

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E BIOFÍSICA**

Ana Maria Bernal Correa

**Isoforma de receptor e canais iônicos responsáveis pela corrente ativada por
receptores metabotrópicos de glutamato em neurônios do MNTB.**

Belo Horizonte

2016

Ana Maria Bernal Correa

Isoforma de receptor e canais iônicos responsáveis pela corrente ativada por receptores metabotrópicos de glutamato em neurônios do MNTB.

Dissertação submetida ao departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia e Farmacologia, sob orientação do Prof. Dr. Christopher Kushmerick.

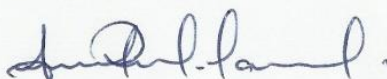
Belo Horizonte

2016

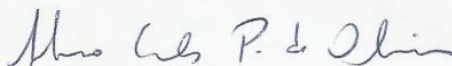
**"ISOFORMA DE RECEPTOR E CANAIS IÔNICOS
RESPONSÁVEIS PELA CORRENTE ATIVADA POR RECEPTORES
METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EM NEURÔNIOS DO
MNTB"**

ANA MARIA BERNAL CORREA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 25 de agosto de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
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, 25 de agosto de 2016

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Maria del Pilar e César,
ao meu amado esposo Nájera e a nossa inigualável filha Juanita.

AGRADECIMENTOS

A Deus que se manifesta todos os dias na alegria que minha família me provê;

Aos meus pais e irmãos por me apoiarem desde o começo, quando surgiu a ideia de vir para o Brasil a estudar;

Ao meu esposo e a minha filha que me deram sua força e companhia para que este momento, tantas vezes sonhado, se tornasse realidade;

Ao meu orientador Prof. Dr. Christopher Kushmerick e a Prof.^a Dr.^a Ligia Naves por confiar em mim e abrir mais do que a porta do seu laboratório para mim e minha família;

Ao Prof. Dr. Miguel José Lopes que compartilhou comigo suas experiências no setup de registro intracelular;

Aos colegas de laboratório Éverton, Aline, Jennifer e Wallace que me permitiram ficar do seu lado nos primeiros meses para aprender as técnicas;

À Isabella Olmo, doutoranda em Neurociências, que dedicou tempo para me ensinar a genotipagem;

Aos professores que através das suas aulas tem contribuído para minha formação;

À minha professora colombiana Carmen Helena Moreno que sempre me estimulou a continuar estudando;

À Laura Jaimes, quem conheci aqui e se fez minha amiga desde o primeiro dia e sempre ficou atenta a mim;

A toda minha família, e demais colegas que conheci aqui no ICB, que contribuíram no âmbito espiritual e acadêmico ao longo destes dois anos.

Obrigada!

RESUMO

Os receptores metabotrópicos para glutamato são uma família de receptores acoplados a proteína G, que desenvolvem funções importantes no controle da excitabilidade neuronal, na modulação da transmissão sináptica e no desenvolvimento do sistema nervoso central. Estes receptores têm sido classificados dentro de três grupos (denominados Grupo I, II, III) segundo sua estrutura e as vias de sinalização que ativam. O Grupo I é composto pelas isoformas mGluR1 e mGluR5, que apresentam similaridade na sequência de aminoácidos, na seletividade por determinados agonistas e por estarem acoplados a proteína Gq e a via de sinalização da Fosfolipase C / IP3 / DAG. A ativação de receptores mGluR do Grupo I, gera uma corrente de entrada (despolarização) em neurônios do Núcleo Medial do Corpo Trapezoide (MNTB) através de mecanismos desconhecidos. Esta corrente, que chamamos $I_{mGluR-I}$, aumenta a excitabilidade destas células. Os neurônios do MNTB expressam receptores mGluR1 e mGluR5, no entanto a contribuição individual de cada isoforma para a geração da $I_{mGluR-I}$ não está determinada. O objetivo deste estudo é caracterizar a contribuição de cada isoforma dos receptores metabotrópicos para glutamato do Grupo I na geração desta corrente e identificar os tipos de canais responsáveis por esta ação ionotrópica de receptores metabotrópicos para glutamato.

Foram feitos registros em *Patch Clamp* na modalidade *whole-cell current* e *voltage clamp* de neurônios do MNTB em fatias do cérebro de camundongos neonatos (P6 a P9; peso 3 a 6 g). O efeito de agonistas, antagonistas e bloqueadores foi quantificado por medição da variação do potencial de membrana ou da corrente de membrana durante a aplicação das drogas e comparado com a linha de base prévia. Os dados numéricos são apresentados como o valor da média \pm S.E.M. As análises estatísticas foram feitas usando o teste T de Student, considerando diferença estatística quando o valor de P foi menor de 0.05. Este projeto foi aprovado pelo CEUA/UFMG (Protocolo 159/2015).

O agonista seletivo dos mGluR do Grupo I, DHPG, evocou uma despolarização dependente da concentração em neurônios do MNTB, com um efeito máximo ao redor de 8 mV e um EC50 de 1 μ M. Em registros em *voltage-clamp* o DHPG (10 μ M) induziu uma corrente de entrada (-30.4 ± 3.1 pA). MPEP (10 μ M), um antagonista seletivo para a isoforma mGluR5, reduziu a $I_{mGluR-I}$ em $40.5 \pm 9.2\%$ ($P = 0.05$, $N = 5$), enquanto LY367385 (100 μ M), um antagonista seletivo para a isoforma mGluR1, inibiu a corrente de entrada em 100% ($P = 0.02$, $N = 3$). Numa segunda abordagem, foram usados animais com deleção genética do gene correspondente à isoforma mGluR5. Nós não observamos diferença na

$I_{mGluR-I}$ medida em animais KO para o mGluR5 quando comparados com os animais WT da mesma colônia (-37.7 ± 6.5 pA vs. -35.1 ± 5.0 pA, $N = 6$; $P = 0.79$).

Para identificar os mecanismos ionotrópicos da $I_{mGluR-I}$, foram testados bloqueadores de canais iônicos candidatos. O bloqueio dos canais ASIC com Amilorida ($100 \mu\text{M}$) não inibiu significativamente a $I_{mGluR-I}$. Ao contrário, o bloqueio de canais para potássio do tipo retificadores de entrada, com BaCl_2 ($500 \mu\text{M}$) ou o bloqueio de canais HCN com ZD7288 ($100 \mu\text{M}$) reduziu a corrente em $33.6 \pm 5.9\%$ ($P = 0.04$, $N = 8$) e $59.6 \pm 7.5\%$ ($P = 0.01$, $N = 6$), respectivamente. Quando aplicados conjuntamente, BaCl_2 ($500 \mu\text{M}$) e ZD7288 ($100 \mu\text{M}$) inibiram a corrente em $77 \pm 3.3\%$ ($P = 0.02$, $N = 4$).

Através destes resultados nós concluímos que ambos receptores mGluR1 e mGluR5 contribuem na geração da $I_{mGluR-I}$. No entanto, somente mGluR1 é essencial, pois ao ser bloqueada esta isoforma a corrente é abolida, e em animais KO para mGluR5, os receptores mGluR1 compensam completamente esta perda. O bloqueio de canais HCN e canais para K^+ do tipo retificador de entrada inibiu a maior parte da $I_{mGluR-I}$, indicando que estes tipos de canais são responsáveis pelos efeitos ionotrópicos de receptores metabotrópicos para glutamato no MNTB.

Palavras-chave: Núcleo Medial do Corpo Trapezoide, Receptor Metabotrópico Glutamatérgico do Grupo I, DHPG, Canais HCN, Canais Kir 3.1, Canais ASIC.

ABSTRACT

Metabotropic glutamate receptors play physiological roles in the control of neuronal excitability, modulation of synaptic transmission, regulation of synaptic efficacy and development of the nervous system. These receptors can be classified into three groups according to their structure and signaling pathways. Group I is composed of the isoforms mGluR1 and mGluR5 that share genetic sequence similarity, selectivity for certain agonists, and couple through Gq protein and the Phospholipase C / IP3 / DAG pathways. Activation of postsynaptic Group I mGluR receptors generates an inward (depolarizing) current in Medial Nucleus of the Trapezoid Body (MNTB) neurons through an unknown mechanism. This current, which we call $I_{mGluR-I}$, increases the excitability of these cells. MNTB neurons express both mGluR1 and mGluR5 receptors, however the individual contribution of each isoform to $I_{mGluR-I}$ is unknown. The aim of this study is characterize the contribution of each Group I metabotropic glutamate receptor isoform to the generation of this current and to identify the channel types responsible for this ionotropic action of metabotropic glutamate receptors.

Whole-cell current and voltage clamp recording were made from neonatal mice (post-natal days 6-10; weight 3–6 g) MNTB neurons using a brain slice preparation. Drug effects were quantified by measuring the change in membrane potential or membrane current during drug application compared to the previous baseline. Numerical data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using Student's t test with $P < 0.05$ considered statistically significant. This project was approved by CEUA/UFMG (Protocol 159/2015).

The Group I mGluR selective agonist DHPG evoked a dose-dependent depolarization of MNTB neurons, with a maximal effect about 8 mV and an EC₅₀ of 1 μ M. In voltage clamp recordings, DHPG (10 μ M) induced an inward current (-30.4 ± 3.1 pA). MPEP (10 μ M), a selective antagonist for mGluR5, reduced $I_{mGluR-I}$ by $40.5 \pm 9.2\%$ ($P = 0.05$, $N = 5$), whereas LY367385 (100 μ M), a selective antagonist for mGluR1, inhibited the inward current by 100% ($P = 0.02$, $N = 3$). In a second approach we used mice with targeted deletion of the mGluR5 receptor gene. We observed no difference in $I_{mGluR-I}$ measured in mGluR5 KO mice when compared to WT littermates (-37.7 ± 6.5 pA vs -35.1 ± 5.0 pA, $N = 6$; $P = 0.79$). To identify the ionotropic mechanism of $I_{mGluR-I}$, we tested inhibitors of candidate ion channels. Block of ASIC channels with Amiloride (100 μ M) did not inhibit significantly $I_{mGluR-I}$. In contrast, block of inward-rectifying K⁺ channels with BaCl₂ (500 μ M) or block of HCN channels with ZD7288 (100 μ M) reduced the current by $33.4 \pm 5.9\%$ ($P = 0.04$, $N = 8$) and $59.6 \pm 7.5\%$ ($P = 0.01$, N

= 6), respectively. When applied together, BaCl₂ (500 μM) and ZD7288 (100 μM) inhibited the current by 77 ± 3.3% (*P* = 0.02, N=4).

We concluded that both mGluR1 and mGluR5 contribute to the generation of I_{mGluR}. However, only mGluR1 is essential as block of this isoform abolishes the current and mGluR1 can completely compensate for the loss of mGluR5 in KO animals. Block of HCN channels or inward-rectifying K⁺ channels strongly reduces I_{mGluR-1}, indicating that these channel types are responsible for the ionotropic effects of metabotropic glutamate receptors in the MNTB.

Keywords: Medial Nucleus of the Trapezoid Body, Group I Metabotropic Glutamate Receptor, DHPG, HCN channels, Kir 3.1 Channels, ASIC channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral dos receptores mGlu	21
Figura 2 – Via de sinalização dos mGluR-I	23
Figura 3 – Sítios de ligação ortostérico e alostérico dos mGluR	26
Figura 4 – Conexões anatômicas da via auditiva	28
Figura 5 – Cálice de Held	29
Figura 6 – Expressão das isoformas dos mGluR-I no MNTB ao longo do desenvolvimento de camundongos	31
Figura 7 – Montagem do tronco encefálico para cortes no micrótomo	35
Figura 8 – Localização anatômica do MNTB	36
Figura 9 – Desenho da vista superior da câmara de registro no setup	38
Figura 10 – MNTB em fatia de camundongo (P8)	39
Figura 11 – Efeito do aumento de K^+ extracelular em células do MNTB	40
Figura 12 – DHPG despolariza e gera uma corrente negativa em neurônios do MNTB	43
Figura 13 – DHPG despolariza de maneira concentração-dependente os neurônios do MNTB	44
Figura 14 – Os receptores mGluR-I não são dessensibilizados durante duas aplicações consecutivas do DHPG	45
Figura 15 – As duas isoformas do mGluR-I contribuem para a geração da $I_{mGluR-I}$	47
Figura 16 – Magnitude da $I_{mGluR-I}$ evocada por DHPG em animais WT e KO para mGluR5	48
Figura 17 – Amilorida não afeta a magnitude da $I_{mGluR-I}$ evocada por DHPG	49
Figura 18 – Ba^{2+} reduz a corrente de entrada evocada por DHPG	50
Figura 19 – ZD7288 reduz a corrente de membrana evocada DHPG	51
Figura 20 – Aplicação conjunta de Ba^{2+} ZD7288 e reduz 77% da corrente evocada por DHPG	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isoformas e ligantes seletivos para iGluR	19
Tabela 2 – Características que permitiram estabelecer os grupos de mGluR	20
Tabela 3 – Potência de alguns agonistas seletivos e não seletivos para receptores mGluR do Grupo I	25
Tabela 4 – Potência de alguns antagonistas seletivos e não seletivos para receptores mGlu do Grupo I	26
Tabela 5 – Antagonistas para mGluR-I e canais iônicos usados.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSF	<i>Artificial Cerebrospinal Fluid</i>
ASIC	<i>Acid-Sensing Ion Channels</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CoH	Calyx de Held
CRAC	<i>Calcium-Release Activated Ca current</i>
DAG	Diacil-glicerol
DHPG	<i>3,5-Dihydroxyphenylglycine hydrate</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
EC50	Concentração Efetiva 50%
EPSC	Potencial Pós-sináptico Excitatório
GBC	<i>Globular Bushy Cells</i>
GDP	Guanosina Difosfato
GIRK	<i>G-protein regulated inwardly rectifying K channels</i>
GlyT2	<i>Glycine Transporter 2</i>
GRK	Quinases do receptor acoplado a proteína G
GTP	Guanosina Trifosfato
HCN	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels</i>
iGluR	Receptores Ionotrópicos para Glutamato
ImGluR-I	Corrente evocada pela ativação dos mGluR-I
IP	Fosfoinosítídeos
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP3R	Receptores para IP3
KO	<i>Knockout</i>
LBR	Região de Ligação do Neurotransmissor
LNTB	Núcleos Lateral do Corpo Trapezoide
LSO	Oliva Lateral Superior
LTD	<i>Long-term Depression</i>
LTP	<i>Long-term Potentiation</i>

LY 367385	<i>(S)-(+)-α-Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid</i>
mGluR	Receptores Metabotrópicos para Glutamato
mGluR-I	Receptores Metabotrópicos para Glutamato do Grupo I
MNTB	Núcleo Medial do Corpo Trapezoide
MPEP	<i>2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride</i>
MSO	Oliva Medial Superior
NAM	Modulador Alostérico Positivo
NTS	Núcleo do Trato Solitário
P6-9	Pós-natal 6 a 9
PA	Potencial de Ação
PAM	Modulador Alostérico Positivo
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
SNr	Substância Nigra Pars Reticulata
SPON	Núcleo Paraolivar Superior
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
VCN	Núcleo Coclear Ventral
VFD	Domínios <i>Venus Flytrap</i>
VGCC	Canal de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
Vm	Potencial de membrana
VNTB	Núcleos Ventral do Corpo Trapezoide
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Glutamato	17
1.2 Receptores Glutamatérgicos	18
1.2.1 Receptores inotrópicos para glutamato (iGluR)	18
1.2.2 Receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR)	19
Receptores mGlu do grupo I (mGluR-I)	22
Farmacologia dos mGluR-I	24
Agonistas	24
Antagonistas	25
1.3 Núcleo Medial do Corpo Trapezoide	27
1.3.1 MNTB na via auditiva	27
1.3.2 Formação e maturação as sinapse CoH	28
1.3.3 Controle da transmissão sináptica no MNTB	30
1.3.4 mGluRs no MNTB	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAS E MÉTODOS	34
4.1 Animais	34
4.2 Fármacos e reagentes	34
4.3 Obtenção de fatias	34
4.3.1 Localização do MNTB	35
4.4 Eletrofisiologia	36

4.4.1 Equipamento	36
4.4.2 Pipetas	37
4.4.3 Solução Interna	37
4.4.4 Sistema de perfusão	37
4.5 Registros eletrofisiológicos	38
4.5.1 Teste do sistema de perfusão e resposta celular	39
4.5.2 Estabelecimento da curva dose resposta para o agonista.	40
4.5.3 Uso de antagonistas e bloqueadores	40
4.6 Análises estatísticas	41
5. RESULTADOS	42
5.1 Ativação de mGluR do grupo I em neurônios do MNTB	42
5.2 Curva concentração resposta para o DHPG em neurônios do MNTB.	43
5.3 Respostas dos neurônios do MNTB a aplicações consecutivas do DHPG.	44
5.4 Bloqueio da $I_{mGluR-I}$ com antagonistas seletivos.	46
5.5 Corrente mGluR-I em animais knockout para mGluR5	48
5.6 Mecanismos ionotrópicos responsáveis pela $I_{mGluR-I}$	48
5.6.1 Canais ASIC na geração da $I_{mGluR-I}$	49
5.6.2 Canais GIRK na geração da $I_{mGluR-I}$	49
5.6.3 Canais HCN na geração da $I_{mGluR-I}$	50
5.6.4 Participação conjunta de canais GIRK e HCN na geração da $I_{mGluR-I}$	51
6. DISCUSSÃO	53
6.1 Ativação dos mGluR-I induzida por DHPG	53
6.2 Os neurônios do MNTB respondem de forma concentração dependente à aplicação do DHPG.	54
6.3 Dessensibilização dos receptores a aplicações consecutivas do DHPG	54

6.4 Participação das isoformas mGluR1 e mGluR5 na geração da $I_{mGluR-I}$	55
6.5 Mecanismos ionotrópicos envolvidos na geração da $I_{mGluR-I}$	57
6.5.1 Canais ASIC	57
6.5.2 Canais Kir 3.1	58
6.5.3 Corrente I_h mediada por Canais HCN	59
6.5.4 Resumo de canais envolvidos na $I_{mGluR-I}$	59
7. CONCLUSÕES	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9. AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO	71

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho descrevemos a modulação de um grupo de neurônios por receptores metabotrópicos para glutamato, procurando entender a isoforma de receptor e as bases iônicas de tal modulação. A introdução apresentará um breve resumo do papel do glutamato como um neurotransmissor e os tipos de receptores para os quais ele se pode ligar. Em seguida, serão descritas características do grupo de neurônios em que foram desenvolvidos os experimentos, que estão localizados nas vias auditivas do tronco encefálico. Por último, serão apresentados achados da literatura sobre a expressão dos receptores metabotrópicos para glutamato durante o desenvolvimento, especialmente no núcleo encefálico de interesse.

1.1 Glutamato

O glutamato, também conhecido como ácido glutâmico, é um aminoácido identificado, também, como neurotransmissor no sistema nervoso central de mamíferos. Em 1930 foi reconhecido, pela primeira vez, que o cérebro continha altas concentrações desta substância, motivo que levou a se especular sobre sua função como neurotransmissor. Em experimentos desenvolvidos entre 1950 e 1960, o glutamato foi reconhecido como uma substância excitatória (Hayashi, 1954; Curtis & Watkins, 1960) ainda que só fosse considerado como neurotransmissor na década dos 80, depois de múltiplas investigações que esclareceram, em parte, o ciclo da glutamina-glutamato (Watkins J, 1972), a recaptção do glutamato na fenda sináptica e a presença de receptores específicos para o glutamato (Curtis & Johnston, 1974).

Hoje, é sabido que o glutamato é armazenado em vesículas do terminal pré-sináptico, e pode ser liberado quando a membrana é despolarizada o que desencadeia um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, pelo influxo do íon através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Purves et al., 2004). Quando liberado na fenda sináptica o glutamato pode se ligar aos seus receptores ou ser recaptado pelos astrócitos para serem convertidos em glutamina ou fazer parte do ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) (Björkalund & Hökfelt, 2000).

1.2 Receptores Glutamatérgicos

O reconhecimento de receptores específicos permitiu catalogar o glutamato como neurotransmissor e os receptores ionotrópicos para glutamato (iGluR) foram os primeiros a serem descobertos no final da década dos 70. Esses receptores foram chamados de receptores NMDA, AMPA (quisqualate) e Kainato de acordo com a afinidade dos receptores para estas substâncias que funcionam como agonistas (*Revisado por Watkins & Jane, 2006*).

No final do século XX, a ativação de segundos mensageiros através de fosfoinosítídeos foi reconhecida como uma via de transdução de sinais para hormônios e neurotransmissores no SNC e SNP (Berridge & Irvine, 1984; Nishizuka, 1984). A técnica de marcação de ³H-inositol permitiu amplificar as respostas induzidas por agonistas em fatias de cérebro (Berridge et al., 1982), e desta maneira foi descrita a hidrólise de fosfoinosítídeos induzida por glutamato e seus agonistas em neurônios (Bardsley & Roberts, 1983; Sladeczek et al., 1985). Isto levou a confirmar a existência de outro tipo de receptores específicos, tempo depois chamados de receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR) (Schoepp, Jane, & Moon, 1999).

1.2.1 Receptores ionotrópicos para glutamato (iGluR)

Os iGluR medeiam respostas sinápticas rápidas e de duração curta pela abertura direta de canais para cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}). Os receptores iGluR são representados por três famílias de receptores (AMPA, NMDA, Kainato e Delta (δ)) definidas originalmente por sua afinidade farmacológica a determinados agonistas, subsequentemente por sua similaridade na estrutura e na sequência genética. Cada uma destas famílias apresenta na sua estrutura molecular subunidades diferentes que foram identificadas e que determinam as isoformas de cada família de iGluR (Meldrum, 2000; Purves et al., 2004; Collingridge, et al., 2009) (Tabela 1).

Estes receptores desenvolvem papéis importantes na plasticidade neuronal, como fundamento para o aprendizado e a memória, além de terem sido estudados como alvos de fármacos no tratamento de várias doenças (*Revisado por Krieger et al., 2015*).

Tabela 1. Isoformas e ligantes seletivos para iGluR.

	NMDA	AMPA	Kainato	Delta
Isoformas (NC-IUPHAR*)	GluN1 GluN2A GluN2B GluN2C GluN2D GluN3A GluN3B	GluA1 GluA2 GluA3 GluA4	GluK1 GluK2 GluK3 GluK4 GluK5	GluD1 GluD2
Agonistas	NMDA Tetrazolyglycine	AMPA LY404187 (S)-5-fluorowillardiine	Kainate ATPA (S)-5-iodowillardiine LY339434 SYM 2081	?
Antagonistas	CPP PEAQX PPDA Ro 25-6981	NBQX LY293558 (S)-ATPO GYKI53655	LY382884 UBP302 NS 3763	?
* <i>International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification</i> ? Não identificados				

Adaptado de Purves et al., 2004 Watkins et al., 2006 Collingridge, et al., 2009 & Peters et al., 2016

1.2.2 Receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR)

Este tipo de receptores são membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G, que no caso são ativados pelo neurotransmissor glutamato. A ativação de receptores mGluR e da proteína G associada, desencadeia cascatas de segundos mensageiros e vias de sinalização intracelular.

A proteína G é formada pelo complexo de três subunidades α , β e γ . No estado inativo as subunidades α , β e γ formam um complexo no qual uma molécula de guanosina difosfato (GDP) está ligada à subunidade α . A ativação da proteína G muda a conformação das subunidades permitindo que o GDP seja trocado por uma guanosina trifosfato (GTP). Em seguida, o complexo se separa em duas partes: a subunidade α ligada a GTP e o complexo das subunidades β e γ . Esta dissociação permite que as duas partes (α -GTP e β - γ) possam interagir com e modular a função de várias moléculas como enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição. A subunidade α possui atividade GTPase e quando o GTP é hidrolisado para GPD ocorre a reassociação do complexo $\alpha\beta\gamma$ e o término das ações iniciadas pela proteína G (Cartmell & Schoepp, 2000; Niswender & Conn, 2010).

A estrutura dos receptores mGluR está dividida em três regiões: a região extracelular (divida também na região de ligação (LBR) e região rica em cisteína), a região dos sete

domínios transmembrana e a região intracelular. Os domínios de ligação extracelular também são conhecidos como domínios “*Venus flytrap*” (VFDs) os quais ligam o glutamato ou outros ligantes ortostéricos. As regiões ricas em cisteína ligam os VFDs aos sete domínios transmembrana (7TM) (Fig. 1).

Em 1992, Nakanishi propôs que a variada família de receptores mGluR poderia ser classificada em três grupos diferentes (I, II e III) de acordo a homologia entre as sequências, semelhanças no mecanismo de transdução e nas propriedades farmacológicas (*Revisado por* Schoepp et al., 1999). Atualmente, esta classificação é ainda usada, especialmente para determinar propriedades farmacológicas. Dentro destes três grupos estão classificados oito subtipos ou isoformas do receptor com suas respectivas variantes por “*splicing*” alternativo (Tabela 2).

Tabela 2. Características que permitiram estabelecer os grupos de mGluR.

	Isoformas	Tipo de proteína G α	Variantes Splicing	Agonista	Mecanismo de transdução
mGlu - I	mGluR1	G α q	a - f	Quisqualate	↑ Hidrolises de PI
	mGluR5		a, b		
mGlu - II	mGluR2	Gi	—	L-CCG-I	↓ AMP _c
	mGluR3		—		
mGlu - III	mGluR4	Gi	—	L-AP4	↓ AMP _c
	mGluR6		a - c		
	mGluR7		a - e		
	mGluR8		a - c		
	<i>PI: Fosfoinosítídeos</i>				

Adaptado de Niswender et al., 2010 & Schoepp et al., 1999

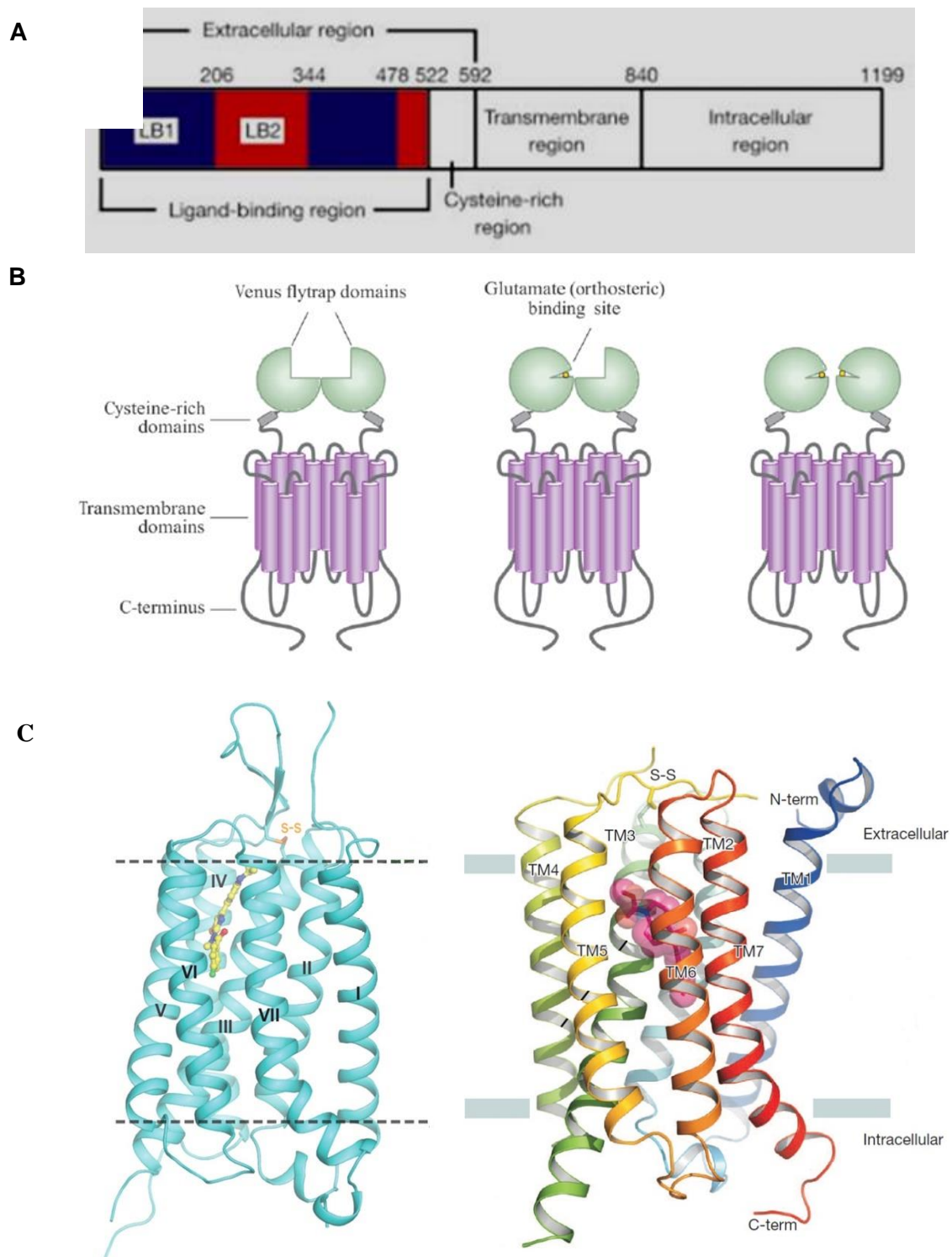


Figura 1: Estrutura geral dos receptores mGlu. **A:** Diagrama das regiões do receptor. Os domínios LB1 e LB2 constituem a região de ligação (LBR). Os números indicam as posições de resíduos de a.a. (Kunishima, *et al.*, 2000) **B:** dímero do receptor. Os domínios *Venus Flytrap* representam a LBR. Os círculos em amarelo representam o Glutamato. Os diagramas do centro e da direita representam as formas ativas do receptor (Niswender *et al.*, 2010). **C:** Estrutura em 3D dos receptores mGluR1 (**C1**) (Wu, *et al.*, 2014) e mGluR5 (**C2**) (Doré, *et al.*, 2014).

Estudos imunohistoquímicos têm permitido determinar a localização dos receptores mGluR do Grupo I como pós-sináptica, os mGluR do Grupo III predominantemente expressos no terminal pré-sináptico, já os receptores mGluR do grupo II estão expressos em terminais pré e pós-sinápticos. A localização pré-sináptica dos receptores dos Grupos II e III os envolve com o controle retrógrado da liberação de neurotransmissores (*Revisado por* Cartmell et al., 2000 & Niswender et al., 2010). A função dos receptores do grupo I é mais complexa, com ações pré- e pós-sinápticas. A ativação desses receptores na célula pós-sináptica evoca a liberação de endocannabinóides e a retroinibição da liberação de neurotransmissores, além de provocar a geração de correntes pós-sinápticas que afetam diretamente a excitabilidade celular (Varma et al., 2001; Maejima et al., 2001).

Receptores mGlu do Grupo I (mGluR-I)

O mecanismo de transdução clássico destes receptores, ao estarem acoplados a proteína $G\alpha_q$, inclui a ativação da fosfolipase C (PLC) e a hidrólise de fosfoinosítídeos (4,5) bisfosfato gerando inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) e diacil-glicerol (DAG). Estes segundos mensageiros, por sua vez, resultam na liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e a ativação da proteína quinase C (PKC) (Fig. 2). No entanto, além dessas vias clássicas, tem sido reconhecido que receptores mGluR do Grupo I podem ativar outras vias de sinalização como PLD, MAPK/ERK e MTOR/p70/S6 quinase (Niswender et al., 2010).

Este grupo de receptores está amplamente expresso tanto em neurônios quanto em células glia de diversas regiões do SNC. O mGluR1 tem sido identificado na região CA3 do hipocampo, nas células de Purkinje do cerebelo, no bulbo olfatório e no tálamo, enquanto a isoforma mGluR5 está expressa nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, no córtex, no estriado e no bulbo olfatório. Nas células de Purkinje do cerebelo foi identificada o mGluR5 em densidade menor respeito à isoforma mGluR1 (Bordi & Ugolini, 1999). Apesar de pertencer ao mesmo grupo e estarem co-localizados em algumas regiões do cérebro, a expressão dos receptores mGluR1 e mGluR5 é regulada de forma diferente durante o desenvolvimento, o que sugere diferenças funcionais das isoformas dependendo da região em que se encontra o neurônio (Catania, et al., 1994).

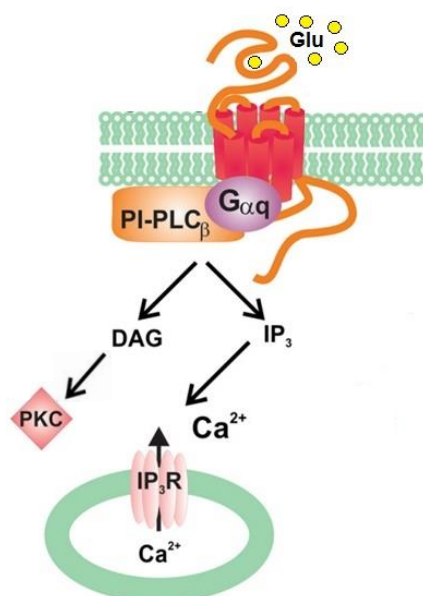


Figura 2: Via de sinalização dos mGluR-I: A ativação da proteína Gq do receptor, ao se ligar o glutamato ou agonista, ativa a PLC que promove a hidrólise de PI gerando IP₃ e DAG, o IP₃ age sobre receptores IP₃ no retículo endoplasmático provocando a abertura de canais de Ca²⁺ e a difusão do íon no citosol; o DAG pode também ativar PKC. Glu, Glutamato; PI, fosfoinosítídeos; PLC, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; IP₃R, receptores para IP₃; PKC, proteína quinase C (*Adaptado de Hamilton et al., 2015*).

A ativação dos receptores mGluR1 e mGluR5 induz diferentes respostas que tem papéis importantes nos processos de plasticidade sináptica (*Long-term Potentiation – LTP* e *Long-term Depression – LTD*) envolvendo a aprendizagem, a memória e o comportamento; no desenvolvimento neuronal e na neurodegeneração (Malenka R.C., 1994; Malenka & Bear, 2004; Citri & Malenka, 2008)

A resposta destes receptores acoplados a proteína G pode ser regulada por processos de dessensibilização. Este mecanismo protege da excessiva estimulação do receptor e é ativado imediatamente após se expor o receptor ao agonista. Ainda que o mecanismo de dessensibilização dependa do tipo de receptor, tipo de ligante e do sistema, tem sido identificadas algumas proteínas que intervêm no processo, por exemplo:

As quinases do receptor acoplado a proteína G (GRK) medeiam a fosforilação promovendo a ligação da β-arrestina, que funciona como um alvo para endocitose causando a internalização do receptor no endossoma, onde pode ser reciclado para voltar à membrana ou degradado;

A proteína quinase C e A (PKC e PKA) são efetores dos segundos mensageiros implicados na dessensibilização dos receptores mGluR do Grupo I (Ferguson, 2001; Dhimi & Ferguson, 2006; Bhattacharyya, 2016).

Devido às variadas funções fisiológicas dos receptores mGluR do Grupo I, estes tem sido estudados como alvos terapêuticos para graves doenças neurológicas e neurodegenerativas, como a seqüela após isquemia ou trauma cerebral, a dor crônica, as epilepsias, a esclerose múltipla, a esclerose lateral amiotrófica, Doenças de Huntington e Parkinson, síndrome do X frágil e autismo, portanto a criação e descoberta de moduladores tanto positivos, quanto negativos para estes receptores são um amplo alvo de estudo atualmente (Bhattacharyya, 2016).

Farmacologia dos mGluR-I

Agonistas

Os perfis farmacológicos de receptores mGluR-I foram primeiramente estudados na isoforma mGluR1_a, e tem sido caracterizadas várias substâncias que agem como agonistas.

Vários agonistas tem sido caracterizados com diferentes faixas de potência: Quisqualato > 3,5-dihydroxyphenylglycine (3,5-DHPG) > glutamato > 1S,3R-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (ACPD) > L-CCG-I > 3-HPG > t-ADA. No entanto, só (S)-3,5-DHPG, 3-HPG e t-ADA são específicos para mGluR-I (Wisniewski & Car, 2002)(Tabela. 3).

O Quisqualato é o agonista mais potente, ainda que possa ativar também receptores AMPA. O (S)-3,5-DHPG estimula potentemente os receptores do Grupo I e não foi observada atividade do DHPG sobre receptores ionotrópicos ou receptores metabotrópicos do grupo II ou III. Este agonista ortostérico foi identificado como ativador de mGluR₁ (Ito, et al., 1992) e mGluR₅ com afinidade similar (Balázs, et al., 1997).

O (S)-3,5-DHPG estimula a hidrólise de fosfoinosítídeos em fatias de ratos neonatos ($EC_{50} \sim 7 \mu M$) e ratos adultos ($EC_{50} \sim 28 \mu M$) (*Revisado por* Wisniewski et al., 2002), e na concentração 10 μM age sobre receptores dos neurônios do CA1 do hipocampo aumentando a excitabilidade, assim como também induz a despolarização da membrana, de forma dose dependente, em concentrações entre 2,5 e 50 μM (Zahorodna et al., 1998).

Tabela 3: Potência de alguns agonistas seletivos e não seletivos para receptores mGluR do Grupo I.

	Potencia EC ₅₀ (µM)							
	Grupo I		Grupo II		Grupo III			
	mGlu1	mGlu5	mGlu2	mGlu3	mGlu4	mGlu6	mGlu7	mGlu8
L-Glutamato ^{a,b}	1-13	3-11	0,3-12	2-9	3-17	5-38	2300	8-10
L-CCG-I ^{a,b}	2	3	0,5	0,4	9	6	230	3
Quisqualato ^{a,b}	0,03-3	0,02–0,3	100-1000	40-220	100-1000	n.e.	n.e.	720
S-3,5-DHPG^{a,b}	6	2	n.e.	n.e.	n.e.	--	n.e.	n.e.

^a Human, ^b Rat
(n.e.) Não tem efeito
(--) efeito não determinado

Adaptado de Schoepp et al., 1999 & Acher, 2011

Antagonistas

O primeiro antagonista dos receptores mGlu do grupo I amplamente usado foi o (S)-MCPG. No entanto, essa molécula apresentava pouca seletividade entre os grupos de mGluR. Na tentativa de melhorar sua seletividade, varias modificações sobre a estrutura molecular do MCPG foram feitas, e algumas novas moléculas apresentaram uma maior seletividade pelos mGluR-I. O LY367385 (4C2MPG) foi um dos resultados destas modificações mostrando maior seletividade pela isoforma mGluR1 (Tabela 4).

Em 1999, o composto *6-methyl-2-(phenylethynyl)-pyridine* (MPEP), que age como antagonista seletivo do mGluR5, foi sintetizado a partir de outras duas moléculas (SIB 1757 e SIB 1893) (Varney, et al., 1999). MPEP apresentou seletividade para os receptores mGluR5, permitindo assim desenvolver experimentos para explorar o papel dos receptores mGluR5 (Gasparini, et al., 1999), que posteriormente o transformariam em um potencial alvo terapêutico para várias doenças.

A partir de antagonistas específicos para as isoformas mGluR1 e mGluR5, tem sido desenvolvidas outras moléculas que agem como moduladores destes receptores quando ativados. Moléculas que interagem com o receptor em sítios de ligação topograficamente diferentes do sitio ativo e que podem modular, aumentando ou diminuindo, a afinidade do receptor pelo ligante endógeno são chamados de Moduladores Alostéricos positivos ou negativos (Wootten et al., 2013) (Fig. 3).

Tabela 4: Potência de alguns antagonistas seletivos e não seletivos para receptores mGlu do grupo I

	IC ₅₀ (μM)							
	Grupo I		Grupo II		Grupo III			
	mGlu1	mGlu5	mGlu2	mGlu3	mGlu4	mGlu6	mGlu7	mGlu8
MCPG	40-320	195-460	15-340	300-1000	>1000	>100	>1000	>300
LY367385 ^a	8,8	>300	>100	--	>300	--	--	--
LY367366 ^{a,b}	6,6	5,6	--	--	--	--	--	--
LY339840 ^a	7,5	140	>300	--	>300	--	--	--
SIB 1757 ^a	>30	0,4	>30	--	>30	>30	>30	>30
SIB 1893 ^a	>30	0,3	>30	--	>30	>30	>30	>30
MPEP ^a	>100	0,036	>100	--	PAM	>100	>100	>100

^a Human, ^b Rat
(PAM) Modulador alostérico positivo
(--) efeito não determinado

Adaptado de Acher, 2011 & Schoepp et al., 1999

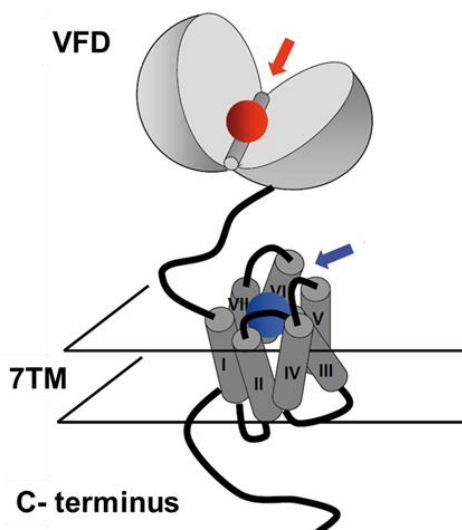


Figura 3: Sítios de ligação ortostérico e alostérico dos mGluR. Os mGluR podem apresentar duas regiões de ligação o sítio de ligação ortostérico ou primário, alvo de agonistas e antagonistas (indicado pela seta vermelha); e o sítio alostérico, alvo de moduladores positivos (PAM) ou negativos (NAM) (indicado pela seta azul). VFD, Domínios *Venus Flytrap*. 7TM, sete domínios transmembrana. Adaptado de Acher, 2011.

1.3 Núcleo Medial do Corpo Trapezoide

Os experimentos descritos abaixo foram realizados em neurônios do Núcleo Medial do Corpo Trapezoide (MNTB). Esse núcleo faz parte do Complexo Olivar Superior (COS) localizado na parte caudal e ventral da ponte e na região medial do núcleo paraolivar. O MNTB é formado por células globulares com diâmetro aproximado de ~20 μm (**Harrison & Warr, 1962**). O MNTB transforma sinais excitatórios recebidos do núcleo coclear contralateral em sinais inibitórios que são dirigidos a diferentes núcleos auditivos no tronco cerebral (*Revisado por Tolnai et al., 2008*).

1.3.1 MNTB na via auditiva

O MNTB é um núcleo inibitório que projeta para a oliva medial superior (MSO) e a oliva lateral superior (LSO) (Clause et al., 2014), dois núcleos que analisam diferenças do tempo e intensidade dos sinais interaurais que permite a localização da origem de sons no plano horizontal.

Os neurônios do núcleo ventral coclear (VCN) recebem entradas cocleares pelo VIII nervo craniano. Parte desses aferentes fazem sinapses com as “*globular bushy cells*” (GBCs) do VCN que projetam axônios para as células principais do MNTB contralateral (**Morest, 1968**). O término dos axônios dos GBCs formam uma gigante sinapse axosômica chamada o Calyx de Held (CoH). Os neurônios do MNTB emitem projeções glicinérgicas ipsilaterais para outras regiões como LSO, MSO, o núcleo paraolivar superior (SPON), e os núcleos lateral e ventral do corpo trapezoide (LNTB e VNTB) (Aoki et al. 1988) (Borst et al., 2012) (Fig. 4)

Este núcleo apresenta uma frequência de disparo espontânea relativamente alta (em torno de 30 Hz) e na presença de estímulos sonoros pode disparar potências em frequências que chegam a ~300 Hz (Kopp-Scheinflug et al., 2008).

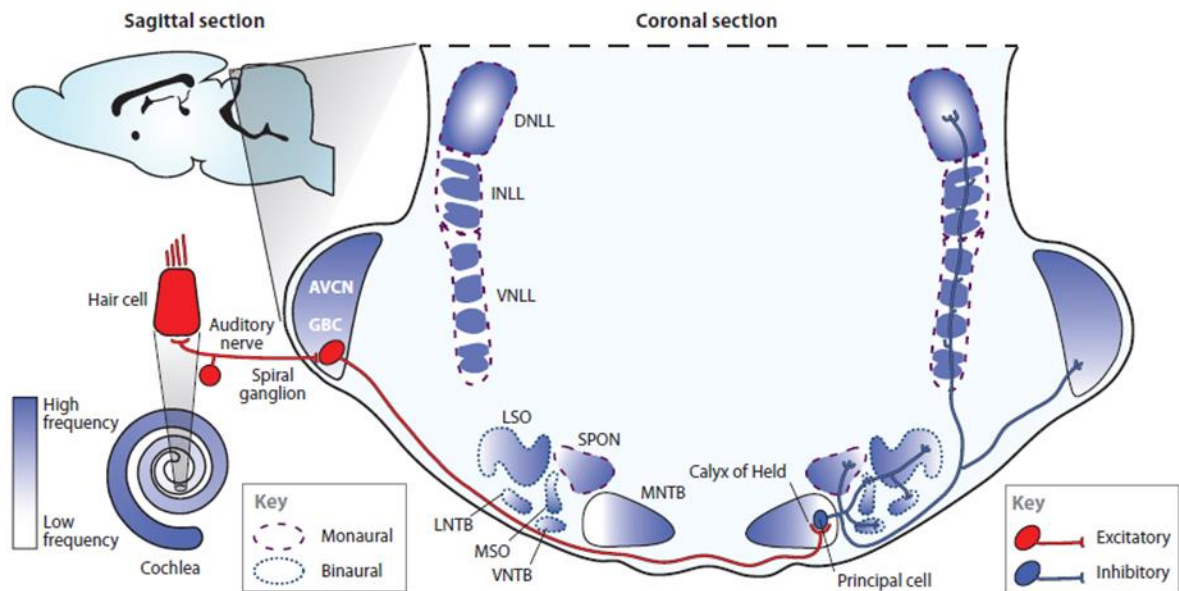


Figura 4. Conexões anômicas da via auditiva. GBCs recebem inputs do nervo auditivo e emitem projeções para o MNTB contraletal. O MNTB projeta para os núcleos ipsilaterais LSO, SPON, MSO, VNTB, LNTB. Outras projeções do MNTB fora do COS incluem VNLL, INLL e DNLL. GBC, globular bushy cells; AVCN, núcleo coclear anteroventral; MNTB, núcleo medial do corpo trapezoide; VNTB, núcleo ventral do corpo trapezoide; LNTB, núcleo lateral do corpo trapezoide; MSO, oliva medial superior; SPON, núcleo paraolivário superior; LSO, oliva lateral superior; VNLL, núcleo ventral do lemnisco lateral; INLL, núcleo intermédio de lemnisco lateral; DNLL, núcleo dorsal do lemnisco lateral (Borst et al., 2012).

1.3.2 Formação e maturação das sinapses CoH

A sinapse do CoH foi descoberta pelo anatomista alemão Hans Held, quem trabalhou no século XIX sobre as vias auditivas centrais em gatos, usando a técnica histológica de Golgi (Held, 1893). Esta sinapse é amplamente reconhecida como um modelo para o estudo de neurotransmissão devido ao tamanho formidável, tanto do terminal pré-sináptico (cálice), quanto do pós-sináptico (células globulares principais), permitindo a realização de estudos eletrofisiológicos (Schneppenburger & Forsythe, 2006) (Fig. 5).

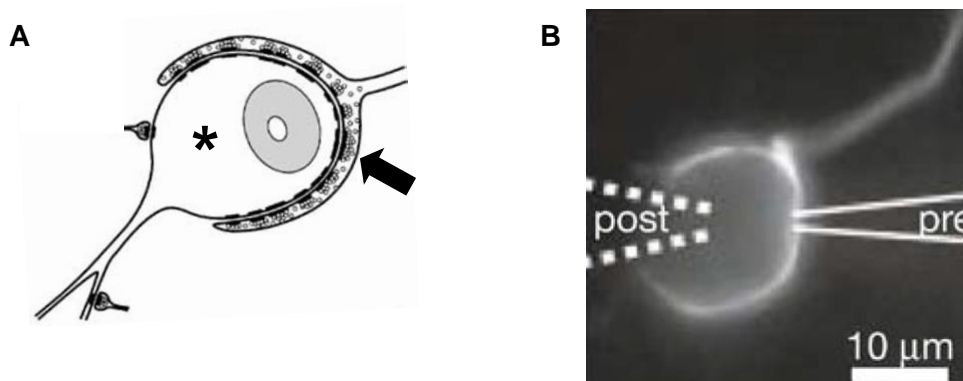


Figura 5. Cálice de Held. **A:** Desenho da sinapse CoH. * Indicando o terminal pós-sináptico que pode receber outros inputs excitatórios ou inibitórios através de pequenos botões sinápticos; seta preta indica terminal pré-sináptico (Cálice). **B:** posicionamento dos eletrodos nos terminais pré e pós-sináptico durante registros eletrofisiológicos (Adaptado de Schneggenburger et al., 2006).

Durante a embriogênese, as células principais do MNTB são derivadas dos rombômeros 3 e 5 (r3 e r5) do tubo neural, enquanto o VCN deriva dos rombômeros 2 a 4 (r2 – r4); a maioria de neurônios do VCN nascem durante os dias 12 e 13 do estado embrionário (E12 – E13). Esses neurônios projetam axônios que fazem contato com as células principais do MNTB contralateral, aproximadamente em E17. O padrão de inervação dos neurônios de MNTB mantém o mapa tonotópico originado da cóclea, com os neurônios laterais responsáveis pelas frequências mais baixas e os neurônios da região medial por frequências mais altas (Leão, et al., 2006).

A inervação do neurônio principal do MNTB pelas projeções do VCN sofre uma metamorfose anatômica e funcional durante o desenvolvimento neonatal. Inicialmente, cada neurônio do MNTB recebe múltiplas entradas do VCN (Rodríguez-Contreras et al., 2008), mas durante o desenvolvimento, somente uma delas persiste para formar o cálice. O protocálice imaturo pode ser reconhecido no segundo dia após o nascimento (*pós-natal 2*, P2). Nessa fase, o CoH tem o formato de uma hemiesfera que engloba metade da célula pós-sináptica. Durante a segunda e terceira semana após o nascimento, imediatamente após o início da audição, o CoH muda seu formato, formando dígitos e fenestrações sobre a célula principal (o terminal pré-sináptico se bifurca em novos prolongamentos) (Revisado por Nakamura & Cramer, 2011). Ao mesmo tempo, as propriedades biofísicas mudam, preparando a sinapse para seu papel de um relé de alto desempenho responsável pelo processamento da informação sonora (Taschenberger et al., 2002; von Gersdorff & Borst, 2002).

1.3.3 Controle da transmissão sináptica no MNTB

Durante o desenvolvimento pós-natal, ocorrem mudanças morfológicas e fisiológicas na sinapse do cálice, favorecendo a maturação da sinapse para que a resposta em altas frequências seja mantida. Essas mudanças se tornam adaptações que permitem aos neurônios manter recursos (Ca^{2+} , ATP, vesículas) disponíveis à geração de PAs.

Nas duas primeiras semanas, após o nascimento, o padrão dos PAs pré-sinápticos muda, se tornando mais rápidos e curtos devido a mudanças em canais de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem. As características dos PAs na idade P14 são conservadas até a etapa adulta (Taschenberger & von Gersdorff, 2000). PAs pré-sinápticos mais curtos reduzem o número de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VGCCs) a serem recrutados para a liberação de vesículas, fazendo com que a liberação de glutamato seja mais eficiente.

Em neurônios imaturos do VCN, o Ca^{2+} entra através de canais para cálcio tipo N, R e /Q, mas na etapa adulta, este influxo somente acontece através de canais tipo P/Q. A ativação de mGluRs controla a liberação de glutamato do cálix diminuindo a condutância dos canais para cálcio tipo P/Q. Os receptores $\alpha 2$ -adrenérgico, $5\text{-HT}_{1\text{B}}$, A1 , GABA_{B} também modulam ou inibem o terminal pré-sináptico nas primeiras etapas do desenvolvimento (Revisado por Kopp-Scheinpflug et al., 2011 & Nakamura et al., 2011).

Durante estimulação repetitiva, receptores NMDA e AMPA ativos podem ser desativados ou dessensibilizados, para manter receptores disponíveis para seguintes estímulos. Isto contribui como um mecanismo para proteger a sinapse durante períodos de muita atividade (Kopp-Scheinpflug et al., 2011). No terminal pós-sináptico, mGluR-I podem ativar a liberação de endocanabinóides que agem no receptor CB_1 do terminal pré-sináptico modulando a liberação do glutamato (Kushmerick, et al., 2004)

1.3.4 mGluRs no MNTB

A expressão de mGluRs no terminal pré-sináptico é regulada durante o desenvolvimento pós-natal. A expressão de receptor mGlu4a aumenta progressivamente entre P3 e P9, mas logo após diminui chegando aos níveis mais baixos durante a etapa adulta (Elezgari, et al., 1999). Nos primeiros dias após o nascimento, os mGluR2/3 foram localizados nos astrócitos ao redor do cálices, já na etapa adulta, sua presença foi detectada no terminal pré e pós-sinápticos do CoH (Elezgarai, et al., 2001).

No que se refere aos mGluR do grupo I eles foram identificados no terminal pós-sináptico do CoH, assim como também em astrócitos (Elezgarai, et al., 2003), e de acordo com Lein, et al. (2007), a expressão das duas isoformas muda diferentemente com o desenvolvimento. A isoforma mGluR1 parece perdurar entre P14 e P56, com o pico de expressão em P14, seguido de uma diminuição progressiva até P56. A expressão do mGluR5 está presente desde os primeiros dias pós-natais e aumenta progressivamente tendo o pico de expressão em P14, posterior a isso a presença do receptor diminui rapidamente, tanto, que os níveis de expressão em P28 e P56 são muito baixos (Fig. 6).

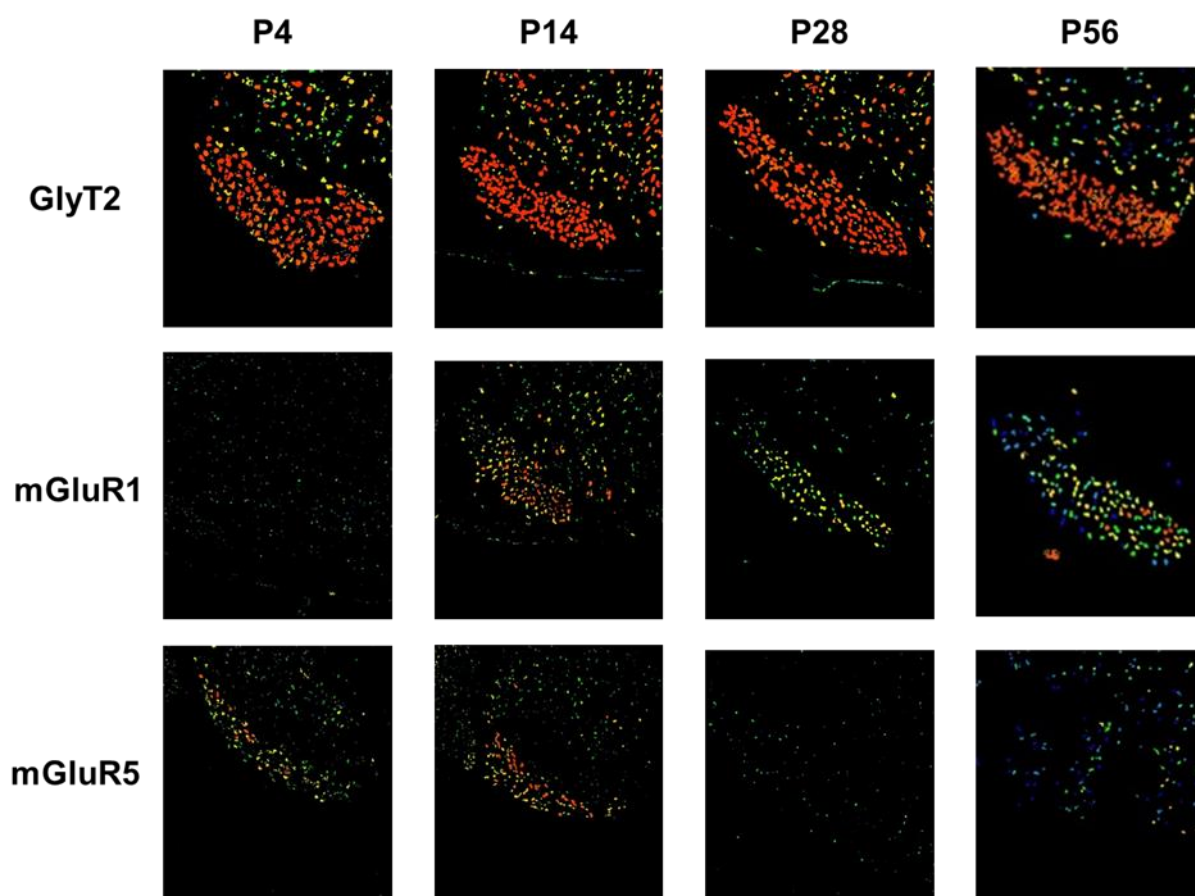


Figura 6. Expressão das isoformas dos mGluR-I no MNTB, ao longo do desenvolvimento de camundongos. Imagens de fatias sagitais mostrando a expressão das isoformas mGluR1 e mGluR5 em animais com idades de 4, 14, 28 e 56 dias (P4, P14, P28 e P56, respectivamente). A expressão do GlyT2 indica a localização certa no MNTB, já que ao ser um núcleo glicinérgico deve expressar este transportador para glicina. Adaptado de *Lein et al., 2007*.

2. JUSTIFICATIVA

Os receptores acoplados a proteína G são a maior classe de receptores de membrana e o alvo da maioria de fármacos atualmente em uso. Dentro desta família de receptores se encontram mGluR-I, receptores metabotrópicos para glutamato do Grupo I, que pertencem à família de receptores acoplados a proteína G_{α_q} .

Os neurônios do MNTB são um modelo de sinapse axossomática amplamente estudada devido ao tamanho formidável dos neurônios que a compõem. Este núcleo constitui parte do circuito auditivo no tronco encefálico, onde funcionam como relés sinápticos, recebendo sinais excitatórios do VCN e emitindo sinais inibitórios para outros núcleos, permitindo assim a localização espacial de fontes sonoras (Grothe et al., 2010).

Nas células principais do MNTB foi identificada a presença dos receptores metabotrópicos para glutamato do Grupo I. Em trabalhos prévios foi visto que sua ativação gera uma despolarização da membrana (Alhadas, 2014) e uma inibição pré-sináptica via liberação de endocannabinoídes (Kushmerick, et al., 2004), no entanto, pouco se sabe sobre a corrente gerada por estes receptores e sua origem iônica, que provavelmente modulam a excitabilidade destas células.

Estudos nesta sinapse envolvendo os mGluR-I podem contribuir cientificamente em dois âmbitos: 1) No entendimento do papel fisiológico destes receptores acoplados a proteína G, já que vem sendo vistos como alvos farmacêuticos com grande potencial e 2) na compreensão dos mecanismos básicos que controlam a excitabilidade pós-sináptica de neurônios do sistema auditivo.

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais

- ❖ Identificar a contribuição das isoformas mGluR1 e mGluR5 na geração da corrente mGluR-I induzida pelo agonista DHPG, em neurônios do Núcleo Medial do Corpo trapezoide de camundongos neonatos.
- ❖ Identificar as bases iônicas responsáveis pela corrente induzida por DHPG em neurônios do MNTB

Objetivos específicos

- Estabelecer a curva de concentração-resposta de neurônios do MNTB para o agonista de receptores metabotrópicos do grupo I, DHPG.
- Utilizar os antagonistas LY367385 e MPEP para determinar a importância das isoformas mGluR1 e mGluR5, respectivamente, na corrente induzida por DHPG.
- Empregar animais geneticamente modificados, mGluR5^{-/-}, como uma abordagem alternativa, para determinar a contribuição individual das isoformas dos mGluR-I, na geração da corrente induzida por DHPG.
- Determinar a participação dos canais ASIC, canais para potássio do tipo retificadores de entrada e canais HCN no efeito induzido por DHPG.

4. MATERIAS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, no protocolo No. 159/2015.

4.1 Animais

Experimentos foram realizados em neurônios do Núcleo Medial do Corpo Trapezóide (MNTB) localizados em fatias do tronco encefálico, obtidas de camundongos C57BL/6 de 6 a 9 dias. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais knockout para o mGluR5 foram gentilmente cedidos pela Professora Dra. Fabiola Mara Ribeiro do Departamento Bioquímica e Imunologia da UFMG. Animais heterozigotos (mGluR5^{+/-}) foram acasalados e mantidos no biotério do departamento de Fisiologia e Biofísica, alimentados com água e ração *ad libitum*, mantendo o ciclo claro escuro de 12 horas. A genotipagem dos camundongos recém nascidos foi feita com cinco dias de idade no laboratório de Neurobioquímica de RNA de Interferência do Departamento Bioquímica e Imunologia – ICB - UFMG. Somente animais com genotipagem comprovada WT (+/+) ou KO (-/-) foram utilizados neste estudo.

4.2 Fármacos e reagentes

Os sais e fármacos utilizados foram obtidos das companhias Sigma Chemical Company (St. Luis, MO, EUA) e Tocris (EUA)

4.3 Obtenção de fatias

No procedimento para obter fatias, foram utilizados dois tipos de ACSF (do inglês Artificial Cerebrospinal Fluid) identificados com os nomes “ACSF para corte” e “ACSF para registro”. O ACSF para corte continha NaCl (125 mM), KCl (2.5 mM), CaCl₂ (0.1 mM), MgCl₂ (3 mM), NaHCO₃ (25 mM), NaH₂PO₄ (1.25 mM), Glicose (25 mM), Ácido ascórbico (0.4 mM), Piruvato de sódio (2 mM) e Myo-inositol (3 mM). O ACSF para registro foi idêntico ao ACSF para corte, exceto pelas concentrações de CaCl₂ e MgCl₂ que foram 2 mM e 1 mM, respectivamente. Ambos os tipos de ACSF foram borbulhados com mistura gasosa de “carbogênio” contendo 5%CO₂/95%O₂. Nessas condições apresentaram pH de 7.3 – 7.4.

Os animais foram sacrificados por decapitação. A caixa craniana foi aberta usando uma tesoura, seguindo a comissura dos ossos parietais no sentido caudal – rostral. O cérebro foi seccionado na altura do colículo superior, e a parte caudal, contendo o tronco encefálico, foi retirada e transferida para solução ACSF para corte gelada.

A região do tronco encefálico previamente isolada era colada, com adesivo à base de cianocrilato, no prato magnético do micrótomo de lâmina vibratória *Leica VT1000S* (Fig. 7). A câmara de fatiamento era preenchida com ACSF de corte gelado e rodeada por gelo. O bloco de tecido foi cortado em fatias de 170 μM de espessura e aquelas fatias que continham o MNTB foram transferidas, com ajuda de uma pipeta Pasteur modificada, para a câmara de recuperação contendo ACSF para registro a 37 °C e onde eram incubados por no mínimo 60 minutos visando à recuperação do trauma mecânico sofrido pelo tecido. Em seguida, as fatias eram mantidas em temperatura ambiente até a transferência para a câmara de registro no setup de eletrofisiologia.

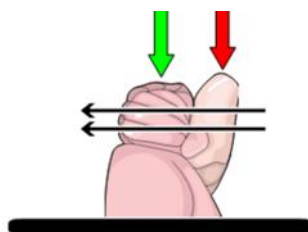


Figura 7. Montagem do tronco encefálico para cortes no micrótomo de lâmina vibratório. Seta vermelha indica a medula espinal; seta verde indica o cerebelo; setas pretas indicam o sentido de corte da lâmina.

4.3.1 Localização do MNTB

Durante o processo de corte do tecido foram observadas várias características anatômicas que permitiam identificar as fatias que provavelmente conteriam o MNTB. Os cortes realizados eram coronais, da região caudal para a rostral do encéfalo. Duas características foram observadas para a seleção de fatias: 1) A presença do sétimo nervo e 2) A presença da porção final do cerebelo (Fig. 8) (Paxinos & Franklin, 2004); a partir da aparição destes dois critérios nas fatias, eram recolhidas as cinco fatias subsequentes e colocadas na câmara de recuperação para posterior registro.

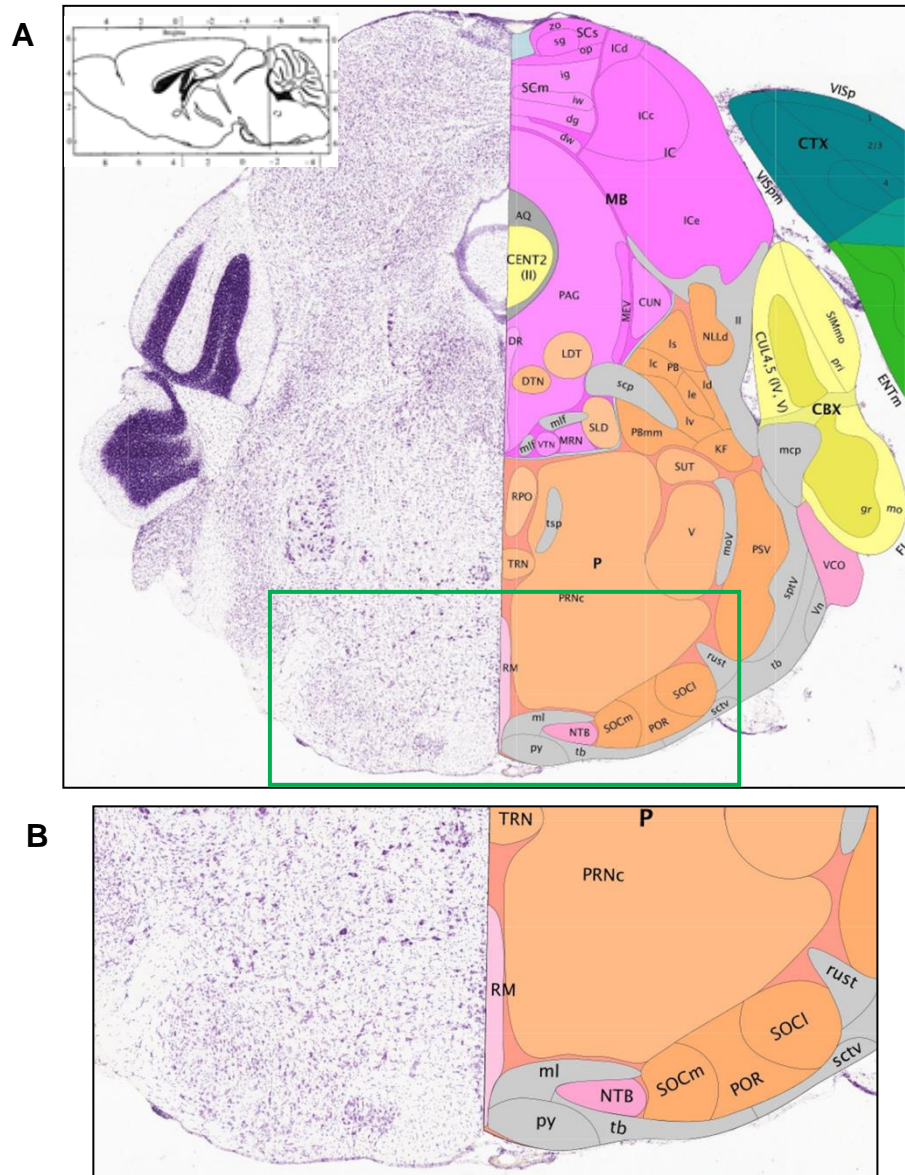


Figura 8. Localização anatômica do MNTB. A: Fatia da região da Ponte contendo o núcleo de interesse. **B:** Detalhe da fatia mostrando o Núcleo do corpo trapezoide (NTB) e outras estruturas circundantes. TRN: Núcleo reticular tegmental; PRNc: Núcleo pontino tegmental; RM: Núcleo magno do Rafe; ml: leminisco medial; py: piramide; tb: Corpo trapezoide; SOCm: Complexo Olivar Superior medial; POR: região perolivaria do Complexo olivar superior; SOCl: Complexo Olivar Superior lateral; sctv: trato espinocerebelar ventral; rust: Trato rubroespinal. Tomado e adaptado de *Allen Brain Atlas: Mouse Brain*. <http://mouse.brain-map.org/>

4.4 Eletrofisiologia

4.4.1 Equipamento

Os registros foram obtidos nas configurações *whole-cell*, *current* e *voltage-clamp* através do amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Califórnia, USA), os sinais foram digitalizados pelo conversor analógico-digital Digidata 1322A (Axon Instruments, Califórnia,

USA) gerenciado pelo software WinWCP e WinEDR (Strathclyde Electrophysiology Software, gentilmente fornecido pelo John Dempster, University of Strathclyde). Uma das saídas do amplificador foi dirigida ao Osciloscópio Tektronix TDS340 (Tektronix Inc, Oregon, USA) para visualização do sinal original.

As imagens foram obtidas usando objetivas de 4x e 40x da Olympus, esta última de imersão, e iluminação de contraste diferencial (DIC) infravermelho no microscópio Modular MRK100 (Siskiyou, Oregon, USA); captadas através da câmara acoplada IR-1000 (DAGE-MTI, Indiana, USA) e visualizadas no PC usando o software ENLTV-FM3 (Encore Electronics, USA).

4.4.2 Pipetas

Pipetas cuja resistência, quando preenchidas com solução interna (veja abaixo), variou entre 2.0 e 3.5 M Ω , foram fabricadas a partir de capilares de vidro (Patch Clamp Glass, PG52151-4, World Precision Instruments) usando um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP830 Narishige, Tokyo, Japan). A superfície externa das pipetas foi coberta com cera dental até aproximadamente 1.0 cm da ponta a fim de reduzir a sua capacitância elétrica.

4.4.3 Solução Interna

Previamente ao registro as pipetas foram preenchidas com solução interna contendo gluconato de potássio (125 mM), KCl (20 mM), fosfocreatina (10 mM), EGTA (0.5 mM), HEPES (10 mM), MgATP (4 mM) e Na₂GTP (0.3 mM), com pH ajustado em 7.2 com KOH.

4.4.4 Sistema de perfusão

Na câmara de registro do setup, as fatias foram perfundidas continuamente com ACSF para registro na temperatura ambiente e com 95% O₂/ 5% CO₂, através de um sistema de mangueiras que mantinham o fluxo de 1.2 ml/min. Foram dispostas duas linhas de perfusão: a principal, contendo ACSF para registro e a linha das drogas contendo ACSF para registro, mas nesta eram adicionadas as drogas e bloqueadores, podendo assim trocar rapidamente de linha para perfundir homoganeamente com drogas ou fazer a lavagem da fatia. O excesso de solução foi removido do banho por sucção gerada por uma bomba geradora de vácuo (Fig. 9).

4.5 Registros eletrofisiológicos

Depois de colocada a fatia na câmara de registro, esta era mantida pressa no fundo com uma “harpa” que garantiria a estabilidade mecânica do tecido durante o registro (Fig. 9).

A visualização panorâmica do tecido era feita com a objetiva de 4x de modo a localizar o MNTB, logo após a objetiva era trocada para uma de maior aumento. Com o aumento de 40x era selecionado o neurônio a ser registrado, momento no qual a pipeta era colocada acima dele sem encostar-se à membrana (Fig. 10). Nesse momento o potencial da pipeta foi ajustado para -9 mV para compensar o potencial de junção líquido que se formaria depois de estabelecido o registro. Em seguida a pipeta era descida o suficiente para que a ponta da pipeta fizesse contato com a membrana da célula, nesse momento a pressão da pipeta era alterada de positiva para negativa resultando na formação de um “selo” de alta resistência (maior a 1 G Ω) entre a ponta da pipeta e a membrana. O potencial da membrana era fixado em -60 mV.

Após a célula estabilizar eram feitos os registros na configuração whole-cell, *current* ou *voltage-clamp*.

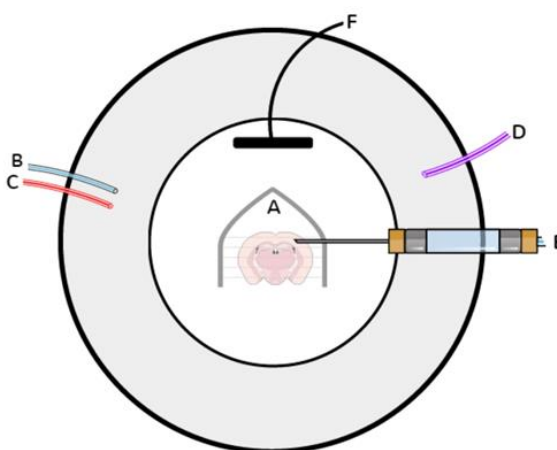


Figura 9. Desenho da vista superior da câmara de registro no setup, mostrando a “harpa” que mantinha pressa a fatia no fundo da câmara (A); as linhas de perfusão principal e das drogas (B e C); a linha de sucção (D); o eletrodo de registro (E) e o eletrodo de referência dentro de banho (F).

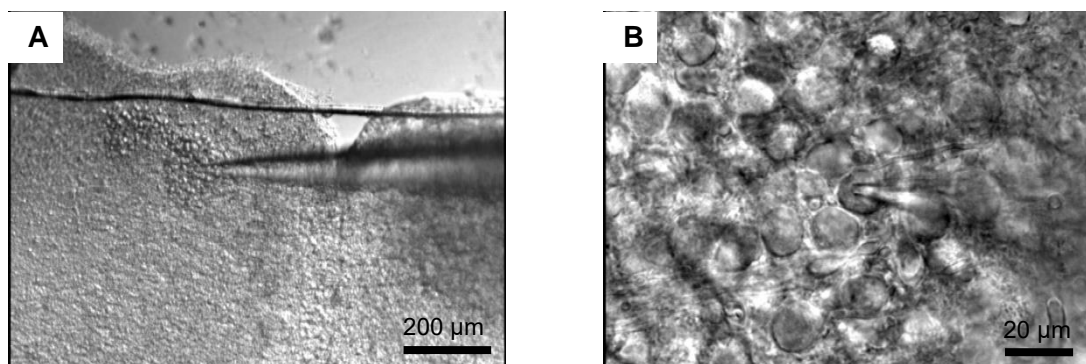


Figura 10. MNTB em fatia de camundongo (P8). A: Localização do MNTB em vista panorâmica com aumento de 4x; B: Neurônios do MNTB vistos com aumento de 40x.

4.5.1 Teste do sistema de perfusão e resposta celular

No início desse estudo, nós realizamos alguns testes para verificar e validar o funcionamento do sistema de registro. Um deles foi medir o efeito de um aumento da concentração de K^+ no líquido extracelular, já que sabidamente o potencial de membrana é sensível a alterações no potencial de equilíbrio deste íon. Após registro do potencial de membrana na modalidade *current-clamp*, a concentração de K^+ no ACSF de registro, era mudada de 2.5 mM para 9 mM KCl. Após um período de latência que corresponde ao tempo necessário para a nova solução entrar no banho e chegar à célula de interesse por difusão, foi observada uma rápida e reversível despolarização do potencial de membrana. Em geral as respostas observadas foram bastante parecidas com as descritas previamente (Fig. 11) (Lohrke, Kungel, & Friauf, 1998). Este teste proporcionou uma boa estimativa do tempo necessário para aplicar e lavar os agonistas e antagonistas que serão utilizados neste estudo.

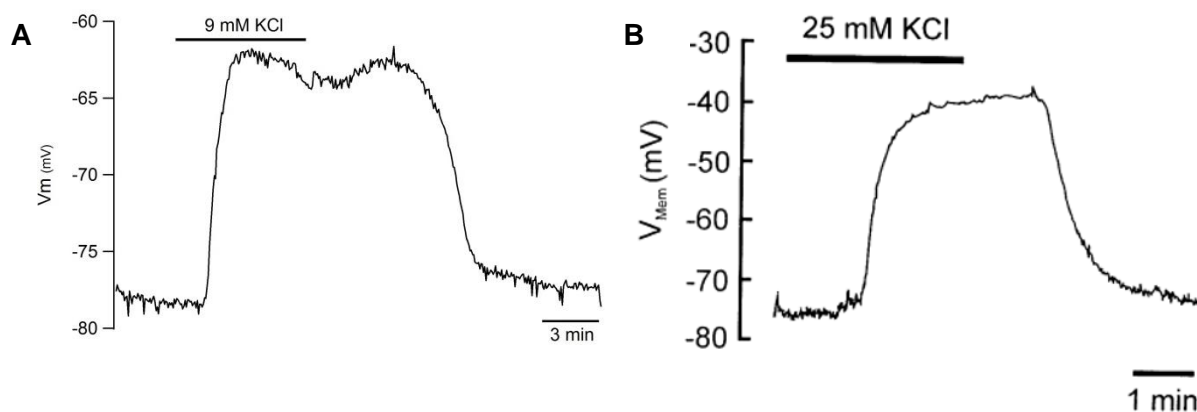


Figura 11: Efeito do aumento de K^+ extracelular em células do MNTB. **A.** Registro em *current-clamp* com aplicação de 9 mM de KCl, corresponde a o teste feito para verificar o funcionamento do sistema de registro. **B.** Registro em *current-clamp* obtido por (Lohrke et al., 1998) com aplicação de 25 mM de KCl.

4.5.2 Estabelecimento da curva dose resposta para o agonista.

Os experimentos foram feitos na configuração *current-clamp*, onde a corrente de membrana é mantida nula e o potencial do neurônio medido em função do tempo. Para serem aceitos para análise, o começo dos registros compreendia uma linha de base estável de, no mínimo, três minutos. Após deste tempo, a linha de perfusão principal foi fechada e simultaneamente aberta a linha das drogas contendo o agonista dos mGluR-I, (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine hydrate (DHPG), proporcionando assim concentrações de 0.01 a 100 μ M na câmara de registro. Logo após a estabilização do efeito do agonista se procedia a fechar a linha das drogas e fazer a lavagem do tecido com a solução da linha de perfusão principal. Para evitar qualquer efeito prolongado do agonista, só foi testada uma concentração de agonista por célula, e apenas era registrada uma célula por fatia.

Para cada uma das concentrações foi registrado um mínimo de três neurônios.

4.5.3 Uso de antagonistas e bloqueadores

Estes experimentos foram feitos na configuração de *voltage-clamp* na qual o potencial de membrana é fixo em -60mV e a corrente da membrana medida ao longo do tempo. A escolha de usar *voltage-clamp* baseou-se na observação de que nos registros em *current-clamp*, eventualmente, a linha de base do potencial de membrana variava consideravelmente podendo com isso ser alterada a resposta da célula quando aplicadas as drogas.

O procedimento empregado foi similar ao descrito no parágrafo anterior: após obter uma linha de base estável, o DHPG era aplicado por no mínimo quatro minutos e em seguida lavado. A seguir, o agonista ou bloqueador foi colocado no banho por, no mínimo, cinco minutos, e uma nova linha de base estabelecida. Em registros pareados o efeito do DHPG na presença do antagonista ou bloqueador foi medido em relação a essa nova linha de base e o tamanho da resposta comparado com a primeira resposta medida na mesma célula sem o antagonista ou bloqueador. Nos gráficos de barra, a $I_{mGluR-I}$ corresponde a diferença da corrente existente entre o valor da corrente registrada durante aplicação do DHPG e o valor da corrente registrada durante a linha de base prévia.

Foram usados os antagonistas seletivos para as duas isoformas dos mGluR-I e para canais iônicos, descritos na tabela abaixo:

Tabela 5: Antagonistas para mGluR-I e canais iônicos usados.

Alvo	Antagonista	Concentração
Receptores mGluR5	MPEP	10 μ M
Receptores mGluR1	LY 367385	100 μ M
Canais ASIC	Amilorida	100 μ M
Canais GIRK	BaCl ₂	500 μ M
Canais HCN	ZD7288	100 μ M
LY 367385: (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid MPEP: 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride Amiloride: 3,5-Diamino-N-(aminoiminomethyl)-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride ZD 7288: 4-Ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyrimidinium chloride		

4.6 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como valor da média \pm Erro padrão da média (S.E.M). A análise foi baseada na comparação dos valores da média da corrente induzida por DHPG em condições controle vs. a corrente induzida por DHPG após tratamento com antagonista ou bloqueadores. Quando possível, o agonista DHPG foi aplicado duas vezes, antes e depois do tratamento com antagonista ou bloqueador na mesma célula, de forma que cada célula serviu como seu próprio controle. Nesses casos, a estatística foi avaliada utilizando o teste t *Student* para dados pareados. Os resultados foram apresentados como valor da média para cada um dos experimentos.

5. RESULTADOS

5.1 Ativação de mGluR do grupo I despolariza neurônios do MNTB

Como descrito na Introdução, os neurônios principais do MNTB de camundongos expressam ambas as isoformas do receptor (mGluR1 e mGluR5). Para determinar a contribuição destes receptores sobre a excitabilidade dos neurônios do MNTB foi medida a variação do potencial de membrana ou a corrente de membrana utilizando um amplificador de *patch clamp* na modalidade *whole-cell*.

A Figura 12 (A) mostra o trecho representativo de um registro feito na configuração *current-clamp*, no qual o potencial de membrana é medido ao longo do tempo. O potencial de membrana da célula, medido durante o trecho em ACSF controle, foi de -82 mV. Durante a ativação dos receptores mGluR-I com o agonista seletivo DHPG (10 μ M) o potencial de membrana mudou rapidamente para -72 mV e o neurônio permaneceu despolarizado até a lavagem do agonista do banho. Em um grupo de experimentos semelhantes, o valor médio da despolarização induzida por DHPG (10 μ M) foi $7,7 \pm 1,0$ mV (n = 5) (Fig. 12 B).

Para conhecer a corrente responsável por aquela despolarização foram realizados experimentos similares com os descritos acima, porém na configuração *voltage-clamp*, com o potencial de membrana (V_m) fixado em -60 mV. Quando aplicado o DHPG (10 μ M) foi visto uma mudança na corrente da membrana, sendo deslocada negativamente em $-38,3 \pm 3,9$ pA (n = 3) (Fig.12C e D). Esta corrente, por ser produzida pela ativação de receptores mGlu do grupo I, de aqui em diante, será chamada de $I_{mGluR-I}$.

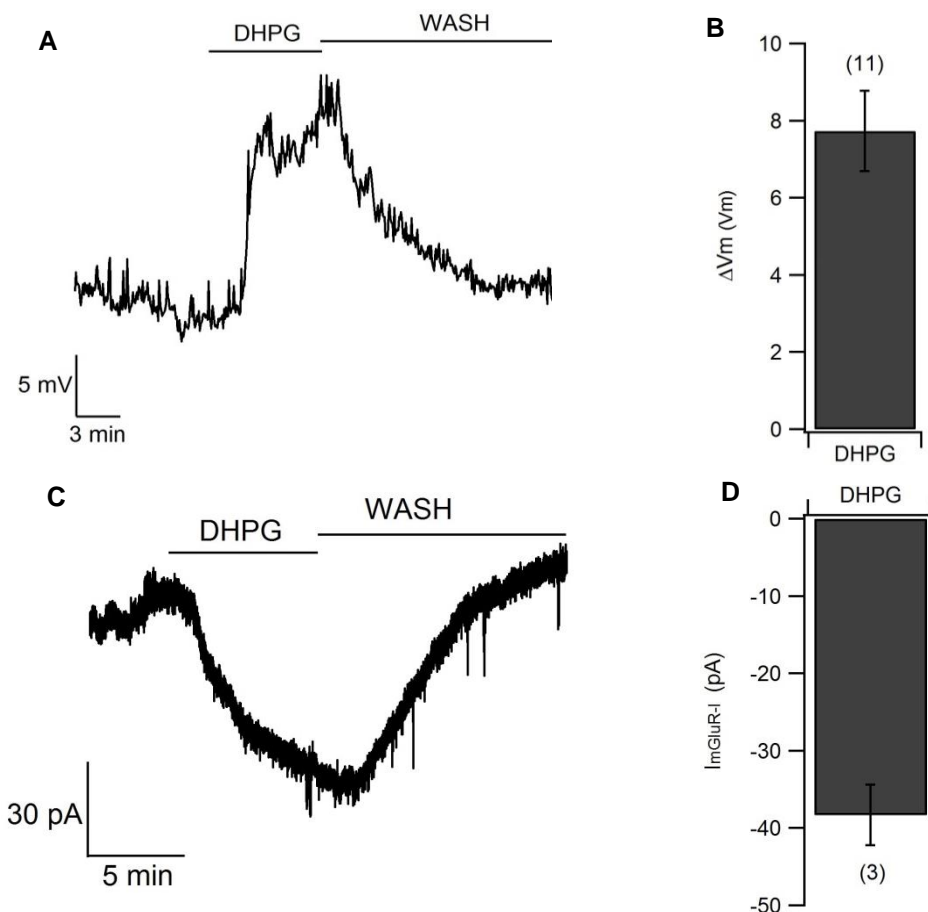


Figura 12: O DHPG (10 μ M) despolariza e gera uma corrente negativa em neurônios do MNTB. (A) Registro em *current-clamp* mostrando a despolarização da membrana induzida por DHPG (10 μ M). **(B)** Efeito médio de DHPG. **(C)** registro em *voltage-clamp* ($V_m = -60$ mV) mostrando a corrente de entrada (excitatória) induzida por DHPG (10 μ M). **(D)** Efeito médio do DHPG. O número de células registradas está no parêntesis.

5.2 Curva concentração resposta para o DHPG em neurônios do MNTB.

Para determinar a relação entre a concentração de DHPG aplicada e seu efeito, foi medida a despolarização (ΔV_m) induzida por concentrações de DHPG, que variam de 0.01 a 100 μ M (Fig. 13). Em cada célula foi testada apenas uma concentração do agonista. O efeito máximo foi observado com concentrações iguais ou superiores a 10 μ M ($7,8 \pm 1,2$ mV, 30 μ M). Tentamos ajustar a Equação de Hill aos valores médios, no entanto, um bom ajuste não foi possível devido ao efeito anômalo correspondente a concentração de 0.1 μ M (ver ponto azul na figura 13).

Um dos propósitos de se estabelecer a curva de concentração-efeito foi ajudar na determinação de uma concentração adequada para ser usada em experimentos com antagonistas competitivos. Para isso foi determinado o melhor ajuste da curva de Hill,

omitindo o ponto correspondente a concentração de 0.1 μM . Ao fazer o ajuste desta maneira o EC_{50} correspondeu a concentração de 1 μM , De acordo aos dados obtidos na curva de concentração resposta a concentração de 10 μM foi a estabelecida para ser usada nos experimentos descritos a seguir.

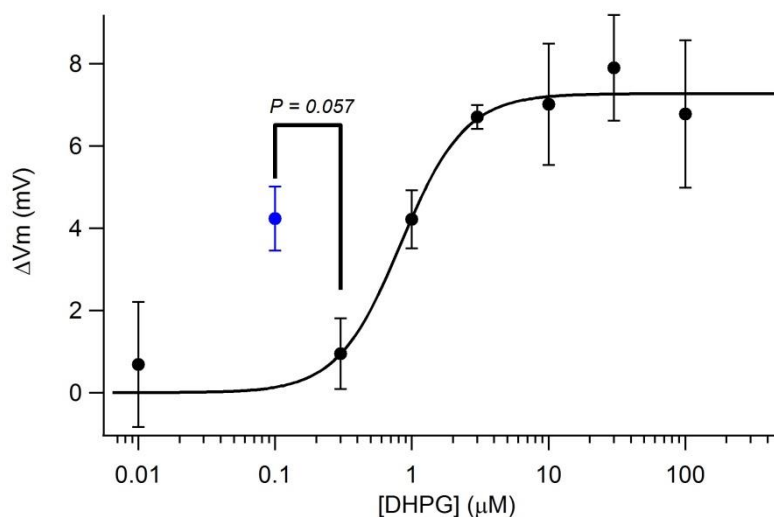


Figura 13: O agonista de receptores mGluR-I, DHPG, despolariza de maneira concentração-dependente os neurônios do MNTB. curva sigmoide é o melhor ajuste da equação de Hill aos dados, omitindo o ponto correspondente à concentração de 0.1 μM . Cada ponto representa a média \pm SEM de respostas registradas de 4 a 6 células.

5.3 Respostas dos neurônios do MNTB a aplicações consecutivas do DHPG.

Os experimentos que serão descritos mais adiante irão avaliar a corrente gerada pela ativação dos mGluR-I ($I_{\text{mGluR-I}}$), na presença de antagonistas seletivos para uma ou outra das duas isoformas destes receptores, mGluR1 e mGluR5. A nossa estratégia experimental utiliza registros pareados em que o efeito de DHPG é medido duas vezes, antes e após tratamento com antagonistas de forma que cada célula serve como seu próprio controle. Para isto uma correta interpretação desses experimentos seria feita sabendo quanto as células respondem igualmente a duas aplicações consecutivas do agonista. Para isso, foi aplicado o DHPG duas vezes com um intervalo mínimo de 20 minutos entre o término da primeira aplicação e o início da segunda. Em cinco experimentos feitos sob *current-clamp* não houve diferença no tamanho da primeira e segunda despolarização (1ª aplicação 8.6 ± 1.5 mV; 2ª aplicação 9.1 ± 1.9 pA, $P = 0.5$) (Fig. 14C). Igualmente, em três experimentos feitos sob *voltage-clamp* ($V_m = -60$ mV), não foram observadas diferenças

entre a primeira e segunda resposta (1^{a} aplicação -38.3 ± 3.9 pA; 2^{a} aplicação -44 ± 9.3 pA, $P = 0.5$) (Fig. 14D).

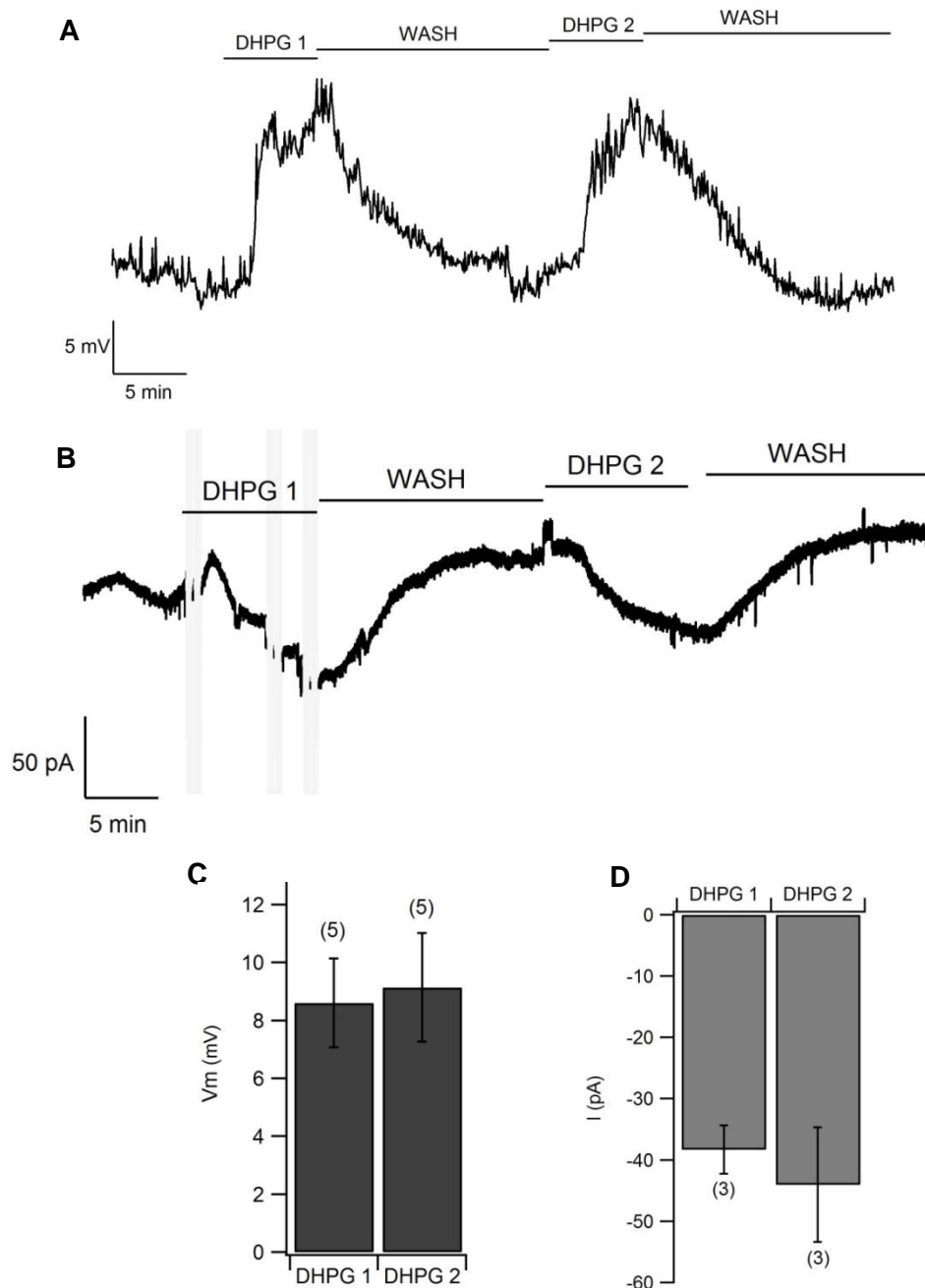


Figura 14: Os receptores mGluR-I não são dessensibilizados durante duas aplicações consecutivas do DHPG. **A:** Registro em current-clamp mostrando duas despolarizações consecutivas como resposta a aplicação do DHPG ($10 \mu\text{M}$). **B:** Registro em voltage-clamp mostrando correntes de entrada obtidas por aplicações consecutivas de DHPG ($10 \mu\text{M}$). Durante a primeira aplicação de DHPG, foram aplicados protocolos de voltage clamp. Para a melhor visualização do trecho, as correntes durante os protocolos foram deixados em cinza claro; Potencial de holding, -60 mV. **C:** Magnitude da despolarização induzida por duas aplicações consecutivas de DHPG. **D:** Corrente de entrada evocada por duas aplicações consecutivas de DHPG. O valor em parêntesis indica o número de células registradas.

5.4 Bloqueio da $I_{mGluR-I}$ com antagonistas seletivos.

O Grupo I dos receptores metabotrópicos para glutamato são compostos pelas isoformas mGluR1 e mGluR5 e o agonista DHPG não é seletivo para uma ou outra (Ito, et al., 1992; Balázs, et al., 1997).

No intuito de determinar a contribuição de cada uma das isoformas na geração da corrente $I_{mGluR-I}$, foram usados os antagonistas seletivos MPEP (10 μ M) e LY367385 (100 μ M), para bloquear os receptores mGluR5 e mGluR1 respectivamente (Acher, 2011). Na primeira parte do registro, logo após de ter obtido um registro estável o DHPG foi aplicado e seu efeito medido. Após a lavagem do DHPG e a recuperação da corrente, o antagonista foi aplicado e em seguida o efeito de DHPG medido novamente. Por serem experimentos pareados, os valores obtidos da segunda aplicação (com antagonista) foram normalizados pelos valores da primeira aplicação (sem antagonista).

Utilizando este protocolo experimental foi determinado que o MPEP, em concentração em que deveria bloquear totalmente e seletivamente os receptores mGluR5 inibiu a $I_{mGluR-I}$ parcialmente ($40.5 \pm 9.2\%$; $P = 0.05$, $n = 5$) (Fig. 15 A e C). Por outro lado após tratamento com o antagonista para mGluR1, LY367385 (100 μ M), a corrente ativada por mGluR-I foi 100% abolida ($P = 0.02$, $n = 3$) (Fig. 15 B e D).

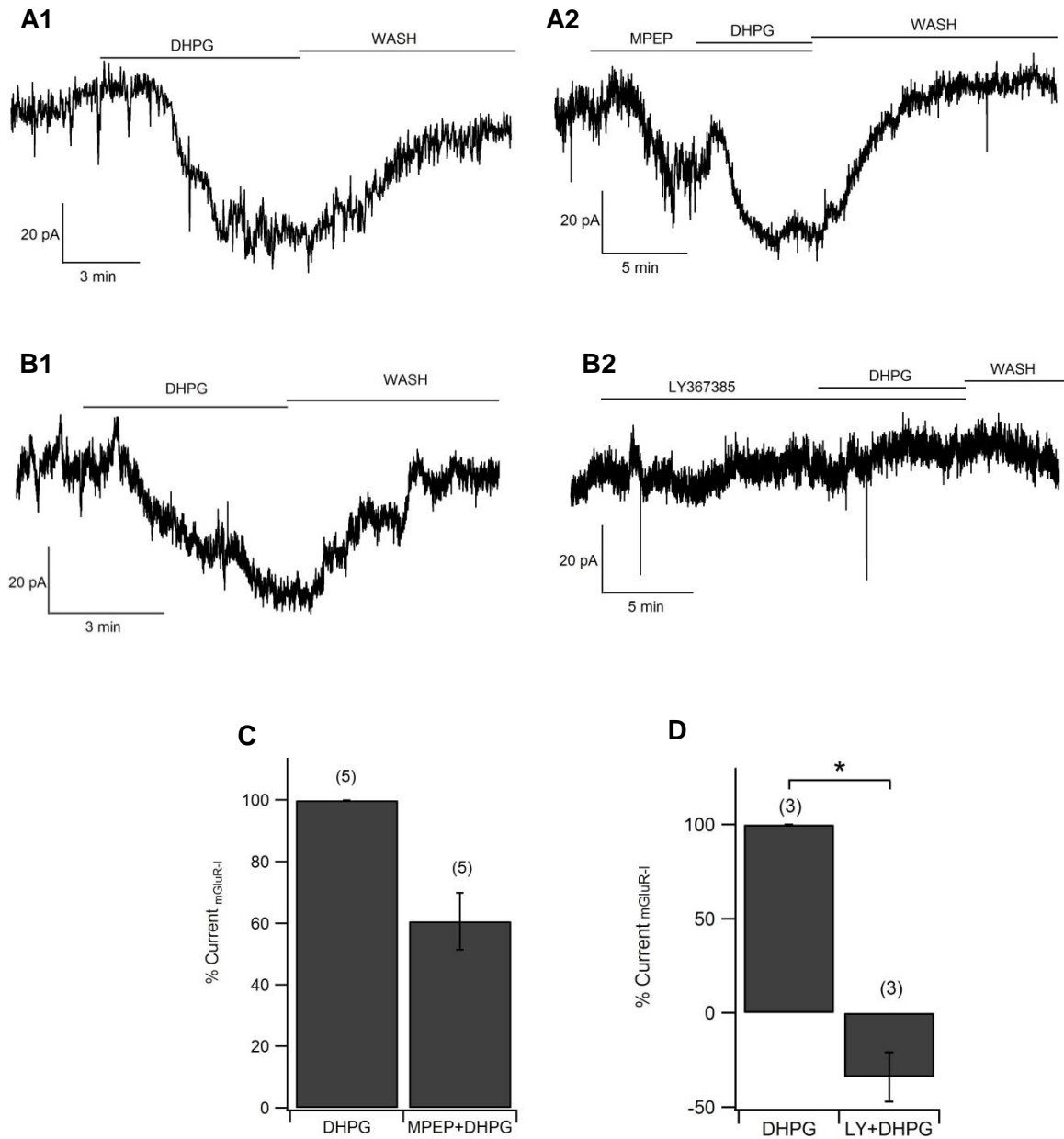


Figura 15: As duas isoformas do mGluR-I contribuem para a geração da $I_{mGluR-I}$. **A1:** Registro em voltage-clamp mostrando a $I_{mGluR-I}$ evocada pelo DHPG (10 μM) em condições controle e **(A2)** na presença do antagonista MPEP (10 μM) **(A2)**. **B1:** Registro em voltage-clamp mostrando a $I_{mGluR-I}$ evocada pelo DHPG (10 μM) em condições controle e **(B2)** na presença do LY367385 (100 μM). **C:** Gráfico de barras normalizado pela corrente DHPG, mostrando a redução na corrente na presença do MPEP. **D:** Gráfico de barras mostrando a abolição da $I_{mGluR-I}$ na presença do LY367385; Potencial de holding, -60 mV. O número de células registradas está no parêntesis. * $P < 0.05$; Test t Student.

5.5 Corrente mGluR-I em animais knockout para mGluR5

Numa segunda abordagem foram usados animais knockout para o gene do mGluR5 (Lu, et al., 1997), de modo a identificar se existiam mudanças na magnitude da $I_{mGluR-I}$ ao estar ausente essa isoforma. Não foi observada diferença na corrente medida nos animais KO (mGluR5^{-/-}) quando comparada com animais WT (mGluR5^{+/+}) (-37.7 ± 6.5 pA vs -35.1 ± 5.0 pA, n = 6; P = 0.79) (Fig. 16). Este resultado mostra que os receptores mGluR5 não são essenciais para a geração da $I_{mGluR-I}$. Em concordância com os resultados anteriores da inibição causada pelo MPEP em animais controle, é possível que nos animais KO os receptores mGlu1 sejam capazes de compensar a perda dos receptores mGluR5 na geração da $I_{mGluR-I}$.

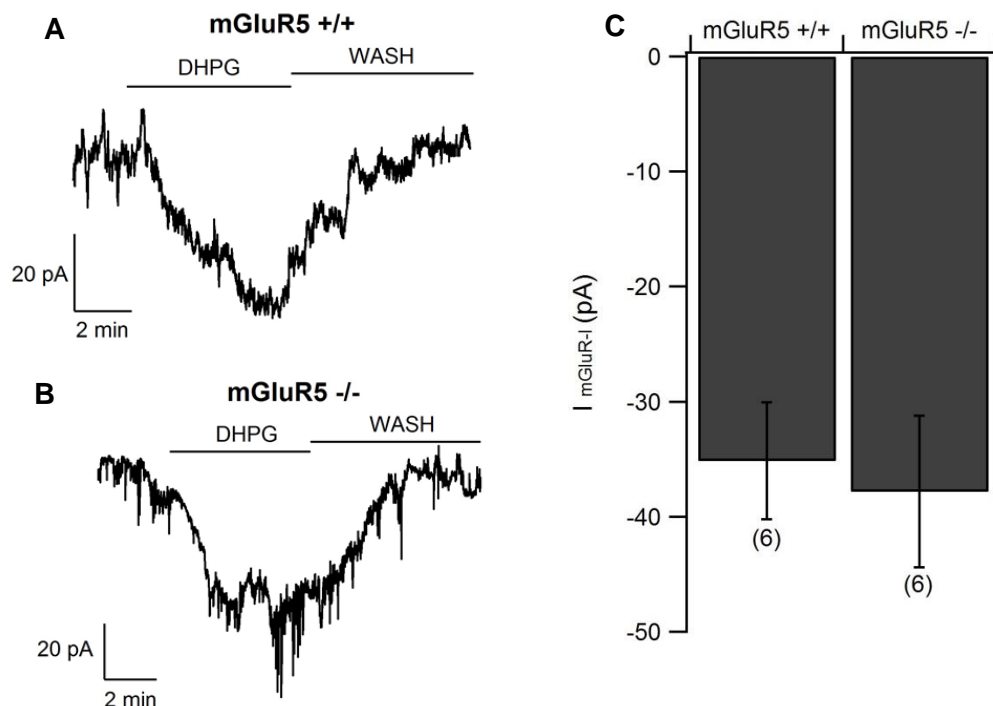


Figura 16: A magnitude da $I_{mGluR-I}$ evocada por DHPG em animais WT e KO para mGluR5 não apresenta diferença. Registro representativos em voltage-clamp da $I_{mGluR-I}$ induzida por DHPG (10 μM) em animais WT (A) e animais KO para mGluR5 (B); potencial de holding, -60 mV. C: Gráfico de barras mostrando que não há variação entre a magnitude da $I_{mGluR-I}$ em animais KO (mGluR^{-/-}) quando comparados com WT (mGluR^{+/+}). O número de células registradas está no parêntesis.

5.6 Mecanismos ionotrópicos responsáveis pela $I_{mGluR-I}$

Para identificar os mecanismos ionotrópicos da $I_{mGluR-I}$, foram testados alguns inibidores de canais iônicos candidatos a serem responsáveis por dita corrente.

5.6.1 Canais ASIC na geração da $I_{mGluR-I}$.

Foi sugerido que os canais sensíveis a concentrações extracelulares de prótons, canais *ASIC*, poderiam estar envolvidos na transmissão sináptica no MNTB durante estimulação de alta frequência (Inchauspe, Urbano, & Uchitel, 2010). Por este motivo utilizamos a Amilorida (100 μ M), um antagonista não seletivo destes canais, de modo a verificar se os canais *ASIC* estariam envolvidos na geração da $I_{mGluR-I}$. Não observamos diferença significativa entre a magnitude da corrente gerado por DHPG (10 μ M) na presença de Amilorida comparada com a corrente controle (-26.2 ± 2.8 pA ($n = 9$) vs. -29.0 ± 3.3 pA ($n = 6$); $P = 0.5$) (Fig. 17).

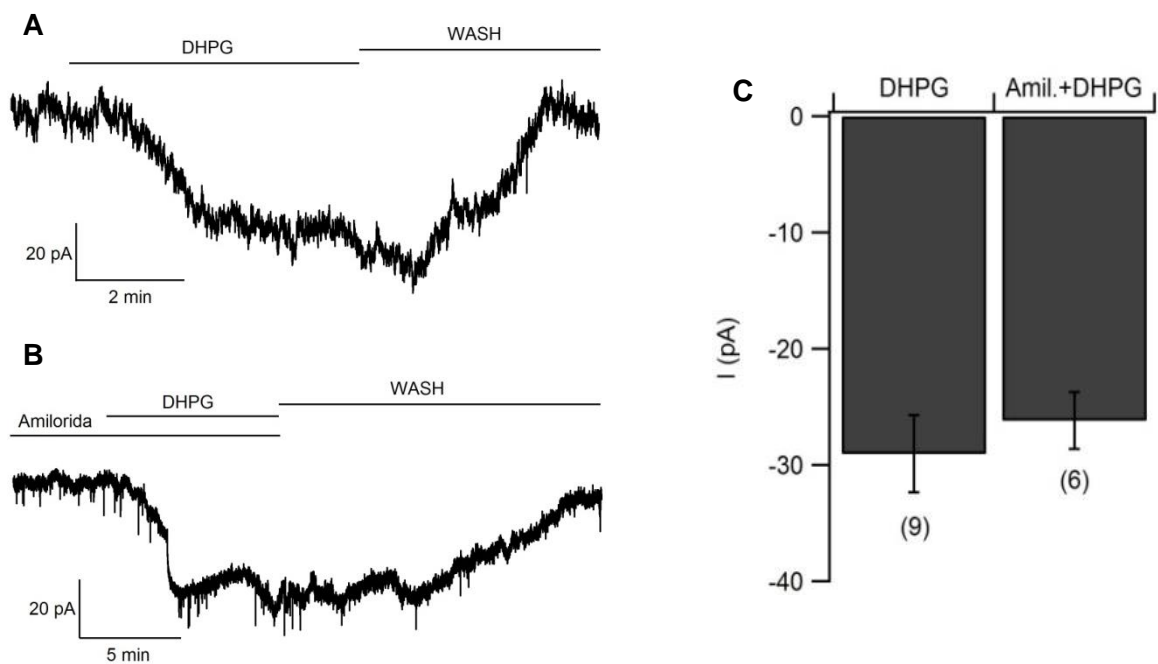


Figura 17: Amilorida não afeta a magnitude da $I_{mGluR-I}$ evocada por DHPG. Trechos de registro representativo mostrando a corrente induzida por DHPG (10 μ M) em controle (A) e (B) na presença da Amilorida (100 μ M); potencial de holding, -60 mV. C: Não existe diferença significativa na corrente induzida por DHPG na presença do bloqueador Amilorida. O número de células registradas está no parêntesis. * $P < 0.05$; Test *t* Student.

5.6.2 Canais GIRK na geração da $I_{mGluR-I}$

Os neurônios do MNTB de camundongos expressam os canais para potássio Kir3.1 (Lein, et al., 2007). Esses canais também chamados de canais GIRK (do inglês *G-protein regulated inwardly rectifying K channels*) desenvolvem um papel importante na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade (Luscher & Slesinger, 2010). Para testar o

envolvimento de canais Kir3.1 na geração da $I_{mGluR-I}$ foi utilizado o íon Ba^{2+} que bloqueia canais da família KIR. Na presença do Ba^{2+} (500 μM) a $I_{mGluR-I}$ foi reduzida para 66.4% do valor em condições controle, mostrando uma diminuição significativa (-21.9 ± 1.9 pA vs. -33.0 ± 4.5 pA; $P = 0.04$, $n = 8$) (Fig. 18).

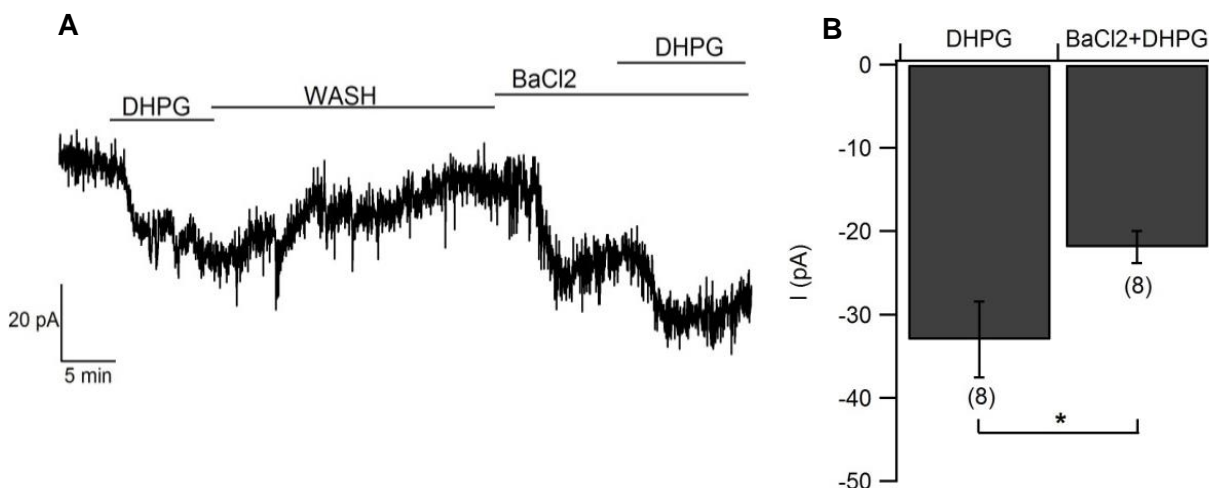


Figura 18: Ba^{2+} reduz a corrente de entrada evocada por DHPG. **A:** Registro representativo em voltage-clamp da $I_{mGluR-I}$ induzida por DHPG (10) na condição controle e na presença do (500 μM); Potencial de holding, -60 mV. **B:** Gráfico de barras mostrando que na presença do Ba^{2+} a corrente é reduzida significativamente. O número de células registradas está no parêntesis. * $P < 0.05$; Test t Student.

5.6.3 Canais HCN na geração da $I_{mGluR-I}$

Foi visto que a corrente I_h , produzida pelos canais ativados por hiperpolarização (canais HCN) contribuem para a excitabilidade de neurônios nas vias auditivas do tronco encefálico (Shaikh & Finlayson, 2003) incluindo o MNTB (Leão et al., 2005). Esses canais são permeáveis aos íons Na^+ e K^+ gerando uma corrente de entrada em valores de potencial de membrana perto do potencial de repouso (Walhl-Schott & Biel, 2009). Várias vias de sinalização intracelular podem influenciar a ativação destes canais, entre elas a via da PLC-PKC ativada por receptores ligados a proteína Gq, como acontece com os mGluR do Grupo I (Walhl-Schott et al., 2009; Chao He et al., 2014). De acordo com estes achados, foi usado o bloqueador para canais HCN, ZD7288 (100 μM), para determinar se estes canais poderiam estar envolvidos na geração da $I_{mGluR-I}$.

Na presença do ZD7288 a magnitude da corrente ativada por DHPG correspondeu a $40.4 \pm 7,5\%$ da corrente controle (-8.1 ± 1.8 pA vs. -21.5 ± 4.4 pA $P = 0.02$, $n = 6$) demonstrando que os canais HCN estão envolvidos na geração da $I_{mGluR-I}$ (Fig. 19).

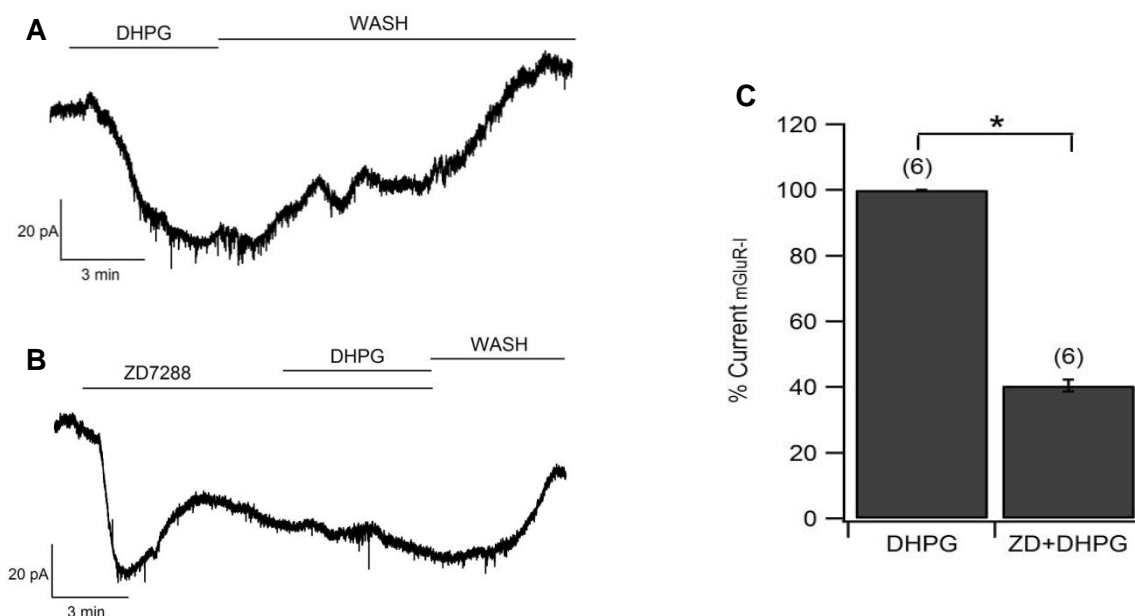


Figura 19: ZD7288 reduz a corrente de membrana evocada DHPG. Trechos de registro representativo mostrando a corrente induzida por DHPG (10 μM) em controle **(A)** e na presença do bloqueador ZD7288 (100 μM) **(B)**; potencial de holding, -60 mV. **C:** Gráfico de barras mostrando que na presença do ZD7288 a corrente reduz significativamente. O número de células registradas está no parêntesis. * $P < 0.05$; Test t Student.

5.6.4 Participação conjunta de canais GIRK e HCN na geração da $I_{mGluR-I}$

De acordo com os resultados obtidos na presença dos bloqueadores para canais GIRK e HCN que mostram bloqueio parcial da corrente $I_{mGluR-I}$, era de se esperar que a aplicação conjunta de ambos antagonistas pudesse abolir a $I_{mGluR-I}$. De acordo com os experimentos prévios, o tempo necessário para o estabelecimento do efeito do Ba^{2+} , quando comparado com o ZD7288, era maior, por isto, durante a aplicação das drogas, o Ba^{2+} foi colocado antecipadamente ao ZD, quando o efeito do ZD foi estável foi adicionado o DHPG. No entanto durante a presença dos dois bloqueadores persistiu $23.3 \pm 3.3\%$ da corrente, comparada com a corrente controle na mesma célula (-41.8 ± 7.9 pA, em controle, vs. -9.2 ± 1.1 pA, na presença de $Ba^{2+} + ZD7288$; $P = 0.02$, $n = 4$) (Fig. 20).

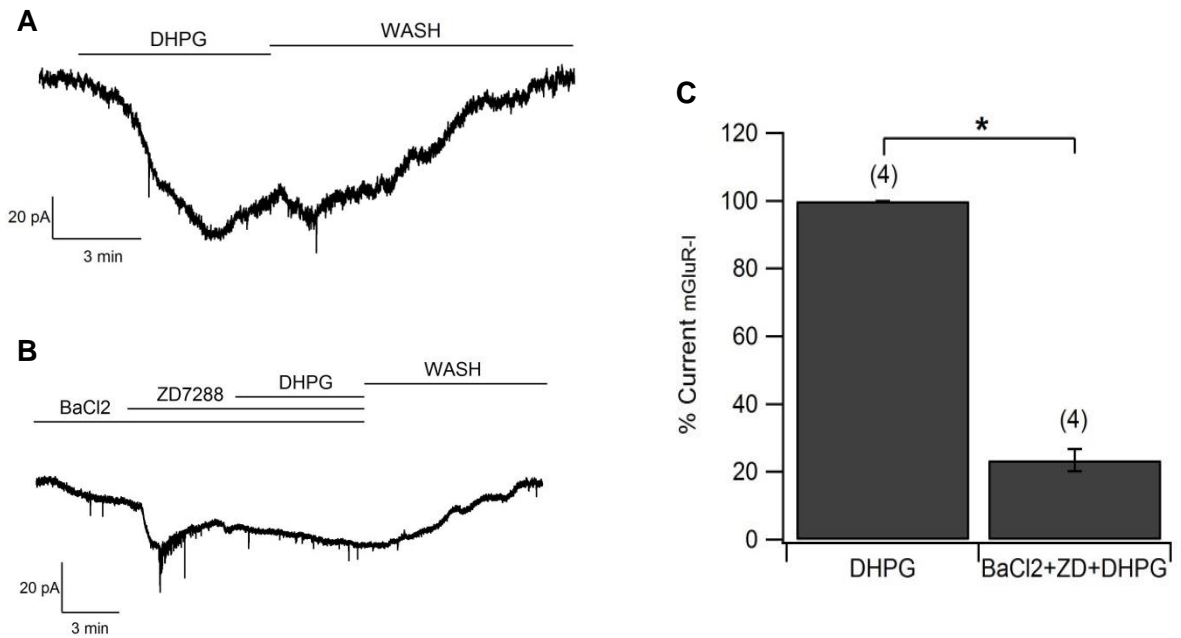


Figura 20: A aplicação conjunta de Ba²⁺ e ZD7288 reduz 77% da corrente evocada por DHPG. Trechos de registro representativo mostrando a corrente induzida por DHPG (10 μM) em controle **(A)** e **(B)** na presença conjunta dos bloqueadores Ba²⁺(500 μM) e ZD7288 (100 μM); potencial de holding, -60 mV. C: Gráfico de barras mostrando que na presença conjunta do Ba²⁺ e ZD7288 a corrente reduz significativamente. O número de células registradas está no parêntesis. **P* < 0.05; Test *t* Student.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos o efeito excitatório causado pela ativação de receptores mGluR do grupo I em neurônios do MNTB em camundongos entre 6 e 9 dias de idade. O Grupo I é formado pelas isoformas mGluR1 e mGluR5, ambas expressas no MNTB de camundongos. Para ativar esses receptores foi utilizado um agonista seletivo, o DHPG. O primeiro objetivo foi determinar a contribuição de cada isoforma para a geração da corrente, para isso, nos estabelecemos a curva de concentração resposta, e utilizamos uma concentração suficiente para gerar um efeito pleno mais adequado que não impedisse o uso de um antagonista competitivo. A segunda questão que tentamos responder foi a de quais canais iônicos seriam responsáveis por causar a corrente excitatória ao ativar os mGluR-I com DHPG.

6.1 Ativação dos mGluR-I induzida por DHPG

Os efeitos induzidos pelo DHPG sobre o potencial de membrana em neurônios do MNTB se manifestam como uma despolarização que se manteve durante a presença da droga e é reversível durante a lavagem (Fig. 12 A e B). Esta depolarização é causada por uma corrente de entrada que é ativada e desativada com o mesmo curso temporal (Fig. 12 C e D). Esse achado corrobora com os resultados obtidos por Chanda & Xu-Friedman (2011) onde a ativação com (DHPG) causou despolarização da membrana das células do núcleo coclear anteroventral em camundongos.

Este efeito induzido por DHPG tem sido relatado também para outras regiões do SNC onde os receptores metabotrópicos para glutamato do tipo I estão envolvidos, como: as células dopaminérgicas e células mitrales de bulbo olfatório principal (Jian et al., 2010) (Heinbockel et al., 2004) , interneurônios do corpo estriado (Partridge et al., 2014) a medula espinal (Kettunen et al., 2003), as células piramidais na região CA1 do hipocampo (Mannaioni et al, 2001) e em barorreceptores no Núcleo do Trato Solitário (NTS) (Serikawa & Bonham, 2006).

6.2 Os neurônios do MNTB respondem de forma concentração dependente à aplicação do DHPG.

Tem sido reportado que o DHPG ativa seletivamente as isoformas mGluR1 e mGluR5 com valores de EC₅₀ menores a 10 µM (Wisniewski et al., 2002), no entanto isso depende do sistema celular em que seja implementado. Em células mitrais do bulbo olfatório o EC₅₀ correspondeu a 27.4 µM (Heinbockel et al., 2004), enquanto para barorreceptores no NTS o EC₅₀ foi 9.1 µM (Serikawa et al., 2006) e em interneurônios colinérgicos do corpo estriado o EC₅₀ foi 4.0 µM (Bonsi, et al., 2005);

De acordo com esses dados divergentes foi necessário estabelecer a curva de concentração-resposta para DHPG em neurônios do MNTB de camundongos neonatos (P6-9). O EC₅₀ para células principais do MNTB foi de 1 µM, com efeito máximo em concentrações iguais ou acima de 10 µM (Fig. 13).

Com base nos valores observados a concentração de 10 µM foi selecionada para ser usada nos experimentos com antagonistas e bloqueadores. Essa concentração foi escolhida, principalmente, por que o antagonista da isoforma mGluR1 que nós utilizamos (LY367385) tem caráter competitivo. Baseado em nossa curva concentração-resposta, a concentração de 10 µM é suficiente para obter o pleno efeito ainda quando aplicado junto ao antagonista permitindo a competição do LY367385 para o receptor.

Apesar de ser útil para determinar a concentração a ser usada em experimentos posteriores, foi observada uma resposta inesperada quando testamos os neurônios com DHPG na concentração de 0.1 µM (Fig. 13). A resposta observada com DHPG 0.1 µM foi quase igual à resposta observada com DHPG 1 µM, porém DHPG 0.3 µM apresentou resposta nula. Os registros utilizados para determinar esse ponto da curva foram examinados cuidadosamente, mas não foram detectados erros experimentais que sugerissem a exclusão daquele ponto. Nas curvas de concentração respostas revisadas da literatura e mencionadas anteriormente, não foram utilizadas concentrações menores a 1 µM o que dificulta a comparação de nossos dados com experimentos de outros laboratórios.

6.3 Dessensibilização dos receptores a aplicações consecutivas do DHPG

Já foi visto que receptores metabotrópicos para glutamato podem sofrer dessensibilização após estimulação constante do receptor (Ferguson, 2001). Por exemplo, em neurônios colinérgicos do corpo estriado, aplicação prolongada e repetitiva do DHPG induz respostas progressivamente menores (Bonsi, et al., 2005).

Com estes antecedentes, foi necessário realizar aplicação dupla do agonista de modo a identificar se estes receptores nos neurônios do MNTB poderiam ser também dessensibilizados. Como apreciado na Figura 14 (C-D) a magnitude da despolarização e da corrente de entrada induzidas pelo DHPG não muda durante as duas aplicações sucessivas. Estes dados permitem concluir que os receptores mGlu do grupo I, de neurônios do MNTB, não são dessensibilizados pelas aplicações prolongadas e repetidas de DHPG utilizadas neste estudo. Isto garantiu que durante experimentos pareados posteriores, a resposta medida na presença de um antagonista ou bloqueador pudesse ser comparado diretamente com a resposta medida em condições controle.

6.4 Participação das isoformas mGluR1 e mGluR5 na geração da $I_{mGluR-I}$

O DHPG é um agonista seletivo para receptores do Grupo I mas não distingue as duas isoformas mGluR1 e mGluR5, ambas expressas pelo MNTB. Devido a essa, não seletividade do agonista, não se sabe se a corrente $I_{mGluR-I}$ depende de uma ou outra (ou ambas) as isoformas. O uso de moléculas com função antagonística seletiva para uma ou outra isoforma pode ser utilizado para responder esta questão.

O MPEP é um antagonista potente, seletivo e não competitivo para o mGluR5 (Acher, 2011). Nos experimentos pareados, o MPEP (10 μ M) inibiu a $I_{mGluR-I}$ por 40% (Fig. 15 A e C). Esse resultado é coerente com outros dados de nosso laboratório. Alhadadas (2014) mediu a despolarização induzida por DHPG (100 μ M) utilizando outra técnica eletrofisiológica (registro intracelular) e foi observada inibição por MPEP (10 μ M) de 38%. A concentração de MPEP utilizada deve saturar os receptores mGluR5 (Acher, 2011). Portanto, esses achados indicam que a mGluR5 participa, mas não é essencial para a resposta a DHPG.

Para testar a participação da isoforma mGluR1, foi usado o LY367385. Este antagonista é competitivo, o que nos levou a usar uma concentração maior (100 μ M) em relação ao agonista, para garantir o bloqueio do receptor. Na presença do LY367385 (100 μ M) a corrente de entrada induzida pelo DHPG (10 μ M) foi completamente abolida (Fig. 15 B e D). Este antagonista é pelo menos onze vezes mais potente para isoforma mGluR1, comparado com a isoforma mGluR5 (Clark et al., 1997), por tanto nas concentrações de agonista e antagonista utilizadas, o LY367385 inibiu bem a mGluR1 com pouco ou nenhum efeito em mGluR5. Por tanto, esses resultados sugerem que o mGluR1 é essencial para a geração da corrente ativada por DHPG.

Resultados similares envolvendo a despolarização induzida por DHPG (100 μ M) em neurônios da Substancia Nigra Pars Reticulata (SNr), mostraram que o MPEP (10 μ M) pode reduzir parcialmente a despolarização, enquanto o LY367385 (100 μ M) reduz o efeito em 80% (Marino, et al., 2001). Estes dados são coerentes com os nossos achados no MNTB. A diferença na eficácia do antagonista (80% de inibição (Marino, et al., 2001) versus 100% (nosso trabalho)) pode ser devido à relação de concentrações entre o agonista e o antagonista competitivo utilizado. Nós conseguimos abolir a resposta usando a razão de LY367385:DHPG de 10:1, enquanto a usada por Marino et al. (2001) correspondeu a 1:1.

Com o propósito de ter outra ferramenta que permitisse definir a participação dos receptores na geração da $I_{mGluR-I}$ foram usados animais knockout para o mGluR5, sendo registrada a resposta de neurônios do MNTB ao DHPG (10 μ M) tanto em animais WT quanto em KO da mesma colônia. A magnitude da corrente para os dois grupos não apresentou diferença (Fig. 16C), mostrando que os receptores mGluR1 compensam a ausência da isoforma mGluR5.

Em conjunto estes resultados mostram que a isoforma mGluR1 é imprescindível para a geração da $I_{mGluR-I}$ em neurônios do MNTB de camundongos neonatos (P6-9).

Achados na literatura indicam que a colocação das isoformas, mGluR1 e mGluR5, na mesma célula não garante que as duas intervenham de igual forma nos processos de sinalização apesar de estarem acopladas à mesma proteína G_q . Heinbockel (2004) usando agonistas e antagonistas seletivos e animais knockout, demonstrou que em células mitrais do bulbo olfatório principal somente a isoforma mGluR1 é responsável por regular a excitabilidade celular. Da mesma maneira Mannaioni et al. (2001) observou que os transientes de cálcio intracelular induzidos pelo DHPG, em células piramidais da região CA1 do hipocampo, são mediados exclusivamente pela isoforma mGluR1. Nessas células, a significância funcional da expressão de receptores mGluR5 ainda não foi esclarecida.

Em outras regiões onde mGluR1 e mGluR5 são co-expressos, o papel de receptores mGluR5 está mais claro. Um exemplo são os neurônios colinérgicos do corpo estriado (Bonsi, et al., 2005) e no Globo Pálido (Poisik et al., 2003) de ratos. Esses neurônios expressam ambas as isoformas mGluR1 e mGluR5, porém somente a ativação do mGluR1 gera, diretamente, uma depolarização da membrana. Por sua vez, ativação de mGluR5, através da PKC, modula a dessensibilização dos receptores mGluR1. Em outro estudo, Volk et al. (2006) demonstrou que ambas as isoformas (mGluR1 e mGluR5) são essenciais para a indução de LTD (do inglês, *Long-term Depression*) na região CA1 do hipocampo. O bloqueio do mGluR1 quanto do mGluR5 é necessário para abolir a indução da LTD por DHPG, pois o

bloqueio de somente uma das isoformas não tem este mesmo efeito. Além disso, animais KO para mGluR1 apresentam redução da LTD (Volk et al. 2006).

Recentemente tem sido descrito que a colocalização das isoformas dos receptores mGluR do grupo I pode dar lugar a um receptor com um perfil farmacológico único que não pode ser explicado adequadamente pela atuação independente das isoformas (Sevastyanova & Kammermeier, 2014). Isso indica que a função desenvolvida por uma isoforma expressa de maneira individual difere da função quando as duas isoformas agem em conjunto como um receptor heterodimérico (Doumazane, et al., 2011).

Todas estas descobertas oferecem várias possibilidades 1) Os receptores podem agir por vias de sinalização diferentes ainda que sejam acoplados a proteína Gq, nesse caso somente uma das isoformas é responsável pelo efeito enquanto a outra não afeta positiva nem negativamente este efeito; 2) As duas isoformas agem de forma cooperativa; 3) Pode se formar um receptor heterodimérico (mGluR1/mGluR5) com resposta farmacológica diferente dos receptores homodiméricos mGluR1 ou mGluR5. De acordo com experimentos realizados em animais WT, se sugere uma cooperatividade entre as isoformas onde o mGluR1 poderia ser responsável pela geração da corrente de entrada enquanto o mGluR5 poderia exercer sua função modulando ou potenciando a corrente. No entanto, baseado nos resultados obtidos nos animais KO poderia ser sugerido que a isoforma mGluR1 quando expressada individualmente poderia assumir ambas as funções, gerar e modular a corrente.

Futuros experimentos usando agonistas seletivos para cada uma das isoformas dos receptores mGluR-I, nos permitirão definir com mais clareza a função de cada isoforma na geração da corrente.

6.5 Mecanismos ionotrópicos envolvidos na geração da $I_{mGluR-I}$

Baseados em relatos prévios sobre a expressão de canais que podem ser ativados ou inibidos pela ativação de receptores mGlu do Grupo I nas células principais do MNTB, foram desenvolvidos experimentos que permitiram avaliar sua participação na geração da $I_{mGluR-I}$.

6.5.1 Canais ASIC

Os canais ASIC são permeáveis aos íons Na^+ e ativados pela acidificação do meio extracelular. A sua ativação gera uma corrente de entrada excitatória que contribui na

função sensorial do Sistema Nervoso Periférico, e no cérebro desenvolve papéis na transmissão sináptica contribuindo para a plasticidade neuronal (LTP) (Liu, et al., 2016). Estes canais apresentam seis isoformas ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 e ASIC4 (Revisado por Omerbasic et al., 2015).

O canal ASIC1a foi identificado em neurônios do MNTB onde modula a plasticidade a curto prazo dos EPSCs, sugerindo um papel importante na transmissão sináptica durante estimulação de alta frequência (Inchauspe et al., 2010). Além disso, outros estudos mostram que os receptores mGluR-I podem potenciar a corrente ASIC em neurônios DRG, especialmente através de isoforma mGluR5 (Gan, et al., 2016).

De acordo com estes achados foi testada a hipótese que a $I_{mGluR-I}$ poderia, parcialmente, ser gerada pela ativação de ASICs, no entanto na presença do bloqueador de amplo espectro para estes canais (Amilorida, 100 μ M) foi visto que a magnitude da corrente induzida por DHPG não varia (Fig. 17 C), sugerindo que os canais ASIC não estão envolvidos na geração da $I_{mGluR-I}$ em neurônios do MNTB de camundongos.

6.5.2 Canais Kir 3.1

Através de hibridação *in situ* foi demonstrada a presença de canais retificadores de potássio para dentro (*GIRK channels*), particularmente do tipo Kir 3.1, no MNTB (Lein, et al., 2007), além disso, em oócitos de *Xenopus* co-expressando canais GIRK1 e receptores mGlu foi visto que estes canais são ativados pelo complexo de subunidades $\beta\gamma$ das proteínas $G_{i/o}$ e G_q (Saugstad et al., 1996). Tem sido demonstrado que os canais GIRK são sensíveis ao íon Ba^{2+} que funciona como bloqueador destes. (Latorre et al, 1997) (Knoflach & Kemp, 1998)

Observamos que os íons Ba^{2+} (500 μ M) reduziram a corrente ativada por DHPG em 33.6% (Fig. 18 B). A nossa interpretação desse dado é que um dos mecanismos ionotrópicos induzidos pelos receptores mGluR-I é o fechamento de canais Kir3.1. A corrente desses canais a -60mV é uma corrente positiva correspondendo à saída dos íons K^+ . O fechamento desses canais pela ação do DHPG deslocaria a corrente de membrana no sentido negativo. Na presença de Ba^{2+} , os canais já se encontram bloqueados e dessa forma impossibilitados a participar na sinalização ativada por DHPG. Estes resultados são corroborados por observações feitas em oócitos de *Xenopus* co-expressando canais GIRK e o receptor mGluR1a, aonde a aplicação de Glutamato diminuiu a atividade basal dos Canais GIRK em 46% sendo esta inativação modulada pelas vias de sinalização da PKC. Estes

achados sugerem também que os canais Kir 3.1 estão envolvidos na regulação do potencial membrana no estado de repouso.

6.5.3 Corrente I_h mediada por Canais HCN

A corrente I_h corresponde a uma corrente excitatória de entrada, ativada durante a hiperpolarização ou em potenciais mais negativos do que o potencial de repouso (Robinson & Siegelbaum, 2003). Nas vias auditivas do tronco encefálico (Shaikh & Finlayson, 2003) e nas células internas da cóclea (Yi et al., 2010) correntes I_h contribuem para a excitabilidade neuronal.

Até o momento têm sido identificadas quatro isomorfias dos canais HCN (HCN1 - HCN4) que estão expressas tanto no coração quanto no cérebro (Robinson et al., 2003). Através de técnicas de imunohistoquímica as isoformas HCN2 e HCN4 foram identificadas em neurônios do MNTB (Leão et al, 2006).

Nos experimentos realizados com o bloqueador para canais HCN (ZD7288, 100 μ M) a corrente induzida pelo DHPG foi diminuída em 60% (Fig. 19 C) o que indica que estes canais participam na geração da corrente excitatória provocada pela ativação de receptores mGluR-I. Nossa interpretação é que a ativação de receptores mGluR-I resulta na ativação de canais HCN no potencial de membrana utilizado, e que essa corrente contribui para a $I_{mGluR-I}$. O bloqueio dos canais HCN com ZD7288 impossibilita a sua participação e reduz o tamanho da corrente evocada por DHPG. A este respeito já foi visto que proteínas quinases como a PKC (Robinson et al., 2003) ativada na via de sinalização intracelular dos receptores mGlu do Grupo I ao estarem acoplados a proteína G_q , pode modular os canais HCN.

Resultados similares aos descritos acima foram registrados por Gao et al. (2016), onde através de uma abordagem farmacológica em neurônios do córtex cingulado anterior de ratos normais e com constrição crônica do nervo ciático, a ativação da isoforma mGluR1 com DHPG regulou os canais HCN inibindo-os, e quando a enzima PKC foi bloqueada o efeito foi abolido.

6.5.4 Resumo de canais envolvidos na $I_{mGluR-I}$.

Com os resultados obtidos nos experimentos com os bloqueadores ZD7288 e Ba^{2+} foi possível supor que é a $I_{mGluR-I}$ dependia maioritariamente dos canais Kir3.1 e HCN pois a somatória das duas inibições matematicamente aboliria 93% da corrente, no obstante

quando aplicado o DHPG na presença concomitante dos bloqueadores ainda restou 23% da corrente controle (Fig. 20 C).

A origem ionotrópica do 23% da $I_{mGluR-1}$ ainda não foi determinada, no entanto existem algumas previsões sobre canais que poderiam intervir. Heinbockel e colaboradores (2004) bloquearam parte da corrente induzida pela ativação de mGluR1, com bloqueadores para canais de K^+ , mas tiveram uma corrente residual que foi completamente bloqueada ao adicionar Cd^{2+} e Ni^{2+} , bloqueadores de canais para Ca^{2+} voltagem dependentes. Outros candidatos a serem responsáveis pelo remanescente desta corrente são os canais CRAC (do inglês, *Calcium-Release Activated Ca current*) e o trocador de Na^+/Ca^{2+} .

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nos permitiu estabelecer algumas conclusões descritas a seguir.

Ativação dos receptores mGluR do grupo I pelo agonista DHPG despolariza, de forma concentração-dependente os neurônios do MNTB. O EC₅₀ desse efeito foi em torno de 1 μ M e o efeito máximo foi de aproximadamente 8 mV. Esta despolarização é causada por uma corrente iônica de entrada.

As duas isoformas do receptor, mGluR1 e mGluR5, contribuem de maneira diferente para a geração da corrente ativada por mGluR-I. Em animais com deleção do gene para o receptor mGluR5, os mGluR1 compensam a função da isoforma ausente, na geração da corrente mGluR-I.

O efeito iônico ativado pelo mGluR-I em neurônios do MNTB é multifatorial, pois depende da contribuição de vários canais iônicos entre eles canais HCN e canais GIRK que contribuem com o 77% da corrente de entrada

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acher, F. (2011). Metabotropic Glutamate Receptors Molecular Pharmacology. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*.
- Alhadas, E., Naves, L., & Kushmerick, C. (2014). Ativação de receptores glutamatérgicos metabotópicos do Grupo I despolariza e aumenta a excitabilidade dos neurônios do corpo trapezoide de camundongos neonatos. *Dissertação de mestrado*. Belo Horizonte: Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB - UFMG.
- Aoki, E., Semba, R., Keino, H., Kato, K., & Kashiwamata, S. (1988). Glycine-like immunoreactivity in the auditory pathway. *Brain Research*, 63-71.
- Balázs, R., Miller, S., Romano, C., de Vries, A., Chun, Y., & Cotman, C. (1997). Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J Neurochem*, 151-163.
- Bardsley, M., & Roberts, P. (1983). Stimulation of phosphatidylinositol turnover in rat brain by glutamate and aspartate. *British Journal of Pharmacology*, 401.
- Berridge, M., & Irvine, R. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 315-321.
- Berridge, M., Downes, C., & Hanley, M. (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochemistry Journal*, 587-595.
- Bhattacharyya, S. (2016). Inside story of Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs). *Int J Biochem Cell Biol.*, 1-8.
- Björkalund, A., & Hökfelt, T. (2000). *Handbook of chemical neuroanatomy: Glutamate*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Bonsi, P., Cuomo, D., De Persis, C., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P., & Pinasi, A. (2005). Modulatory action of metabotropic glutamate receptor (mGluR) 5 on mGluR1 function in striatal cholinergic interneurons. *Neuropharmacology*, 104-113.
- Bordi, F., & Ugolini, A. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors: Implications for brain diseases. *Progress in Neurobiology*, 55-79.

- Borst, J., & Soria van Hoeve, J. (2012). The calyx of Held synapse: from model synapse to auditory relay. *Annu Rev Physiol*, 199-224.
- Cartmell, J., & Schoepp, D. (2000). Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors. *J Neurochem*, 889-907.
- Catania, M., Landwehrmeyer, G., Testa, C., Standaert, D., Penney Jr, J., & Young, A. (1994). Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience*, 481-495.
- Chanda, S., & Xu-Friedman, M. (2011). Excitatory modulation in the cochlear nucleus through group I metabotropic glutamate receptor activation. *J Neurosci*, 7450-7455.
- Citri, A., & Malenka, R. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 18-41.
- Clark, B., Baker, S., Goldsworthy, J., Harris, J., & Kingston, A. (1997). (+)-2-Methyl-4-carboxyphenylglycine (LY367385) selectively antagonizes metabotropic glutamate mGluR1 receptors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2777-2780.
- Clause, A., Sturm, J., Altieri, S., Maricich, S., & Kandler, K. (2014). Development of mammalian primary sound localization circuits. En R. Romand, & I. Varela-Nieto, *Development of auditory and vestibular systems* (págs. 250-270). United States: Elsevier.
- Collingridge, G., Olsen, R., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 2-5.
- Curtis, D., & Watkins, J. (1960). The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem*, 117-141.
- Curtis, D., & Johnston, G. (1974). Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol*, 97-188.
- Dhami, G., & Ferguson, S. (2006). Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 260-271.
- Doré, A., Okrasa, K., Patel, J., Serrano-Vega, M., Bennett, K., Cooke, R., . . . Marshall, F. (2014). Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature*, 557-562.

- Doumazane, E., Scholler, P., Awier, J., Trinquet, E., Rondard, P., & Pin, J. (2011). A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *FASEB J*, 66-77.
- Elezgarai, I., Bilbao, A., Mateos, J., Azkue, J., Benítez, R., Osorio, A., . . . Grandes, P. (2001). Group II metabotropic glutamate receptors are differentially expressed in the medial nucleus of the trapezoid body in the developing and adult rat. *Neuroscience*, 487-498.
- Elezgarai, I., Puente, N., Díez, J., Azkue, J., Herminda, D., Bilbao, A., . . . Grandes, P. (2003). Group I metabotropic glutamate receptors are localized in developing calyces of Held. *Neuroscience Meeting Planner*. New Orleans: Abstract.
- Elezgari, I., Benitez, R., Mateos, J., Lázaro, E., Osorio, A., Azkue, J., . . . Grandes, P. (1999). Developmental expression of the group III metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Comp Neurol*, 431-440.
- Ferguson, S. (2001). Evolving concepts in G Protein-coupled Receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, 1-24.
- Gan, x., Wu, J., Ren, C., Qiu, C.-Y., Li, Y.-K., & Hu, W.-P. (2016). Potentiation of acid-sensing ion channel activity by peripheral group I metabotropic glutamate receptor signaling. *Pharmacological Research*, 19-26.
- Gao, S.-H., Wen, H.-Z., Shen, L.-L., Zhao, Y.-D., & Ruan, H.-Z. (2016). Activation of mGluR1 contributes to neuronal hyperexcitability in the rat anterior cingulate cortex via inhibition of HCN channels. *Neuropharmacology*, 361-377.
- Gasparini, F., Lingenhohl, K., Stoehr, N., Flor, P., Heinrich, M., Vranesic, I., . . . Kuhn, R. (1999). 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 1493-1503.
- Grothe, B., Pecka, M., & McAlpine, D. (2010). Mechanisms of Sound Localization in Mammals. *Physiol. Rev.*, 983-1012.
- Hamilton, A., Zamponi, G., & Ferguson, S. (2015). Glutamate receptors function as scaffolds for the regulation of β -amyloid and cellular prion protein signaling complexes. *Molecular Brain*, 8-18.
- Harrison, J., & Warr, W. (1962). A study of the cochlear nuclei and ascending auditory pathways of the medulla. *J Comp Neurol.*, 341-379.

- Hayashi, T. (1954). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio Journal of Medicine*, 183-192.
- Heinbockel, T., Heyward, P., Conquet, F., & Ennis, M. (2004). Regulation of main olfactory bulb Mitral cell excitability by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *J Neurophysiol*, 3085-3096.
- Held, H. (1893). Die centrale Gehörleitung. *Arch. Anat. Physiol. Anat. Abt.*, 201-248.
- Inchauspe, C. G., Urbano, F. J., & Uchitel, O. D. (2010). Characterization of acid sensing ion channels (ASICs) at the MNTB neurons in auditory brainstem slices. *40^o Annual Meeting of The Society for Neuroscience*. San Diego, California.
- Ito, I., Kohda, A., Tanabe, S., Hirose, E., Hayashi, M., Mitsunaga, S., & Sugiyama, H. (1992). 3,5-Dihydroxyphenyl-glycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport*, 1013-1019.
- Jian, K., Cifelli, P., Pignatelli, A., Frigato, E., & Belluzi, O. (2010). Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Res*, 47-63.
- Kettunen, P., Hess, D., & El Manira, A. (2003). mGluR1, but not mGluR5, mediates depolarization of spinal cord neurons by blocking a leak current. *J Neurophysiol*, 2341-2348.
- Knoflach, F., & Kemp, J. (1998). Metabotropic glutamate group II receptors activate a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ current in neurones of the rat cerebellum. *J Physiol*, 347-354.
- Kopp-Scheinflug, C., Steirnet, J., & Forsythe, I. (2011). Modulation and control of synaptic transmission across the MNTB. *Hearing research*, 22-31.
- Kopp-Scheinflug, C., Tolnai, S., Malmierca, M., & Rubsamen, R. (2008). The medial nucleus of the trapezoid body: comparative physiology. *Neuroscience*, 160-170.
- Krieger, J., Bahar, I., & Greger, I. (2015). Structure, Dynamics, and Allosteric Potential of Ionotropic Glutamate Receptor N-Terminal Domains. *Biophys J.*, 1136-1148.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., . . . Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 971-977.

- Kushmerick, C., Price, G., Taschenberger, H., Puente, N., Renden, R., & Wadiche, J. (2004). Retroinhibition of presynaptic Ca²⁺ currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J Neurosci*, 5955-5565.
- Latorre, R., Hurst, R., Diaz, F., Toro, L., & Stefani, E. (1997). Barium as a probe of the molecular architecture of the pore of K⁺ channels. In: R. Latorre, & J. Sáez, *From Ion Channels to Cell-to-Cell Conversations* (pp. 129-146). New York: Springer Science.
- Leão, K., Leão, R., Sun, H., Fyffe, R., & Walmsley, B. (2006). Hyperpolarization-activated currents are differentially expressed in mice brainstem auditory nuclei. *J Physiol*, 849-864.
- Leão, R., Sun, H., Svahn, K., Berntson, A., Youssoufian, M., Paolini, A., . . . Walmsley, B. (2006). Topographic organization in the auditory brainstem of juvenile mice is disrupted in congenital deafness. *J Physiol*, 563-578.
- Leão, R., Svahn, K., Berntson, A., & Walmsley, B. (2005). Hyperpolarization-activated (I) currents in auditory brainstem neurons of normal and congenitally deaf mice. *Eur J Neurosci*, 147-157.
- Lein, E., Hawrylycz, M., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., . . . Jones, A. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 168-176.
- Liu, M., Li, H., Li, W., Wu, Y., Deng, S., Huang, C., . . . Xu, T. (2016). Acid-sensing ion channel 1a contributes to hippocampal LTP inducibility through multiple mechanisms. *Sci Rep*, 1-14.
- Lohrke, S., Kungel, M., & Friauf, E. (1998). Electrical membrane properties of trapezoid body neurons in the rat auditory brain stem are preserved in organotypic slice cultures. *J Neurobiol*, 36(3), 395-409.
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., & Kano, M. (2001). Presynaptic Inhibition Caused by Retrograde Signal from Metabotropic Glutamate to Cannabinoid Receptors. *Neuron*, 463-475.
- Malenka, R. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTD and LTP. *Cell*, 535-538.
- Malenka, R., & Bear, M. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 5-21.
- Mannaioni, G., Marino, M., valenti, O., Traynelis, S., & Conn, P. (2001). Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci*, 5925-5934.

- Marino, M., Wittmann, M., Risso B., S., Hubert, G., Smith, Y., & Conn, P. (2001). Activation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors Produces a Direct Excitation and Disinhibition of GABAergic Projection Neurons in the Substantia Nigra Pars Reticulata. *J Neurosci*, 7001-7012.
- Meldrum, B. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology. *Journal of Nutrition*, 1007S-1015S.
- Morest, D. (1968). The growth of synaptic endings in the mammalian brain: a study of the calyces of the trapezoid body. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 201-220.
- Nakamura, P., & Cramer, K. (2011). Formation and maturation of the calyx of Held. *Hearing Research*, 70-78.
- Nishizuka, Y. (1984). Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*, 1365-1370.
- Niswender, C., & Conn, P. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology,. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 295-322.
- Omerbasic, D., Schuhmacher, L.-N., Bernal S., Y.-A., Smith, E., & Lewin, G. (2015). ASICs and mammalian mechanoreceptor function. *Neuropharmacology*, 80-86.
- Partridge, J., Lewin, A., Yasko, J., & Vicini, S. (2014). Contrasting actions of group I metabotropic glutamate receptors in distinct mouse striatal neurones. *J Physiol*, 2721-2733.
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. California, USA: Elsevier Science.
- Peters, J. A., Peineau, S., Collingrifge, G. L., & Wenthold, R. J. (03 de 07 de 2016). *Ionotropic glutamate receptors*. Obtenido de IUPHAR\BPS Guide to PHARMACOLOGY:
<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=75>
- Poisik, O., Mannaioni, G., Traynelis, S., Smith, Y., & Conn, J. (2003). Distinct Functional Roles of the Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5 in the Rat Globus Pallidus. *J Neurosci*, 122-130.
- Purves, D., & et al. (2004). Neurotransmitters and their receptors. En *Neuroscience* (págs. 137-142). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

- Robinson, R., & Siegelbaum, S. (2003). Hyperpolarization-activated cation currents: From molecules to physiological function. *Annu. Rev. Physiol*, 453-480.
- Rodríguez-Contreras, A., Soria van Hove, J., Habets, R., Locher, H., & Borst, J. (2008). Dynamic development of the calyx of Held synapse. *PNAS*, 5603-5608.
- Saugstad, J., Segerson, T., & Westbrook, G. (1996). Metabotropic Glutamate Receptors Activate G-Protein-Coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels in *Xenopus* Oocytes. *J Neurosci*, 5979-5985.
- Schneggenburger, R., & Forsythe, I. (2006). The calyx of Held. *Cell Tissue Res*, 311-337.
- Schoepp, D., Jane, D., & Moon, J. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 1431-1476.
- Serikawa, S.-i., & Bonham, A. (2006). Group I Metabotropic Glutamate Receptors on Second-Order Baroreceptor Neurons Are Tonicly Activated and Induce a Na⁺-Ca²⁺ Exchange Current. *J Neurophys*, 882-992.
- Sevastianova, T., & Kammermeier, P. (2014). Cooperative Signaling between Homodimers of Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5. *Molecular Pharmacology*, 492-504.
- Shaikh, A., & Finlayson, P. (2003). Hyperpolarization-activated (I_h) conductances affect brainstem auditory neuron excitability. *Hear Res*, 183(1-2), 126-136.
- Sharon, D., Vorobiov, D., & Dascal, N. (1997). Positive and Negative Coupling of the Metabotropic Glutamate Receptors to a G Protein-activated K⁺ Channel, GIRK, in *Xenopus* Oocytes. *J Gen Physiol*, 477-490.
- Sladeczek, F., Pin, J., Recasens, M., Bockaert, J., & Weiss, S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, 717-719.
- Taschenberger, H., & von Gersdorff, H. (2000). Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci*, 9162-9173.
- Taschenberger, H., Leão, R., Rowland, K., Spirou, G., & von Gersdorff, H. (2002). Optimizing Synaptic Architecture and Efficiency for High-Frequency Transmission. *Neuron*, 1127-1143.

- Tolnai, S., Hernandez, O., Englitz, B., Rubsamen, R., & Malmierca, M. (2008). The medial nucleus of the trapezoid body in rat: spectral and temporal properties vary with anatomical location of the units. *European Journal of Neuroscience*, 2587-2598.
- Varma, N., Carlson, G., Ledent, C., & Alger, B. (2001). Metabotropic Glutamate Receptors Drive the Endocannabinoid System in Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 1-5.
- Varney, M., Cosford, N., Jachec, C., Rao, S., Sacaan, A., Lin, F.-K., . . . Johnson, E. (1999). SIB-1757 and SIB-1893: Selective, Noncompetitive Antagonists of Metabotropic Glutamate Receptor Type 5. *J Pharmacol Exp Ther*, 170-181.
- Volk, L., Daly, C., & Huber, K. (2006). Differential Roles for Group 1 mGluR Subtypes in Induction and Expression of Chemically Induced Hippocampal Long-Term Depression. *J Neurophysiol*, 2427-2438.
- von Gersdorff, H., & Borst, J. (2002). Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nat Rev Neurosci*, 53-64.
- Wang, L.-Y., Gan, L., Forsythe, I., & Kaczmarek, L. (1998). Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones. *J Physiol*, 183-194.
- Watkins, J. (1972). Metabolic regulation in the release and action of excitatory and inhibitory amino acids. *Biochem J*, 71P-73P.
- Watkins, J. C., & Jane, D. E. (2006). The glutamate story. *Br J Pharmacol.*, S100-S108.
- Wisniewski, K., & Car, H. (2002). (S)-3,5-DHPG: A Review. *CNS Drug Reviews*, 101-116.
- Wootten, D., Christopoulos, A., & Sexton, P. (2013). Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nature*, 630-644.
- Wu, H., Wang, C., Gregory, K., Han, G., Cho, H., Xia, Y., . . . Stevens, R. (2014). Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science*, 58-64.
- Yi, E., Roux, I., & Glowatzki, E. (2010). Dendritic HCN Channels Shape Excitatory Postsynaptic Potentials at the Inner Hair Cell Afferent Synapse in the Mammalian Cochlea. *J Neurophysiol*, 2532-2543.

Zahorodna, A., Palucha, A., & Bijak, M. (1998). Comparison of the effects of low and high concentrations of group I metabotropic receptor agonists on field potentials in the hippocampal CA1 region in vitro. *Pol J Pharmacol*, 291-298.

9. AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi realizado com recursos da **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), do **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da **FAPEMG** (Fundação de Amparo à Pesquisa de MG).