolo era repetido três vezes nas situações de controle, na presença de DHPG e após a lavagem. Dessa forma, os efeitos do agonista, sobre os disparos, poderiam ser mensurados.

Antes de uma análise dos efeitos do agonista sobre esses potenciais elicitados, uma análise comparativa com achados da literatura era sempre realizada e essas avaliações nos permitiram melhor certificar a região anatômica de interesse.

A **Figura 17A** exhibe potenciais de ação gerados, utilizando o protocolo anteriormente descrito, em um neurônio do NTB, nas situações de controle (A1), durante tratamento com DHPG (A2) e após a Lavagem (A3). A partir desse dado, um gráfico do número de PAs gerados versus a intensidade de corrente injetada, foi

criado (**Figura 17B**), nos permitindo observar que o DHPG reduziu a reobase de 550 pA para 200 pA, e aumentou o número de PAs gerado em cada corrente testada. Ambos os efeitos reverteram-se após a lavagem do DHPG. Sobre isso, foi notado que os valores encontrados na condição de controle não se assemelhavam aos achados nas situações de presença do agonista DHPG e tão pouco na situação de lavagem. Sendo assim, os dados foram analisados e plotados na **Figura 17C**. O que se observou foi que as células variam seu limiar de excitabilidade, porém, agrupando os dados por uma dada corrente, capaz de gerar o primeiro potencial de ação em cada um dos treze registros, poderia se verificar uma tendência em todas as células a aumentarem os disparos na presença do DHPG e, que existia uma boa reversibilidade dos efeitos do agonista nos disparos do potencial de ação, quando no momento da lavagem.



Número de PA quando estimulado na reobase de controle

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Controle	1	1	1	1	1	1	1	1	4
DHPG	7	5	4	10	0	12	9	3	6
Lavagem	3	3	3	8	1	3	5	0	5

**Figura 17.** Efeito da ativação dos mGluR-I na geração de potenciais de ação nas células do Corpo Trapezoide. **A.** Registro representativo demonstrado potenciais de ação gerados a partir da reobase de controle. **A1** Controle, **A2** Presença de DHPG e **A3** após a Lavagem. Importante salientar que em **A** somente são exibidos os potenciais de ação obtidos até o valor de reobase de controle. **B.** Número de potenciais de ação gerados em resposta a cada estímulo para a célula ilustrada em **A**. **C.** Efeito do DHPG no número de PAs gerado quando estimulado na reobase de Controle. (N= 9 experimentos independentes realizados em células obtidas de fatias oriundas de 9 animais diferentes). Comparações realizadas sempre na mesma célula (\*p = 0,05). (**Inferior**) Tabela exibindo os números de potenciais de ação obtidos em cada registro e organizados na figura **C**.

### 5.5 Uma despolarização por 5 mV mimetiza todos os efeitos de DHPG?

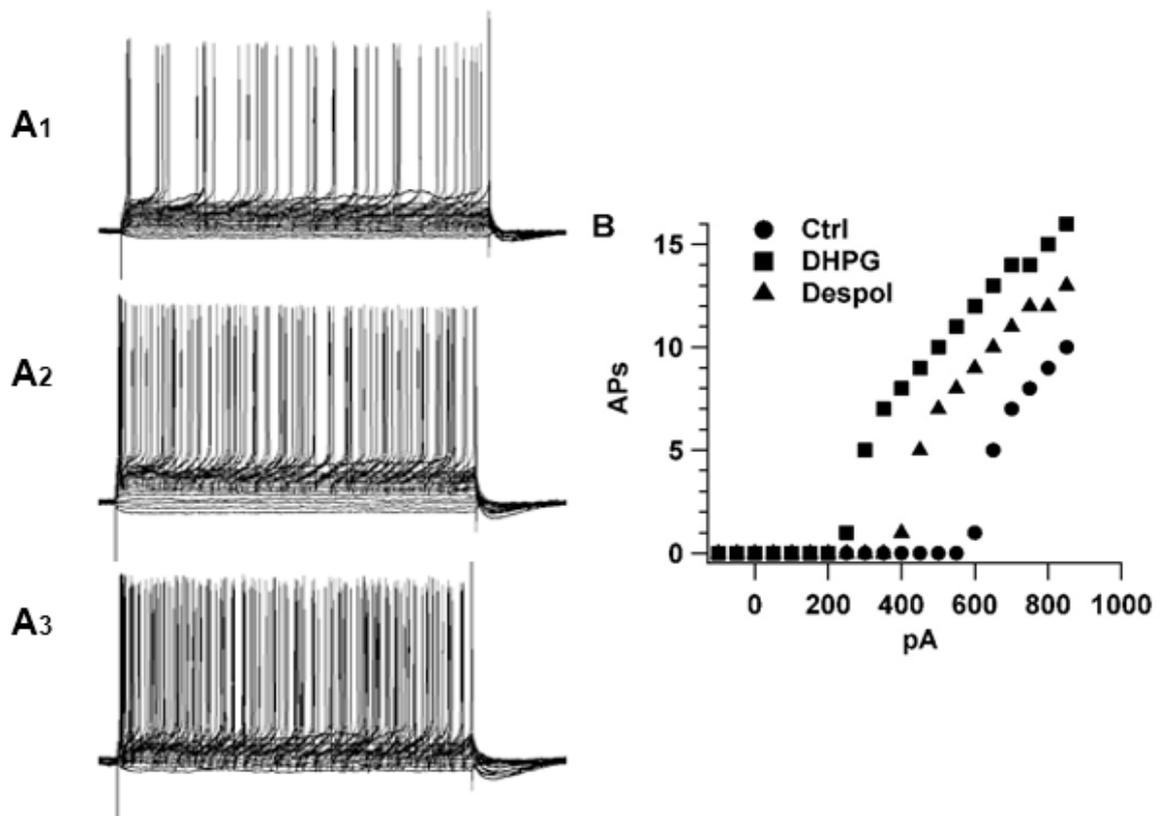
Em sequência, verificamos se os efeitos promovidos pelo DHPG, observados nos potenciais de ação, eram advindos tão somente da despolarização da membrana, provocada pelo agonista. Tal observação foi relevante, haja vista, que fica evidente que ao se alterar o potencial de membrana para valores menos negativos, logicamente, mais próximos do limiar de excitabilidade, uma menor corrente será necessária para elicitar potenciais de ação. Dessa forma, propusemos alguns experimentos para elucidar essa questão.

A **Figura 18** exibe um experimento que teve como objetivo a mimetização dos efeitos promovidos pelo DHPG no potencial de membrana, dessa forma, se os efeitos observados nos potenciais de ação eram devidos somente à elevação dos valores do potencial de membrana a patamares próximos aos do limiar de disparo, possivelmente o efeito observado sobre os potenciais de ação seria reproduzido.

Dessa forma, uma série de três experimentos foi organizada com o propósito de se verificar, na mesma célula, o efeito do DHPG seguido por uma injeção manual de corrente, capaz de alterar por tempo indeterminado, o potencial de membrana nas mesmas proporções daquelas alterações observadas pela adição do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG.

Sendo assim a **Figura 18A** expõe dados brutos obtidos em uma célula do Corpo Trapezoide, onde são exibidos potenciais de ação elicitados pelo protocolo de injeção de corrente nas condições de Controle (A1), Despolarização (A2) e DHPG (A3). A **Figura 18B** expõe, de forma numérica, a célula representativa usada na imagem superior esquerda da mesma figura.

Dessa forma, o que se observa é que a adição do DHPG promoveu uma maior diminuição no limiar de excitabilidade e um maior aumento no número de potenciais de ação obtidos em um dado valor de injeção de corrente, que o mesmo efeito, sobre o potencial de membrana, promovido pela despolarização através da injeção manual de corrente, quando comparados com a situação de controle. A tabela inferior exhibe os números de potenciais de ação, em cada um dos três registros encontrados em um dado valor de corrente injetada, nas três situações anteriormente citadas.



Potenciais em um dado valor de corrente	1	2	3
Controle	10	11	0
Despolarização	13	13	1
DHPG	16	15	2

**Figura 18.** Uma despolarização de 5 mV não reproduz o efeito excitatório de DHPG nas células do Corpo Trapezoide. **A.** Célula representativa demonstrando os efeitos da presença do DHPG (**A3**) em comparação com as situações de controle (**A1**) e Despolarização em 5 mV com manutenção do potencial de membrana por constante injeção de corrente (**A2**). **B.** Registro representativo demonstrando o número de potenciais de ação gerados a partir de uma dada injeção corrente nas situações de Controle, DHPG e Despolarização. (N= 3 experimentos). Comparações entre a aplicação de DHPG e a injeção de corrente realizadas sempre nas mesmas células. (**Inferior**) Tabela exibindo os números de potenciais de ação obtidos quando estimulado com a corrente limiar medida em situação controle, em cada um dos três experimentos.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, usando fatias do tronco cerebral de camundongos neonatos (p7-9), seccionadas ao nível do córtex auditivo, contendo células do Corpo trapezoide, foi possível observar o claro efeito excitatório, promovido pelo agonista glutamatérgico metabotrópico, DHPG, sobre as células alvo desse núcleo.

### 6.1 Efeitos do DHPG

Os efeitos sobre o potencial de membrana foram observados em todos os experimentos. Assim como o observado por Chanda and Xu-Friedman (2011), que verificaram os efeitos da mGluRs nas Células espessas (BC) do Núcleo Coclear Anteroventral (AVCN) de camundongos p42 e observaram que a ativação de mGluRs com dihidroxifenilglicina (DHPG) causava a despolarização da membrana, nossos achados foram consistentes ao observar que em um total de 13 experimentos, em células do Corpo trapezoide, a administração de DHPG ativou mGluRs provocando a alteração do potencial de membrana para valores menos negativos. A **Figura 14** exibe um trecho específico de um registro bruto onde são visíveis os valores do potencial de membrana no momento da administração do agonista mGluR-I, DHPG. Fica claro o efeito promovido pelo agonista glutamatérgico metabotrópico, DHPG, no potencial de membrana da célula alvo, quando da sua presença na câmara de registro. Esse padrão de comportamento foi o identificado em todos os registros e uma variação de  $5,5\text{mv} \pm 0,55$  observada no potencial de membrana. Esses dados foram expressos na **Figura 15** onde são evidenciadas as análises dos valores de trechos do potencial de membrana, como o exibido na **Figura 14**, em situações de presença do agonista e lavagem.

A princípio, observando os dados, podemos verificar o efeito médio promovido pelo agonista no potencial de membrana das células alvo, evidenciado pela barra à esquerda da **Figura 15**. A **Figura 17C** expõe a análise da lavagem do agonista DHPG do banho e nos permite concluir que este interage com o sítio ativo dos receptores mGluR-1 e mGluR-5 de modo reversível. Voltando a **Figura 15**, a barra da direita evidencia os valores de trechos extraídos de quatro experimentos em que uma segunda aplicação do agonista DHPG foi realizada. Isso foi necessário porque, como intervenções farmacológicas seriam realizadas em momentos subsequentes do nosso estudo e, seus efeitos, que posteriormente seriam comparados com efeitos prévios do DHPG necessariamente do mesmo registro, deveriam ser obtidos na presença do agonista DHPG, duas aplicações semelhantes deveriam ser observadas para que os efeitos fossem realmente comparados.

Toda essa preocupação com efeitos subsequentes advindos de múltiplas administrações do agonista DHPG, era devido a possibilidade da ocorrência de uma dessensibilização dos mGluR-1 e mGluR-5, diante de seguidas exposições destes ao agonista, promovendo, dessa forma, uma segunda aplicação que não refletia o real efeito, até então, observado nos registros com DHPG, alterando nossa interpretação dos dados envolvendo o DHPG na presença dos antagonistas LY367385 e MPEP.

A comparação das barras da **Figura 15**, onde são expostas as médias dos efeitos obtidos em quatro experimentos, de duas aplicações seguidas e na mesma célula, do agonista DHPG, nos permite verificar que não houve diferença entre a primeira e a segunda aplicação do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG. O que nos garante boas análises dos efeitos observados durante os experimentos

farmacológicos, quando múltiplas administrações do DHPG foram realizadas na presença ou não dos antagonistas.

## **6.2 Efeitos do DHPG na presença de LY367385 e MPEP**

Para avaliar se os efeitos observados até o momento nas células do NTB, advinham do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico DHPG, nós propusemos o uso de bloqueadores seletivos para os subtipos de receptores do Grupo I dos mGluRs, mGluR-1 e mGluR-5, LY367385 e MPEP, respectivamente.

Para tanto, como previamente citado, optamos pelo uso do MPEP, um antagonista não competitivo que apresenta alta afinidade pelos mGluR-5 (Kushmerick et al., 2004) e LY367385, um antagonista competitivo, que apresenta afinidade pelos mGluR-1 (MANNAlONI et al. 2001).

A estratégia experimental, como observado na **Figura 16A-B**, consistiu na aplicação dos antagonistas, de modo prévio, em doses necessárias para obtenção de efeitos máximos, a fim de que eles se difundissem por toda a câmara de registro, bloqueando o maior número possível dos mGluRs-I da célula alvo.

Nossos achados observaram claramente uma redução dos efeitos do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico DHPG sobre os mGluRs-I, quando na presença dos antagonistas MPEP e LY367385, sugerindo que, sem dúvida, os efeitos observados até o momento advinham da ação do DHPG sobre os receptores citados da célula alvo do Corpo trapezoide.

Um trecho de um registro bruto, contendo o momento exato da aplicação dos antagonistas e agonista em questão, é exibido na **Figura 16B**. Em um primeiro instante, a linha de perfusão, contendo 20ml de aCSF, era acionada e banhava a câmara de registro por um período de 5 minutos. Esse procedimento nos fornecia a

linha de base esperadamente estável, e demonstrava a não interferência da alternância entre as linhas de perfusão nos efeitos subsequentes. O volume da linha de perfusão era, então, reajustado para níveis prévios e uma quantidade de 20 µl do antagonista MPEP e 20 µl de LY367385 eram adicionados afim de gerarem uma concentração final, individual, de 10µm e 240 µm, respectivamente e simultaneamente. Essas concentrações encontram-se igual ou acima dos valores utilizados em trabalhos apresentados por Kushmerick et al., 2004, Yan Wang et al., 2009, Chanda e Xu-Friedman, para obtenção de um efeito total, já que a nossa intenção era o bloqueio máximo dos mGluR-I presentes na célula alvo do Corpo Trapezoide, para avaliação dos efeitos do agonista DHPG. É válido ressaltar que, como o LY367385 é um antagonista competitivo, essa alta concentração foi utilizada na tentativa de superar a concentração de DHPG no banho (100 µm).

O que pode ser observado, de acordo com o exposto até o momento, é que nossos dados indicam que o DHPG ativa os receptores mGluR-I pós-sinápticos em neurônios do NTB. Haja vista que, sua ação é antagonizada pelos bloqueadores seletivos para mGluR-1 e mGluR-5, LY367385 e MPEP, respectivamente.

Porém deve ser ressaltado que como demonstrado na **Figura 16**, não foi possível observarmos um bloqueio total dos efeitos gerados pelo DHPG. O esperado quando utilizamos de forma prévia e concomitante os antagonistas para mGluR-1 e mGluR-5, LY367385 e MPEP, em concentrações iguais ou acima às citadas pela literatura, é que fossem bloqueados em 100% dos mGluRs-I da célula alvo. Contudo, como ilustrado na **Figura 16C** isso não ocorreu. Uma redução de cerca de 68% da ação do agonista DHPG foi observada quando administrado na presença de ambos os antagonistas.

A explicação, levantada por nós, diz respeito à competitividade pelo sítio de ligação por parte dos agonistas e antagonistas usados. Como mencionado, o antagonista para receptores mGluR-5 MPEP é um antagonista seletivo não competitivo, já o antagonista seletivo para receptores mGluR-1, LY367385, é um antagonista seletivo competitivo (MANNAIONI et al., 2001). Isso nos diz muito a respeito dos resultados obtidos em termos dos percentuais de bloqueio observados pela administração das drogas em conjunto, já que apesar de aplicado previamente, o LY367385 competiria com o Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG, pelos sítios de ligação.

Isso ajudaria a explicar o fato de a ação conjunta dos bloqueadores MPEP e LY367385, para mGluR-5 e mGluR-1, respectivamente, não ter bloqueado completamente os efeitos produzidos pelo agonista DHPG. Em experimentos futuros, pretendemos realizar curvas de dose-resposta envolvendo DHPG x LY367385, afim de avaliarmos essa possível competição.

### **6.3 Efeitos do DHPG na presença do MPEP**

Sabendo que as modificações impostas observadas até o momento no potencial de membrana advinham do agonista DHPG, verificamos a necessidade de uma intervenção farmacológica, que evidenciasse através do bloqueio específico de um dos tipos de receptores do Grupo I dos mGluRs, o grau de envolvimento de cada um dos mGluRs-I (mGluR-1 e mGluR-5) nos efeitos até o momento observados.

Para tanto, em busca da conclusão do relatado acima, foi resolvido determinar a ação do agonista DHPG sobre o mGluR-5, bem como, seu percentual de participação no efeito total. Isso nos permitiria prever a participação dos mGluRs-1. Sendo assim, um pré-tratamento, com duração de cinco minutos, foi

realizado de modo a permitir que o antagonista para receptores mGluR-5, MPEP, se difundisse pela câmara de registro e interagisse previamente com os sítios dos receptores alvo, inibindo a ação do DHPG neste receptor. Sabendo que o MPEP, é um antagonista não competitivo de alta afinidade para receptores mGluR-5 (MANNAIONI et al., 2001), e que a concentração usada, como mencionada previamente, era suficiente para o amplo bloqueio deste receptor, o esperado por nós é que ele bloqueasse de forma ideal, completamente os mGluR-5 presentes na célula alvo, permitindo verificar o real envolvimento e o grau de contribuição nos efeitos gerados por ambos os receptores devido a ação do agonista DHPG.

Observando a **Figura 16A**, onde é exibido um trecho de um registro bruto contendo o momento exato da aplicação do agonista DHPG e do antagonista para mGluR-5, MPEP, fica evidente que a ação do DHPG foi severamente reduzida quando bloqueados os receptores mGluR-5, porém deve ser notado que, como não houve um completo bloqueio do efeito do agonista (n= 4 células), claramente os receptores mGluR-1 também medeiam o efeito promovido pelo DHPG. A **Figura 16C**, exibe em números, o efeito médio promovido pelo DHPG isoladamente e na presença do antagonista MPEP em 4 experimentos e nos permite observar uma redução no efeito do agonista em aproximadamente 38%.

Dessa forma, os achados até o momento, sugerem que mGluR-1 e mGluR-5 participam de formas distintas na regulação da excitabilidade em células do Núcleo do Corpo Trapezoide em camundongos p7-9 e que ocorre uma maior contribuição dos mGluRs-5 quando comparados com os mGluRs-1 na despolarização da membrana da célula alvo, quando subtraída a participação dos mGluRs-5 nos efeitos visualizados. Esses dados produziram conclusões semelhantes àquelas descritas por Chanda and Xu-Friedman, (2011), alterados valores, porém mantidas as

proporções, já que Chanda and Xu-Friedman utilizam técnica de patch clamp, whole-cell, nas células espessas do núcleo Coclear e nós utilizamos a técnica intracelular nos NTB.

#### **6.4 Efeitos do DHPG nos potenciais de ação dos registros com DHPG e Despolarização.**

Quando, então, provados os efeitos do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico sobre o potencial de membrana das células do NTB, questionamentos foram feitos sobre os possíveis efeitos do agonista nos potenciais de ação dessas mesmas células. Novos procedimentos foram idealizados e um protocolo de injeção progressiva de corrente (degraus de 50 pA) foi organizado afim de induzir a variação, em mV, do potencial de membrana, em trechos de 400 ms a cada 2 segundos, aproximando o valor do potencial de membrana desses trechos, do valor do limiar de disparo da célula alvo, elicitando, nesses espaços, potenciais de ação. Esse protocolo era executado três vezes em cada uma das situações de controle, DHPG, lavagem e, ainda, nos experimentos envolvendo a anulação da corrente produzida pelo DHPG, através da hiperpolarização manual da membrana pela injeção de corrente negativa no meio intracelular e também durante o processo de despolarização da membrana através da injeção manual de corrente positiva, no interior da célula.

Durante os experimentos que envolveram somente a aplicação do agonista DHPG (**Figura 17**), oito dos nove experimentos responderam à aplicação do agonista, aumentando o número de potenciais de ação e reverteram de forma completa ou parcialmente o efeito promovido pelo DHPG após a lavagem do agonista. Deve ser salientado que o registro que não aumentou o número de

potenciais de ação, mediante aplicação do agonista DHPG, reagiu dessa forma pois, inicialmente apresentava um potencial de membrana em repouso de -52 mV e, quando administrado o DHPG, apresentou elevação de seu potencial de membrana para valores na casa de -48 mV. Dessa forma, devido à alteração lenta do potencial de membrana da célula, o esperado é que um maior número de canais de membrana se inativasse e, dessa forma, como observado, produzisse um efeito inverso ao observado nas demais células, reduzindo o número de potenciais de ação. É válido ressaltar que no momento da lavagem, a célula reduziu seus valores de potencial de membrana para valores em torno de -53 mV e o que podemos observar foi a restauração do número de potenciais de ação elicitados como os observados na condição de controle.

A **Figura 17C**, (assim como a **Figura 12C**), expõem os dados em forma de tendências de efeito, isso porque, as células se comportaram de forma independentes umas das outras. Entretanto, demonstraram um padrão de comportamento.

O ponto no Eixo X, denominado “Ctrl” (Controle), demonstra o número de potenciais de ação observados nas células, produzidos pela menor corrente durante a situação de controle, capaz de elicitar o primeiro disparo. Os pontos denominados “DHPG” e “Wash” (Lavagem), foram obtidos pela contagem do número de potenciais de ação gerados pela mesma corrente necessária, na situação de controle, para gerar o primeiro potencial de ação.

Sendo assim, pelos dados expostos, ficou claro que o DHPG agiu excitando as células do NTB, aumentando o número de potenciais de ação gerados por uma mesma corrente de forma reversível.

## 6.5 Efeitos do DHPG + Despolarização

Observando os efeitos promovidos, até o momento, pelo Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG, na membrana e nos potenciais de ação das células do NTB, nós nos questionamos sobre o real efeito promovido pelo DHPG na célula alvo.

Os autores Chanda and Xu-Friedman, (2011), sugeriram que o efeito do DHPG sobre os potenciais de ação, seria resultado, tão somente, da despolarização promovida pelo Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG, na membrana da célula alvo. Nossa experimentação, como observado na **Figura 18**, demonstrou que a injeção manual de corrente, capaz de mimetizar os efeitos promovidos pelo DHPG, não reproduziu com exatidão os efeitos de DHPG.

Os potenciais de ação demonstrados na **Figura 18A**, são registros brutos de uma célula representativa e nos permite observar que um número maior de potenciais de ação pode ser contado na porção A3 da figura, onde se encontram os potenciais elicitados na presença de DHPG. A porção A2, demonstra potenciais de ação elicitados durante a injeção manual de corrente positiva intracelular e fica evidente que um número menor de potenciais de ação pode ser contado quando comparado com a porção A3 da mesma figura, porém, um número maior de potenciais de ação foi elicitado, quando se comparado com a porção A1 da mesma figura, onde estão potenciais de ação obtidos na situação de controle.

A **Figura 18B** complementa as observações feitas sobre a **Figura 18A** expondo em valores, um registro representativo que demonstra o número de potenciais de ação, gerados a partir de uma mesma corrente, nas situações de controle, DHPG e Despolarização. Observando cuidadosamente as duas figuras, fica evidente que apesar de aumentar o número de potenciais de ação gerados, quando

comparada com a situação de controle, a injeção manual de corrente não elicitava o mesmo número de potenciais de ação que aqueles observados quando na presença do agonista DHPG.

## 6.6 Padronização

O presente estudo, se mostrou eficaz como modelo de estudo dos efeitos de ativação de receptores mGluR-I sobre a excitabilidade neuronal, haja vista que os resultados obtidos em nossos experimentos puderam ser reproduzidos e demonstraram boas correlações com os achados na literatura.

Os parâmetros observados durante todo o trabalho foram padronizados nos experimentos envolvendo o KCl. Esse sal de baixo custo, fácil preparo e de baixa exigência de cuidado (armazenamento, manuseio e administração) permitiu que todo o sistema fosse testado e que os resultados fossem comparados com dados já existentes na literatura. Dessa forma, os testes envolvendo KCl foram idealizados e realizados de forma a mimetizar as exigências que teríamos durante os experimentos envolvendo o agonista glutamatérgico metabotrópico, DHPG. Foram feitas aplicações únicas e múltiplas de KCl com o intuito de avaliar, a capacidade de resposta estável do sistema às mudanças de perfusão, e a geração de respostas seguidas e, de forma esperada por nós, semelhantes. Isso porque aplicações de DHPG seriam executadas em sequência de forma isolada ou concomitante aos antagonistas para mGluR-I, MPEP e LY367385. Esses registros foram reproduzidos e compuseram um grupo de quatro experimentos, bem reproduzidos (**Figura 12C**), exibindo efeitos semelhantes quando comparados entre si e com a literatura, como demonstrado na **Figura 12**, itens **A** e **B**.

Observando atentamente essa série de experimentos, realizada durante a padronização, ressaltamos que a adição de 6 mM KCl no líquido extracelular deveria ter causado uma alteração em torno de 32 mV no potencial de equilíbrio de K<sup>+</sup>, no entanto, ao avaliarmos os dados da **Figura 12D**, identificamos que a variação do potencial de membrana foi da ordem de 15 mV, ou seja, um valor inferior aquele previsto para uma membrana perfeitamente seletiva aos íons K<sup>+</sup>. De modo comparativo, aplicando-se a Equação de Nernst para os experimentos realizados por Löhrke et al. (1998), obtém-se um valor esperado para variação do potencial de membrana de aproximadamente 60 mV. No entanto, os valores medidos por ele são da ordem de 35 mV, ou seja, de modo semelhante aos nossos experimentos. Um valor inferior ao previsto, foi medido. Este dado sugere que a membrana aparenta ser apenas, parcialmente seletiva para os íons de K<sup>+</sup>. Em acréscimo, é sabido que as células do NTB possuem canais para K<sup>+</sup> que são ativados por pequenas despolarizações, os chamados canais para K<sup>+</sup> de baixo limiar, como demonstrado por Yan et al, (1998). A ativação desses canais, pela despolarização induzida pelo K<sup>+</sup>, tenderia a repolarizar a membrana, reduzindo as alterações que seriam produzidas pelo KCl 6mM.

Contudo, dentro do que foi observado, acreditamos que os estudos iniciais produziram resultados muito semelhantes a aqueles achados na literatura e nos respaldaram para a realização dos experimentos, envolvendo o Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG e os respectivos bloqueadores para mGluR-1 e mGluR-5, LY367385 e MPEP.

## 7. CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos, nos permitiu algumas conclusões importantes conforme descrito a seguir:

Foi possível observar uma clara ação do Agonista Glutamatérgico Metabotrópico, DHPG, agindo sobre receptores mGluR-1 e mGluR-5 em neurônios do NTB. Isso ficou evidente pelos estudos farmacológicos, onde bloqueadores seletivos para os receptores do Grupo I dos mGluRs, inibiram, ainda que não totalmente, os efeitos do agonista.

As alterações promovidas sobre o potencial de membrana das células do NTB, pelo agonista DHPG, foram de caráter excitatório, haja vista que, uma despolarização da membrana foi observada em todos os experimentos. Alterações excitatórias também foram observadas sobre os potenciais de ação das células do NTB, também devido a ação do agonista DHPG, tendo em vista que o número de potenciais aumentou significativamente na presença desse agonista.

Foi possível concluir também que os efeitos promovidos pelo agonista DHPG não são reproduzidos pela mimetização de seus efeitos através da adição manual de corrente positiva intracelular em neurônios do NTB. Isso ficou evidente após análise quantitativa dos potenciais de ação, elicitados nas situações de controle, DHPG e despolarização por injeção manual de corrente, quando o número de potenciais de ação encontrados durante a despolarização, apesar de maior, quando comparado com os achados durante o controle, não se equivalem a quantidade de potenciais de ação observadas durante aplicação do agonista DHPG.

## 8. REFERÊNCIAS

1. ALGER B.E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids". *Prog Neurobiol.* 68:247–286, 2002.
2. ANWYL R.. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews* 29 1999 83–120, 1999.
3. BAKER S.R., GOLDSWORTHY J., HARDEN R.C., SALHOFF C.R., SCHOEPP D.D. Enzymatic resolution and pharmacological activity of the enantiomers of 3,5-dihydroxyphenylglycine, a metabotropic glutamate receptor agonist. *Bioorg Med Chem Lett*, 5:223–228, 1995.
4. BARNES-DAVIES M., FORSYTHE I.D. Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. *J. Physiol. (Lond)* 488:387–406, 1995.
5. BILLUPS B., FORSYTHE I.D. Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J. Neurosci.* 22:5840–5847, 2002.
6. BLAKE E. BUTLER AND STEPHEN G. LOMBER. Functional and structural changes throughout the auditory system following congenital and early-onset deafness: implications for hearing restoration. *Front. Syst. Neurosci.*, 26 November, 2013.
7. BORST J. G. G., VAN HOEVE J. S.. The Calyx of Held Synapse: From Model Synapse to Auditory Relay. *Annu Rev Physiol.* 2011.
8. BREW, H. M. & FORSYTHE, I. D.. Two voltage-dependent K<sup>+</sup> conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *Journal of Neuroscience* 15, 8011-8022, 1995.

9. CAROLE M. HACKNEY AND DAVID N. FURNESS. The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *JCS Advance Online Article*. Posted on 2 May, 2013.
10. CARTMELL J., SCHOEPP D.D.. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 75:889–907, 2000.
11. CONN P.J., PIN J.P.. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205–237, 1997.
12. ELEZGARAI I, PUENTE N, DIEZ J, AZKUE J, HERMIDA D, BILBAO A, DONATE-OLIVER F., VON GERSDORFF H., GRANDES P.. Group I metabotropic glutamate receptors are localized in developing calyces of Held. *Soc Neurosci Abstr* 29:800.6, 2003.
13. ENGLITZ B., TOLNAI S., TYPLT M., JOST J., RÜBSAMEN R.. Reliability of synaptic transmission at the synapses of Held in vivo under acoustic stimulation. *PLoS One* 4: e7014, 2009.
14. FITZJOHN S.M., LODGE D., COLLINGRIDGE G.L.. Long-term depression of synaptic transmission induced by group I Metabotropic Glutamate Receptor activation in the CA1 region of the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol*; 493:49P, 1996.
15. GEORGE PAXINOS AND CHARLES WATSON. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th. ed *Academic Press*, 1998.
16. GERDEMAN G. AND LOVINGER D. M.. CB1 Cannabinoid Receptor Inhibits Synaptic Release of Glutamate in Rat Dorsolateral Striatum. *J. Neurophysiology* 85:468-471, 2001.
17. GERSDORFF V.H. AND BORST J.G.. Short-term plasticity at the calyx of held. *Nature reviews, Neuroscience*, volume 3: 53-64, January, 2002.

18. GODFREY, D.A.; CARTER, J.A.; LOWRY O.H.; MATSCHINSKY F.M.. Distribution of gamma-aminobutyric acid, glycine, glutamate and aspartate in the cochlear nucleus of the rat, 1978.
19. GRAY, E. G.. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of cerebral cortex: an electron microscope study. *J. of Anatomy*, Vol. 93, 420-433P, 1959.
20. GROTHE B., PECKA M., MCALPINE D.. Mechanisms of sound localization in mammals. *Physiol Rev* 90: 983-1012, 2010.
21. GUYTON, A. C.. Tratado de Fisiologia Médica”. 9ª ed – São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 1996.
22. HELFERT, R.H.; SNEAD, C.R.; ALTSCHULER, R.A (1991). The ascending auditory pathways., in Altschuler, R.A.; bobbin, R.P.; Clopton, B.M.; Hoffman, D.W., (eds): Neurobiology of hearing: the central auditory pathways, New York, *Raven Press*, p. 1-26, 1991.
23. J. HOWARD, W. M. ROBERTS, AND A. J. HUDSPETH. Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17: 99-124, 1988.
24. JEFFREY R. HOLT, DAVID P. COREY, AND EATOCK R. A.. Mechanoelectrical Transduction and Adaptation in Hair Cells of the Mouse Utricle, a Low-Frequency Vestibular Organ. *The Journal of Neuroscience*, November 15, 17(22):8739–8748, 1997.
25. KADNER A., BERREBI A. S.. Encoding of temporal features of auditory stimuli in the medial nucleus of the trapezoid body and superior paraolivary nucleus of the rat. *Neuroscience* 151: 868-887, 2008.
26. KOPP-SCHEINPFLUG C, FUCHS K, LIPPE WR, TEMPEL BL, RÜBSAMEN R.. Decreased temporal precision of auditory signaling in Kcna1-null mice: an electrophysiological study in vivo. *J. Neuroscience* 23:9199-9207, 2003.

27. 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 Ca<sup>2+</sup> currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J. Neurosci* 24:5955–5965, 2004.
28. KUNISHIMA N., SHIMADA Y., TSUJI Y., SATO T., YAMAMOTO M., KUMASAKA T., NAKANISHI S., JINGAMI H., MORIKAWA K.. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971-977, 2000.
29. LÉVÉNÈS C., DANIEL H., SOUBRIÉ P., AND CRÉPEL F.. Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol (Lond)* 510: 867-879, 1998.
30. LÖHRKE S., KUNDEL M., FRIAUF E.. Electrical Membrane Properties of Trapezoid Body Neurons in the Rat Auditory Brain Stem Are Preserved in Organotypic Slice Cultures. *Physiologie III*, Universität Frankfurt – Germany, 1998.
31. LORTEIJE J. A. M., RUSU S. I., KUSHMERICK C., BORST J. G. G. (2009). Reliability and precision of the mouse calyx of Held synapse. *J. Neurosci* 29: 13770-13784.
32. MANNAIONI G., MARINO M. J., VALENTI O., TRAYNELIS S. F. AND CONN P. J.. Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5 Differentially Regulate CA1 Pyramidal Cell Function. *The Journal of Neuroscience*, August 15, 21(16):5925–5934, 2001.
33. MAYER, M.L. E WESTBROOK, G.L.. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol*, v.28, n.3, p.197-276, 1987.

34. MELDRUM, B. S.. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130(4S Suppl): 1007S-1015S, 2000.
35. MOURA, P. R., VIDAL, F.A.P.. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica (Porto Alegre)* 21, 2011.
36. NELSON DL, COX MM. BIOSINALIZAÇÃO. IN: SIMÕES AA, LODI WRN [Coord.] Tradução. *Lehninger Princípios de Bioquímica*, 4<sup>o</sup> Ed. São Paulo: Ed. Sarvier; p. 440-4, 2006.
37. NICOLETTI, F.; BATTAGLIA, G.; STORTO, M.; NGOMBA, R.; LACOVELLI, L.; ARCELLA, A.; GRANDINI, R.; SALE, P.; RAMPELLO, L.; DE VITA, T.; DI MARCO, R.; MELCHIORRI, D. E BRUNO, V.. Metabotropic glutamate receptors: Beyond the regulation of synaptic transmission. *Psychoneuroendocrinology*, 2008.
38. NISWENDER, C. M. AND P. J. CONN. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 295-322, 2010.
39. OHNO-SHOSAKU, T., MAEJIMA, T., KANO, M., Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29, 729–738, 2001.
40. OHNO-SHOSAKU, T., TSUBOKAWA, H., MIZUSHIMA, I., YONEDA, N., ZIMMER, A. & KANO, M.. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J. Neurosci.*, 22, 3864–3872, 2002b.
41. OLIVE, M. F. (2009). Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 2(1): 83-98.

42. OZAWA, S.; KAMIYA, H. AND TSUZUKI, K.. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 54: 581-618, 1998.
43. PATRICE CONGAR AND LOUIS-ERIC TRUDEAU. Perturbation of synaptic vesicle delivery during neurotransmitter release triggered independently of calcium influx. *Journal of Physiology*, 542.3, pp. 779–793, 2002.
44. PAXINOS, G. & WATSON, C.. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th. ed San Diego, *Academic Press*, 1998.
45. PHILIP H. SMITH, PHILIP X JORZS, LAUREL H. CARNEY, AND TOM C.T. YIN. Projections of physiologically characterized Globular Bushy Cell axons from the Cochlear Nucleus of the cat. *The journal of comparative neurology*. 304:387-407, 1991.
46. RALF SCHNEGGENBURGER & IAN D. FORSYTHE. The calyx of Held – Review. *Cell Tissue Res* 326:311–337, 2006.
47. STANLEY JACOBSON AND ELLIOTT M. MARCUS. Neuroanatomy for the Neuroscientist. *Springer Science*, 2008.
48. SHIPE, W. D., S. E. WOLKENBERG, ET AL.. Recent advances in positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8(4): 449-457, 2005.
49. SOHAM CHANDA AND MATTHEW A. XU-FRIEDMAN. Excitatory Modulation in the Cochlear Nucleus through Group I Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *The Journal of Neuroscience* May 18, 2011 - 31(20):7450 –7455, 2011.
50. STUART A. FORMAN, JANET CHOU, GARY R. STRICHARTZ E ENG H. Lo. Princípios de Farmacologia do Sistema Nervoso Central 11º cap.

- Farmacologia da Neurotransmissão GABAérgica e Glutamatérgica p. 146-165.
51. T. ABE et al. *J. Biol. Chem.* 267, 13361, 1992.
52. THOMPSON A. M., SCHOFIELD B. R.. Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51: 330-354, 2000.
53. VINCENT, P., ARMSTRONG, C.M., MARTY, A.. Inhibitory synaptic currents in rat cerebellar Purkinje cells: modulation by postsynaptic depolarization. *J. Physiol. (London)* 456, 453–471, 1992.
54. WATKINS, J. C. E JANE, D.E. The glutamate story. *Br J Pharmacol*, v.147 Suppl 1, p.S100-8, 2006.
55. WATKINS, J. C., P. KROGSGAARD-LARSEN & T. HONORE. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci*, v.11, n.1, Jan, p.25-33, 1990.
56. WANG LY, LI GAN, IAN D FORSYTHE AND LEONARD K KACZMAREK. Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones. *The Journal of Physiology*, 509, 183-194, 1998.
57. WAZEN J. J., GHOSAINI S. N., SPITZER J. B., KULLER M.. Localization by unilateral BAHA users. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 928-932, 2005.
58. WEBSTER WR, W.R (1995). Auditory system, IN PAXINOS, G., (ed): The rat nervous system, London, *Academic Press*, p. 797-827, 1995.
59. WISNIEWSKI, K. AND H. CAR. (S)-3,5-DHPG: a review. *CNS Drug Rev* 8(1): 101-116, 2002.

60. WYNNE B., ROBERTSON D.. Somatostatin and substance P-like immunoreactivity in the auditory brainstem of the adult rat. *J. Chem Neuroanat.* May; 12(4):259-66, 1997.
61. XIAO-TAO JIN, CHRISTOPHER J. BEAVER, QINGHUA JI, NIGEL W. DAW. *J. of Neurophysiology.* Published 1 October, Vol. 86no. 1622-1631, 2001.
62. YAN W., FEI ZHENG, XIANJU ZHOU, ZHONGSHENG SUN, AND HONGBING WANG. Converging signal on ERK1/2 activity regulates group I mGluR mediated *Arc* transcription. *Neurosci Lett.* August 21; 460(1): 36-40, 2009.
63. Y. TANABE, M. MASU, T. ISHII, R. SHIGEMOTO, S. NAKANISHI (1992). *Neuron* 8, 169; K. M. Houamed et al., *Science* 252, 1318 (1991).
64. YU S.P, SENSI S.L., CANZONIERO L.M.T, BUISSON A, CHOI D.W.. Membrane-delimited modulation of NMDA currents by metabotropic glutamate receptor subtypes 1/5 in cultured mouse cortical neurons. *J. Physiol (Lond)* 499:721–732, 1997.