



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

Tese de Doutorado

Éverton dos Santos e Alhadas

Modulação excitatória das células principais do núcleo medial do corpo trapezoide por receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I

Belo Horizonte

2019

Éverton dos Santos e Alhadad

Modulação excitatória das células principais do núcleo medial do corpo trapezoide por receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, 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

2019

043

Alhadas, Éverton dos Santos e.

Modulação excitatória das células principais do núcleo medial do corpo trapezoide por receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I. [manuscrito] / Éverton dos Santos e Alhadas. – 2019.

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

Orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick.

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

1. Fisiologia. 2. Aparelho auditivo. 3. Corpo Trapezoide. 4. Receptores de Glutamato Metabotrópico. I. Kushmerick, Christopher. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

**"MODULAÇÃO EXCITATÓRIA DAS CÉLULAS PRINCIPAIS DO
NÚCLEO MEDIAL DO CORPO TRAPEZOIDE POR
RECEPTORES METABOTRÓPICOS GLUTAMATÉRGICOS DO
GRUPO I"**

ÉVERTON DOS SANTOS E ALHADAS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 20 de fevereiro de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. RICARDO MAURÍCIO XAVIER LEÃO
FMRP/USP



PROF. DR. CÉLIO JOSÉ DE CASTRO JÚNIOR
IEP/SCBH



PROFA. DRA. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. JEROME PAUL ARMAND LAURENT BARON
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. CHRISTOPHER KUSHMERICK
ICB/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, 20 de fevereiro de 2019

DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir e sustentar absolutamente tudo que fundamentou minha aprendizagem desde o início. 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 namorada, Josiane, por toda atenção, carinho, cuidados e pelo apoio incondicional em todos os momentos. Aos meus pais, Luiz e Dulcinéia, por todo o esforço e atenção dedicados a mim durante os vários anos de estudo em minha vida.

Tudo o que consegui foi graças a vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Christopher Kushmerick, por todo auxílio no desenvolvimento desse trabalho e pelos conhecimentos que foram passados a mim durante esses anos. Meu respeito e admiração são eternos.

À Professora Lígia Naves, pelos constantes ensinamentos.

Aos meus professores, responsáveis pela minha formação durante todos os anos da minha vida escolar.

Aos meus amigos de laboratório, por toda ajuda com o projeto, pelos sorrisos e por toda companhia. Vocês foram essenciais na minha vida e eu os levo eternamente comigo!

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

Aos animais que contribuíram indubitavelmente para o desenvolvimento deste trabalho e para o avanço da ciência.

À UFMG pela excelência no ensino.

À CAPES pelo apoio financeiro.

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

Sorria

Sorria, embora seu coração esteja doendo

Sorria, mesmo que ele esteja partido

Quando há nuvens no céu,

Você conseguirá...

Se você sorrir

Com seu medo e tristeza

Sorria e talvez amanhã

Você verá o sol brilhando, para você

Ilumine seu rosto com alegria

Esconda qualquer traço de tristeza

Embora uma lágrima possa estar tão próxima

Esse é o momento que você tem que continuar tentando

Sorria, o que adianta chorar?

Você descobrirá que a vida ainda continua

Se você apenas sorrir

Este é o momento que você tem que continuar tentando

Sorria, de que adianta chorar?

Você descobrirá que a vida ainda continua

Se você apenas...

Sorrir

Charles Chaplin, John Turner e Geoffrey Parsons

RESUMO

Alhadas, Éverton dos Santos e. Modulação excitatória das células principais do núcleo medial do corpo trapezoide por receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Fisiologia e Biofísica – Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais - 2019.

Receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR) são receptores acoplados a proteína G amplamente distribuídos no sistema nervoso central. Em trabalho anterior, utilizando registros intracelulares, mostrei que a ativação de receptores mGluR do Grupo I altera, de forma rápida e reversível, a excitabilidade de neurônios do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB). Especificamente, o tratamento com o agonista seletivo, S-3,5 dihidroxyfenylglycerol (DHPG, 100 μ M), despolariza os neurônios, aumenta a resistência de membrana, reduz a reobase e aumenta o número de potenciais de ação por uma dada intensidade de corrente injetada. No presente trabalho, procuramos avaliar os mecanismos responsáveis por esses efeitos e as consequências funcionais para o desempenho da sinapse. Para tal, realizamos registros de potencial de membrana e da corrente de membrana utilizando a técnica de patch clamp na modalidade whole cell. Assim como foi observado utilizando registros intracelulares, utilizando a técnica de whole-cell o DHPG (10-100 μ M) despolarizou os neurônios do MNTB, por 7.2 ± 1 mV (N=10). Sob voltage clamp ($V_m = -60$ mV), DHPG gerou uma corrente de entrada de -70 ± 8 pA (N=10), e ao mesmo tempo aumentou a resistência da membrana. A corrente gerada pelo DHPG foi significativamente reduzida quando medida na presença de MPEP, um antagonista da isoforma mGlu₅. Porém, cerca de 60% da corrente gerada pela DHPG foi insensível ao MPEP, sugerindo a participação do receptor mGlu₁. O pré-tratamento conjunto com MPEP e LY367685 (antagonista mGlu₁) aboliu o efeito de DHPG (N=4), demonstrando ação clara do agonista, DHPG, agindo sobre receptores mGluR-I em neurônios do MNTB. O uso de outros antagonistas seletivos permitiu descartar a participação de receptores iGluRs (NMDA, AMPA e Cainato) e canais NaV no efeito promovido pela ativação dos receptores metabotrópicos do Grupo I. Para melhor explorar a natureza da corrente gerada pelo DHPG, aplicamos protocolos de voltage clamp em formato de rampas que se estendem de -120 mV a -30 mV e permitiam medir a relação corrente-voltagem (I-V) nesse faixa de potencial. Pela subtração digital das curvas medidas na presença de DHPG e das curvas medidas em controle, a dependência de voltagem da corrente ativada por DHPG foi calculada. Tal análise revelou uma corrente negativa, que tende para zero em potenciais perto do potencial de equilíbrio de K⁺. Juntos, esses dados sugerem que a corrente gerada pelo DHPG, que se manifesta como uma corrente de entrada, na realidade se dá pela inibição de uma corrente de saída por um canal para K⁺. O presente estudo indica, ainda, que a injeção de corrente positiva mimetiza o efeito da aplicação de DHPG levando a conclusão de que o principal efeito da ativação dos receptores mGluR-I nos potenciais de ação é

mediado pela despolarização da membrana. Para avaliarmos as consequências funcionais da ativação de receptores mGluR-I, estimulamos a fibra aferente que forma a sinapse glutamatérgica cálice de Held e medimos os EPSPs e APs gerados no neurônio do MNTB. Quando estimulado na taxa de 100 Hz (duração do estímulo 1 s), houve depressão do tamanho do EPSP e falhas pós-sinápticas (i.e., a geração de EPSPs cujas amplitudes foram insuficientes para gerar um PA). A análise dos resultados revelou uma nítida redução das falhas pós-sinápticas na presença de DHPG quando comparado com a condição controle, medida na mesma célula. Essa diferença não foi por alterações na plasticidade sináptica porque nem a facilitação nem a depressão foram significativamente alteradas. Os achados sugerem que a ativação dos mGluR do Grupo I aumenta a probabilidade de EPSPs de mesma amplitude desencadearem potenciais de ação. Concluímos que as alterações na excitabilidade intrínseca, ocasionada pela ativação de receptores mGluR-I, resultam em importantes consequências para a robustez da neurotransmissão em alta frequência no MNTB, que é uma característica dessa sinapse.

Palavras-chave: MNTB, Whole-cell Patch clamp, Receptor Metabotrópico Glutamatérgico, DHPG, ImGluR-I, Potencial de ação.

ABSTRACT

Alhadas, Éverton dos Santos e. Excitatory modulation of the main cells in the medial nucleus of the trapezoidal body through Group I glutamatergic metabotropic receptors. Thesis (PhD in Physiology) - Institute of Biological Sciences - Department of Physiology and Biophysics - Belo Horizonte, Federal University of Minas Gerais - 2019.

Metabotropic glutamate receptors (mGluR) are G protein-coupled receptors widely distributed in the central nervous system. In previous work, using intracellular registers, I showed that the activation of mGluR receptors rapidly and reversibly alters the excitability of neurons in the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB). Specifically, treatment with the selective agonist, DHPG (100 μ M), depolarizes the neurons, increases membrane resistance, reduces rebase, and increases the number of action potentials by a given intensity of injected current. In the present work, we try to evaluate the mechanisms responsible for these effects and the functional consequences for the synapse performance. For this, we performed membrane and membrane current potential records using the patch clamp technique in the whole cell mode. As observed using intracellular registries, using the whole-cell technique DHPG (10-100 μ M) depolarized the MNTB neurons by 7.2 ± 1 mV (N = 10). Under voltage clamp ($V_m = -60$ mV), DHPG generated an input current of -70 ± 8 pA (N = 10), and at the same time increased membrane resistance. The current generated by DHPG was significantly reduced when measured in the presence of MPEP. However, about 60% of the current generated by DHPG was insensitive to MPEP (mGlu5), suggesting the participation of the mGlu₁ receptor. Pre-treatment with MPEP and LY367685 (mGlu1) abolished the effect of DHPG (N=4), demonstrating clear agonist action, DHPG, acting on mGluR-I receptors on MNTB neurons. The use of antagonists allowed to discard the participation of iGluRs receptors (NMDA, AMPA and Kainate) and NaV channels in the effect promoted by the activation of Group I metabotropic receptors. To better explore the nature of the current generated by DHPG, we applied voltage clamp protocols in the form of ramps that extended from -120 mV to -30 mV and allowed to measure the current-voltage (IV) relation in this potential range. By the digital subtraction of the curves measured in the presence of DHPG and the curves measured in control, the voltage dependence of the DHPG activated current was calculated. Such analysis revealed a negative current, which tends to zero at potentials near the equilibrium potential of K⁺. Together, these data suggest that the current generated by DHPG, which manifests itself as an input current, actually occurs by inhibiting an output current through a channel for K⁺. The present study also indicates that positive current injection mimics the effect of DHPG application leading to the conclusion that the main effect of the activation of mGluR-I receptors on action potentials is mediated by membrane depolarization. To evaluate the functional consequences of the activation of mGluR-I receptor, we stimulated the afferent fiber forming the glutamatergic synapse Calyx of Held and measured the EPSPs and APs generated in the MNTB neuron. When

stimulated at the rate of 100 Hz (duration of the stimulus 1 s), there was depression of the EPSP size and post-synaptic failures (i.e., generation of EPSPs whose amplitudes were insufficient to generate a PA). Analysis of the results revealed a clear reduction of postsynaptic failures in the presence of DHPG when compared to the control condition, measured in the same cell. This difference was not due to changes in synaptic plasticity because neither facilitation nor depression were significantly altered. The findings suggest that the activation of Group I mGluR increases the chance of EPSPs of the same amplitude triggering post-synaptic action potentials. We conclude that the changes in intrinsic excitability caused by the activation of mGluR-I receptors result in important consequences for the robustness of high-frequency neurotransmission, which is a characteristic of this synapse.

Keywords: MNTB, Whole-cell Patch clamp, Metabotropic glutamate receptors, DHPG, ImGluR-I, Action potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Receptores mGluR-I.....	04
Figura 2 – Vias de sinalização intracelular mGluR-I.....	07
Figura 3 – Figura esquemática do cálice de Held e maturação.....	11
Figura 4 – Processamento de informação auditiva no tronco encefálico	23
Figura 5 – Efeitos do DHPG, na membrana do neurônio MNTB.....	26
Figura 6 – Resposta do DHPG mediante presença de ambos os antagonistas.....	28
Figura 7 – Identificação da corrente ativada por DHPG	31
Figura 8 – Aumento da resistência de membrana em resposta ao DHPG.....	32
Figura 9 – Diminuição da reobase mediante ativação dos mGluR-I.....	33
Figura 10 – Injeções de corrente positiva e negativa	35
Figura 11 – Ativação dos mGluR-I melhora o disparo em alta frequência no MNTB.....	39
Figura 12 – Depressão sináptica e aumento da probabilidade de PAs.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF – Artificial cerebrospinal fluid (Fluido artificial cerebral)

aVCN – Anteroventral cochlear nucleus (Núcleo coclear anteroventral)

CETEA – Comitê de ética e experimentação animal

CB1 – Receptor Canabinoide tipo I

COS – Complexo Olivar Superior

DHPG – (S)3,5 Dihidroxifenilglicina

EPSP – Excitatory postsynaptic potential

GBCs – Globular bushy cells (Células globulares espessas)

GPCRs – G protein-coupled receptor

HCN – Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated

ImGluR-I – Corrente elicitada por mGluRs do Grupo I

mGluR – Metabotropic Glutamate Receptor

MK801 – (5R,2S)-(+)-5-Metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imine hidrogênio maleato

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMDAR – Receptor N-metil-D-aspartato

iGluR – Ionotropic Glutamate Receptor

Kir – Inwardly rectifying potassium

LY367385 - (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid

MNTB – Medial Nucleus of the Trapezoid Body (Núcleo medial do corpo trapezoide)

MPEP – 2-Methyl-6-(phenylethynyl) pyridine hydrochloride

NTB – Núcleos do Corpo Trapezoide

PA – Potencia de ação

PLC – Fosfolipase C

PKC – Proteína cinase C

SNC – Sistema nervoso central

TB – Trapezoide body

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Receptores.....	2
1.2.1 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos	3
1.2.2 Receptores glutamatérgicos metabotrópicos	4
1.2.2.1 Receptores mGluR-I e proteína Gq.....	6
1.3 Neurotransmissão	8
1.3.1 Neurotransmissão glutamatérgica.....	8
1.3.2 Plasticidade sináptica.....	9
1.3.3 Núcleo medial do corpo trapezoide como modelo de estudo	10
1.4 Agonista e antagonistas seletivos	13
1.5 Estudos prévios.....	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivo específico	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Fármacos, Reagentes e Soluções	19
4.3 Preparação das fatias contendo o MNTB.....	19
4.4 Estratégia experimental.....	20
4.4.1 Eletrofisiologica	20
4.4.2 Análise.....	23
5. RESULTADOS	25
5.1 Efeito do DHPG no potencial de membrana e corrente de membrana	25
5.2 Qual subtipo de receptores medeia a ImGluR-I?	27
5.3 Qual é a base iônica da ImGluR-I?	28
5.4 Alterações na excitabilidade.....	33
5.5 Qual o significado da ImGluR-I na neurotransmissão do MNTB	36
6 DISCUSSÃO	44

6.1 Efeito do DHPG no potencial de membrana e corrente de membrana	44
6.2 Subtipo de receptor que medeia a ImGluR-I	45
6.3 Caracterização farmacológica da ImGluR-I.....	47
6.4 Participação de IGluRs na ImGluR-I.....	48
6.5 Íon responsável pela Imglur-I.....	49
6.6 Alterações na excitabilidade.....	50
6.7 Sinificado da ImGluR-I na neurotransmissão	51
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos, ou mGluRs, são altamente expressos em todo SNC, e participam amplamente da neurotransmissão (CONN E PIN, 1997). Essa classe de receptores de glutamato está acoplada à proteína G que sabidamente modifica a excitabilidade neuronal e glial para mais ou para menos agindo sobre proteínas de membrana ou em uma variada quantidade de vias intracelulares acopladas a segundo mensageiros intracelulares (MELDRUM, 2000, RIBEIRO et al., 2017).

A localização anatômica dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos, associada as suas características bioquímicas, fisiológicas e farmacológicas têm sido intensamente investigadas. Envolvidos na regulação da excitabilidade neuronal, plasticidade sináptica e liberação de neurotransmissores, essa classe de receptores metabotrópicos é importante para o desenvolvimento neuronal e para os mecanismos de aprendizagem e neuroproteção (FERRAGUTI et al., 2008).

Receptores metabotrópicos glutamatérgicos também tem sido associados a respostas patológicas. A ativação de mGluRs do Grupo I pelo agonista seletivo DHPG, por exemplo, foi considerada responsável pela geração de atividade epileptiforme em CA3 e alterou respostas epiléticas induzidas experimentalmente no neocórtex (ANWYL, 1999; MANNAIONI, 2001). Diversos estudos ligam os mGluR-I à lesões pós isquêmicas (PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1999).

Os mGluRs constituem, dessa forma, alvos terapêuticos em potencial para o desenvolvimento de procedimentos que atuem na transmissão glutamatérgica, fazendo com que disfunções como epilepsia, amnésia, ansiedade e doenças neurodegenerativas possam responder à futuros tratamentos (FERRAGUTI et al.,

2008; MELDRUM, 2000). Contudo, os mecanismos pelos quais a ativação de receptores mGluR altera a função neuronal ainda não está completamente esclarecido.

No presente documento vamos discutir os mecanismos envolvidos com a neurotransmissão nas sinapses glutamatérgicas, em geral e especificamente na sinapse formada entre o cálice de Held e os neurônios do MNTB, dando ênfase ao aumento da excitabilidade pós-sináptica promovida pela ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do Grupo I.

1.2. Receptores

Receptores sinápticos são proteínas de membrana que, quando ativadas, podem, a partir de seu característico mecanismo de ação, promover efeitos no neurônio pós-sináptico, modulando para mais ou para menos a atividade celular via canais de membrana ou ação via sinalização intracelular, permitindo um extenso controle sobre a propagação do sinal e as ações neurais (JACOBSON and MARCUS, 2008).

Diversas são as proteínas de membrana encontradas no sistema nervoso central, em especial e de nosso interesse estão os receptores para glutamato que são proteínas de membrana que medeiam, em sua maioria, grande parte da neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central (NAKANISHI, 1992). Importantes na aquisição de memória, aprendizado, plasticidade neuronal, a superestimulação destes receptores de glutamato também pode, em contraposição aos efeitos listados anteriormente, desencadear eventos bioquímicos no meio intracelular, resultando em lesões do SNC de animais em desenvolvimento e em adultos, resultando em processos de morte celular em situações de distúrbios

neurodegenerativos crônicos, como esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (OLNEY et al., 1973; SCHWARCZ et al., 1984; STEWART et al., 1986; MAYER and WESTBROOK, 1987; CHOI, 1988; DINGLELINE et al., 1988; MCDONALD et al., 1988; MONAGHAN et al., 1989; MCDONALD, 1989; ROTHMAN and OLNEY, 1995; MELDRUM et al., 1999; MELDRUM, 2000; LEE et al., 2004).

Os receptores para glutamato podem ser divididos em dois grandes grupos, de acordo com seu mecanismo de ação, os ionotrópicos e os metabotrópicos. Estudos moleculares e farmacológicos reiteram a existência de subtipos de receptores e demonstram heterogeneidade nos padrões de expressão e função (NAKANISHI, 1992).

1.2.1. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Os iGluRs medeiam as respostas sinápticas rápidas, através do controle direto do fluxo iônico (WATKINS et al., 1990). Os receptores ionotrópicos podem ser classificados por critérios moleculares, farmacológicos e eletrofisiológicos, e são denominados segundo o agonista com o qual eles são seletivamente ativados. 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^+ , K^+ , e Ca^{2+} , ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA), permeável ao Na^+ e K^+ , e ao Ca^{2+} , dependendo da composição das subunidades (NISWENDER and CONN, 2010) e cainato (KA), permeável ao Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (OLIVE, 2009).

1.2.2. Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos, ou mGluRs, são amplamente expressos no SNC, e participam amplamente da neurotransmissão através de mecanismos ainda não completamente compreendidos (CONN and PIN, 1997). São proteínas que apresentam sete domínios transmembrana (7TM), que além do seu papel estrutural detém sítios de ligação para os moduladores alostéricos (DORÉE et al., 2014; WU et al., 2014) e para a proteína G (PIN et al., 1994), um domínio extracelular N-terminal hidrofílico, que detém uma grande estrutura chamada de domínio “Venus flytrap” (planta carnívora), descrita pela primeira vez para os receptores GABA B (GALVEZ et al., 1999) e que contém o sítio de ligação ortostérico (KUNISHIMA et al., 2000; MUTO et al., 2007; TSUCHIYA et al., 2002). Após o sétimo segmento transmembranar, o domínio 7TM dá lugar a um grande domínio C-terminal intracelular de acordo com o subtipo (**Figura 1**) (NAKANISHI, 1992).

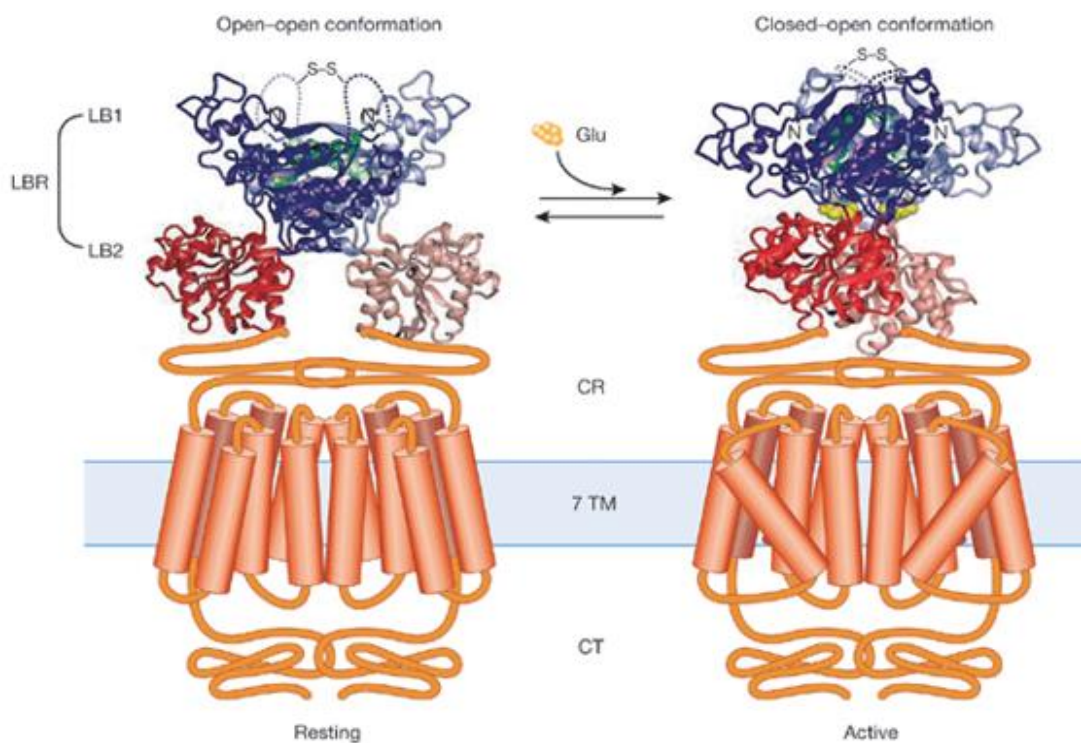


Figura 1. Estrutura de receptores metabotrópicos para glutamato. Esses receptores são caracterizados por um grande domínio extracelular, dividido em sítio de ligação (LBR) e uma região rica em cisteína (CR). Estado “inativo” à esquerda e estado “ativo” à direita (ligação do glutamato). (Adaptado de Kunishima et al. 2000).

Os receptores mGluR são ativados por glutamato e promovem ações intracelulares através de seu acoplamento com uma proteína G, sendo denominados, dessa forma, GPCRs (G protein-coupled receptor). Diferente dos receptores ionotrópicos, os receptores metabotrópicos glutamatérgicos não são eletrogênicos (i.e., não são canais iônicos [canais para íons]). Contudo, as vias de sinalização que eles ativam podem modular a atividade de canais iônicos e, assim, produzir efeitos sobre o potencial de membrana e a excitabilidade (ANWYL, 1999; revisador por Correia et al., 2017) como pode ser observado em situações onde a ativação de receptores mGlu5 promove a elevação dos níveis da PKC estimulando os receptores NMDA e desencadeando um aumento na probabilidade de abertura deste canal (LU et al., 1999; RIBEIRO et al., 2017).

Mecanismos de geração de corrente pela proteína G também podem ser observados pela ativação da PLC pela $G_{\alpha q} / 11$ e a hidrólise do PI (4,5) P_2 que libera Ca^{2+} no meio intracelular advindo dos estoques do retículo endoplasmático. Esse aumento de Ca^{2+} pode estimular as correntes do trocador eletrogênico Na^+ / Ca^{2+} (BLAUSTEIN and LEDERER, 1999) e dessa forma, fornecer um mecanismo eletrogênico (revisado por CORREA et al., 2017).

Atualmente, oito isoformas de receptores mGluR foram descritas, denominadas mGlu₁-mGlu₈ (CONN and PIN, 1997). Essas isoformas podem ser divididas em três grupos com base na sua via de sinalização, localização celular, homologia quanto a suas sequências de aminoácidos e farmacologia (OZAWA et al., 1998). Os receptores do Grupo II, ao qual fazem parte os mGlu₂ e mGlu₃, e os do Grupo III, do qual fazem parte os receptores mGlu₄, mGlu₆, mGlu₇ e mGlu₈ (MOURA, 2010) são localizados predominantemente nos terminais nervosos pré-sinápticos e atuam como auto receptores de glutamato (FORSYTHE and CLEMENTS, 1990; Von GERDORFF et al.,

1997). Esses receptores estão acoplados a proteína Gi/o envolvida com a inibição da adenilato ciclase, inibição de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e a ativação de canais de GIRK (TAKAHASHI et al., 1996; CONN E PIN, 1997; Von GERSDORFF et al., 1997; OZAWA et al., 1998; MELDRUM, 2000; SCHOEPP, 2001).

Já os receptores mGluR do Grupo I, de nosso interesse, compreendem as isoformas mGlu1 e mGlu5 e se encontram predominantemente localizados no terminal pós-sináptico, como observado no MNTB (KUSHMERICK et al., 2004, CARTMELL E SCHOEPP, 2000; ELEZGARAI et al., 2003, NISWENDER and CONN, 2010). Os receptores metabotrópicos do Grupo I são descritos em diversos núcleos no sistema nervoso central. Altos níveis de expressão de mGlu1 podem ser encontrados nos neurônios do córtex cerebelar, bulbo olfatório, tálamo, septo lateral, núcleo pré-óptico, globus pallidus, magnocelular (MARTIN, 1992; RIBEIRO et al., 2017). Por sua vez, a expressão de mGlu5 é vastamente observada no córtex cerebral, no telencéfalo, hipocampo, bulbo olfatório, corpo estriado, núcleo accumbens e também corno dorsal da medula espinhal e em células gliais (SHIGEMOTO et al., 1993; BIBER et al., 1999; RIBEIRO et al., 2017).

Com tudo que foi descrito até o momento, fica evidente que os mGluRs podem vir a constituir importantes alvos terapêuticos em diversos processos patológicos pelo sistema nervoso central.

1.2.2.1. Receptores mGluR-I e proteína Gq

Os receptores do Grupo I são acoplados a proteína Gq (**Figura 2**), que, de forma resumida, após sua ativação, ativa o fosfolipase C que catalisa a hidrólise fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), gerando diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3). O IP_3 , devido a sua estrutura hidrossolúvel, migra pelo citosol e se

liga a receptores específicos no retículo endoplasmático promovendo a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, enquanto que, paralelamente, o DAG, ativa a proteína quinase C (PKC) (NAKANISHI, 1992; ABE et al., 1992).

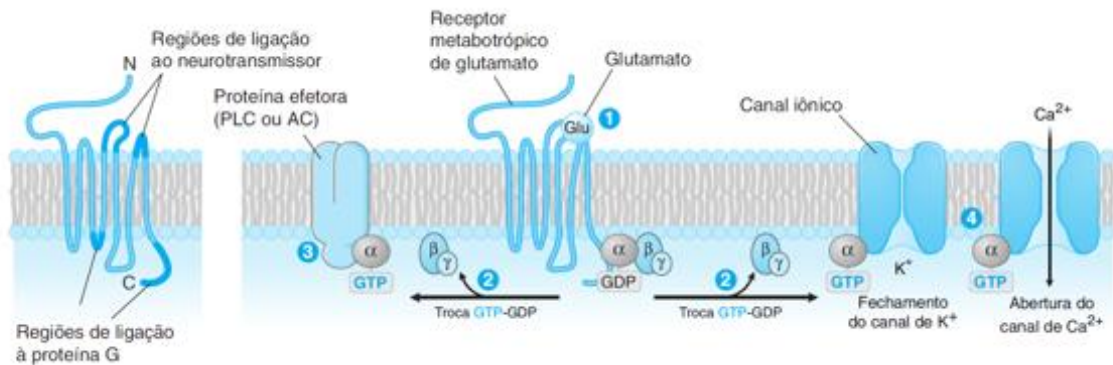


Figura 2. Vias de sinalização intracelulares iniciadas pela ligação do agonista glutamato ao sítio ativo do mGluR (Stuart A. Forman, Eng H. Lo).

O aumento do Ca^{2+} intracelular, seja pela abertura de canais para Ca^{2+} ou pela ação de IP_3 , agindo sobre IP_3Rs no retículo sarcoplasmático inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, dentre as quais, a síntese de 2-AG a partir de diacilglicerol (DAG) na membrana, pela via envolvendo fosfatidil-inositol-fosfolipase C (PI-PLC) (NELSON and COX, 2006; MOURA, 2011). O composto 2-AG, visto como principal endocanabinoide no hipocampo e neocórtex, uma vez sintetizado, pode obter acesso ao exterior da célula (ALGER, 2002).

Em algumas regiões, como no hipocampo, cerebelo, e também no núcleo medial do corpo trapezoide (objeto de nosso estudo), estudos prévios demonstraram que a ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I pós-sinápticos resulta na liberação de endocanabinoide que culmina em uma retroalimentação negativa de liberação de neurotransmissor, via receptores CB1 pré-sinápticos (OHNO-SHOSAKU, 2001, ALGER, 2002, KUSHMERICK et al., 2004). A esses eventos de sinalização retrograda foram dados os nomes DSI e DSE,

Supressão da Inibição por Despolarização e Supressão da Excitação por Despolarização, respectivamente.

Mediante o acima exposto, fica evidente que as vias de transdução de sinais mediadas pela proteína Gq apresentam importantes funções no cérebro. Envolvidas na neurotransmissão e plasticidade sináptica, pesquisas também demonstraram que a deficiência da proteína Gq pode contribuir em processos de neurodegeneração, como aqueles observados na doença de Alzheimer (MOURA, 2011).

O estudos dos GPCRs e das vias que envolvem a proteína Gq podem vir a permitir o desenvolvimento de procedimentos farmacológicos empregados na terapêutica de diversas patologias.

1.3. Neurotransmissão

1.3.1. Neurotransmissão glutamatérgica

Neurotransmissores são substâncias que 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 (JACOBSON and MARCUS, 2008; NAKANISHI, 1992).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de vertebrados e exerce, sabidamente, um papel importante no desenvolvimento neuronal, aprendizado, memória e na plasticidade neuronal (MAYER and WESTBROOK, 1987; NAKANISHI, 1992; MELDRUM, 2000, CAR, 2002; RIBEIRO et al., 2017). Suas ações no cérebro e na medula espinhal de mamíferos são conhecidas desde os anos 1950 (HAYASHI, 1952).

Evidências também mostram que o glutamato participa de processos fisiopatológicos como epilepsia e esquizofrenia, e que a superestimulação de

determinadas vias glutamatérgicas em situações como isquemia, trauma cerebral e epilepsia, está envolvida com a morte neuronal (NICOLETTI, 2008; RIBEIRO et al., 2017).

Observado em diferentes células do SNC o glutamato, assim como outros neurotransmissores, é liberado de vesículas sinápticas em zonas ativas localizadas nos terminais pré-sinápticos através de mecanismos dependentes de Ca^{2+} envolvendo canais de Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo N e P/ Q (BIRNBAUMER et al., 1994).

Os efeitos do glutamato são muito diversos já que sua ação se dá sobre uma ampla gama de tipos de receptores ionotrópicos dos tipos AMPA, Cainato, NMDA e receptores metabotrópicos (mGluR), acoplados à proteína G, que ativam uma enorme variedade de vias acopladas à proteína G ou agem através de sinalizações que ativam vias de sinalização intracelulares (WISNIEWSKI E CAR, 2002; RIBEIRO et al., 2017).

1.3.2. Plasticidade sináptica

Ao nível celular, os processos que resultam em modificações da força sináptica, como adaptações de curta ou longa duração, são considerados mecanismos fundamentais para o correto funcionamento das sinapses e transmissão da informação, no momento em que permitem a alteração das respostas celulares por mecanismos não-lineares de modo dependente do grau da atividade sináptica (WU and KELLY, 1992).

Essa capacidade de adaptação, característica das sinapses, é comumente descrita como como plasticidade sináptica, descreve, pelo menos em parte, as mudanças adaptativas que ocorrem nos circuitos neuronais. Acredita-se que essas mudanças adaptativas sejam responsáveis por mecanismos de memória,

armazenadas por mudanças de curta ou longa duração na força das conexões sinápticas entre os neurônios (CITRI and MALENKA, 2008, BOCCHIO et al., 2017).

Inúmeros estudos tem investigado a plasticidade sináptica em diversas sinapses diferentes pelo sistema nervoso. Vários mecanismos têm sido propostos para explicarem a plasticidade sináptica a curto prazo, porém, o pequeno tamanho dos terminais sinápticos do cérebro de mamíferos impedia o avanço dos achados (Von GERSDORFF and BORST, 2002).

Não interessante por acaso, o cálice da Held dispõe de características morfológicas, fisiológicas e biofísicas importantes que permitem o estudo eletrofisiológico da neurotransmissão e logicamente permite o estudo dos mecanismos que geram e modulam a plasticidade sináptica a curto prazo (Von GERSDORFF and BORST, 2002).

1.3.3. Núcleo medial do corpo trapezoide como modelo para o estudo da neurotransmissão

O Cálice de Held, localizado no tronco encefálico, mais precisamente, no Núcleo Medial do Corpo Trapezoide (**Figura 3**), faz parte do Complexo Olivar Superior (COS), composto 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).

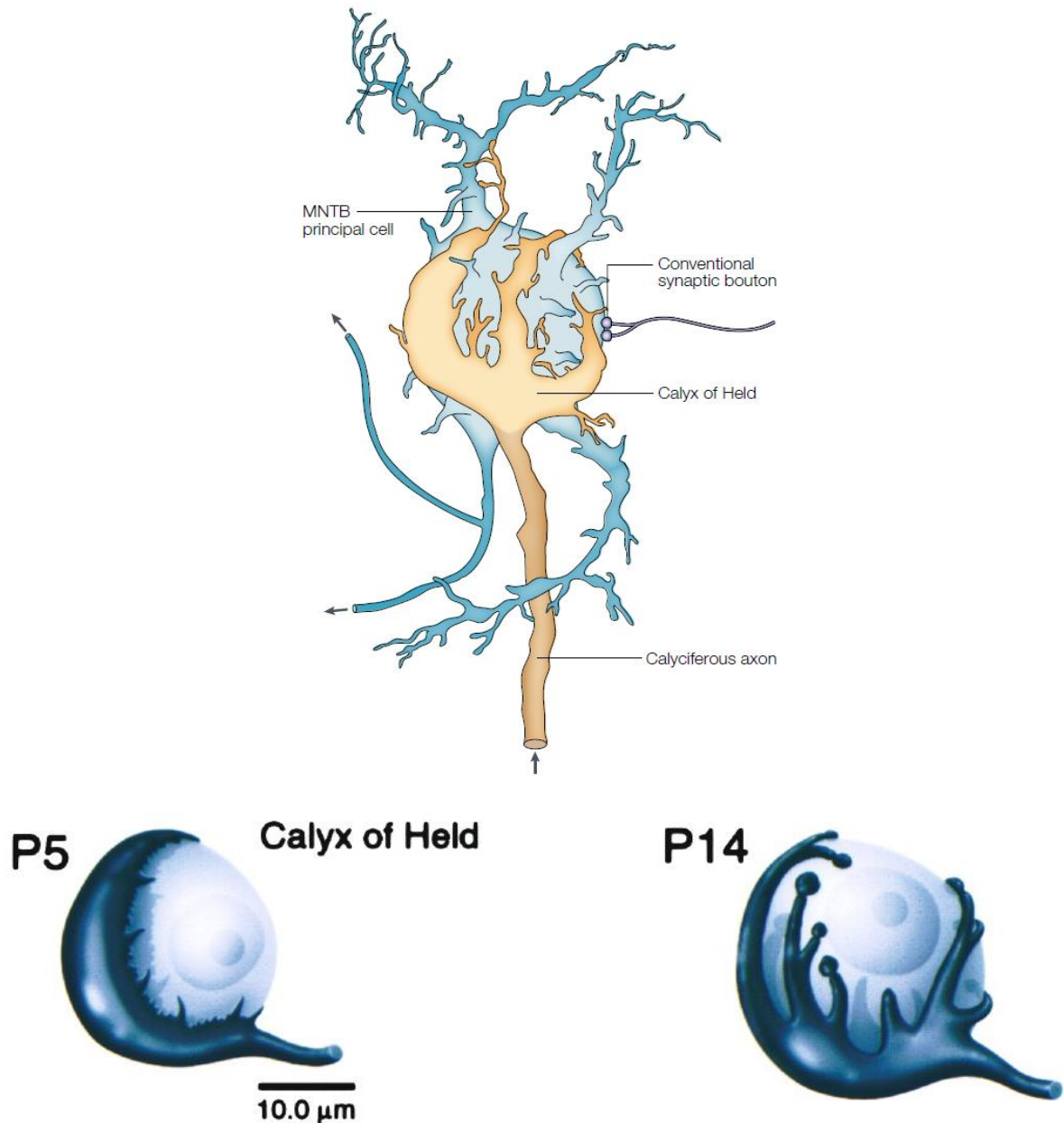


Figura 3. Figura esquemática do cálice de Held adulto. (**Superior**) Observar o axônio de grande calibre oriundo dos núcleos cocleares anteroventrais que forma o terminal pré-sináptico, denominado cálice de Held (Amarelo). A célula pós-sináptica (azul), que compõe essa sinapse glutamatérgica em conjunto com o cálice de Held, faz parte do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB) e projeta seus axônios para a oliva superior lateral ipsilateral em uma sinapse glicinérgica (GERSDORFF and BORST, 2002 adaptado de MOREST, D. K., 1968). (**Inferior**) A Figura demonstra a maturação do cálice de Held, aumento da estrutura altamente ramificada e com fenestrações. Esse arranjo aparentemente facilita a difusão do glutamato na fenda sináptica e aumenta a eficiência da neurotransmissão. (Adaptado de TASCHENBERGER et al., 2002).

Esta sinapse, primeiramente descrita por Hans Held no fim do século XIX (P. CONGAR and TRUDEAU, 2002; Von GERSDORFF and BORST, 2002), faz parte dos circuitos do sistema auditivo envolvidos na determinação da posição de uma fonte de som no espaço (BARNES-DAVIES and FORSYTHE, 1995; HACKNEY and FURNESS, 2013; HELFERT et al., 1991, WEBSTER 1995). Potências de ação, gerados no gânglio espiral da cóclea, são transmitidos através do 8º nervo craniano para o núcleo coclear anteroventral ipsilateral (aVCN), formado pelas células esféricas espessas (SBCs) e pelas células globulares espessas (GBCs). Os axônios das GBCs, então, cruzam a linha mediana do tronco encefálico e fazem sinapse com as células principais do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB) contralateral. À essa sinapse formada pelas fibras oriundas do aVCN e as células principais do MNTB foi dado o nome de Cálice de Held, um terminal sináptico axo-somático glutamatérgico. Os neurônios glicinérgicos do MNTB projetam seus axônios para a oliva superior lateral (LSO) ipsilateral onde formam sinapses inibitórias.

A título de compreensão, tons de estímulos evocados pelos sons nas duas cócleas, portanto, convergem para os neurônios do LSO (conexão excitatória ipsilateral, através das SBCs, aVCN e inibição contralateral, através do MNTB) e as diferenças de intensidade interaurais, na chegada dos sons são usadas na determinação da localização da origem sonora.

Para que potenciais de ação pré-sinápticos desencadeiem potenciais de ação no terminal pós-sináptico, mesmo em altas frequências de transmissão, os neurônios oriundos do núcleo coclear apresentam características estruturais, fisiológicas e sobretudo, biofísicas importantes. Essas fibras se comunicam através sinapses únicas com as células principais do núcleo medial do corpo trapezoide (WANG et al., 2013), obedecendo a uma organização tonotópica, através de regiões contendo alta

densidade de mitocôndrias e zonas ativas, quando comparada às sinapses convencionais (Von GERSDORFF and BORST, 2002). Além disso, expressam isoformas de canais para Na⁺ e receptores para glutamato do tipo AMPA, além de receptores metabotrópicos para glutamato e adaptações morfológicas como o extraordinário e característico tamanho de seu terminal pré-sináptico que permite, inclusive, o acesso eletrofisiológico simultâneo nos terminais pré-sinápticos e pós-sinápticos (Von GERSDORFF and BORST, 2002; KOPP-SCHEINPFLUG et al., 2003; SCHNEGGENBURGER & FORSYTHE, 2006; LEÃO et al., 2005, TASCHENBERGER and Von GERSDORFF, 2000; BORST and Van HOEVE; GROTHE et al., 2010). Recentemente, essa sinapse tem sido extensamente usada para elucidar os mecanismos que geram e modulam a plasticidade a curto prazo.

Dessa forma, fascinante não por acaso, o Cálice de Held se predispõe como um modelo científico interessante no momento em que fornece condições adequadas para o estudo da neurotransmissão e sua modulação por compostos farmacológicos (Von GERSDORFF and BORST, 2002).

1.4. Agonista e antagonistas seletivos

O agonista adotado em nossos experimentos foi o s-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG), análogo da glicina que age sobre mGlu1 e mGlu5 se ligando ao sítio ortostérico destes receptores (ITO et al., 1992, SCHOEPP et al., 2001). Seletivo para os receptores do Grupo I (OZAWA et al., 1998), o DHPG apresenta afinidades similares tanto para mGlu5 como para mGlu1 (WISNIEWSKI E CAR, 2002). O DHPG é um agonista potente para ambas as isoformas (WISNIEWSKI and CAR, 2002; OZAWA et al., 1998), com uma fraca ou mesmo nenhuma afinidade pelos receptores

mGluR dos Grupos II e III (Y. TANABE AND NAKANISHI, 1992), ou receptores ionotrópicos para glutamato (ITO et al., 1992).

Aliado ao agonista, DHPG, o uso de antagonistas seletivos para os receptores mGluR do Grupo I permite a separação farmacológica dos efeitos mediados por esses receptores e se apresenta como uma ferramenta útil para a caracterização das funções dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I. Dessa forma, foram úteis no presente estudo, o antagonista competitivo LY367385, para mGlu₁ (CLARK et al., 1997) e o inibidor seletivo não competitivo (modulador alostérico negativo) MPEP, para mGlu₅ (GASPARINI et al., 1999; WISNIEWSKI and CAR, 2002).

O desenvolvimento e a caracterização de agonistas e antagonistas seletivos para receptores mGlu permite o estudo das funções dessa classe de receptores nas respostas fisiológicas e patológicas (NISWENDER and CONN 2010; NICOLETTI et al., 2011; HOVELSØ et al., 2012).

1.5. Estudos prévios

Em meu estudo de mestrado, explorei algumas das consequências funcionais do efeito eletrogênico da ativação de receptores mGluR do Grupo I no tronco encefálico de camundongos usando, para tal, registros intracelulares do potencial de membrana com microelétrodos pontiagudos. Medimos o impacto dos receptores mGluR-I sobre o potencial de repouso da membrana, limiar de corrente para a geração de um potencial de ação, e excitabilidade intrínseca dos neurônios do corpo trapezoide. A aplicação do agonista seletivo para mGluR-I, DHPG (0,1 mM), causou uma despolarização rápida e reversível do neurônio pós-sináptico. Esta despolarização foi significativamente inibida quando o DHPG fora aplicado na presença de antagonistas seletivos para receptores mGluR-I, MPEP (mGluR-5) e

LY367385 (mGluR-1). Para estudar o impacto desta despolarização no limiar de disparo dos potenciais de ação, estimulamos as células principais do núcleo medial do corpo trapezoide com injeções de corrente de diferentes intensidades e registramos o número de potenciais de ação gerados. O tratamento agudo com DHPG causou uma diminuição significativa no limiar de excitabilidade e aumentou o número de potenciais de ação gerados por um determinado valor de corrente injetada. Essa diminuição do limiar de excitabilidade poderia ser explicada pela despolarização no potencial de membrana nas células principais do MNTB, promovidas pela ativação dos mGluR-I. Porém, utilizando protocolos de injeção de correntes positivas e negativas, observamos que despolarizações equivalentes da membrana não mimetizaram, completamente, os efeitos de DHPG, induzindo-nos ao raciocínio que a $I_{mGluR-I}$ promove efeitos que vão além de uma simples despolarização da membrana das células do MNTB.

Os resultados experimentais descritos acima nos levaram a desenvolver um modelo de dupla modulação da atividade sináptica via receptores mGluR-I. Neste modelo, a retroalimentação negativa da liberação de glutamato reduz a depressão sináptica e a liberação excessiva de glutamato. Ao mesmo tempo, as ações eletrogênicas dos receptores mGluR do Grupo I fornecem um impulso adicional de excitação para o neurônio pós-sináptico que garante a retransmissão confiável e precisa do potencial de ação.

2. Justificativa

A expressão generalizada dos receptores mGluR no sistema nervoso central, bem como as diferentes vias de sinalização que estes receptores podem ativar, aliado a uma crescente disponibilidade de agonistas e antagonistas seletivos para as oito isoformas de mGluR, fazem com que esses receptores sejam vistos como alvos farmacológicos altamente promissores para o estudo ou tratamento de diversas doenças, incluindo epilepsias (OZAWA et al., 1998), doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Huntington (MAYER and WESTBROOK, 1987; MELDRUM, 2000), distúrbios de movimento e dor crônica (OZAWA et al., 1998) (ver LEE, 1996 para revisão). Contudo, apesar de muito estudo, os mecanismos específicos pelos quais os receptores metabotrópicos regulam a atividade neural e a função sináptica ainda estão pouco esclarecidos. Em algumas regiões, como no hipocampo, cerebelo, e também no MNTB (objeto de nosso estudo), estudos prévios demonstraram que a ativação de receptores mGluR resulta na liberação de endocanabinoide que culmina em uma retroalimentação negativa de liberação de neurotransmissor (KUSHMERICK et al., 2004). Além dessa via mediada por receptores CB1, no MNTB, a ativação de receptores mGluR-I gerou uma corrente de entrada no neurônio pós-sináptico (KUSHMERICK et al., 2004). Efeitos semelhantes foram observados em neurônios do núcleo coclear (CHANDA and XU-FREEMAN, 2011). O íon e o canal responsável para essa corrente ainda estão desconhecidos, e por esse motivo iremos nos referir à essa corrente como “ImGluR-I”, ou seja, a corrente ativada pela ação de receptores mGluR. No meu mestrado (ALHADAS, 2014), demonstramos que a ativação desses receptores despolariza o neurônio pós-sináptico e, além disso, aumenta a sua excitabilidade intrínseca, sugerindo que esses receptores podem ter um importante

papel no alto desempenho dessa sinapse. Para testar essa hipótese , no presente estudo iremos explorar melhor o papel desses receptores por meio de objetivos específicos que visam uma melhor caracterização do canal responsável pelos efeitos eletrogênicos da ativação desses receptores, via $I_{mGluR-1}$, bem como gerar conhecimento sobre as suas consequências funcionais, contribuindo para o entendimento da neurotransmissão não somente nas vias auditivas, mas em todos os sistemas onde os mGluR agem.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Determinar os mecanismos e o impacto funcional do aumento da excitabilidade pós-sináptica na neurotransmissão, promovida por receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I nas células principais do núcleo medial do corpo trapezoide de camundongos.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar a participação de cada subtipo de receptor mGluR-I na geração da corrente $I_{mGluR-I}$.
2. Determinar se o aumento da excitabilidade advém tão somente da alteração do potencial de membrana
 - 2.1. Injeções de corrente positiva mimetizam os efeitos de DHPG em sua ausência?
 - 2.2. Injeções de corrente negativa anulam o efeito de DHPG em sua presença?
3. Identificar o íon responsável pela $I_{mGluR-I}$ de acordo com:
 - 3.1. O perfil farmacológico da corrente dependente de receptores mGluR-I.
 - 3.2. A dependência de voltagem
 - 3.3. A alteração da resistência de membrana.
4. Determinar o impacto da $I_{mGluR-I}$ na neurotransmissão do MNTB, medindo seu efeito na:
 - 4.1. Robustez da neurotransmissão quando a sinapse é estimulada em alta frequência
 - 4.2. Plasticidade sináptica de curta duração
 - 4.3. Amplitude dos EPSPs

4. Material e métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57b neonatos, de 8 dias ou 18 dias pós-natal, sem distinção entre macho ou fêmea, mantidos em microisoladores sob ar filtrado, temperatura controlada de 23°C e ciclo vigília de claro escuro 12h/12h, fornecidos pelo CEBIO –Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA-UFMG (protocolo número 159/2015).

4.2. Fármacos, reagentes e soluções

Onde indicado no texto, os seguintes fármacos foram aplicados: Tetrodotoxina (TTX, 1 μ M), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 1 μ M), Dizocilpine (MK801, 10 μ M), (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG, 10-100 μ M), (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385 ; 100 μ M), cloridrato de 2-metil-6-(feniletinil) piridina (MPEP, 10 μ M). TTX, CNQX, MK801, LY367385, MPEP e DHPG eram da Tocris (Bristol, UK).

Todos os sais utilizados foram de pureza analítica obtidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

4.3. Preparação das fatias contendo o MNTB

Os animais foram sacrificados por decapitação, o cérebro removido e imediatamente imerso em solução aCSF resfriado contendo (em mM): NaCl (125), KCl (2.5), CaCl₂ (0.1), MgCl₂ (2.0), NaCO₃ (25), NaH₂PO₄ (1.25), Glicose (25) ácido ascórbico (0.4), piruvato de Na⁺ (2) e myo-inositol (3), pH=7.4 quando saturado com

a mistura gasosa carbogênio (5% CO₂ / 95% O₂). Em seguida, o tronco encefálico isolado era fixado com cola a base de éster de cianoacrilato na plataforma do micrótomo de lâmina vibratório (“vibrátomo”, modelo Leica VT1000S). O tecido era então, cortado em espessura de 0,19 mm e as fatias contendo o núcleo medial do corpo trapezoide eram transferidas para uma câmara contendo solução aCSF para registro condicionado em temperatura fisiológica. A solução aCSF de registro dispõe da mesma composição do aCSF para corte exceto pelas concentrações de Ca²⁺ (2 mM) e Mg²⁺ (1 mM). As fatias obtidas foram incubadas em aCSF a 37°C em banho-Maria por 60 minutos visando a recuperação do trauma mecânico sofrido durante o fatiamento. Após esse tempo, as fatias eram mantidas em temperatura ambiente (± 25°C) até o término do dia experimental.

4.4. Estratégia experimental

Em todos os experimentos desse estudo foi utilizada apenas uma célula por fatia, garantindo maior confiabilidade nas respostas da amostra experimental.

Durante os experimentos, as fatias eram perfundidas com aCSF para registro. Nos experimentos com estimulação das fibras aferentes, a solução externa continha concentrações de 1,2 mM de Ca²⁺ e 1,8 mM de Mg²⁺, com o intuito de aproximar a concentração de Ca²⁺ dos níveis fisiológicos. Importante salientar que as falhas que aparecem em nossos registros em fatias também são vistas em registros *in vivo* (LORTEIJE et al, 2009).

4.4.1. Eletrofisiologia

Registros de Whole-cell voltage e current clamp foram feitas nos neurônios principais do núcleo medial do corpo através de um amplificador Axon Axopatch 200B

(Molecular Devices, EUA). Os sinais foram filtrados em 5 kHz antes de serem digitalizados com intervalos de amostragem de 10 μ s através de um conversor A/D Digidata 1320A de 16 bits (MDS Analytical Technologies) controlado pelo programa da Strathclyde Electrophysiological Software, gentilmente fornecido pelo John Dempster, University of Strathclyde. Os neurônios principais do núcleo medial do corpo trapezoide foram identificados visualmente por microscopia através de uma objetiva de imersão de 40x e uma câmera CCD. As fatias foram continuamente perfundidas com aCSF oxigenado (1,5-2 ml/min) utilizando uma bomba peristáltica e mantido em 25 °C através do uso de um aquecedor de perfusão.

As pipetas de patch foram fabricadas de vidro de borossilicato (WPI, Sarasota, FL) num estirador vertical Narishige (PP-830; Tóquio, Japão). As resistências das pipetas, tanto para voltage quanto para current clamp, variaram entre 2.5 e 3.5 M Ω quando preenchidas com a solução de pipeta que continha (em mM): 125 K-gluconato, 20 KCl, 10 Na₂-fosfocreatina, 10 HEPES, 0,5 EGTA, 4 ATP-Mg, 0,3 GTP, pH 7,2 com KOH. O potencial de junção líquida entre a solução da pipeta e o aCSF do banho, criado principalmente pela difusão lenta do ânion gluconato quando comparado com os demais tipos de íons, foi calculado em -9 mV utilizando a ferramenta própria do pClamp (MDC). Para corrigir esse erro, o potencial registrado pelo amplificador, quando a pipeta era submersa na solução de banho, foi ajustado, utilizando o controle "pipette offset", em -9 mV logo antes do contato da ponta da pipeta com a célula. As pipetas foram revestidas com cera dental para reduzir o ruído elétrico e a capacitância da pipeta. A resistência de acesso nos registros foi sempre <20 M Ω e os erros causados por essa resistência, corrigidos, quando necessário, durante a análise. Quando utilizada, a correção foi feita no valor do potencial de membrana usando a relação $V_{\text{Corr}} = V_{\text{Cmd}} - I_{\text{m}} R_{\text{a}}$, onde V_{Corr} é o potencial corrigido, V_{Cmd} é o potencial

nominal do amplificador de voltage clamp, I_m é o valor da corrente medida e R_a é o valor da resistência de acesso.

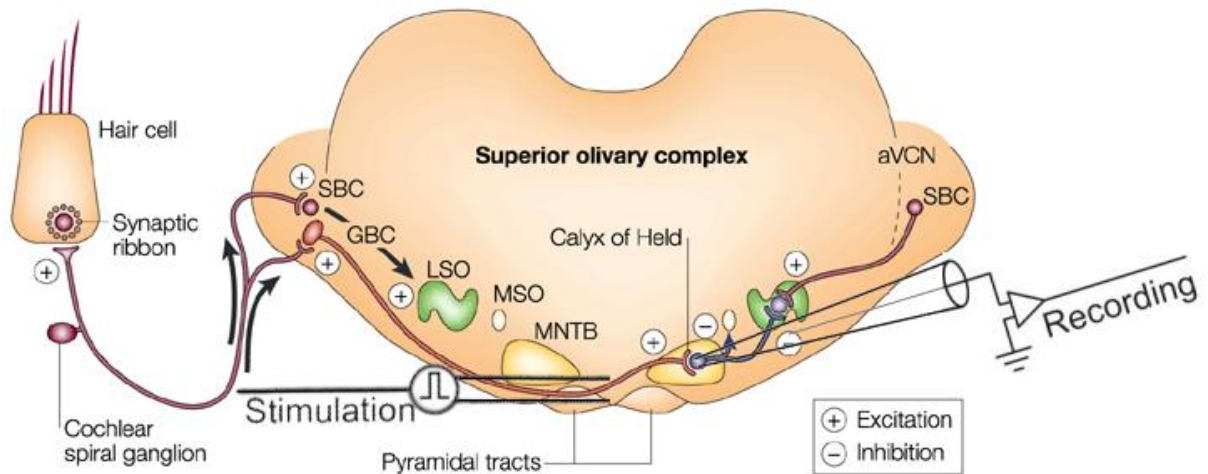
Os trens de estímulo foram gerados pela saída digital da Digidata 1320A, acionada por protocolos do Strathclyde Electrophysiology Software. Esse sinal foi utilizado para controlar um eletroestimulador Grass SD9.

A obtenção dos dados vindos da resposta passiva dos neurônios foi feita através da aplicação de pulsos hiperpolarizantes de 50 pA e duração de 200 ms. Já as respostas evocadas eram obtidas pela realização de protocolos de injeção de corrente em degraus que se acresciam de 50 pA com duração de 400 ms.

As células do núcleo medial do corpo trapezoide, escolhidas para o registro com estimulação apresentavam, em registros extracelulares, indicativo do potencial de ação pós-sináptico (AP) em resposta a estimulação aferente, como já bem descrito (BORST et al., 1995; LORTEIJE et al., 2009).

A solução de pipeta usada nos registros extracelulares foi a mesma descrita na solução externa (em mM): NaCl (125), KCl (2.5), CaCl₂ (1.0), MgCl₂ (2.0), NaCO₃ (25), Na₂H₂PO₄ (1.25), Glicose (25) ácido ascórbico (0.4), piruvato de Na⁺ (2) e myo-inositol (3).

Nos experimentos com estimulação das vias aferentes do núcleo medial do corpo trapezoide, um eletrodo de estímulo, confeccionado com terminais de prata, cloretado, foi posicionado sobre a linha média junto a borda ventral da fatia de modo a estimular as aferências oriundas do núcleo coclear anteroventral, como exibido na **Figura 4**. O protocolo de estímulos compreendeu trens de estímulos supralimíares (1.5V a 3V, ajustada para ser 50% acima do valor de limiar encontrado em cada célula) em alta frequência (100 Hz) e duração de 0.1 ms, aplicados por um estimulador Grass SD9 (EUA).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 4. Processamento de informação auditiva no tronco encefálico. O diagrama mostra o circuito do Complexo Olivar Superior auditivo 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). (adaptado de Von GERSDORFF and BORST, 2002).

Alguns registros experimentais foram obtidos por meio de protocolos de voltage clamp com protocolos de rampa visando determinar a relação corrente-voltagem (I-V) da $I_{mGluR-1}$. Neste protocolo, o potencial era deslocado repentinamente para -120 mV e alterado linearmente (80 mV/s) até -30 mV, resultando em uma curva I-V que permitiu identificar regiões de alta e baixa condutância. A subtração das curvas I-V obtidas em controle das curvas obtidas durante a aplicação de DGPH (10^{-4} M) foi usada para avaliar o potencial de reversão da $I_{mGluR-1}$.

4.4.2. Análise

As análises foram feitas nas diferenças dos valores de potencial de membrana ou corrente de membrana, medidas em trechos estáveis específicos padronizados,

situados próximos à adição da droga testada, em linhas de base estáveis e igualmente realizada em todos os registros em cada um dos grupos experimentais.

Exceto aonde descrito no texto, a análise estatística experimental não foi fundamentada em um estudo de população e sim em grupos de registros onde todas as fases do experimento (aCSF / aCSF + antagonistas / aCSF + antagonistas + agonistas / aCSF) foram executadas em uma mesma célula de forma a permitir que a análise fosse padronizada e, dessa forma, igualmente realizada em todos os registros em cada um dos grupos experimentais.

Os dados eletrofisiológicos foram analisados pelo software "IgorPro 7" (Wavemetrics, Lake Oswego, OR). Os dados são reportados como média \pm SEM. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p, calculado pelo teste t de Student, foram $< 0,05$.

5. Resultados

5.1 Efeito de DHPG no potencial de membrana e corrente de membrana em neurônios do MNTB

Como descrito na Introdução, experimentos prévios, realizados utilizando registros intracelulares com microelétrodos de alta resistência, mostraram que a ativação de receptores mGluR do Grupo I via DHPG despolariza os neurônios do MNTB. Repetimos esse experimento utilizando agora registros de Whole-cell patch clamp, modalidade current clamp, e observamos efeitos semelhantes ao que foi observado com registro intracelular (**Figura 5A**). Em média, o DHPG despolarizou a membrana em 7.2 ± 1 mV (N=10) com recuperação significativa após a lavagem da droga. Para fins comparativos, o efeito de DHPG observado em registros com microelétrodos de alta resistência, foi de 5.7 ± 0.5 mV (N=16; ALHADAS, 2014). Concluímos que o uso da técnica de whole-cell, com a consequente diálise intracelular, não prejudica o estudo dos efeitos da ativação de receptores mGluR nesta preparação.

Em seguida, testamos o efeito de DHPG sob voltage clamp, com o potencial de membrana mantido em -60 mV (**Figura 5B**). Coerente com o efeito despolarizante da droga descrito acima, na condição de voltage clamp a aplicação de DHPG gerou um deslocamento negativo (i.e., de entrada) da corrente de manutenção. Em média, a corrente ativada pelo DHPG foi de -70 ± 8 pA (N=10).

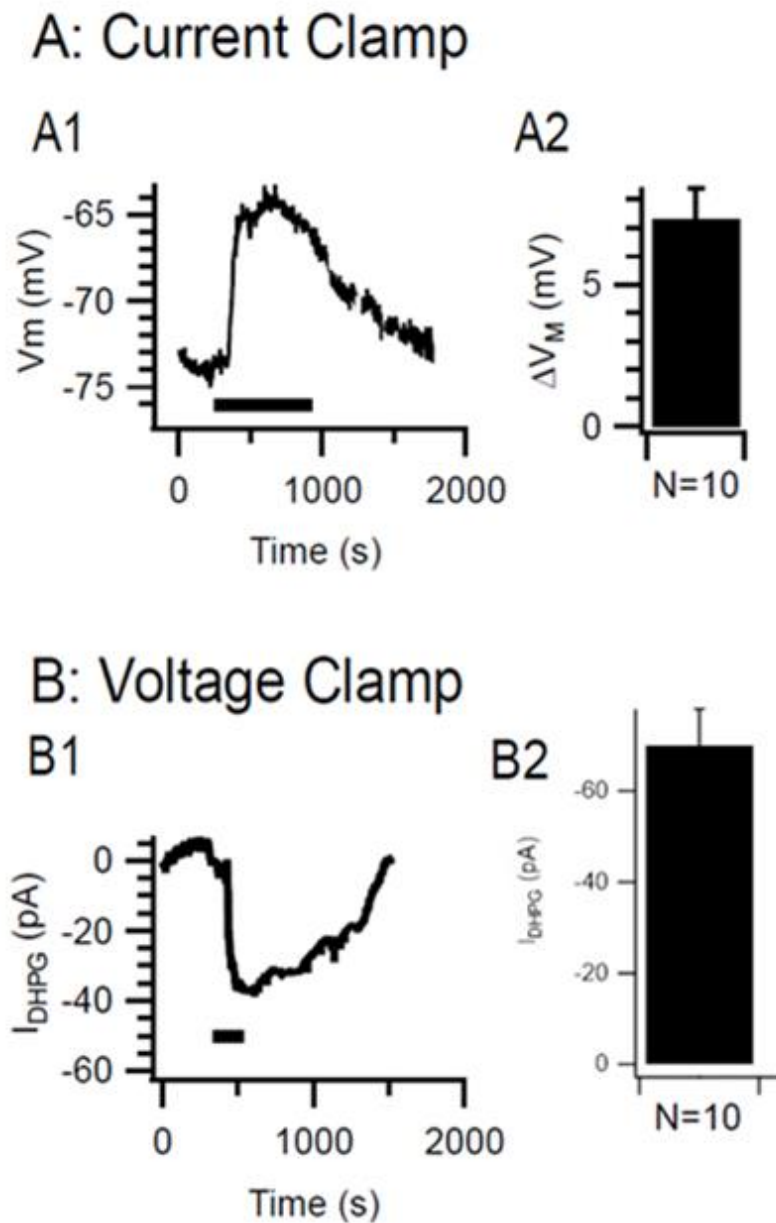


Figura 5 – Resposta de duas células representativas à aplicação de DHPG. **A1.** Registro em patch clamp whole cell, current clamp exibindo a resposta de uma célula representativa à aplicação de DHPG. **A2.** Efeito médio promovido pelo DHPG sobre o potencial de membrana das células do MNTB. Média \pm SEM = 7.2 ± 1 mV (N=10). **B1.** Registro em patch clamp whole cell, voltage clamp exibindo o deslocamento negativo da corrente em detrimento da aplicação de DHPG em uma célula representativa com potencial de membrana fixado em -60mV. **B2.** Efeito médio promovido pelo DHPG na corrente de membrana das células do MNTB Média \pm SEM = -70 ± 8 pA (N=10).

5.2 Qual subtipo de receptor medeia a corrente $I_{mGluR-I}$?

Como descrito na Introdução, o DHPG é um agonista para ambas as isoformas dos receptores mGluR do Grupo I, mGlu₁ e mGlu₅. Infelizmente, não existem agonistas disponíveis que são seletivos para um ou outro desses receptores. Contudo, o LY367685 e o MPEP são descritos como antagonistas seletivos para mGlu₁ e mGlu₅, respectivamente. Para determinar o tipo de receptor envolvido nos efeitos de DHPG descritos acima, medimos o efeito de DHPG quando aplicado em condições controle, ou após o pré-tratamento com MPEP (10 μ M) (**Figura 6**). Observamos que a corrente gerada pelo DHPG foi significativamente menor quando medida na presença de MPEP [-70 ± 8 pA, N=6 (Controle) vs -44 ± 9 pA, N=6 (MPEP)] ($p < 0,05$). Porém, cerca de 60% da corrente gerada pela DHPG foi insensível a MPEP, sugerindo a participação do receptor mGlu₁. Para testar isso, aplicamos o DHPG após o pré -tratamento conjunto de MPEP e LY367685 e observamos que o efeito de DHPG foi abolido (N=4). Com base neste resultado, concluímos que a corrente gerada pela DHPG observada em nossos experimentos é mediada por receptores mGluR do Grupo I, nos permitindo denomina-la $I_{mGluR-I}$. Além disso, a inibição apenas parcial do efeito pelo MPEP indica que ambas as isoformas, mGlu₁ e mGlu₅, contribuem para a geração desta corrente.

Voltage Clamp

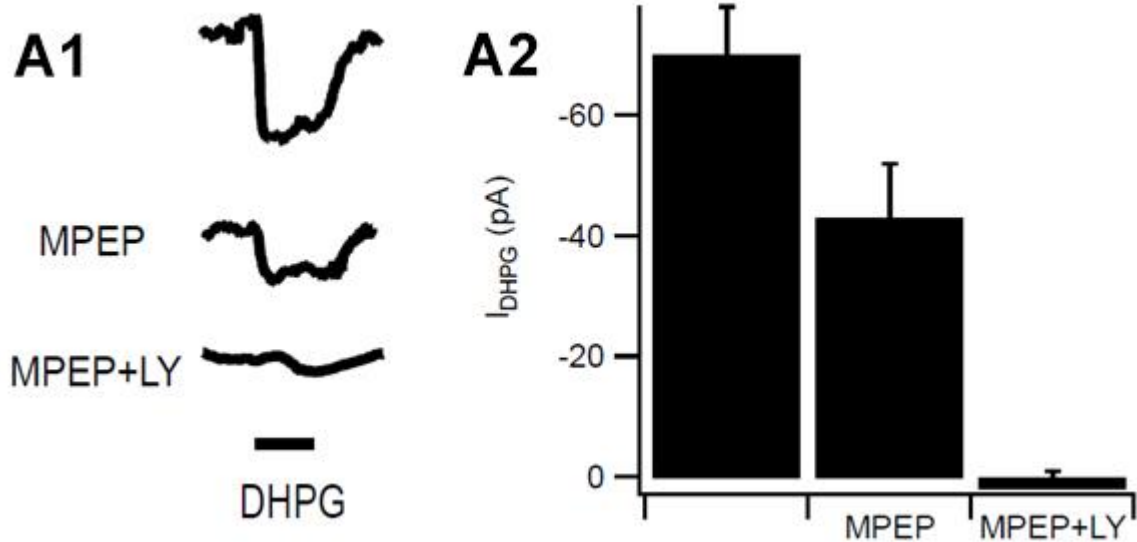


Figura 6 – Respostas de células representativas a aplicação de DHPG isolado ou concomitante a aplicação dos antagonista seletivos para mGluR-I, LY367385 e MPEP. **A1**. Resposta observada em whole cell patch clamp, voltage clamp em uma célula representativa nas condições de controle, pré tratamento com o antagonista mGlu₅, MPEP e pré tratamento com ambos os antagonistas mGluR-I, MPEP e LY367385. **A2**. Resumo das correntes geradas por DHPG (n=14), inibição parcial de MPEP e a inibição total por MPEP + LY367385 (n=4).

5.3 Qual é a base iônica da $I_{mGluR-I}$?

Após concluirmos que a corrente elicitada pelo DHPG ($I_{mGluR-I}$) advinha dos receptores mGluR do Grupo I, o próximo passo foi determinarmos a base iônica desta corrente. Para tanto, propusemos um conjunto de quatro grupos de experimentos. Os dois primeiros consistiram no bloqueio farmacológico de certos canais candidatos a serem os responsáveis a mediar esta corrente, os dois subsequentes permitiram a aferição do potencial de reversão e dos valores de resistência de membrana, permitindo, a nós, determinar quais canais e íons estariam sendo responsáveis pela $I_{mGluR-I}$.

Dessa forma, a primeira série de experimentos foi projetada com o intuito de testarmos a hipótese de que a corrente fosse mediada por canais de Na⁺ voltagem dependentes. Sendo assim, foi organizado um conjunto de registros com o seguinte desenho experimental: Controle (aCSF) / antagonista NaV (TTX (1 μM)) / antagonista + agonista (TTX (1 μM) + DHPG (10 μM)) / Lavagem (aCSF). A medida da corrente de membrana foi feita em trechos estáveis próximos às trocas de solução, na presença de TTX, durante a aplicação do DHPG concomitante a presença de TTX e após a lavagem do DHPG.

A análise dos dados obtidos no experimento nos permitiu afirmar que o bloqueio de canais NaV não produziu efeito algum sobre a corrente $I_{mGluR-I}$, como mostrado na **Figura 7A**.

Na mesma linha de raciocínio, consideramos a hipótese de que o efeito observado mediante ativação dos mGluR-I pudesse estar sendo mediado ou modulado por receptores ionotrópicos para glutamato (NMDA, AMPA e Cainato). Para testarmos essa hipótese, de forma semelhante ao protocolo usado nos experimentos com TTX, organizamos um conjunto de registros com o seguinte desenho experimental: Controle (aCSF) / antagonistas (CNQX (10 μM) + MK801 (10 μM)) / antagonistas + agonista (CNQX (10 μM) + MK801 (10 μM) + DHPG (10 μM)) / Lavagem (aCSF).

Esse conjunto de experimentos nos permitiu concluir que o bloqueio dos receptores iGluR (AMPA/ Cainato e NMDA) também não alterou de forma significativa a corrente $I_{mGluR-I}$ quando comparado ao controle (**Figure 7A**).

Em sequência, ainda para elucidarmos a base iônica da corrente elicitada pela ativação dos mGluR do Grupo I, propusemos um conjunto de experimentos baseados

em protocolos de rampa, produzindo uma variação lenta (duração de 2 s) do potencial de membrana de -120 mV para -30 mV, nas situações de controle, durante a aplicação do agonista metabotrópico glutamatérgico (DHPG) e após lavagem. Esse protocolo nos permitiu medir o valor da corrente em função do potencial de membrana e identificar o potencial de reversão da $I_{mGluR-I}$ pela subtração de curvas I-V obtidas antes e durante a aplicação de DHPG (10 μ M).

Para tanto, a **Figura 7B** exhibe os dados brutos de um registro representativo da corrente de membrana ($V_m = -60$ mV) ao longo do tempo, mediante execução de protocolos de rampa (linhas verticais cinzas) nas situações de controle, durante aplicação do agonista mGluR-I (DHPG) e após a lavagem.

As análises realizadas com os dados obtidos pelo experimento acima, deram origem a duas curvas de relação corrente-voltagem (I-V), mostradas na **Figura 7C**. A curva azul exhibe a relação I-V na condição de controle e a curva verde exhibe a média dos valores obtidos pelas rampas registradas na presença de DHPG. A parte inferior da mesma figura exhibe o resultado da subtração das curvas mencionadas acima. O que podemos perceber é que a corrente gerada pela ativação de receptores mGluR-I apresenta uma relação I-V que tende a zero à medida que o potencial de membrana aproxima-se do potencial de equilíbrio de K^+ (-101 mV).

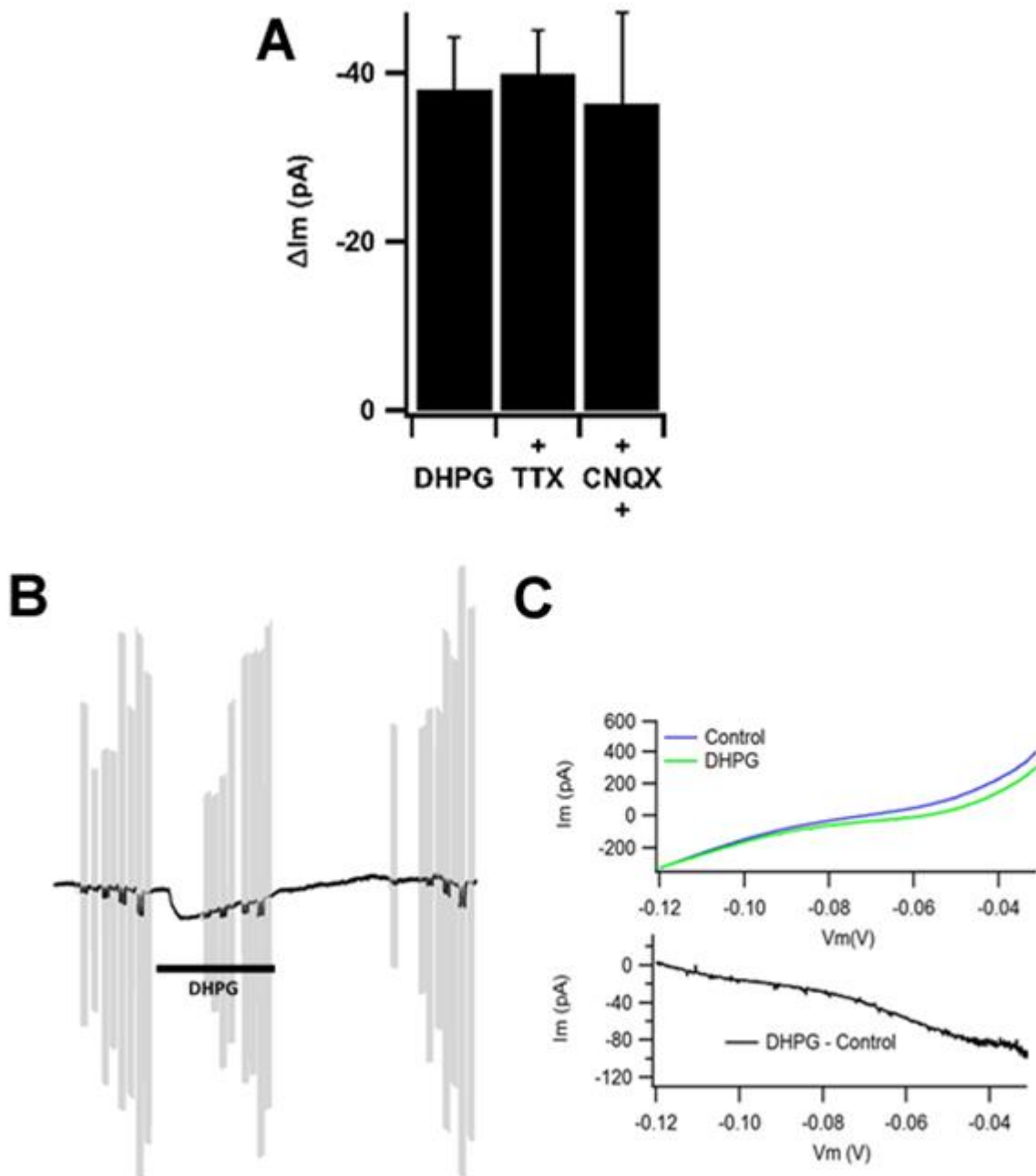


Figura 7 – Identificação da corrente ativada por DHPG **A.** A administração de antagonistas seletivos para NaV e iGluRs concomitante a DHPG, não altera o efeito da ImGluR-I na corrente de membrana. **B.** Mudança na corrente de membrana mediante a aplicação de DHPG (10 μ M), durante a barra preta. O potencial de holding foi de -60 mV. As linhas cinzas verticais são correntes evocadas por protocolos de rampa. **C.** Corrente de membrana durante os protocolos de rampa no controle (Azul) e durante o tratamento com DHPG (10 μ M) (Verde). A parte inferior mostra a subtração das duas curvas. Observar que a curva tende a zero em potenciais bem negativos.

Ainda na tentativa de elucidarmos a base iônica da $I_{mGluR-I}$, pulsos de corrente hiperpolarizantes, com amplitudes de -50 pA e duração de 200 ms foram aplicados na parte inicial durante todos os experimentos acima em períodos que se repetiam a cada dois segundos. O resultado disso é o deslocamento do potencial de membrana para valores mais negativos. A análise do tamanho desse deslocamento, quando comparado nas situações de controle, aplicação do agonista mGluR-I (DHPG) e lavagem nos permitiu calcular a resistência da membrana. E o que podemos perceber, como mostrado na **Figura 8**, é que durante a aplicação do agonista houve um aumento da resistência de membrana, conseqüente à redução da condutância da membrana, nos sugerindo que os efeitos observados até o momento podem advir do bloqueio de um canal para K^+ .

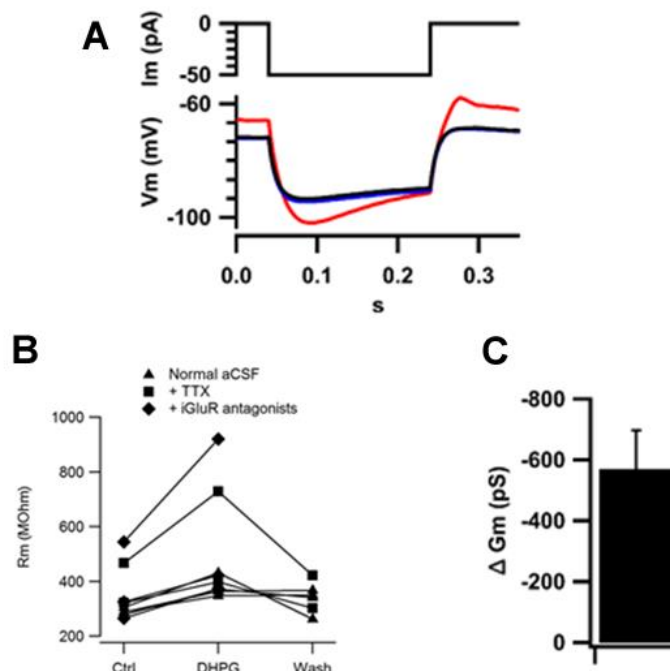


Figura 8 – A ativação dos receptores metabotrópicos para glutamato do Grupo I nos neurônios principais do MNTB aumenta a resistência da membrana. **A.** Hiperpolarização da membrana dos neurônios principais do MNTB induzida por injeção de corrente (-50 pA) no controle aCSF (preto), durante a aplicação de DHPG (vermelho) e após lavagem de DHPG do banho (azul). **B.** Resumo da diminuição da condutância da membrana mediante ativação dos mGluR-I. **B.** Efeitos do DHPG, na resistência de membrana do neurônio MNTB, quando aplicado isolado ou concomitante aos antagonistas para NaV, TTX (1 μ M) e iGluRs, CNQX (1 μ M) e MK801 (10 μ M). **C.** Resumo da diminuição da condutância da membrana mediante ativação dos mGluR-I.

5.4 Alterações de excitabilidade

Seria razoável esperar que a despolarização do potencial de membrana e o aumento da resistência da membrana, conjuntamente, aumentassem a excitabilidade da célula, tornando mais fácil gerar um potencial de ação. Contudo, é notória a capacidade de uma despolarização prolongada produzir um aumento na inativação de canais para Na⁺ dependentes de voltagem. Portanto, é difícil prever o que seria o efeito resultante de todos esses fatores na excitabilidade dos neurônios. Para determinar tais efeitos, medimos a reobase (corrente mínima necessária para gerar um potencial de ação) na mesma célula em situação controle e na presença de DHPG. A **Figura 9** mostra um exemplo típico, representativo de 6 experimentos semelhantes. Chamamos a atenção para redução da reobase durante a aplicação de DHPG.

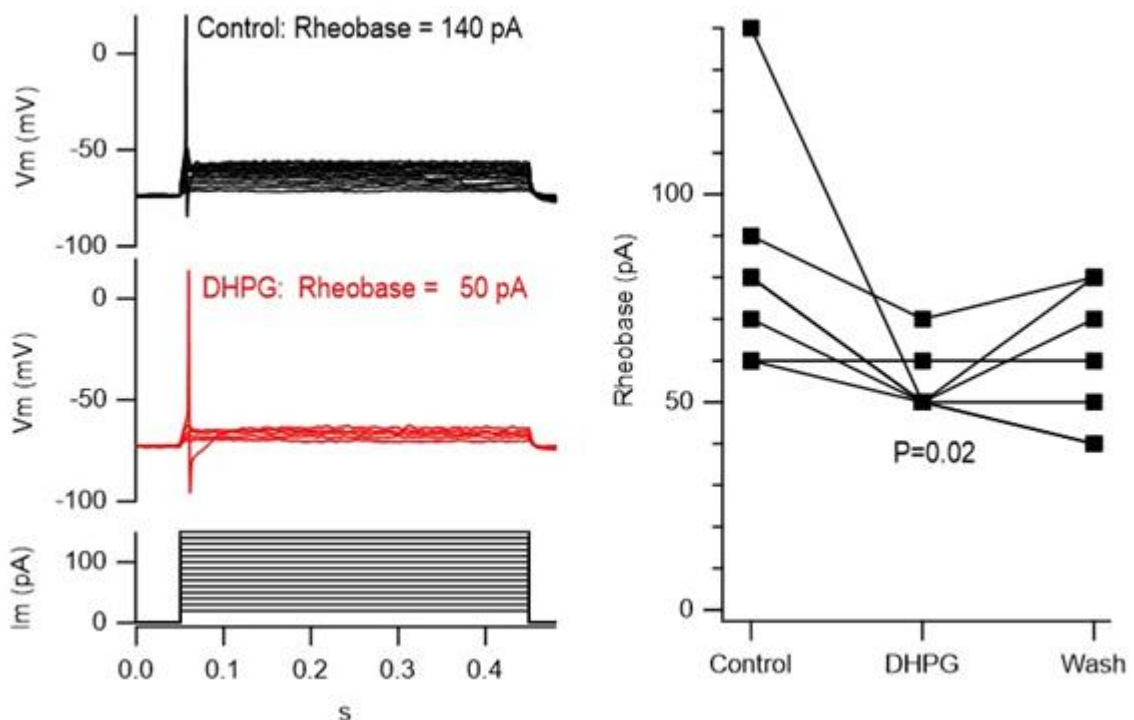


Figura 9 – Diminuição da reobase mediante ativação dos mGluR-I. (Esquerda) Célula representativa demonstrando a diminuição da reobase na presença de DHPG. (Direita) Comportamento de 6 experimentos semelhantes ao da direita, mostrando os efeitos de DHPG na reobase nas condições de controle, presença de DHPG e lavagem.

Dessa forma, a **Figura 10** exhibe os dados do grupo experimental (N=6) onde protocolos de injeção de corrente positiva ou negativa intracelular modificam os valores de membrana das células do MNTB com o objetivo de reproduzirem o efeito da ativação dos mGluR-I pelo DHPG e protocolos de degraus de injeção de corrente positiva (steps) medem os valores da reobase. Fica evidente que se na ausência do DHPG, as modificações no potencial de membrana reproduzirem os achados da ativação dos mGluR-I, os efeitos observados podem ser tão somente devidos a despolarização.

Sabendo que as alterações promovidas no potencial de membrana, pelo DHPG, foram da ordem de 7.2 ± 1 mV (N=10), propusemos uma sequência de seis protocolos, administrados na mesma célula, num conjunto de seis células, com o intuito de alterarmos o potencial de membrana nas mesmas proporções daquelas alterações observadas pela adição do agonista glutamatérgico metabotrópico e verificarmos os valores da reobase. Em **S1**, observamos a situação de controle, **S2** denota a situação de injeção de corrente positiva capaz de alterar o potencial de membrana em +5mV, **S3** denota a situação de injeção de corrente positiva capaz de alterar o potencial de membrana em +10mV, **S4** mostra a modificação no potencial de membrana obtido pela administração de DHPG (10 μ M) no banho, **S5** evidencia a injeção de corrente negativa, ainda na presença de DHPG, capaz de restaurar o valor do potencial de membrana para aqueles valores anotados momentos antes da aplicação do agonista DHPG, **S6** denota a lavagem da droga do banho. Em todas as situações, aliadas as injeções de corrente, que produziram as modificações no potencial de membrana das células principais do MNTB, foram realizados protocolos de steps contendo 15 degraus de 10 pA em 10 pA e duração de 400 ms.

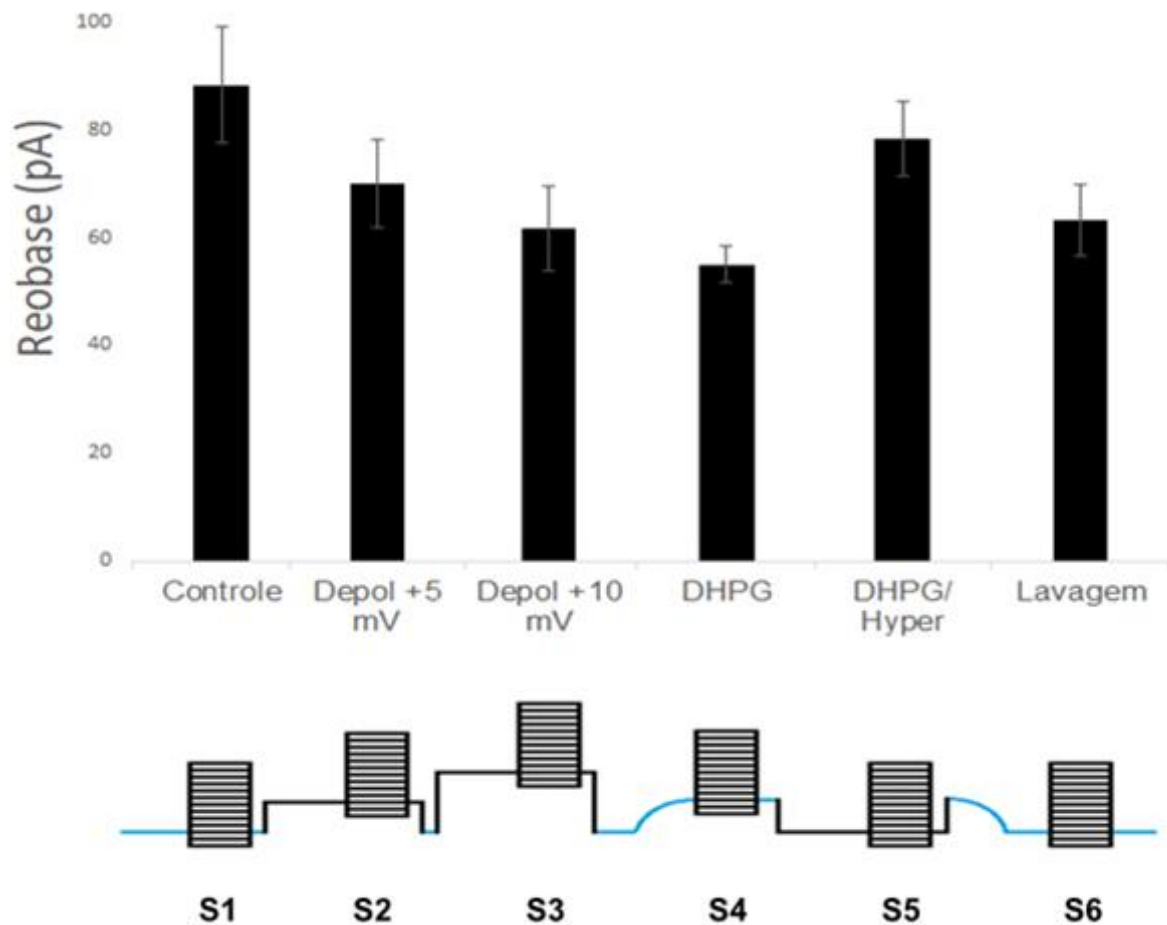


Figura 10 – Injeções de correntes positivas e negativas em comparação com efeito da ativação dos mGluR-I no MNTB. (Parte superior) Média dos valores da rebase obtidos durante o experimento com injeção de correntes positivas e negativas, demonstrando os efeitos da presença de DHPG (S4) em comparação com as situações de controle (S1), despolarização em 5 mV (S2), despolarização em 10 mV (S3), presença de DHPG + hiperpolarização (S5), Lavagem (S6). (n=6). (Parte inferior) Esquema ilustrando o protocolo de injeção de corrente (linha azul – potencial de membrana na ausência de injeção de corrente ($I=0$) na situação controle ou durante tratamento com DHPG. Linha preta – Alteração do potencial de membrana para mais ou para menos mediante injeção de corrente positiva ou negativa intracelular). Apesar da tendência de diminuição da rebase mediante ativação dos mGluR-I, mostrada no gráfico de barras, não houve diferença estatística entre as injeções de corrente e a ativação promovida pelo DHPG.

Os achados indicam que apesar de termos obtidos valores de rebase menores em **S4** mediante a aplicação do agonista glutamatérgico DHPG, como mostrado pelo gráfico de barras da **Figura 10**, os testes estatísticos não comprovaram a diferença

entre a aplicação do agonista (**S4**) e uma despolarização via injeção de corrente capaz de alterar o potencial de membrana das células do MNTB em cinco (**S2**) ou dez milivolts (**S3**), sugerindo que a principal causa da redução do reobase é a despolarização. Coerente com essa ideia, a redução do valor da reobase, causada pelo DHPG, pode ser quase completamente revertido pela aplicação de uma corrente hiperpolarizante que restaurou o potencial de membrana para o valor de controle. medido na presença de DHPG.

Os resultados, portanto, indicam que o principal efeito da ativação dos receptores mGluR-I na reobase são mediados pela despolarização.

5.5 Qual é o significado da $I_{mGluR-I}$ na neurotransmissão do MNTB?

Os dados apresentados até o momento descrevem um efeito direto e significativo da $I_{mGluR-I}$ na excitabilidade das células principais do MNTB. Interessados no significado da $I_{mGluR-I}$ na neurotransmissão, nós abordamos, a partir de agora, as consequências funcionais da ativação de mGluR-I nas células principais do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB).

Para que tivéssemos condições experimentais que reproduzissem com mais exatidão as condições fisiológicas, as concentrações de cálcio no meio extracelular foram modificadas para valores na ordem de 1,2 mM em contraste com os 2.0 mM usados em todos os demais experimentos descritos anteriormente.

Sendo assim, em um primeiro conjunto de experimentos, investigamos as alterações funcionais que ocorrem na sinapse do cálice de Held em resposta as alterações promovidas pelo agonista glutamatérgico metabotrópico do Grupo I, DHPG, mediante a estimulação das aferências dos núcleos cocleares anteroventrais concomitante a gravações em Whole-cell patch clamp, current clamp, nas células

principais do núcleo medial do corpo trapezoide, em animais de dezoito dias, nas situações de controle, DHPG e lavagem,

Um eletrodo com terminais de prata posicionado na linha média, próximo a borda ventral da fatia, gerou trens de 100 estímulos com frequência de 100 Hz, repetidos a cada sessenta segundos, em tensões que variavam entre 1,5 a 3V definidas em 50% acima do valor do limiar de disparo encontrado para cada célula, aplicados nas fibras aferentes oriundas dos núcleos cocleares anteroventrais desencadeando potenciais de ação pré-sinápticos que elicitaram potenciais pós-sinápticos (EPSP) sub ou supralimiais nas células principais do MNTB. A **Figura 11A**, então, exibe um trecho de um registro bruto do potencial de membrana durante a estimulação do terminal pré-sináptico nas situações de controle (parte superior) e aplicação do agonista DHPG (10 μ M) (parte inferior). É possível perceber o artefato dos estímulos elétricos, apresentados como pequenas inflexões rápidas, seguidas, em maior proporção, por potenciais pós-sinápticos supralimiais (grandes linhas verticais), tanto nos registros de controle quanto na aplicação do agonista, DHPG.

Deve ser notado que alguns potenciais de ação pré-sinápticos não dão origem a potenciais pós-sinápticos supralimiais, mas sim resultam em potenciais pós-sinápticos sublimiais, desenhados como pequenas ondulações positivas que preenchem os espaços entre os estímulos elétricos (**Figura 12A**) que serão denominados “falhas”.

Ao compararmos, na **Figura 11**, os potenciais de ação das porções superior e inferior, fica evidente a notável diminuição da frequência de falhas dos potenciais de ação supralimiais pós-sinápticos promovida pela aplicação do agonista, DHPG, ativando receptores mGluR-I. Deixando claro que a ativação dos receptores

metabotrópicos do Grupo I melhora as propriedades de respostas evocadas dessa sinapse.

A análise dos dados apresentados acima permitiu identificar e quantificar as falhas (potenciais pós-sinápticos sublimiáres) e os sucessos (potenciais pós-sinápticos supralimiáres) e deu origem ao raster apresentado na **Figura 11B**, que permite a completa análise visual de um único experimento, como o descrito acima, consistindo, na região de interesse, de 50 sweeps de 100 estímulos aplicados a frequência de 100 Hz com intervalos de 60 s. Os potenciais de ação pós-sinápticos elicitados com sucesso, após o protocolo supracitado, são plotados como pontos pretos e as falhas estão indicadas em vermelho. A banda cinza, no intervalo entre as gravações 20 – 30, indica a presença do agonista glutamatérgico metabotrópico, DHPG, no banho. Nessa região é possível identificar visualmente uma redução do número de falhas (i.e., um maior número de potenciais de ação) devido a ativação dos receptores mGluR-I.

Na Figura 11C, plotamos os dados obtidos no registro descrito acima em uma curva que exibe o percentual de falhas em função do tempo, exibido na forma de protocolos de estímulo aplicados a cada 60 s (a barra preta indica aplicação do agonista DHPG). A curva exibe a redução das falhas nos potenciais de ação pós-sinápticos, elicitados pela estimulação aferente, em resposta a ativação dos mGluR-I pelo agonista DHPG (N=5).

Dessa forma, em conjunto, os resultados descritos acima indicam uma redução das falhas, o que denota melhora da capacidade de resposta dessa sinapse mediante ativação dos receptores metabotrópicos do Grupo I. Fato que se repete nas cinco células do grupo experimental, como demonstrado pela **Figura 11D**.

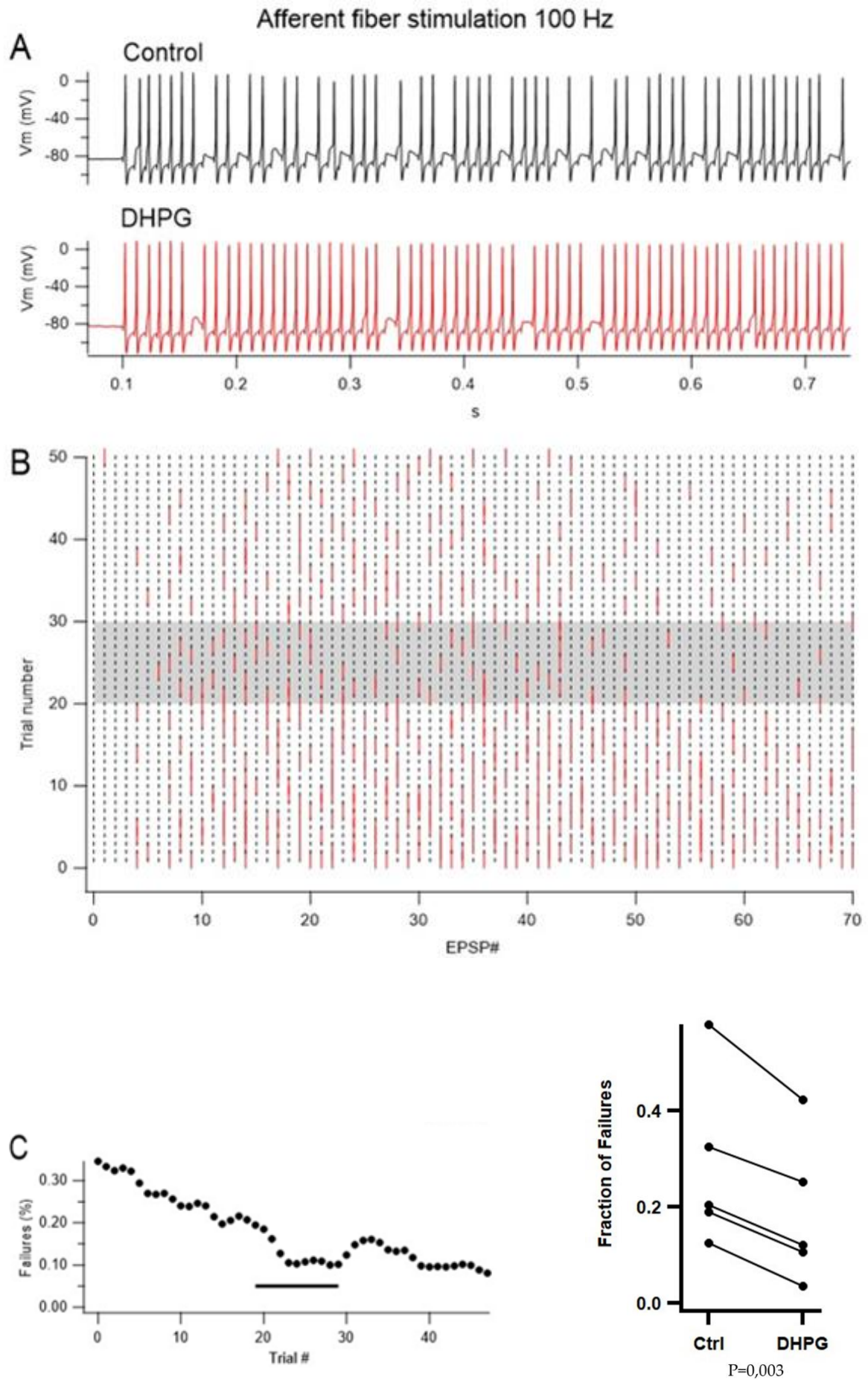


Figura 11 – A ativação dos mGluR-I aumenta o número de potenciais de ação mediante estimulação em alta frequência nos neurônios do núcleo medial do Corpo trapezoide.

A. Resposta EPSP/ AP em neurônios do MNTB durante a estimulação prolongada em alta frequência (100 estímulos a 100 Hz). Superior: Controle, parte inferior: durante a aplicação do DHPG.

B. A ativação dos mGluR-I reduz o número de falhas dos potenciais de ação. O raster acima resume um experimento onde os pontos vermelhos representam falhas nos potenciais de ação pós-sinápticos após estimulação a 100Hz. A zona cinza denota a aplicação de DHPG. É possível perceber um aumento do número de potenciais de ação pós-sinápticos supralimiais durante a ativação dos receptores glutamatérgicos do Grupo I.

C. DHPG (10 μ M) reduz o percentual de falhas de potenciais de ação nos neurônios do MNTB. Tempo de evolução dos protocolos de estímulo e a porcentagem de falhas (ou seja, EPSPs que não geraram um AP) antes, durante (barra cinza) e após a aplicação do DHPG.

D. Resumo da diminuição do número de falhas pela ativação dos mGluR-I.

A análise dos dados acima foi feita como demonstrado na **Figura 12A** que exhibe na parte superior um pequeno trecho de um único registro bruto contendo os eventos obtidos no terminal pós-sináptico das células do MNTB mediante estimulação das aferências como descrito para a **Figura 11**. A análise da derivada dos dados brutos (porção inferior da **Figura 12A**) permite a identificação, com maior precisão, dos eventos elétricos medidos na célula pós-sináptica. É possível identificar os potenciais pós-sinápticos sub e supralimiais, elicitados pelo estímulo do terminal pré-sináptico.

Sendo assim, num próximo passo, buscamos avaliar o efeito de DHPG no tamanho dos EPSPs e a quantidade de falhas em função do tempo. Inicialmente, na **Figura 12B**, plotamos os valores do EPSP', obtidos no registro acima, expressos em termos da primeira derivada temporal do potencial de membrana, em função do tempo nas condições de controle (símbolos pretos) e aplicação de DHPG (símbolos vermelhos). A sobreposição dos pontos pretos e vermelhos demonstrada na **Figura 12B** permite concluir que a aplicação de DHPG não promove efeito sobre o tamanho dos EPSPs quando comparado à situação controle, tampouco diferenças na extensão da facilitação ou depressão sináptica observadas no início e no final do registro, respectivamente.

Na **Figura 12C**, plotamos separadamente os EPSP' em função do tempo nas situações de controle (superior) e na presença de DHPG (inferior), identificando os EPSPs que geraram falhas em vermelho. Identificamos, neste gráfico, uma menor densidade de pontos vermelhos (que significam falhas) na presença do DHPG quando comparado com a situação de controle. A **Figura 12C** ainda nos permite observar a consequência, em termos de probabilidade de falhas, causada pela depressão sináptica nessa sinapse, pelas falhas (pontos vermelhos) que surgem somente após o 5^o ou 6^o estímulo, na maioria dos casos.

Para quantificar esse resultado, a probabilidade de sucesso (i.e., não falha) foi plotada em função do tamanho do EPSP. Como exibido na **Figura 12D**, esses achados indicam que a ativação dos mGluR-I, pelo DHPG, aumenta a chance de um potencial pós-sináptico de determinada amplitude gerar um potencial de ação pós-sináptico.

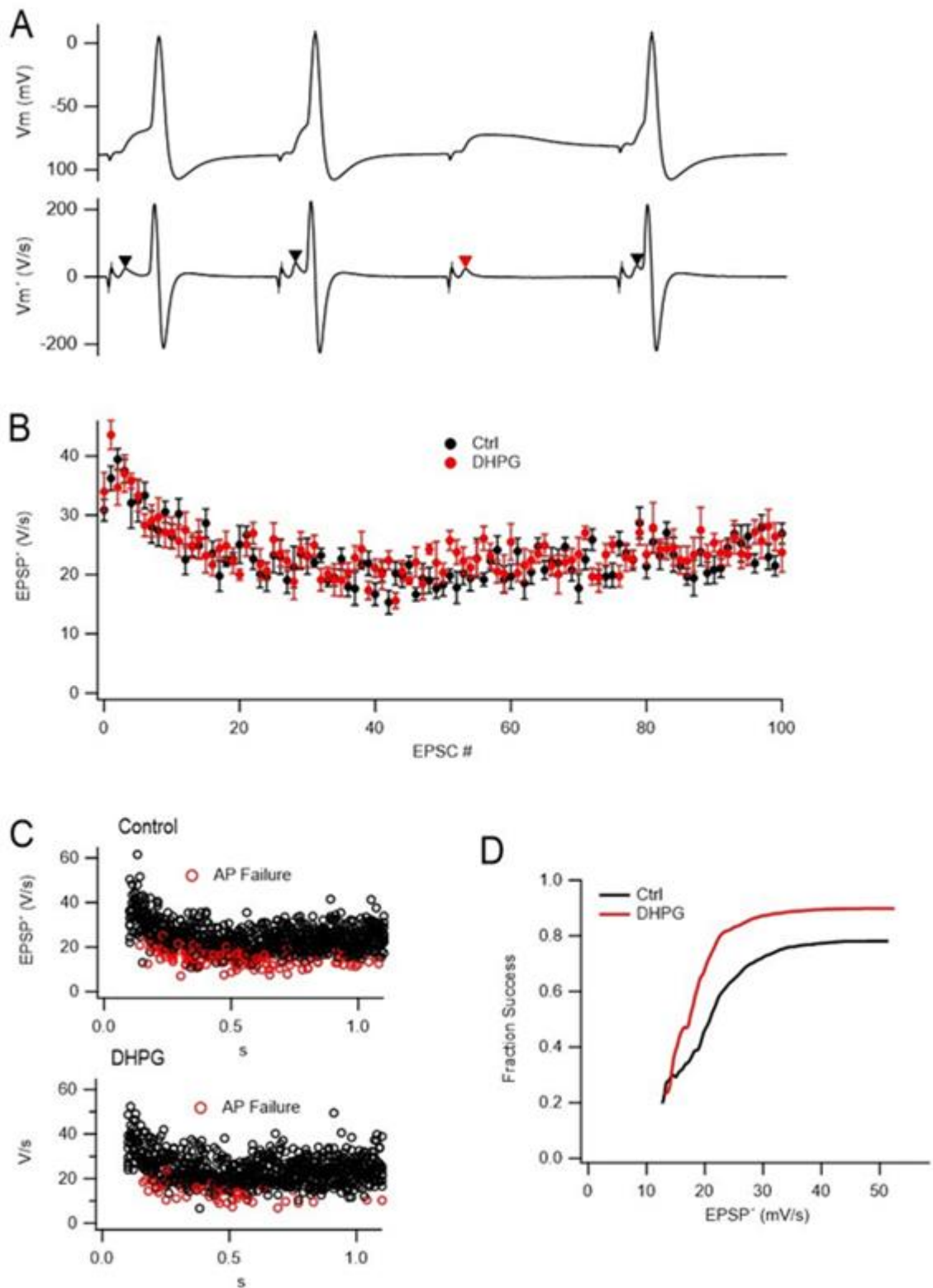


Figura 12 – EPSPs que originaram potenciais de ação.

A. Parte superior, trecho de um registro bruto exibindo a resposta EPSP/ AP em neurônios do MNTB durante estimulação prolongada em alta frequência. Observar as inflexões maiores que denotam potenciais de ação pós-sinápticos elicitados por estimulação do terminal pré-sináptico e a ausência de uma grande inflexão demonstrando uma falha na geração de um potencial de ação . Parte inferior, exibe a derivada do registro superior e indica os potenciais pós-sinápticos que geraram potenciais de ação (preto) ou falhas (vermelho).

B. Depressão sináptica nas células principais do MNTB. Registro representativo da amplitude dos EPSP em função do tempo. Eventos gerados por protocolo de 100 estímulos pré-sinápticos a 100Hz. Pontos pretos representando a amplitude dos EPSPs nas condições de controle. Pontos vermelhos representando a amplitude dos EPSPs na condição de presença do DHPG. Observar a ausência de efeito de DHPG na amplitude dos EPSPs e na depressão dessa sinapse mediante estímulos prolongados em alta frequência.

C. A ativação dos mGluR-I aumenta a probabilidade de sucesso de um EPSP de mesma amplitude desencadear um potencial de ação. Pontos pretos denotam EPSPs que deram origem a potenciais de ação pós-sinápticos supralimiar e pontos vermelhos representam EPSPs que deram origem a potenciais de ação sublimiar (falhas). Observar a menor porcentagem de falhas representada pela menor densidade de pontos vermelhos durante a aplicação de DHPG (Parte inferior) quando comparado ao controle (Parte superior). Observar que não houve mudança na amplitude dos EPSPs quando comparados nas situações de controle e aplicação do DHPG.

D. Probabilidade de gerar um potencial de ação pós-sináptico em função do tamanho do EPSP. Curva preta representando o controle (aCSF) e a curva vermelha denota a aplicação de DHPG. Apesar da invariabilidade na amplitude dos EPSPs, para um mesmo valor de amplitude a administração de DHPG, ativando os receptores mGluR do Grupo I, oferece maior chance de sucesso de um EPSP deflagrar um potencial de ação pós-sináptico supralimiar.

6 Discussão

6.1 Efeito de DHPG no potencial de membrana e corrente de membrana em neurônios do MNTB

Em vias auditivas, os efeitos dos mGluRs do Grupo I tem sido observados em estudos que demonstram sua contribuição no aumento do cálcio intracelular, na liberação de endocanabinoide, plasticidade sináptica e maturação (ZIRPEL and RUBEL, 1996; KUSHMERICK et al., 2004, ANWYL, 1999 ; Von GERSDORFF and BORST, 2002). No entanto, os efeitos da ativação dos mGluRs no potencial de membrana ainda não estão claros. Para tanto, estudamos os efeitos dos mGluRs do Grupo I no potencial de membrana nas células principais do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB).

Nossos achados foram consistentes e semelhantes aos dados já demonstrados por nós no meu mestrado (ALHADAS, 2014) ao observar que assim como nos registros intracelulares, o DHPG promove uma despolarização em registros feitos em whole cell patch clamp, current clamp. Media \pm SEM = 7.2 ± 1 mV (n=10). Também foi possível, em registros whole cell patch clamp, voltage clamp, clampear a célula em potenciais de membrana de -60 mV e observar a corrente gerada pelo DHPG. Nesse caso, a aplicação de DHPG ocasionou um deslocamento negativo da corrente, com valor médio de -70 ± 8 pA (n=10).

Dessa forma, em todos os experimentos, nas células principais do núcleo medial do corpo trapezoide, a administração de DHPG ativou mGluRs do Grupo I provocando a alteração do potencial de membrana para valores menos negativos.

6.2O Subtipo de receptor que medeia a corrente ImGluR-I

Nós mostramos previamente que o antagonista seletivo de amplo espectro, LY341495, bloqueia a $I_{mGluR-I}$ (KUSHMERICK et al., 2004). O Grupo I dos receptores mGluR compreende as isoformas, mGluR-1 e mGluR-5, e apesar da crescente disponibilidade de drogas que são seletivas para determinado subtipo e permite o estudo mais seletivo de cada subunidade, o papel dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluRs) ainda é controverso, na medida em que diferentes autores defendem que a ativação das isoformas dos mGluR do Grupo 1 parece produzir consequências distintas a depender da ativação de ambas ou de somente uma das isoformas mGluR-1 ou mGluR-5.

Evidências indicam, como exemplo, que a diminuição da atividade da isoforma mGluR-5 promove efeitos protetores em modelos murinos de doença de Alzheimer (RIBEIRO et al., 2017). Na mesma linha de raciocínio, alguns estudos demonstraram que o antagonismo do receptor mGlu5 melhora o déficit motor em modelos animais de doença de Parkinson, se dispondo como alvo em potencial para a elaboração de terapias. Em contrapartida, o uso de moduladores alostéricos negativos para mGluR-1 não sugeriu uma boa estratégia no tratamento de sintomas motores na doença de Parkinson (RIBEIRO et al., 2017). Já a atividade protetora promovida pelo antagonista seletivo para mGluR-1, LY367385, em estudos envolvendo dano neuronal induzido em modelos de isquemia, (BRUNO et al., 1999) deu a entender que o subtipo mGluR-1 e não o receptor mGluR-5 facilita a toxicidade neuronal (NICOLETTI et al., 1999). No hipocampo, estudos sugerem que a ativação prolongada de ambos os receptores mGluRs do Grupo I produz efeito neuroprotetor na célula nervosa à lesão citotóxica (ADAMCHIK and BASKYS, 2000; BASKYS et al., 2005).

Dessa forma, o entendimento da participação dos mGluR-1 e mGluR-5, pertencentes aos mGluRs do Grupo I, na $I_{mGluR-I}$, respaldado pelas evidências acima, é fundamental para o entendimento da neurotransmissão no MNTB.

Sendo assim, nós mostramos no mestrado, através de procedimentos farmacológicos, que ambas as subunidades parecem ser as responsáveis por gerarem a $I_{mGluR-I}$ no MNTB (ALHADAS, 2014). Porém, ao observarmos atentamente as respostas obtidas durante a aplicação concomitante de ambos os antagonistas para mGluR-I (LY367385 e MPEP), percebemos a existência de um pequeno efeito remanescente do agonista glutamatérgico DHPG (ALHADAS, 2014), deixando aberta a questão que argumenta a participação de ambos os receptores mGluR-1 e mGluR-5 pertencentes ao Grupo I dos mGluRs na geração da $I_{mGluR-I}$ ou ainda a existência de um possível envolvimento de outros receptores nas respostas observadas de aumento da excitabilidade dessas células principais do MNTB.

Com base na curva de dose resposta promovida pelo DHPG em neurônios do núcleo medial do corpo trapezoide (CORREA, 2016), que exibiu valores de respostas máximos próximos à concentração de 10 μ M, a concentração do agonista glutamatérgico metabotrópico do Grupo I foi reajustada em detrimento às concentrações usadas previamente (100 μ M) nos experimentos que buscavam a identificação da isoforma responsável pela $I_{mGluR-I}$. Tal procedimento permitiu a administração de concentrações mais adequadas do antagonista competitivo e altamente seletivo para mGluR-1, LY367385 (100 μ M) e também do antagonista não competitivo e altamente seletivo para mGluR-5, MPEP (10 μ M) (GASPARINI et al., 1999) em relação às concentrações administradas do agonista DHPG (10 μ M).

Ao aplicarmos ambos os antagonistas seletivos para os mGluRs do Grupo I, MPEP e LY367385, percebemos que o resquício de resposta supracitado, até então,

não abolido, foi agora, nesse experimento, eliminado (**Figura 6**). A fim de identificarmos a participação de um ou ambos os subtipos de mGluR-I, medimos o efeito de DHPG aplicado na condição de controle e após o pré-tratamento com MPEP (10 μ M). Observamos que a corrente gerada pelo DHPG na presença do antagonista foi significativamente reduzida mas não abolida. Dessa forma, as evidências sugerem, que ambos os receptores mGluR-1 e mGluR-5 participam da $I_{mGluR-I}$ em neurônios do MNTB.

6.3 Caracterização farmacológica da $I_{mGluR-I}$

A primeira série de experimentos objetivou responder qual a base iônica da corrente $I_{mGluR-I}$ e também constituiu uma caracterização farmacológica dessa corrente. Como descrito previamente, o núcleo medial do corpo trapezoide expressa não só receptores mGluRs como também iGluRs e canais para Na^+ , Ca^{2+} e K^+ . Fica evidente que o uso de métodos farmacológicos é essencial para entendermos a $I_{mGluR-I}$. Seguindo o raciocínio, fizemos uso da Tetrodotoxina (1 μ M), um conhecido antagonista, potente e seletivo para canais de Na^+ , que permitiu avaliar a participação de canais para Na^+ na $I_{mGluR-I}$ do MNTB, já que sabidamente esse núcleo expressa uma corrente persistente de Na^+ (LEÃO et al., 2005). Em outros tipos de células neuronais essa corrente pode ser potencializada pelos receptores metabotrópicos do Grupo I (D'ASCENZO et al., 2009). A aplicação de Tetrodotoxina causou uma mudança positiva na corrente de holding (N= 7), porém, depois de estabilizado, o efeito de DHPG, na presença de TTx, não foi significativamente diferente, como mostrado na **Figura 7A**. Evidenciando assim, de forma clara, a não participação de canais de Na^{2+} na corrente $I_{mGluR-I}$.

6.4 Participação de iGluRs na $I_{mGluR-I}$

Em sequência, seguindo a justificativa do experimento anterior, resolvemos averiguar o possível envolvimento de iGluRs na $I_{mGluR-I}$. Como descrito na introdução, os mGluRs do Grupo I podem produzir interações funcionais com receptores ou canais de membrana. A ativação de mGluR potencializa a corrente NMDA pela interação com as subunidades NR2 desses receptores em neurônios do corno dorsal da medula espinhal de rato (CERNE and RANDIC, 1992) e em células piramidais, CA3 (BENQUET et al., 2002). Dessa forma, especulamos se os iGluRs poderiam estar sendo estimulados diretamente pelo agonista DHPG ou, como supracitado, poderiam estar produzindo algum efeito secundário à ativação dos mGluR-I.

Como bem demonstrado nos resultados, o bloqueio dos receptores ionotrópicos para glutamato, pelos antagonistas CNQX (10 μ M), um potente e seletivo antagonista para receptores AMPA/ Cainato e MK801 (10 μ M), um antagonista não competitivo para receptores NMDA, não alterou o efeito observado na resposta obtida pela ativação dos receptores mGluR do Grupo I quando aplicados concomitantemente ao agonista DHPG. Evidenciando a não participação de receptores iGluR na $I_{mGluR-I}$, como mostrado na **Figura 7A**.

É válido ressaltar que o uso dos bloqueadores citados acima, apesar de não produzir efeito na $I_{mGluR-I}$, facilitou inúmeras medidas relativas ao potencial de membrana por inibirem canais permeáveis ao Na^+ , modulando a frequência dos potenciais de ação pós-sinápticos e conseqüentemente diminuindo as oscilações da linha de base.

6.5 Íon responsável pela $I_{mGluR-1}$

Ainda com relação a base iônica da $I_{mGluR-1}$, o uso dos protocolos de rampa (**Figura 7B**), nas situações de controle e aplicação do agonista DHPG, permitiu, mediante a subtração das curvas geradas, averiguar picos de corrente e potenciais de reversão iônica que sugeriram a participação do íon K^+ na $I_{mGluR-1}$, haja vista, a observação de que o zero da curva se dá em potenciais de membrana muito negativos (**Figura 7C**). Correlacionando esses achados com os dados obtidos mediante a injeção de corrente negativa realizada no quarto grupo de experimentos dessa série, aonde uma redução da condutância foi observada, concluímos que os efeitos observados até o momento podem advir do bloqueio de canais de saída de íons K^+ . Em regiões do hipocampo, como em CA3, o DHPG despolariza os neurônios através da inibição de uma condutância de potássio para fora da célula (GUERINEAU et al., 1994), o mesmo parece acontecer em CA1, onde aparentemente a ativação de receptores $mGluR-1$ despolariza as células piramidais via inibição de uma condutância de saída de potássio (MANNAIONI, 2001).

Sabendo disso, e sabendo que os neurônios do MNTB são conhecidos por expressarem Kir3.1 canais de potássio retificadores de entrada (LEIN et al., 2007), que desempenham um papel importante na regulação da excitabilidade celular via GPCR (LUSCHER & SLESINGER, 2010) e que canais HCN contribuem para a excitabilidade dos neurônios auditivos do tronco encefálico (SHAIKH & FINLAYSON, 2003), inclusive no MNTB (LEÃO et al., 2006), experimentos posteriores em paralelo (CORREA, 2016) demonstraram que quando aplicados em conjunto, ZD7288 (100 μ M) e Ba²⁺ (500 μ M) bloqueiam a $I_{mGluR-1}$ em $73 \pm 3\%$ (N = 4, p = 0,02). Tais achados, quando concatenados, nos permitem concluir que uma combinação de canais KIR suprimidos por Ba²⁺ e canais HCN sensíveis a ZD7288 são responsáveis pela maior

parte da $I_{mGluR-I}$ gerada pela ativação dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I no MNTB.

6.6 Alterações de excitabilidade

Ao observarmos os efeitos promovidos pela ativação dos mGluR-I, em todos os experimentos, até o momento, nós nos perguntamos se isso seria consequência tão somente da despolarização induzida pela $I_{mGluR-I}$, ou poderia ser um reflexo de uma alteração na excitabilidade intrínseca dos neurônios. Fica claro que as alterações no potencial de membrana para valores mais próximos do limiar de disparo, como aquelas observadas durante a aplicação de DHPG, por si só, poderiam explicar o aumento da excitabilidade observado até o momento e também descrito por nós no meu mestrado (ALHADAS, 2014).

Para distinguir essas possibilidades, nós realizamos experimentos em whole cell patch clamp, current clamp e utilizamos protocolos que conjugaram injeção de corrente despolarizante e hiperpolarizante com a aplicação do agonista seletivo para mGluR-I e nos permitiram comparar os efeitos de ambos na mesma célula. A magnitude das correntes despolarizantes foi a necessária para promover a despolarização da membrana, inicialmente em 5mV e posteriormente em 10mV, definida para cada célula. A magnitude da corrente negativa injetada, na presença de DHPG, foi a necessária para permitir o retorno do potencial de membrana para os valores registrados na condição de controle. Em cada uma das situações, as injeções de corrente despolarizantes em degraus de 10 em 10pA permitiu a identificação da reobase para cada célula.

A média dos efeitos obtidos pela aplicação do DHPG foi de $7,2 \pm 1$ mV (N=10), como demonstrado pela **Figura 5**. Era de se esperar que os efeitos observados

mediante despolarização de 5mV fossem menores quando comparados com a administração de DHPG e que, talvez, as despolarizações de 10mV mimetizassem o efeito de DHPG pela magnitude do deslocamento do potencial de membrana para valores muito positivos. No entanto, as respostas obtidas tanto pelas despolarizações de 5mV quanto as obtidas pela variação de 10mV não se distinguem estatisticamente entre si e também não diferem daqueles efeitos observados pela ativação dos mGluR-I pelo DHPG. As respostas obtidas durante as hiperpolarizações também não produziram efeitos estatisticamente diferentes daqueles observados na presença de DHPG.

Com base nessas informações, assim como descrito por Chanda and Xu-Friedman em 2011, para experimentos realizados em núcleos cocleares, os nossos achados, para esse grupo experimental, indicam que os principais efeitos da ativação dos mGluRs do Grupo I são mediados pela despolarização nas células principais do núcleo medial do corpo trapezoide em camundongos neonatos.

6.7 Significado da $I_{mGluR-I}$ na neurotransmissão do MNTB

Em todos os experimentos realizados até o momento, avaliamos as propriedades funcionais das células principais do núcleo medial do corpo trapezoide via registros usando a técnica de patch clamp, whole cell, modalidade voltage ou current clamp, mediante estímulos diretos no terminal pós-sináptico pelo próprio eletrodo de registro.

A partir de agora, interessados nas implicações fisiológicas que a $I_{mGluR-I}$ tem sobre a neurotransmissão, já que compreender os mecanismos celulares e moleculares que modulam a neurotransmissão é crucial para um melhor entendimento da rede neural não somente em áreas auditivas, mas também em todo organismo,

fez-se necessário considerar todo o processo de maturação que ocorre nessa sinapse. Essa maturação, especialmente no período entre o décimo e o décimo quarto dia, quando o animal começa a detectar o som (MIKAELIAN and RUBEN, 1964), confere ao cálice sua morfologia da forma como é observada no adulto, de modo que o mapa tonotópico do MNTB atinge propriedades adultas em animais P14 (FRIAUF, 1992), ocorre aumento nos níveis de expressão dos canais pré-sinápticos de Ca^{2+} (IWASAKI and TAKAHASHI, 1998), aumento nos níveis de expressão de receptores metabotrópicos e ionotrópicos para glutamato (ELEZGARAI et al., 1999; CAICEDO and EYBALIN, 1999; TASCHEBERGER and Von GERSDORFF, 2000).

Dessa forma, o uso de animais p18 em detrimento aos animais p8 foi necessário, considerando que alterações importantes promovidas pela maturação, tanto no terminal pré-sináptico quanto no terminal pós-sináptico ocorreram, estão concluídas e que suas respostas são fortemente influenciadas pelo estágio de desenvolvimento (LORTEIJE et al., 2009; TASCHEBERGER e Von GERSDORFF, 2000; FUTAI et al., 2001; JOSHI and WANG, 2002).

Os experimentos descritos até o momento demonstram que a ativação dos receptores mGluR do Grupo I no MNTB causam tanto uma despolarização do potencial de repouso quanto uma redução do limiar de corrente. Nesse ponto do trabalho nós nos perguntamos qual seriam os efeitos dessas mudanças na neurotransmissão nessa sinapse. Para abordar essa questão, registramos EPSPs e APs pós-sinápticos em resposta à estimulação de alta frequência das fibras aferentes pré-sinápticas que formam o cálice da sinapse de Held. Colocamos um eletrodo de estimulação bipolar na linha média e utilizamos uma intensidade de estímulo 50% acima do limiar, determinada individualmente para cada célula, que variou de 1,5-3,0 V. Trens de 100 estímulos a 100 Hz foram aplicados uma vez a cada 60 s e respostas

foram medidas em condições de controle e durante a ativação de mGluR-I por DHPG (10-20 μM). Nestas experiências, o Ca^{2+} foi reduzido para 1,2 mM para melhor reproduzir a concentração fisiológica de Ca^{2+} *in vivo* (HANSEN, 1985, LORTEIJE, 2009).

Os registros mostrados na **Figura 11** ilustram um exemplo de registro típico deste grupo experimental. Sob nossas condições de gravação, cada estimulação pré-sináptica foi seguida por um EPSP pós-sináptico. A maioria (> 70%) desses EPSPs foi grande o suficiente para gerar um potencial de ação pós-sináptico, no entanto, falhas no potencial de ação pós-sináptico também foram observadas. A ativação dos mGluR-I com DHPG reduziu o número de falhas pós-sinápticas (compare os traços superior e inferior da **Figura 11A**). Para quantificar esses resultados, geramos gráficos rasterizados (**Figura 11B**) nos quais as falhas pós-sinápticas são indicadas por linhas vermelhas. Neste experimento, o DHPG foi aplicado durante os ensaios de número 20-30 (área sombreada), e reduziu significativamente o número de falhas. Este efeito do DHPG pode ser claramente visto na **Figura 11C**, que mostra o número de falhas por avaliação. Note que neste experimento representativo houve uma diminuição constante no número de falhas, mesmo no controle com aCSF. Isso pode ser devido a alterações no neurônio pós-sináptico, causadas pelo clamp do patch em whole cell ou pelos protocolos de estimulação. Nós não investigamos essas mudanças espontâneas ainda mais. No entanto, quando o DHPG foi aplicado (indicado pela linha preta) houve uma diminuição acentuada no número de falhas, que reverteu após a lavagem do fármaco do banho. É importante notar que mesmo após a lavagem do DHPG, a taxa de falhas continuou seu declínio lento e constante como descrito acima. Efeitos similares foram observados em outras 4 células (**Figura 11D**).

Os achados acima indicam que a ativação dos mGluR-I reduz o número de falhas e dessa forma melhora o disparo em alta frequência dos neurônios do núcleo medial do Corpo trapezoide.

Esses dados são consistentes com todos os nossos achados até o momento que apontam para o aumento da excitabilidade provocado pela ImGluR-I e corroboram também com os meus dados de mestrado (ALHADAS, 2014).

Para explorar ainda mais os efeitos da ativação dos mGluR-I na neurotransmissão no MNTB, quantificamos seus efeitos no tamanho dos EPSPs e no limiar dos EPSPs necessário para gerar um potencial pós-sináptico supralimiar. Para medir o tamanho dos EPSPs, analisamos a primeira derivada V_m , que permite a separação clara entre o EPSP e potencial de ação (**Figura 12A**). Nessa figura, o potencial de ação é indicado por setas pretas no traço superior e o tamanho do EPSP (primeira derivada) é indicado no traço inferior por setas pretas (para o caso de um par EPSP/ AP) ou setas vermelhas quando uma falha pós-sináptica é detectada.

Usando este método de análise, medimos o tamanho do EPSP para cada estímulo durante cada tentativa. O EPSP médio em condições de controle e durante a ativação de mGluR-I com DHPG é mostrado na **Figura 12B**. Estes dados mostram uma facilitação pequena mas significativa da amplitude do EPSP (em 27%) durante os primeiros 2 ou três estímulos, seguida por uma depressão maior das amplitudes de EPSPs que atingiram um estado estacionário de 37% (relativo ao primeiro EPSP) ou 51% (relativo à facilitação máxima). Não houve diferença significativa no tamanho dos EPSPs ou no grau de facilitação ou depressão ao comparar traços registrados em condições de controle e na presença de DHPG. Resultados semelhantes foram obtidos em todos os outros registros do grupo experimental (N=5). Portanto,

mudanças no tamanho do EPSP não podem explicar a diminuição no número de falhas observadas quando os receptores mGluR-I foram ativados pelo DHPG.

A ausência de alterações no tamanho do EPSP durante o tratamento com DHPG levou-nos a considerar mudanças no limiar como uma explicação para o aumento da confiabilidade da neurotransmissão durante a ativação do mGluR-I. Por isso, examinamos a relação entre o tamanho do EPSP e a probabilidade de gerar um potencial de ação. A **Figura 12C** mostra as amplitudes de EPSPs que geraram um AP (preto) ou não geraram um AP (vermelho) registrado sob condições de controle ou após a ativação de mGluR com DHPG. A interface entre os símbolos vermelho e preto permite estimar o tamanho limite do EPSP para disparar um potencial de ação. Embora haja muita dispersão nos dados, a interface entre os símbolos pretos e vermelhos parece ocorrer com valores menores de EPSPs na presença de DHPG em comparação ao controle. Assim, a ativação do Grupo I dos mGluR reduz o limiar de disparo dos potenciais de ação. Para quantificar ainda mais esse resultado, calculamos a probabilidade de um EPSP, de determinado tamanho, disparar um potencial pós-sináptico supralimiar (**Figura 12D**). Como esperado, a probabilidade de um EPSP, de determinada amplitude, gerar um potencial de ação pós-sináptico supralimiar aumentou significativamente na presença de DHPG (**Figura 12D**). Resultados semelhantes foram obtidos em todos os outros registros do grupo experimental (N=5).

Apesar da necessidade de transmissões de sinal estável, como descrito na introdução, todas as sinapses exibem alterações importantes, principalmente temporárias, mediante o uso repetitivo. Os dados exibidos na **Figura 12B** nos permitem identificar uma forte depressão sináptica nas células do núcleo medial do corpo trapezoide mediante estimulação prolongada (100 estímulos) em alta frequência

(100Hz), descritas na forma de uma diminuição da amplitude dos EPSPs em função do tempo. Resultados semelhantes foram obtidos em todos os outros registros do grupo experimental (N=5).

Diversos estudos apontam para uma importante e conhecida depressão a curto prazo nas células principais do MNTB (Von GERSDORFF and BORST, 2002; NEHER and SAKABA, 2008). Embora a recuperação do pool vesicular, disponível para a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica após estimulação em alta frequência do cálice de Held, seja eficazmente rápida, devido a mecanismos dependentes de cálcio (WANG and KACZMAREK, 1998; HOSOI et al., 2007), a recuperação da depressão sináptica acontece após alguns segundos (LORTEIJE et al., 2009).

Devido a questões técnicas, todos os nossos experimentos foram feitos em temperatura ambiente controlada no banho (25 °C). Isso certamente favoreceu o surgimento de falhas (**Figura 11A**) e uma depressão sináptica mais pronunciada (**Figura 12B e 12C**). Já que é bem definido que a transmissão sináptica é fortemente dependente da temperatura (LORTEIJE et. al., 2009; TASCHENBERGER and Von GERSDORFF, 2000; FUTAI et al., 2001; JOSHI and WANG, 2002)

Alguns dos possíveis mecanismos pré-sinápticos do cálice de Held que poderiam levar à depressão sináptica incluem inativação das correntes de cálcio e esgotamento do pool vesicular (Von GERSDORFF and BORST, 2002).

Mediante protocolos de estimulação prolongada e em alta frequência, as evidências sugerem que esgotamento do pool de vesículas parece ser o mecanismo mais crítico. No entanto, prolongadas estimulações em alta frequência (como exemplificado por Von Gersdorff and Borst, 2002, para protocolos de 100 Hz, 10 s) conduzem a uma forma de depressão que é predominantemente devido a uma inativação de correntes de Ca^{2+} (Von GERSDORFF and BORST, 2002).

Ambas as ideias são defendidas por Von Gersdorff and Borst em experimentos semelhantes nesta sinapse e poderiam também explicar nossos achados.

7 Conclusão

O uso da técnica de whole-cell, com a consequente diálise intracelular, não prejudica o estudo dos efeitos da ativação de receptores mGluR nesta preparação já que os achados são coerentes com aqueles observados via eletrodo de alta resistência.

O DHPG despolarizou a membrana em 7.2 ± 1 mV (N=10) com recuperação significativa após a lavagem da droga. Em registros de voltage clamp a aplicação de DHPG gerou uma corrente de entrada de -70 ± 8 pA (N=10).

Ação clara do agonista, DHPG, agindo sobre receptores mGluR-1 e mGluR-5 em neurônios do MNTB. A corrente gerada pelo DHPG foi significativamente reduzida quando medida na presença de MPEP. Porém, cerca de 60% da corrente gerada pela DHPG foi insensível ao MPEP, sugerindo a participação do receptor mGlu1. O pré-tratamento conjunto com MPEP e LY367685 aboliu o efeito de DHPG (N=4).

Nosso estudo descartou a participação de receptores iGluRs (NMDA, AMPA e Cainato) no efeito promovido pela ativação dos receptores metabotrópicos do Grupo I. Descartou também a dependência de canais de sódio voltagem dependentes.

Nossos achados sugeriram fortemente a participação de íons de potássio no efeito observado pela ativação dos mGluR-I e forneceram base para experimentos paralelos que ratificaram o achado, esclarecendo a participação de canais Kir e dos canais HCN no efeito da ImGluR-I.

O presente estudo indica, ainda, que o principal efeito da ativação dos receptores mGluR-I nos potenciais de ação são mediados pela despolarização da membrana.

Sobre o significado da $I_{mGluR-I}$ na neurotransmissão no MNTB, podemos dizer que os dados obtidos, sugerem que a $I_{mGluR-I}$ melhora as capacidades de resposta do terminal pós-sináptico dessas células mesmo durante estimulação prolongada em alta frequência reduzindo o percentual de falhas pós-sinápticas. Podemos dizer, também, que os achados sugerem que a ativação dos mGluR do Grupo I aumenta a chance de EPSPs de mesma amplitude desencadearem potenciais de ação pós-sinápticos supralimbiares.

Os protocolos de estimulação permitiram, também, observar a existência de uma forte depressão na sinapse do cálice de Held, desencadeada pela estimulação prolongada em alta frequência das via aferentes.

9 Referências

1. ABE T., SUGIHARA H., NAWA H., SHIGEMOTO R., MIZUNO N., NAKANISHI S., Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGlu5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem.* Jul 5;267(19):13361-8, 1992.
2. ADAMCHIK Y., BASKYS A., Glutamate-mediated neuroprotection against N-methyl-D-aspartate toxicity: A role for metabotropic glutamate receptors, *Neuroscience*, 99 (4), pp. 731-736, 2000.
3. ALGER B.E., Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids". *Prog Neurobiol.* 68:247–286, 2002.
4. ALHADAS E.S., Activation of metabotropic glutamate receptors group I depolarizes and increases the excitability of neurons in the Trapezoid Body of newborn mice. 77f. Dissertation (Physiology). Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
5. ANWYL R., Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews* 29 1999 83–120, 1999.
6. 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.
7. BASKYS, A., BAYAZITOV, I., FANG, L., BLAABJERG, M., POULSEN, F.R., ZIMMER, J., Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis, *Neuropharmacology*, 49 (SUPPL.), pp. 146-156, 2005.
8. BENQUET P., GEE C.E., GERBER U., Two distinct signaling pathways upregulate NMDA receptor responses via two distinct metabotropic glutamate receptor subtypes. *J Neurosci* 22: 9679-9686, 2002.

9. BIRNBAUMER L., CAMPBELL K. P., CATTERALL W. A., HARPOLD M. M., HOFMANN F., HORNE W. A., MORI Y., SCHWARTZ A., SNUTCH T. P., TANABE T. & TSIEN R. W. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13: 505–506, 1994.
10. BIBER K., LAURIE D.J., BERTHELE A., SOMMER B., TOLLE T.R., GEBICKE-HARTER P.J., D.VAN CALKER, BODDEKE H.W., Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia, *J. Neurochem.* 72 (4) 1671–1680, 1999.
11. BLAUSTEIN M.P., LEDERER W.J.. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev.* 79:763–854, 1999.
12. Bliss T.V.P., Lømo T., Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331-356, 1973.
13. BOCCHIO M., NABAVI S., CAPOGNA M., Synaptic plasticity, engrams, and network oscillations in amygdala circuits for storage and retrieval of emotional memories. *Neuron.* 94: 731-743, 2017.
14. BORST J.G., HELMCHEN F., SAKMANN B., Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Physiol* 489:825–840, 1995.
15. BORST J.G., van HOEVE J.S., The Calyx of Held Synapse: From Model Synapse to Auditory Relay. *Annu Rev Physiol.* 2012.
16. BRUNO V.G.B., KINGSTON, O ' NEILL R.M.J., CATANIA M.V., DI GREZIA R., NICOLETTI F., Neuroprotective activity of the potent and selective mGlu1a metabotropic glutamate receptor antagonist, (+)-2-methyl-4 carboxyphenylglycine (LY367385): comparison with LY357366, a broader

- spectrum antagonist with equal affinity for mGlu1a and mGlu5 receptors, 38, pp. 199-207, 1999.
17. CAICEDO A., EYBALIN M., Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur J Neurosci.* Jan;11(1):51-74, 1999.
 18. CARTMELL J., SCHOEPP D.D., Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 75:889–907, 2000.
 19. CERNE R., RANDIC M., Modulation of AMPA and NMDA responses in rat spinal dorsal horn neurons by trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid. *Neurosci Lett* 144: 180-184, 1992.
 20. CHANDA S. and XU-FRIEDMAN M. A., Excitatory Modulation in the Cochlear Nucleus through Group I Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *The Journal of Neuroscience* May 18, 31(20):7450 –7455, 2011.
 21. CHOI D. W., Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends. Neurosci.* 11, 465±469, 1988.
 22. CITRI A., MALENKA R.C., Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 33: 18-41, 2008.
 23. CLARK B.P., BAKER S.R., GOLDSWORTHY J., et al., (+) - 2-metil-4-Carboxifenilglicina (LY367385) seletivamente Antagoniza receptores de glutamato mRluR1 metabotrópicos. *Bioorganic Med Chem Lett* 7: 2777-2780. 1997. 10.1016 / S0960-894X (97) 10071-3
 24. CONGAR P. and TRUDEAU LE., Perturbation of synaptic vesicle delivery during neurotransmitter release triggered independently of calcium Influx. *Journal of Physiology*, 542.3, pp. 779–793, 2002.

25. CONN P.J., PIN J.P., Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205–237, 1997.
26. CORREA A.M.B., Isoforma de receptor e canais iônicos responsáveis pela corrente ativada por receptores metabotrópicos para glutamato em neurônios do MNTB. Dissertação (Fisiologia). Instituto de ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.
27. CORREA A.M.B., GUIMARÃES J.D.S., ALHADAS E.S., and CHRISTOPHER KUSHMERICK C., Control of neuronal excitability by Group I metabotropic glutamate receptors. *Biophys Rev.* Oct; 9(5): 835–845. 2017. 10.1007/s12551-017-0301-7
28. D'ASCENZO M., PODDA M.V., FELLIN T., AZZENA G.B., HAYDON P., GRASSI C., Activation of mGlu5 induces spike afterdepolarization and enhanced excitability in medium spiny neurons of the nucleus accumbens by modulating persistent Na⁺ currents. *J Physiol.* Jul 1;587(Pt 13):3233-50, 2009.
29. DINGLE DINE R., BOLAND L. M., CHAMBERLIN N. L., KAWASAKI K., KLECKNER N. W., TRAYNELIS S. F. AND VERDOORN T. A., Amino acid receptors and uptake systems in the mammalian central nervous system. *CRC Crit. Rev. Neurobiol.* 4, 1-96, 1988.
30. DORÉ A.S., OKRASA K., PATEL J.C. et al., Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature*, 2014. 511:557–562. 10.1038/nature13396
31. ELEZGARAI I., BENITEZ R., MATEOS J.M., LAZARO E., OSORIO A., AZKUE J.J., BILBAO A., LINGENHOEHL K., VAN DER PUTTEN H., HAMPSON D.R., KUHN R., KNOPFEL T., GRANDES P., Developmental expression of the group III metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Comp Neurol.* 411:431–440, 1999.

32. 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.
33. FERRAGUTI F., CREPALDI L., and NICOLETTI F., Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol Rev* 60:536 –581 2008.
34. FORSYTHE I.D., CLEMENTS J.D., Glutamate autoreceptors depress excitatory monosynaptic transmission between mouse hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)* 429:1–16, 1990.
35. FORSYTHE I.D., TSUJIMOTO T., BARNES-DAVIES M., CUTTLE M.F. & TAKAHASHI T. Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron* 20, 797–807, 1998.
36. FRIAUF E., Tonotopic Order in the Adult and Developing Auditory System of the Rat as Shown by c-fos Immunocytochemistry. *Eur J Neurosci*. 4(9):798-812, 1992.
37. FUTAI K., OKADA M., MATSUYAMA K., TAKAHASHI T., High-fidelity transmission acquired via a developmental decrease in NMDA receptor expression at an auditory synapse. *J Neurosci* 21:3342–3349, 2001.
38. GASPARINI F., LINGENHOHL K., STOEHR N. et al., 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 38:1493–1503. 1999. 10.1016/S0028-3908(99)00082-9
39. GALVEZ T., PARMENTIER M.L., JOLY C. et al., Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J Biol Chem* 274:13362–13369, 1999. 10.1074/jbc.274.19.13362

40. 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.
41. GRAY E. G., Axo-somatic and axo-dendritic synapses of cerebral cortex: an electron microscope study. *J. of Anatomy*, Vol. 93, 420-433P, 1959.
42. GROTHE B., PECKA M., MCALPINE D., Mechanisms of sound localization in mammals. *Physiol Rev* 90: 983-1012, 2010.
43. GUERINEAU N.C., GAHWILER B.H., GERBER U., Reduction of resting K current by metabotropic glutamate and muscarinic receptors in rat CA3 cells: mediation by G-proteins. *J Physiol (Lond)* 474:27–33, 1994.
44. GUYTON A. C., *Tratado de Fisiologia Médica*”. 9ª ed – São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 1996.
45. GUO W., WEI F., ZOU S., ROBBINS M.T., SUGIYO S., IKEDA T., TU J.C., WORLEY P.F., DUBNER R., AND REN K., Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 24: 9161-9173, 2004.
46. HACKNEY C. M. and FURNESS D. N., The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *J. Cell. Sci.* 126, 1721–1731, 2013.
47. HAYASHI T., A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. J. Physiol.* 3:46–64, 1952.
48. HANSEN A.J., Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65:101–148, 1985.

49. HELFERT R.H., SNEAD C.R., ALTSCHULER R.A., 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.
50. HOSOI N., SAKABA T., NEHER E., Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 27:14286 –14298, 2007.
51. HOVELSØ N., SOTTY F., MONTEZINHO L.P. et al., Therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulators. *Curr Neuropharmacol* 10:12–48, 2012. 10.2174/157015912799362805
52. ITO I., KOHDA A., TANABE S., HIROSE E., HAYASHI M., MITSUNAGA S., SUGIYAMA H., 3,5-Dihydroxyphenyl-glycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport*, 3:1013–1016, 1992.
53. IWASAKI S., TAKAHASHI T., Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol*. Jun 1;509 (Pt 2):419-23, 1998.
54. JACOBSON S. AND MARCUS E. M., “Neuroanatomy for the Neuroscientist”. Springer Science, 2008.
55. JOSHI I., WANG L.Y., Developmental profiles of glutamate receptors and synaptic transmission at a single synapse in the mouse auditory brainstem. *J Physiol* 540:861–873, 2002.
56. KACZMAREK L.K., BHATTACHARJEE A., DESAIA R., GAN L., SONG P., CHRISTIAN A.A. VON HEHN., WHIM M.D., YANGA B., Regulation of the timing of MNTB neurons by short-term and long-term modulation of potassium channels. *Hearing Research* Volume 206, Issues 1–2, August, Pages 133-145, 2005.

57. KOPP-SCHEINPFLUG C., FUCHS K., LIPPE W.R., TEMPEL B.L., RÜBSAMEN R., Decreased temporal precision of auditory signaling in *Kcna1*-null mice: an electrophysiological study in vivo. *J. Neuroscience* 23:9199-9207, 2003.
58. KOPP-SCHEINPFLUG C., STEINERT J.R., FORSYTHE I.D., Modulation and control of synaptic transmission across the MNTB. *Hearing Research*, Volume 279, Issues 1–2, Pages 22-31, 2011.
59. KUNISHIMA N., SHIMADA Y., TSUJI Y. et al., Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971–977, 2000. 10.1038/35039564
60. KUSHMERICK C., PRICE G.D., TASCHEBERGER H., PUENTE N., RENDEN R., WADICHE J.I., DUVOISIN R.M., GRANDES P., von GERSDORFF H., Retroinhibition of presynaptic Ca^{2+} currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J. Neurosci* 24:5955–5965, 2004.
61. LEÃO R. M., KUSHMERICK C., PINAUD R., RENDEN R., LI G-L., TASCHEBERGER H., SPIROU G., LEVINSON S. R., VON GERSDORFF H., Presynaptic Na^{+} channels: locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *J Neurosci* 25 : 3724-3738. 2005.
62. LEÃO R.N., NAVES M.M., LEÃO K.E., WALMSLEY B., Altered sodium currents in auditory neurons of congenitally deaf mice. *Eur J Neurosci*. Aug;24(4):1137-46. 2006.
63. LEE, G. J., Therapeutic potential of AMPA receptor ligands in neurological disorders. *CNS drugs* 5, 51-74, 1996.
64. LEE H.G.; ZHU X., O'NEILL M.J., WEBBER K., CASADESUS G., MARLATT M. RAINA A.K., PERRY G. and SMITH M.A., The role of metabotropic glutamate

- receptors in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, v.64, n.1, p.89-98, 2004.
65. LORTEIJE J.A.M, RUSU S.I., KUSHMERICK C., BORST J.G., Reliability and Precision of the Mouse Calyx of Held Synapse. *Journal of Neuroscience*, 29 (44) 13770-13784, 2009.
66. LÜSCHER C, SLESINGER P.A., Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 11:301–315, 2010.
67. 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.
68. 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.
69. MARTIN L. J., BLACKSTONE C.D., HUGANIR R.L., PRICE D.L., Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain, *Neuron* 9 (2) 259–270, 1992.
70. MCDONALD J.W., SILVERSTEIN F.S. and JOHNSTON M.V., Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res*, v.459, n.1, p.200-3, 1988.
71. MCDONALD J.W., Pharmacology of N-methyl-D-aspartate toxicity in the developing central nervous system. University of Michigan., Michigan, 1989.
72. MELDRUM B.S., AKBAR M.T. and CHAPMAN A.G., Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res*, v.36, n.2-3, p.189-204, 1999.

73. MELDRUM B. S., Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130(4S Suppl): 1007S-1015S, 2000.
74. MIKAELIAN D., RUBEN R.J., Development of hearing in the normal CBA-J mouse. *Acta Otolaryngol*59:451–461, 1964.
75. MONAGHAN D. T., BRIDGES R. J. AND COTMAN C. W., The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 365±402, 1989.
76. MOURA P.R., VIDAL F.A.P., Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica (Porto Alegre)* 21, 2011.
77. MULKEY R.M., MALENKA R.C., Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron.* 9: 967-975, 1992.
78. MUTO T., TSUCHIYA D., MORIKAWA K., JINGAMI H., Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 10.1073/pnas.0611577104
79. NAKAMURA P.A., CRAMER K.S., Formation and maturation of the calyx of Held. *Hear*, 276:70–78, 2011.
80. NAKANISHI S., Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* Oct 23;258(5082):597-603, 1992.
81. NEHER E., SAKABA T., Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron.* Sep 25;59(6):861-72, 2008. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.019.

82. NELSON D.L., COX MM. BIODISSEMINAÇÃO. IN: SIMÕES AA, LODI WRN [Coord.] Tradução. Lehninger *Princípios de Bioquímica*, 4^o Ed. São Paulo: Ed. Sarvier; p. 440-4, 2006.
83. NICOLETTI F., BOCKAERT J., COLLINGRIDGE G.L. et al., Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60:1017–1041, 2011. 10.1016/j.neuropharm.2010.10.022
84. NISWENDER C.M. and P.J. CONN., Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 295-322, 2010.
85. OHNO-SHOSAKU T., MAEJIMA T., KANO M., Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29, 729–738, 2001.
86. OLIVE M. F., Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 2(1): 83-98, 2009.
87. OLNEY J.W., HO O.L., RHEE V. and DEGUBAREFF T., Letter: Neurotoxic effects of glutamate. *N Engl J Med*, v.289, n.25, p.1374-5, 1973.
88. OZAWA S., KAMIYA H. and TSUZUKI K., Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 54: 581-618, 1998.
89. PAXINOS G. and WATSON C., “The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates”. 4th. ed Academic Press 1998.
90. PELLEGRINI-GIAMPIETRO DE, COZZI A., PERUGINELLI F., LEONARDI P., MELI E., PELLICCIARI R., MORONI F., 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid and (S)-(+)-2-(3'-carboxybicyclo[1.1.1]pentyl)-glycine, two mGlu1 receptor-preferring antagonists, reduce neuronal death in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *Eur J Neurosci* 11:3637–3647, 1999.

91. PIN J-P, JOLY C, HEINEMANN S.F., BOCKAERT J., Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C-coupled metabotropic glutamate receptors. *EMBO J.* 13:342–348, 1994.
92. RIBEIRO F. M., VIEIRA L. B., PIRES R. G., OLMO R. P., FERGUSON S. S., Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* 115 179–191. 10.1016/j.phrs.2016.11.013, 2017.
93. ROTHMAN S.M. and OLNEY J.W., Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci*, v.18, n.2, p.57-8, 1995.
94. SCHNEGGENBURGER R. and FORSYTHE I.D., The calyx of Held – *Review*. *Cell Tissue Res* 326:311–337, 2006.
95. SCHOEPP D.D., GOLDSWORTHY J., JOHNSON B.G., SALHOFF C.R., BAKER S.R., 3,5-Dihydroxyphenylglycine is a highly selective agonists for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Neurochem*, 63:769–772, 1994.
96. SCHOEPP D.D., Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*299 (1) 12–20, 2001.
97. SCHWARCZ R., BRUSH G.S., FOSTER A.C. and FRENCH E.D., Seizure activity and lesions after intrahippocampal quinolinic acid injection. *Exp Neurol*, v.84, n.1, p.1-17, 1984.
98. SHAIKH, A. G., & FINLAYSON, P. G., Hyperpolarization-activated (I_h) conductances affect brainstem auditory neuron excitability. *Hearing Research*, 183(1–2), 126–136, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00224-7)

99. SHIGEMOTO R., NOMURA S., OHISHI H., SUGIHARA H., NAKANISHI S., MIZUNO N., Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGlu5, in the rat brain, *Neurosci. Lett.* 163 (1) 53–57, 1993.
100. STEWART G.R., PRICE M., OLNEY J.W., HARTMAN B.K. and COZZARI C., N-methylaspartate: an effective tool for lesioning basal forebrain cholinergic neurons of the rat. *Brain Res*, v.369, n.1-2, p.377-82, 1986.
101. 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.
102. TAKAHASHI T., FORSYTHE I. D., TSUJIMOTO T., BARNES-DAVIES M., ONODERA K., Presynaptic Calcium Current Modulation by a Metabotropic Glutamate Receptor. *Science*. Vol. 274, 1996.
103. TASCHENBERGER H. and von GERSDORFF H., Fine-Tuning an Auditory Synapse for Speed and Fidelity: Developmental Changes in Presynaptic Waveform, EPSC Kinetics, and Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 20(24):9162–9173, 2000.
104. TASCHENBERGER H., LEÃO R.M., ROWLAND K.C., SPIROU G.A., VON GERSDORFF H., Optimizing synaptic architecture and efficiency for high frequency transmission. *Neuron* 36:1127–1143, 2002.
105. TSUCHIYA D., KUNISHIMA N., KAMIYA N. et al., Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd³⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2660–2665, 2002. 10.1073/pnas.052708599
106. Von GERSDORFF H., SCHNEGGENBURGER R., WEIS S., NEHER E. Presynaptic depression at a calyx synapse: the small contribution of metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* 17:8137–8146, 1997.

107. Von GERSDORFF H. and BORST J.G., Short-term plasticity at the calyx of held. *Nature reviews, Neuroscience*, volume 3: 53-64, January, 2002.
108. WANG L.Y., LI GAN, FORSYTHE I.D. and KACZMAREK L.K., Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones. *The Journal of Physiology*, 509, 183-194, 1998.
109. WANG T., RUSU S. I., HRUSKOVA B., TURECEK R., BORST J. G. G., Modulation of synaptic depression of the calyx of Held synapse by GABAB receptors and spontaneous activity. *J. Physiol.* 591 4877–4894, 2013. 10.1113/jphysiol.2013.256875
110. 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.
111. WEBSTER W.R., Auditory system, IN PAXINOS, G., (ed): The rat nervous system, London, Academic Press, p. 797-827, 1995.
112. WISNIEWSKI K. and CAR H., (S)-3,5-DHPG: a review. *CNS Drug Rev* 8(1): 101-116, 2002.
113. WU H., WANG C., GREGORY K.J. et al., Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science* 344(80):58–64. 2014. 10.1126/science.1249489. Structure
114. WU S.H. and KELLY J.B., Response of neurons in the lateral superior olive and medial nucleus of the trapezoid body to repetitive stimulation: Intracellular and extracellular recordings from mouse brain slice. *Hearing Research*, 68 189-201, 1993.

115. WU S.H., OERTEL D., Maturation of synapses and electrical properties of cells in the cochlear nuclei. *Hearing Research* 30: 99–110. doi: 10.1016/0378-5955(87)90187-0, 1987.
116. LU W.Y., XIONG Z.G., LEI S., ORSER B.A., DUDEK E., BROWNING M.D., MACDONALD J.F., G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors, *Nat. Neurosci.* 2 (4) 331–338, 1999.
117. Y. TANABE, MASU M., ISHII T., SHIGEMOTO R., NAKANISHI S.. *Neuron* 8, 169; K. M. Houamed et al., *Science* 252, 1318, 1992.
118. ZIRPEL L., RUBEL E.W., Eighth nerve activity regulates intracellular calcium concentration of avian cochlear nucleus neurons via a metabotropic glutamate receptor. *J Neurophysiol.*, 76:4127–4139, 1996.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 159 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Modulação da excitabilidade celular por receptores metabotrópico para glutamato (mGluR).”, que tem como responsável Christopher Kushmerick, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 15/06/2015. Este certificado espira-se em 15/06/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 159 / 2015, related to the Project entitled “Modulation of cellular excitability by metabotropic glutamate receptors”, under the supervision of Christopher Kushmerick, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 15/06/2015. This certificates expires in 15/06/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 15/06/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br