

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

Jennifer Diniz Soares Guimarães

**MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS DO LOCUS COERULEUS POR  
RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DO GRUPO I**

Belo Horizonte

2017

Jennifer Diniz Soares Guimarães

**MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS DO LOCUS COERULEUS POR  
RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DO GRUPO I**

Dissertação de Mestrado submetido  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas: Fisiologia e  
Farmacologia

Orientador: Christopher Kushmerick

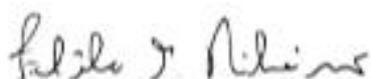
Belo Horizonte

2017

# "MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS DO LOCUS COERULEUS POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DO GRUPO I"

**JENNIFER DINIZ SOARES GUIMARÃES**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 21 de julho de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROFA. DRª. FABIOLA MARA RIBEIRO**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. JADER DOS SANTOS CRUZ**  
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, 21 de julho de 2017**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a duas pessoas muito importantes na minha vida, a minha tia-avó, Lucia Teresinha, e meu avô, Rubens Meireles, por todo o apoio e incentivo que tive durante toda a minha formação.

À minha família, especialmente minha mãe, Nathalie Christine Diniz, e minha avó, Elizabeth Diniz, pelo amor, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr. Christopher Kushmerick pela oportunidade e todo o apoio que recebi desde a minha chegada ao laboratório.

Ao Prof. Dr. Miguel José Lopes e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ligia Naves por todo o auxílio dentro do laboratório e contribuição para a minha formação.

Aos colegas de laboratório, Aline, Ana, Éverton, Wallace, Nathalia, Karina pelas experiências compartilhadas, paciência e por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável.

Meu querido “namorado”, Maximilian Carvalho Silva, por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos de minha vida, sempre me estimulando a continuar firme.

Aos meu amigos da LOG, pelo incentivo e todo o auxílio emocional nos dias difíceis.

A todos os colegas que conheci na UFMG durante as aulas e todos os demais que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

Muito Obrigada!!

## RESUMO

Receptores metabotrópicos de glutamato são uma grande família de receptores acoplados a proteína G. Estes receptores podem ser divididos em três Grupos: Grupo I (mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub>), Grupo II (mGlu<sub>2</sub> e mGlu<sub>3</sub>) e Grupo III (mGlu<sub>4</sub>, mGlu<sub>6</sub>, mGlu<sub>7</sub> e mGlu<sub>8</sub>). Neste estudo, avaliamos os efeitos da ativação de receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I (mGluR-I) em neurônios do Locus Coeruleus (LC) de ratos neonatos. Experimentos utilizando a técnica eletrofisiológica de *Whole-cell* nas modalidades *current clamp* e *voltage clamp* foram realizados em fatias coronais de 200 µm do tronco encefálico de ratos Wistar neonatos. Os neurônios do LC apresentaram atividade rítmica e espontânea, disparando potenciais de ação com frequência de  $1.8 \pm 0.3$  Hz (N=9). A aplicação do agonista seletivo para mGluR-I, (S)-3-5-DHPG (DHPG, 10 µM), promoveu um aumento na taxa de disparos dos potenciais de ação em  $210 \pm 23\%$  (p=0.004). O caráter do efeito foi transiente, com uma redução do efeito ainda na presença do agonista, caracterizando uma dessensibilização. Para determinar se DHPG causou uma despolarização dos neurônios LC, histogramas de trechos dos registros foram usados para identificar o valor do potencial de membrana correspondente às pausas entre os potenciais de ação. Aplicação de DHPG causou uma pequena, porém significativa despolarização do potencial de membrana de  $1.8 \pm 0.03$  mV (N=3, p=0.03). Para determinar se essa despolarização é suficiente para explicar o aumento de disparos observados, utilizamos protocolos que permitiram determinar a relação entre  $V_m$  e a frequência de potenciais de ação. Aplicando protocolos de rampas lentas (de -30 para +30 pA no período de 10 s) foi possível calcular a dependência da frequência dos potenciais de ação no valor de  $V_m$ , obtendo um aumento de  $0.7 \pm 0.1$  Hz / mV (N=2). Concluímos que a despolarização promovida pelo agonista DHPG justifica apenas parte do aumento de disparos observado. Experimentos realizados na modalidade *voltage clamp* evidenciaram que DHPG promove, de forma dose-dependente, uma corrente de entrada com valor de  $EC_{50} = 7.3$  µM e efeito máximo em -35 pA. Assim como o efeito de DHPG na frequência de disparos, a corrente gerada por DHPG foi transitória com uma dessensibilização após ~100 segundos da sua instalação. A utilização de antagonistas específicos para mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub> evidenciou uma forte inibição na corrente promovida por DHPG durante a presença de LY367385 (160 µM), antagonista seletivo para receptores mGlu<sub>1</sub> sem efeito aparente do MPEP (20 µM), antagonista de mGlu<sub>5</sub>. Embora o núcleo LC tem

sido caracterizado como um núcleo dimórfico sexualmente, não foram encontradas diferenças dependentes do sexo dos animais utilizados nas correntes promovidas por DHPG.

Nós concluímos que a ativação de receptores mGluR-I geram um aumento na taxa de disparos dos neurônios do LC através de múltiplos mecanismos incluindo despolarização do potencial de membrana, geração de uma corrente de entrada e mudanças nas correntes envolvidas na atividade marca-passo destes neurônios

## ABSTRACT

Metabotropic Glutamate Receptors are members of the G-protein-coupled receptors superfamily. These receptors are classified into three groups: Group I (mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub>), Group II (mGlu<sub>2</sub> e mGlu<sub>3</sub>) and Group III (mGlu<sub>4</sub>, mGlu<sub>6</sub>, mGlu<sub>7</sub> e mGlu<sub>8</sub>). We investigated the effects of activating Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluR-I) on the excitability of Locus Coeruleus (LC) neurons. Whole-cell current clamp and voltage clamp experiments were performed on LC neurons in coronal slices (200  $\mu$ M) of brainstem from Wistar rats. LC neurons presented spontaneous and rhythmic action potentials at a frequency of  $1.8 \pm 0.3$  Hz (N=9). Application of the selective mGluR-I agonist, (S)-3-5-DHPG (DHPG, 10  $\mu$ M), caused a increase in action potential firing rate of  $210 \pm 23\%$  ( $p=0.004$ ). The effect of DHPG was transient and action potential frequency recovered partially during application of agonist (i.e., the effect of DHPG desensitized). We tested if DHPG depolarized the neurons by measuring the peak of the all-points histogram of membrane potentials. This is the value of membrane potential at which  $V_m$  pauses briefly between action potentials. DHPG caused a small but significant increase in  $V_m$  (i.e., a small depolarization of the membrane potential) of  $1.8 \pm 0.03$  mV (N=3,  $p=0.03$ ). To determine if this small membrane depolarization could be responsible for the observed increase in action potential firing frequency, we measured action potential frequency and the resting potential while applying slow current ramps (from -30 to +30 pA over 10 s). These data allowed us to calculate the dependence of AP frequency on value of resting potential and we obtained a slope of  $0.7 \pm 0.1$  Hz / mV (N=2). We conclude that the depolarization caused by DHPG can explain only part of the observed increase in action potential frequency. We next recorded membrane current under whole-cell voltage clamp to measure the DHPG-dependent current. DHPG caused a dose-dependent inward shift in membrane current with an  $EC_{50}$  of 7.3  $\mu$ M and a maximal effect of -35 pA. Like the effect of DHPG on action potential frequency, the DHPG-dependent current desensitized with a time constant of  $\sim 100$  s. This current was largely inhibited by the selective mGlu<sub>1</sub> receptor antagonist LY367385 (160  $\mu$ M), with no apparent effect of the mGlu<sub>5</sub> antagonist MPEP (20  $\mu$ M). Although differences in LC has been reported for female and male rats, we observed no dependence of sex on the size of the DHPG-dependent current. We conclude that activation of mGluR-I receptors changes the firing rate of these neurons through multiple mechanisms including

depolarization of the membrane potential, generation of a steady-state inward current, and changes to pacemaker currents.

## Sumário

1.	Introdução .....	1
1.1	Neurotransmissão .....	1
1.1.1	Sinapse Elétrica vs. Química .....	1
1.1.2	Neurotransmissão Excitatória vs. Inibitória .....	4
1.1.3	Glutamato .....	4
1.2	Receptores para glutamato .....	5
1.2.1	Receptores mGluR do Grupo I .....	7
1.2.1.1	Correntes promovidas pela ativação dos receptores mGluR-I .....	9
1.3	Locus Coeruleus .....	11
2.	Justificativa .....	16
3.	Objetivos .....	16
3.1	Objetivos específicos .....	16
4.	Metodologia .....	17
4.1	Animais .....	17
4.2	Fármacos, reagentes e soluções .....	17
4.3	Preparo das fatias .....	17
4.4	Eletrofisiologia .....	18
4.5	Aplicação das drogas .....	19
4.6	Uso do carbogênio .....	19
4.7	Análise dos dados .....	20
5.	Resultados .....	21
5.1	Ativação de receptores mGluR-I modula positivamente os neurônios do LC .....	21
5.2	Ativação de receptores mGluR-I promove despolarização do potencial de membrana dos neurônios do LC .....	24
5.3	DHPG promove, de forma concentração-dependente, uma corrente de entrada .....	28
5.4	Aplicação de antagonistas para mGlu <sub>1</sub> e mGlu <sub>5</sub> inibe o efeito promovido por DHPG .....	29
5.5	Efeito do agonista DHPG em animais machos e fêmeas .....	29
5.6	Efeito do agonista DHPG em temperatura próximas do fisiológico .....	30
6.	Discussão .....	32
7.	Perspectivas .....	37
8.	Conclusão .....	39
9.	Referências .....	40

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Comunicação celular na sinapse elétrica e química .....	3
<b>Figura 2.</b> Via clássica dos receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo 1 .....	11
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do núcleo Locus coeruleus .....	13
<b>Figura 4.</b> Locus Coeruleus .....	15
<b>Figura 5.</b> Aferências e eferências do Locus Coeruleus .....	15
<b>Figura 6.</b> DHPG aumenta a frequência dos disparos espontâneos do Locus Coeruleus .....	23
<b>Figura 7.</b> DHPG despolariza o potencial de membrana, aumentando a frequência dos potenciais.....	26
<b>Figura 8.</b> Relação entre potencial de membrana e frequência dos potenciais de ação.....	27
<b>Figura 9.</b> Experimentos realizados na modalidade <i>voltage clamp</i> .....	31

## Lista de abreviações e siglas

aCSF	Artificial cerebral spinal fluid
ACPD	1-Amino-1,3-dicarboxiclopentano
BDNF	Fator neurotrófico derivado do Cérebro
DAG	Diacilglicerol
DHPG	3,5-dihidroxifenilglicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
GDP $\beta$ S	Guanosine 5- $\beta$ diphosphate
GTP $\gamma$ S	Guanosine 5- $\gamma$ triphosphate
HCN	Canais ativados por hiperpolarização e nucleotídeos cíclicos
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisfosfato
KIR	Canal retificador de entrada de K <sup>+</sup>
LC	Locus Coeruleus
LY367385	(S)-(+)- $\alpha$ -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid
mGluR-I	Receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PLC	Fosfolipase C
PKA	Proteína quinase A
PPSE	Potencial pós-sináptico excitatório
PPSI	Potencial pós-sináptico inibitório
SK <sub>Ca</sub>	Canais de pequena condutância de K <sup>+</sup> ativados por Ca <sup>2+</sup>
TRPC	Receptor de potencial transiente canônico
NMDA	N-methyl-D-aspartate
AMPA	a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Src	Sarcoma kinase

## **1. Introdução**

Este trabalho descreve a modulação da excitabilidade dos neurônios do Locus Coeruleus mediado por receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I. Com o objetivo de contextualizar e visando uma melhor compreensão deste trabalho, esta introdução aborda conceitos básicos e específicos aprofundando em pontos chave relevantes para a interpretação dos dados apresentados.

### **1.1 Neurotransmissão**

A comunicação entre os neurônios é de vital importância para o funcionamento do Sistema Nervoso Central. A condução da informação permite a interpretação e a resposta do organismo à estímulos externos e internos, assim como a regulação de funções básicas necessárias para sua sobrevivência. No Sistema Nervoso Central, local de estudo deste trabalho, encontramos o maior agrupamento de células especializadas na condução da informação, os neurônios.

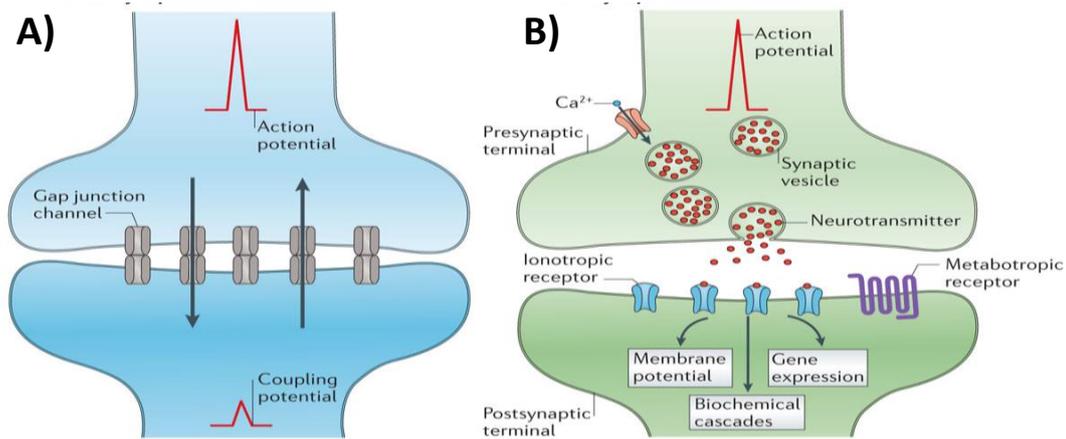
Estudos envolvendo a investigação da neurotransmissão existem desde o século 17, porém o uso do termo sinapse foi amplamente adotado após a introdução realizada por Charles Sherrington em 1897 (revisado por Bennett 1999). Existem duas modalidades nas quais as sinapses podem ser divididas: as sinapses elétricas e as sinapses químicas.

#### **1.1.1 Sinapse Elétrica vs. Química**

A sinapse elétrica consiste no contato célula-a-célula através de estruturas compostas por proteínas denominadas conexinas, agregadas em hexâmeros, formando hemicanais na membrana plasmática denominados conéxons. A junção de dois destes hemicanais dá origem a um canal intercelular que conecta o interior das células. As gap junctions, como são chamadas estas conexões, permitem o compartilhamento de citoplasma, metabólitos, íons e pequenas moléculas de com tamanho de até 1.5 nm através de seus poros (revisado por Kumar and Gilula 1996). O tamanho do poro, assim como características acerca de sua permeabilidade são determinados pela isoforma

da conexina que compõem cada estrutura (Saez et al. 2003). Estudos com imunohistoquímica identificaram a expressão de nove isoformas de conexinas no encéfalo de rato em desenvolvimento, destacando-se as Cx36 pela sua maior presença em neurônios (Condorelli et al. 2003).

Diferente das sinapses elétricas, a sinapse química é caracterizada pela condução da informação mediada por compostos denominados neurotransmissores. A primeira descrição deste tipo de sinapse foi realizada em experimentos com corações de sapos, onde o pesquisador Otto Loewi evidenciou a modulação da frequência cardíaca no coração estimulado através do nervo vago e em um segundo que compartilhava da mesma solução. (revisado por Zeisel 2012). Na sinapse química ocorre a conversão do sinal elétrico em uma resposta química, na célula denominada pré-sináptica, através da liberação de neurotransmissores no meio extracelular. Após sua liberação, os neurotransmissores difundem pela região da fenda sináptica, uma estreita zona extracelular com espessura de  $\sim 200 \text{ \AA}$  (Zuber et al. 2005) que separa a célula pré-sináptica da pós-sináptica. Na célula pós-sináptica, o sinal químico é convertido novamente para elétrico pela interação do neurotransmissor com receptores presentes na sua membrana plasmática. Dessa forma, define-se a célula que libera o neurotransmissor como a pré-sináptica e a que recebe o sinal como pós-sináptica.



**Figura 1. Comunicação celular na sinapse elétrica e química. A)** Esquema representativo de uma sinapse elétrica. O potencial de ação percorre de uma célula a outra através das estruturas *gap junctions*. **B)** Esquema representativo de uma sinapse química. A chegada do potencial de ação nos terminais pré-sinápticos promove a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ocasionando na excitose de vesículas contendo os neurotransmissores. Estes difundem na fenda sináptica e se ligam aos receptores dos tipos ionotrópica ou metabotrópica promovendo efeitos na célula pós-sináptica. Imagem adaptada de (Pereda, 2014)

### **1.1.2 Neurotransmissão Excitatória vs. Inibitória**

A condução da informação através das sinapses se baseia em um balanço entre estímulos excitatórios e estímulos inibitórios. Entre os possíveis efeitos da ligação de um neurotransmissor ao seu receptor está a geração de eventos elétricos. Alterações na seletividade da membrana para os íons que compõem os meios intra e extracelular, resultam nos eventos conhecidos como potenciais pós-sinápticos.

Estímulos excitatórios, também conhecidos como potenciais pós-sinápticos excitatórios (PPSE) são alterações na permeabilidade da membrana que provocam uma despolarização momentânea da célula. Caso ocorra com intensidade suficiente, um PPSE pode ultrapassar o limiar de excitação e ativar canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes em uma resposta tudo-ou-nada resultando no disparo de um potencial de ação. Geralmente, os EPSPs são causados pela abertura de canais para cátions não-seletivos tais como K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (Mourão et al, 2011).

Existem também potenciais pós-sinápticos inibitórios (PPSI) que são alterações na condutância da membrana que causam uma hiperpolarização do potencial de membrana ou seguram o potencial de membrana em valores próximos do potencial de repouso, diminuindo a possibilidade de atingir o limiar de excitação e evocar um potencial de ação. Os receptores inibitórios melhor caracterizados são canais para o íon Cl<sup>-</sup> (Mourão et al, 2011).

### **1.1.3 Glutamato**

O glutamato, ou ácido glutâmico, é uma molécula constantemente produzida no organismo que possui diversos papéis biológicos que vão muito além do seu papel como aminoácido na constituição das proteínas. O ácido glutâmico é um aminoácido poliprótico, ou seja, com mais de uma região onde ocorre a dissociação do próton, enquanto isso o glutamato é a molécula de ácido glutâmico com dois grupos carboxila desprotonados. Considerando o pH fisiológico (pH=7.4), ambas as regiões carboxilas da molécula estão desprotonizadas, sendo portanto o glutamato a isoforma encontrada em maior concentração no organismo (Greenstein 2007). A biossíntese do glutamato é

importante para a manutenção da homeostase de nitrogênio e carbono, também é componente essencial na formação de glutamina e no sistema nervoso central serve como precursor da síntese de ácido gama-aminobutírico, ou GABA e age como neurotransmissor (Erecińska and Silver 1990; Cooper and Jeitner 2016). Comparado com outros aminoácidos como glicina, alanina e aspartato, o glutamato está presente em altas concentrações no sistema nervoso central, com a média de 10 a 15 mmol/kg (Perry et al. 1971). A alta e ubíqua presença da molécula junto da lista de funções no metabolismo e síntese protéica dificultou a identificação do glutamato como um neurotransmissor (Krebs et al. 1935). Contudo, estudos demonstraram que as células possuem um sistema eficiente de captação de glutamato (revisado por Fonnum 1984), mantendo a concentração extracelular extremamente baixa e mais tarde estudos eletrofisiológicos investigando sua ação demonstraram o seu efeito excitatório (Curtis and Watkins 1961). Contudo, a consolidação do aminoácido como neurotransmissor tem registro apenas 20 anos depois (revisado por Fonnum 1984).

Sabe-se hoje que a sinalização glutamatérgica tem grande importância para diversos aspectos do funcionamento do Sistema Nervoso Central. Um exemplo do impacto do glutamato como neurotransmissor é a sua modulação do desenvolvimento. Em 1993, foi relatado que durante o desenvolvimento cerebral, através de receptores ionotrópicos NMDA o glutamato promovia o deslocamento do soma de neurônios imaturos para seu destino final (Komuro and Rakic 1993). Na mesma época, o neurotransmissor também foi descrito como modulador do processo de poda neuronal no cerebelo (Rabacchi et al. 1992).

## **1.2 Receptores para glutamato**

Como neurotransmissor, o glutamato possui uma gama de receptores que inicialmente pode ser segregada de acordo com seu mecanismo de ação. Encontram-se no sistema nervoso duas grandes famílias de receptores para glutamato, os receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos.

Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) são proteínas compostas por quatro subunidades que integram no seu centro um canal iônico. A

nomenclatura de cada subfamília do receptor adotou primeiramente o nome do agonista que seletivamente age no determinado receptor (AMPA, NMDA, etc). Com o passar dos anos observou-se a necessidade de estabelecer uma nomenclatura consistente com sua sequência genética visando diminuir conjuntos de nomenclaturas utilizados para o mesmo receptor (Collingridge et al. 2009). Os subtipos de receptores iGluR incluem receptores  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), receptores N-methyl-D-aspartate (NMDA), receptores Kainato e os delta iGluR (Tabela 1) (Traynelis et al. 2010; Krieger et al. 2015). A ligação de glutamato ou outro agonista com esses receptores abre um canal permeável a cátions, incluindo o íon  $Ca^{2+}$  em alguns casos. Devida à permeabilidade a  $Ca^{2+}$ , a ação prolongada destes receptores pode desencadear excitotoxicidade, podendo inclusive resultar em morte celular.

A outra grande família de receptores para glutamato são os receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR). Esses receptores foram descobertos uma vez que o glutamato causava certos efeitos que não podiam ser explicados com base nas propriedades dos receptores iGluR então conhecidos. (Sladeczek et al. 1985; Nakanishi 1992). O receptor mGlu<sub>1</sub> foi o primeiro a ser isolado e caracterizado (Houamed et al. 1991; Masu et al. 1991). As investigações que seguiram identificaram oito isoformas de receptores para glutamato acoplados à proteína G que medeiam cascatas de sinalizações mais lentas e duradouras comparado aos receptores ionotrópicos. Baseado em diferenças tanto farmacológicas quanto na sequência de aminoácidos e nas vias de sinalização ativadas, estes receptores podem ser classificados em três grupos diferentes denominados Grupo I (mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub>), Grupo II (mGlu<sub>2</sub> e mGluR3) e Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Tabela 1) (Nakanishi 1992; Anwyl 1999). Estudos de imunohistoquímica demonstraram que esses receptores são amplamente expressos em diversas áreas do sistema nervoso central (Conn and Pin 1997).

**Tabela 1. Tipos de receptores para glutamato e suas características.**

<b>Receptores ionotrópicos</b>			
<b>Subtipo</b>	<b>Agonista Seletivo</b>	<b>Isoformas do receptor</b>	
NMDA	N-methyl-D-aspartate	GluN1; GluN2(A-D); GluN3(A-B)	
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	GluA1; GluA2; GluA3; GluA4	
Kainato	Kainato	GluK1; GluK2; GluK3; GluK4; GluK5	
Delta ( $\delta$ )	-	GluD1;GluD2	
<b>Receptores metabotrópicos</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Isoformas do receptor</b>	<b>Proteína G<math>\alpha</math></b>	<b>Via de sinalização</b>
Grupo I	mGlu <sub>1</sub> ; mGlu <sub>5</sub>	G $\alpha_{q/11}$	Hidrólise de fosfoinosítídeos
Grupo II	mGlu <sub>2</sub> ; mGlu <sub>3</sub>	G $\alpha_{i/o}$	Redução de AMP cíclico
Grupo III	mGlu <sub>4</sub> ; mGlu <sub>6</sub> ; mGlu <sub>7</sub> ; mGlu <sub>8</sub>	G $\alpha_{i/o}$	Redução de AMP cíclico
Fonte: (Collingridge et al. 2009; Krieger et al. 2015; Nakanishi 1992)			

### 1.2.1 Receptores mGluR do Grupo I

Os receptores metabotrópicos do Grupo I (mGluR-I) correspondem às isoformas mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub> (Nakanishi et al. 1998). Estes receptores possuem uma similaridade de 60% quando comparadas as suas sequências de aminoácidos (Abe et al. 1992). Estruturalmente, estes receptores possuem sete domínios transmembrana que ancoram o receptor a membrana plasmática além de conter sítios de ligação para moduladores alostéricos e o acoplamento à proteína G (Aramori and Nakanishi 1992; Pin and Duvoisin 1995; Doré et al. 2014). Os mGluR-I são classificados como receptores acoplados a proteína G de Classe C. Este tipo de receptor possui como característica um domínio de interação com agonista localizado na porção N-terminal denominado *vênus fly-trap* (Beqollari

and Kammermeier 2010; Urwyler 2011) Nesta estrutura ocorre a interação do receptor aos ligantes ortostéricos. Outra característica é a formação de dímeros. A estrutura do receptor revelada por cristalografia de raio-X indica a existência de pontes de cisteína que conectam os pares receptores, adquirindo forma de concha (Romano et al. 1996; Jingami et al. 2003).

Como dito anteriormente, os mGluR-I possuem no domínio extracelular o sítio de ligação para agonistas ortostéricos. Estão incluídos como agonistas para este sítio, além do aminoácido glutamato, os agonistas quisqualato, S-DHPG e ACPD. Quisqualato é o agonista mais potente dos receptores mGluR-I, com valores de  $EC_{50}$  próximos de  $0.2 \mu M$  (Masu et al. 1991; Conn and Pin 1997), porém este agonista também promove potente ativação de receptores ionotrópicos AMPA, impactando negativamente no uso de quisqualato como agonista seletivo para receptores mGluR (Horne and Simmonds 1989). ACPD possui seletividade maior para os receptores mGluR-I do que para receptores ionotrópicos, porém ele não discerne na ativação de receptores mGluR dos diferentes Grupos (Schoepp and Conn 1993), invalidando seu uso para ativar seletivamente os receptores do Grupo I.

O agonista mGluR-I utilizado em nossos experimentos é o (S)-3,5-dihidroxifenilglicina (S-DHPG). É um composto com ação seletiva para receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I possuindo valores de  $EC_{50}$  próximos de  $10 \mu M$  para os receptores mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub> e valores acima de  $100 \mu M$  para os receptores dos Grupos II e III (Wiśniewski and Car 2002). Por se tratar de um agonista ortostérico, o DHPG se liga a um sítio contido na estrutura anteriormente mencionada, o “*vênus fly-trap*”, ativando o receptor. (Takahashi et al. 1993).

Os receptores mGluR-I acoplam preferencialmente à proteína  $G_{\alpha/11}$  desencadeando a ativação da isoforma beta de fosfolipase C (PLC- $\beta$ ) e a produção de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) (Berridge and Irvine 1984; Sladeczek et al. 1985). A ativação desta via de sinalização desencadeia efeitos no citosol e na membrana plasmática. Uma vez ativada pela proteína  $G_{\alpha/11}$ , a PLC- $\beta$  promove a hidrólise do fosfoinosítídeo PI(4,5)P<sub>2</sub> presente na membrana plasmática formando como produtos diacilglicerol (DAG) e IP<sub>3</sub>. Enquanto este último se liga aos seus receptores próprios localizados no retículo endoplasmático

promovendo a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, o DAG permanece na membrana onde promove a ativação da Proteína Kinase C resultando em diversos outros efeitos (Pin and Duvoisin 1995).

### **1.2.1.1 Correntes promovidas pela ativação dos receptores mGluR-I**

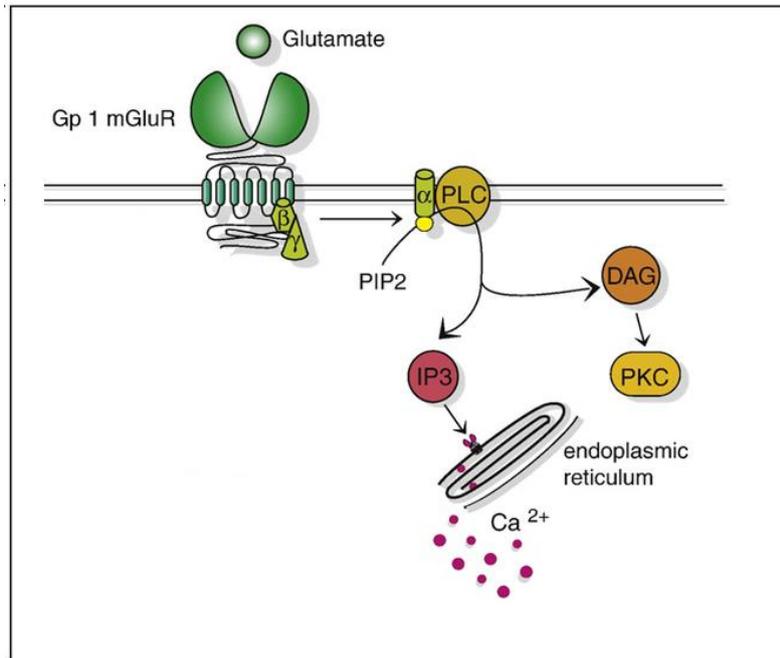
Investigações acerca dos efeitos promovidos pela ativação de receptores mGluR-I foram realizadas em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central e evidenciam a modulação direta ou indiretamente de uma série de tipos de canais, alterando conseqüentemente a excitabilidade das células que os expressam. Essa modulação pode ser desencadeada pela ativação da via clássica de  $\text{G}\alpha_q/\text{PLC}/\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  (Figura 2) ou então por outras vias dependentes e independentes de proteína G (Gerber et al. 2007).

Através da via de sinalização clássica, são relatadas modulações no trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  em neurônios da amígdala basolateral e do bulbo olfatório (Rainnie et al. 1994; Jian et al. 2010) gerando uma corrente de entrada e uma despolarização no potencial de membrana. Esta modulação ocorre de forma indireta, uma vez que o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol promovido pela via clássica estimula a atividade dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Outro canal que sofre modulação por receptores mGluR-I são os canais para  $\text{K}^+$  ativado por  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa condutância (Canais  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) em células da área tegmental ventral (VTA), substância nigra e células de Purkinje do cerebelo (Bond et al, 2004, Fiorillo and Williams, 1998, Netzeband and Gruol, 2008). A ativação destes canais envolve a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, através do  $\text{IP}_3$  produzido por PLC, gerando um PPSI lento (Fiorillo and Williams 1998; Netzeband and Gruol 2008). Modulações dependentes de PKC, incluso na via de sinalização clássica, foram reportadas em células da retina e neurônios piramidais do córtex cingular através da inibição de canais hiperpolarizantes ativados por nucleotídeos cíclicos (HCN), resultando no aumento da excitabilidade devido à redução da corrente de cátions chamada  $I_h$  ativada por estes canais (Gao et al. 2016; Li et al. 2016). Também existem evidências desta modulação em células de Purkinje do cerebelo. Contudo, neste caso, o efeito promovido pela ativação dos receptores mGluR-I era conseqüente de uma via de sinalização dependente da PKA (Shim

et al. 2016). Alterações consequentes da ativação da via de sinalização pelos mGluR-I também resultam na modulação de canais. A atividade da PLC- $\beta$  resulta na depleção de fosfoinosítideo PI(4,5)P<sub>2</sub> da membrana plasmática (Hille et al. 2014) Recentemente, um estudo demonstrou que a redução deste componente modula negativamente a ação de canais para K<sup>+</sup> do tipo retificador de entrada (canais KIR) (Kammermeier 2012).

Estudos também demonstram a modulação de canais por mGluR-I através de mecanismos independentes da proteína G ou da via de sinalização clássica. Ativação de canais TRPC foi identificada em neurônios do hipocampo através de análises da curva I-V e uso de antagonistas específicos e seu efeito não foi inibido na presença de GDP $\beta$ S or GTP $\gamma$ S, inibidores da atividade da proteína G (Guérineau et al. 1995). Em vez disso, estes canais demonstraram dependência de proteínas da família Src quinases (Heuss and Gerber 2000). Efeitos similares são reportados em células de purkinje do cerebelo e em neurônios colinérgicos estriatais (Berg et al. 2007; Kubota et al. 2014).

Em resumo, a ativação dos receptores mGluR-I modula, através de diferentes vias de sinalização e segundo mensageiros uma variedade de canais iônicos resultando em alterações na excitabilidade celular. A expressão dos receptores mGluR-I é amplamente identificada no SNC, porém a identificação dos mecanismos biofísicos pelo os quais elas afetam a atividade neuronal está restrito a apenas algumas regiões.



**Figura 2** – Esquema representativo da via clássica dos receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo 1. A interação do glutamato com o receptor ativa a proteína  $G\alpha_{q/11}$  estimulando a quebra de  $PI(4,5)P_2$  na membrana plasmática pela PLC- $\beta$ , formando como produto diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) (Adaptado de Dölen et al. 2010).

### 1.3 Locus Coeruleus

O Locus Coeruleus é um denso agrupamento de neurônios do tronco encefálico conservado em mamíferos (Berridge and Waterhouse 2003). A primeira descrição do núcleo está datada no século 18, porém a atual nomenclatura foi dada pelos irmãos Wendel em 1812 (Maeda 2000). O LC está localizado na porção da ponte do tronco encefálico e situado bilateralmente à parede do quarto ventrículo (Foote et al. 1983). Cada núcleo contém cerca de 1500 neurônios (Swanson 1976; Berridge and Waterhouse 2003). O caráter noradrenérgico destas células foi definido em 1965 por Kjell Fuxe (Fuxe 1965). Ensaio imunohistoquímico para catecolaminas apresentaram na região do locus Coeruleus forte marcação para dopamina- $\beta$ -hidroxilase, a enzima responsável pela conversão de dopamina em noradrenalina (Maeda 2000). Além de neurônios noradrenérgicos, o Locus Coeruleus possui pequenas populações

de neurônios que coexpressam outros neuromoduladores, tais como galanina e o Neuropeptídeo Y (Holets et al. 1988).

Morfologicamente, neurônios do LC podem ser classificados como ovalar, fusiforme ou multipolar (Loughlin et al. 1986). Pesquisadores investigaram a hipótese de que a heterogeneidade das formas poderia estar relacionada à sua localização no núcleo. De fato, os estudos comprovaram que neurônios ovulares estão concentrados na região dorsal enquanto que neurônios localizados na porção ventral apresentam uma maior diversidade morfológica (Swanson 1976). Outra característica morfológica destas células são as suas extensas prolongações dendríticas que se estendem além do perímetro do núcleo (Swanson 1976; Travagli et al. 1996).

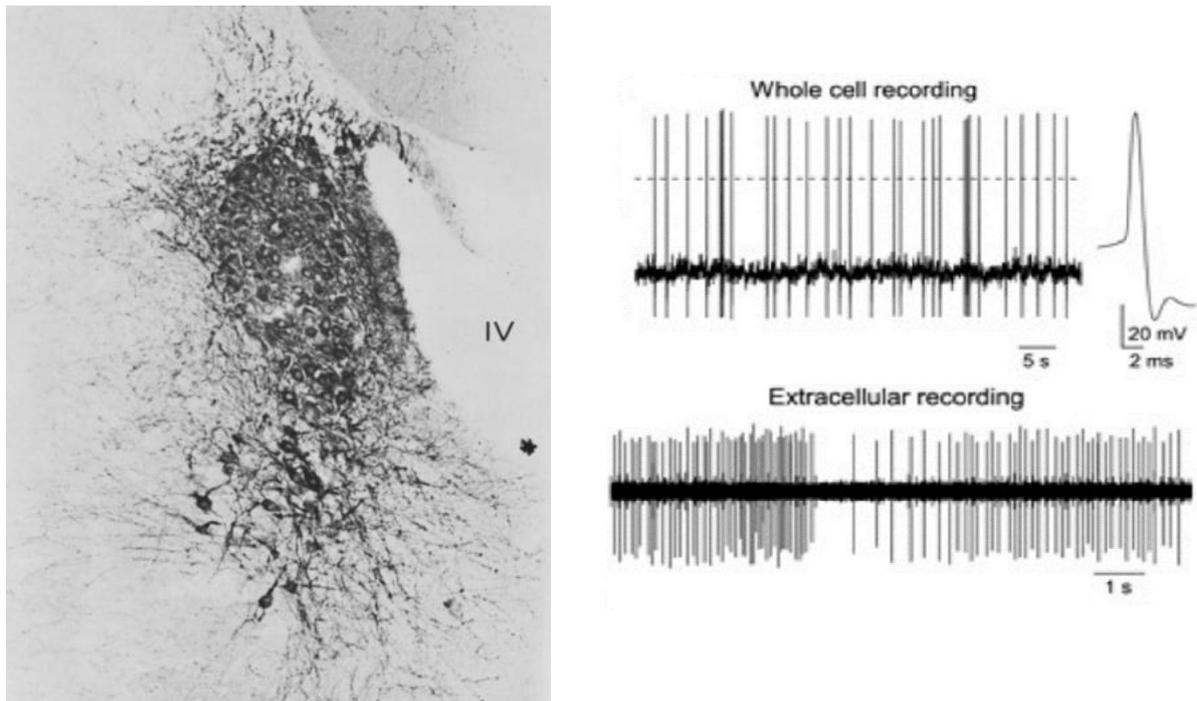
Projeções do Locus Coeruleus são identificadas em grande parte do encéfalo (Figura 5) (Jones 1991). No tálamo encontramos projeções que parecem estar relacionadas com a modulação de processos envolvidos com a cognição (Köhler et al. 2016). Projeções para amígdala mostram uma participação do Locus Coeruleus na formação de memórias aversivas (Sears et al. 2013). Também relacionado a memória, no hipocampo, inervações noradrenérgicas participam do processo de consolidação e os níveis de noradrenalina promovem aumento da expressão do fator de crescimento BDNF (Mello-Carpes et al. 2016). Na medula espinhal inervações de neurônios do LC estão relacionadas com a analgesia (Llorca-Torralba et al. 2016). Estudo recente identificou que a noradrenalina aumenta a frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias (IPSC) nos cornos dorsais das lâminas III e IV através da ativação de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (Seibt and Schlichter 2015). Apesar do número reduzido de neurônios contido no LC, é notável que este núcleo é a única fonte de noradrenalina para vastas regiões do encéfalo, tais como o córtex e o hipocampo (Foote et al. 1983).

O Locus Coeruleus está localizado ao lado dos núcleos Barrington (BN) e o núcleo mesencefálico trigeminal (NMT) (Figura 3). Acerca de suas aferências, o LC recebe projeções de diversas regiões do encéfalo. Destacam-se as projeções com origem nos núcleos paragigantocelular (PGC) e prepositus hipoglossus pela liberação dos neurotransmissores glutamato e GABA, respectivamente (Aston-Jones et al. 1986).

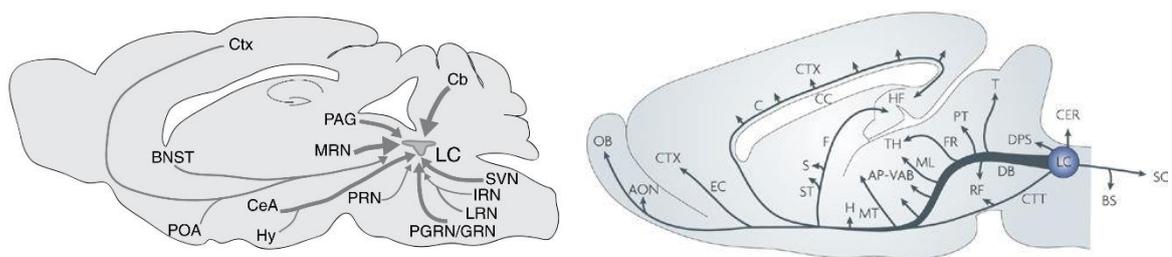


Sobre suas características eletrofisiológicas, os neurônios do Locus Coeruleus são células que dispararam potenciais de ação de forma espontânea e rítmica (Figura 4)(Foote et al. 1983; de Oliveira et al. 2010). Essa atividade foi descoberta pelos pesquisadores Dresse e Dubois, em 1976, sendo contabilizada uma frequência que varia entre 0.5 a 20 Hz (Dubois et al. 1976; Berridge and Waterhouse 2003). Dois tipos de atividade foram reportados no LC, uma atividade tônica de frequência mais baixa e uma atividade fásica caracterizada por uma sequência de disparos em alta frequência seguido de um período sem ocorrência de potenciais de ação. Investigações envolvendo administração de anestésias demonstram que os disparos espontâneos do LC não são inibidos pela presença destes compostos, porém podem sofrer modulação. Estudos com morfina apontam que a ativação dos receptores opióides leva a uma depressão da atividade dos neurônios LC (Bird and Kuhar 1977; Aghajanian 1978). O efeito é observado utilizando baixas doses da substância, e pode ser revertido com a aplicação de antagonistas opióides, como Naloxona. Em contraste, a utilização de doses maiores de opióides provocou um aumento na taxa de disparos, quando realizados experimentos em animais não-anestesiados (Trulson and Arasteh 1986). Devido à grande variedade nas aferências do LC, a atividade do núcleo também pode ser modulada por uma gama de neuromoduladores e inclusive hormônios (Murai and Akaike 2005; Ishibashi et al. 2009; de Carvalho et al. 2014; Szawka et al. 2005) e pela aplicação sistêmica ou direta de etanol causando, respectivamente, uma diminuição e uma supressão da taxa de disparo (Strahlendorf H.K e Strahlendorf J.C., 1983).

O LC é um núcleo que apresenta um dimorfismo sexual (Pinos et al. 2001; Bangasser et al. 2016). A neurogênese do núcleo em fêmeas continua durante a puberdade, ao contrário dos machos. O resultado é um núcleo maior nas fêmeas devido ao aumento na quantidade de neurônios NE (Pinos et al. 2001). Dendritos também são mais densos em fêmeas e também mais complexos, resultando em maior número de aferências (Luque et al. 1992). Essas diferenças entre os gêneros acarretam em divergências nas respostas LC. Estudos relatam uma maior sensibilidade do LC de fêmeas para estímulos estressantes como fator liberador de corticotropina (CRF) (Curtis et al. 2006).



**Figura 4. Locus Coeruleus.** **A esquerda** –Imunohistoquímica evidenciando os neurônios do locus Coeruleus através da marcação por dopamina β-hidroxilase (Grzanna and Molliver 1980). **A direita** – Imagem representativa da atividade espontânea dos neurônios LC em registros eletrofisiológicos de Whole-cell current clamp e extracelular. (Adaptado de Sugiyama et al. 2012).



**Figura 5. Aferências e eferências do Locus Coeruleus.** **A esquerda** – Desenho esquemático das projeções com destino para o núcleo LC. (Schwarz and Luo 2015). **A direita** – Imagem correspondente as projeções noradrenérgicas do núcleo LC (Adaptado de Sara 2009)

## **2. Justificativa**

O locus Coeruleus (LC) é o principal núcleo noradrenérgico do sistema nervoso central (SNC). A modulação da atividade deste núcleo tem impacto em diversas funções fisiológicas. Em estudos anteriores, a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato dos Grupos II e III inibiu a transmissão sináptica excitatória através de cascatas de sinalização promovidas pela proteína  $G_{i/o}$ . Contudo, acerca dos receptores mGluR do Grupo I não existe, atualmente, informações na literatura sobre a sua ativação em neurônios do Locus Coeruleus. O nosso estudo resultou em dados inéditos sobre a modulação da excitabilidade desse núcleo por receptores mGluR-I, contribuindo, dessa forma para a compreensão dos circuitos neuronais que envolvem o núcleo.

## **3. Objetivos**

Identificar o impacto da ativação de receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I em neurônios do Locus Coeruleus.

### **3.1 Objetivos específicos**

- Verificar o efeito do agonista seletivo para mGluR-I, S-(3,5)-DHPG, na frequência dos potenciais de ação e no potencial de repouso.
- Verificar o efeito da ativação de receptores mGluR-I na corrente de membrana e na condutância da membrana.
- Identificar o perfil farmacológico do receptor responsável, assim como valores de  $EC_{50}$  para os efeitos observados.
- Verificar a existência de dimorfismo sexual no efeito observado.

## **4. Metodologia**

### **4.1 Animais**

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

### **4.2 Fármacos, reagentes e soluções**

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

### **4.3 Preparo das fatias**

Os animais foram sacrificados sem anestesia por decapitação e o crânio foi aberto com auxílio de uma tesoura. A porção do encéfalo contendo o tronco encefálico foi removida com o devido cuidado para evitar qualquer dano da região de interesse. As meninges foram removidas com pinças finas e o tecido foi fixado na plataforma do vibrátomo (Leica VT1000) com cola a base de éster de cianoacrilato. O tecido permaneceu banhado em solução aCSF-corte (Tabela 2) em temperaturas próximas de 0 °C durante toda a cirurgia e após fixação na plataforma do vibrátomo. Realizar o procedimento em baixa temperatura diminui a atividade celular reduzindo os impactos negativos promovidos pela cirurgia assim como o processo de fatiamento pelo vibrátomo. Foram retiradas fatias com 200 µm de espessura que em seguida foram incubadas em câmaras preenchidas com solução aCSF-registro (Tabela 2) em banho-maria a 37°C por 45-60 minutos para recuperação.

**Tabela 2. Compostos e concentrações da Solução aCSF**

aCSF (Líquido cérebro-espinhal artificial)		
Substância	Concentração (mM)	
	Corte	Registro
NaCl	125	125
KCl	2,5	2,5
NaHCO <sub>3</sub>	25	25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	1,25
CaCl <sub>2</sub>	0,1	2
MgCl <sub>2</sub>	3	1
glicose	25	25
myo-inositol	3	3
ascorbate	0,4	0,4
piruvato	2	2
pH = 7.4 quando equilibrado com 5% CO <sub>2</sub>		

#### 4.4 Eletrofisiologia

Os registros foram feitos na modalidade de Whole-cell current clamp ou voltage clamp. Pipetas para registro foram fabricadas em vidro borossilicato (PG52151-4, World Precision Instruments) com resistências de 2-3 MOhm quando preenchidos com a solução de pipeta (Tabela 3). O potencial de junção líquida, calculado em -9 mV, foi corrigido antes de formar o gigaselo. Durante o registro, resistência em serie variou de 3 - 14 MOhm e não foi compensada. Capacitância celular variou entre 45 e 60 pF. Medidas do potencial de membrana foram feitos com a corrente da pipeta fixado em 0 pA. Para voltage clamp, o potencial de membrana foi mantido em -60 mV. Em alguns experimentos, pulsos hiperpolarizantes foram aplicadas (-20 mV, duração de 60 ms aplicada a cada 5 s) para medir a condutância de membrana durante o percorrer do registro.

**Tabela 3. Solução de Pipeta**

Solução interna da Pipeta	
Substância	Concentração (mM)
K- gluconate	125
KCl	20
Na <sub>2</sub> -Fosfocreatina	10
EGTA	0,5
HEPES	10
Mg ATP	4
Na <sub>2</sub> ATP	0,3
pH ajustado em 7,2 com KOH	

#### 4.5 Aplicação das drogas

Após obter a configuração de Whole-cell no modo *current clamp*, o potencial de membrana foi observado por um período de, no mínimo, 3 minutos e o registro iniciado somente quando apresentasse uma linha de base estável e potenciais de ação espontâneos. As células foram perfundidas com aCSF durante todo o experimento. A aplicação do agonista DHPG era realizada pela adição de solução estoque de DHPG em 10 ml de ACSF, permitindo a difusão da droga na nova solução. Todas as soluções de estoque utilizadas tinham concentração de 1000 vezes a concentração final. A solução estoque de DHPG continha DMSO, portanto todos os registros apresentavam uma aplicação prévia de DMSO para fins de controle. Não foram registradas alterações pela aplicação de DMSO. Nos experimentos nos quais utilizamos antagonistas, estes foram aplicados durante, no mínimo, cinco minutos, antes de aplicar a DHPG. Cada fatia foi utilizada para apenas uma aplicação de DHPG.

#### 4.6 Uso do carbogênio

O borbulhamento das soluções aCSF com carbogênio (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) foi protocolado devido as características quimiossensíveis do núcleo (Li and Putnam 2013). Antes de utilizar nos experimentos, as soluções eram

previamente saturadas com este gás pelo período de no mínimo cinco minutos. A linha de perfusão utilizada era preenchida gradualmente por novas soluções quando necessário, visando não alterar abruptamente o pH da solução. Após determinar que a célula está apta para a aplicação das drogas a linha de perfusão não era reperfusão. Sendo a adição de DHPG e dos antagonistas sempre feitas em uma solução já saturada e em uso na linha de perfusão.

#### **4.7 Análise dos dados**

Os experimentos foram delineados de forma que cada célula pudesse ser observada em todas as condições (Controle, Teste, Lavagem). Ou seja, cada célula era comparada com seu próprio registro basal para avaliação dos efeitos do agonista DHPG.

A frequência dos potenciais foi avaliada em trechos de um minuto. Os potenciais de ação foram identificados automaticamente pelo programa Clampex através do critério de limiar. Alterações no potencial de membrana que alcançavam o valor de 0 mV eram identificadas como um evento. Uma vez identificados os potenciais de ação, o programa fornecia uma lista do tempo inicial de cada evento. Utilizando a diferença destes valores, o intervalo entre os eventos foi contabilizado e conseqüentemente sua frequência, o inverso do intervalo, identificada.

Para determinar se a ativação de receptores mGluR-I despolariza os neurônios do LC, foram utilizados trechos de 60 s para fazer histogramas dos valores do potencial de membrana utilizando todos os pontos (intervalos de histograma de 0,3-0,6 mV). O pico do histograma, que indica o valor do  $V_m$  no qual o potencial de membrana passa mais tempo, foi definido como sendo o potencial de repouso. A mesma estratégia foi utilizada para determinar a corrente de membrana quando medido na presença de correntes marca passo. Nesse caso foram utilizados intervalos de 1 pA para fazer o histograma. O valor da corrente gerado pela ativação de receptores mGluR-I foi calculado como a diferença entre o valor medido na presença de DHPG e na condição controle.

## 5. Resultados

### 5.1 Ativação de receptores mGluR-I modula positivamente os neurônios do LC

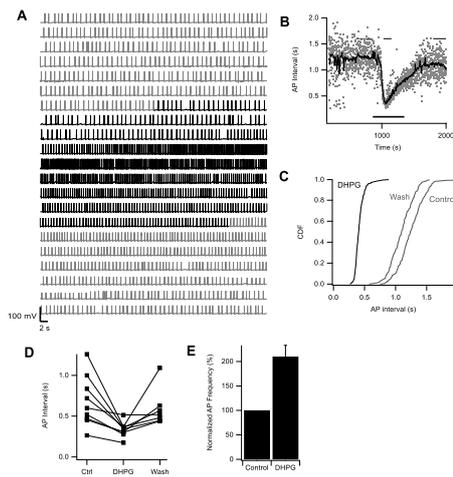
A primeira hipótese investigada neste trabalho foi de que a aplicação do agonista DHPG teria impacto positivo na atividade dos neurônios do LC. Para testar esta hipótese, observamos o potencial de membrana dos neurônios usando a técnica de *Whole-cell current clamp*. Os neurônios registrados apresentaram após o período de estabilização disparos de potencial de ação com frequência de  $1.8 \pm 0.3$  Hz (n=9).

Na **Figura 6A** apresentamos um registro contínuo do potencial de membrana de um neurônio do LC que evidenciando a atividade rítmica e espontânea descrita na Introdução. Cada linha horizontal da imagem tem duração de 60 s. As partes iniciais e finais do registro, apresentadas com coloração cinza, indicam a parte do experimento na qual a fatia foi perfundida apenas com solução aCSF controle e DMSO. A parte do registro na qual a cor da linha está preta representa a porção do experimento onde o agonista DHPG (10  $\mu$ M) foi incluído no banho. Observa-se que, após uma latência de aproximadamente 120 s, DHPG promoveu um aumento na frequência de disparos dos potenciais de ação que chegou a ser ~3 vezes o valor da frequência registrado na condição de controle (a primeira fase do registro). Esse aumento foi transiente, pois mesmo na presença contínua de DHPG, a frequência dos potenciais de ação retorna para valores próximos do valor de controle. A lavagem de DHPG do banho resultou no retorno completo da frequência para o valor observado antes de sua aplicação.

Na **Figura 6B** podemos observar de modo mais claro as alterações na frequência dos disparos espontâneos em função do tempo do registro. Utilizamos o valor do intervalo entre os disparos dos potenciais de ação para identificar a frequência da atividade. Os intervalos entre os potenciais foram calculados pela subtração do tempo de início do potencial de ação pelo seu subsequente (ver Métodos). Durante a condição de controle, observa-se que os intervalos possuem valores diversificados, podendo variar entre 0.8 e 1.7 segundos. A aplicação de DHPG promove uma diminuição nos valores dos intervalos, acompanhado por uma redução da dispersão dos valores. Ainda na

presença do agonista é possível observar um lento retorno dos intervalos para valores maiores. Em **Figura 6C** apresentamos a distribuição cumulativa dos intervalos entre os potenciais de ação nas três condições (controle, DHGP, lavagem). Nota-se pela maior inclinação da curva que corresponde à condição DHPG que houve de fato uma uniformidade nos intervalos entre os potenciais. Observando os valores de intervalo correspondentes a 50% para cada uma das condições, fica evidente que houve uma redução no intervalo entre os potenciais com a aplicação de DHPG.

O efeito de DHPG descrito acima foi observado em 9 células testadas em 9 fatias de 7 animais. Na **Figura 6D** foram plotados os valores do intervalo entre os potenciais de cada condição para cada uma das células. A diminuição nos intervalos foi evidenciada em todas as células testadas e o teste estatístico *t* de Student determinou valor de  $p=0.02$ , sendo, portanto, considerado significativo. Em seguida, calculamos o quanto, em média, o DHPG aumenta a frequência nos 9 experimentos realizados. Após normalizar os dados de cada célula pela sua frequência em condições controles, identificamos que a aplicação de DHPG alterou a frequência dos disparos espontâneos do LC em  $210\pm 23\%$  (Figura 6E).



**Figura 6. DHPG aumenta a frequência dos disparos espontâneos do Locus Coeruleus.** **A)** Registro completo em *Whole-cell Current Clamp* de um neurônio do LC. (Em cinza) Região do experimento no qual a célula foi perfundida com aCSF controle. (Em preto) Aplicação de DHPG (10  $\mu$ M) **B).** Os intervalos entre cada potencial de ação do experimento ilustrado em A foram calculados e plotados em função do tempo no qual ocorreu (símbolos). A linha preta é a média móvel dos intervalos com janela de 20 amostras. A barra preta indica o período no qual a DHPG (10  $\mu$ M) foi aplicado. As linhas cinzas na parte superior indicam as partes do registro utilizadas para calcular a distribuição cumulativa. **C)** Função de distribuição cumulativa dos intervalos entre os potenciais de ação em cada condição experimental do experimento ilustrado em A. **D)** Resumo dos resultados obtidos em 9 experimentos semelhantes ao ilustrado em A. **E)** Efeito da ativação de receptores mGluR-I expresso como aumento da frequência normalizado ao seu valor de controle (N=9).

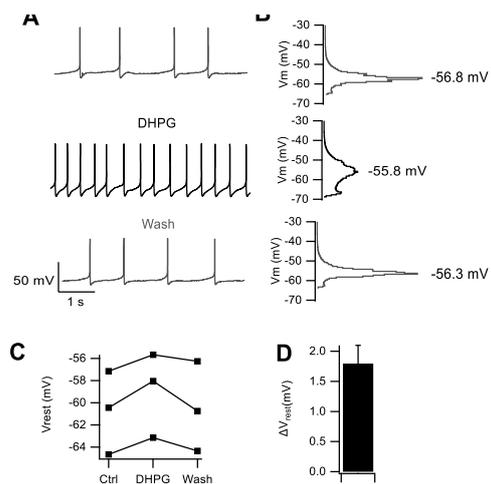
## 5.2 Ativação de receptores mGluR-I promove despolarização do potencial de membrana dos neurônios do LC

Entre as possíveis hipóteses sobre o mecanismo pelo qual o agonista DHPG pode promover um aumento na taxa de disparos dos neurônios do LC está a despolarização do potencial de membrana destes neurônios. Para disparar um potencial de ação a célula necessita despolarizar até o limiar de excitação, a partir deste ponto canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes são ativados e o potencial de ação ocorre. Em neurônios como o Locus Coeruleus que possui uma atividade tônica o alcance do limiar de excitação é feito através de um conjunto de correntes que favorecem despolarizações graduais, as chamadas correntes marca-passo. Nesta hipótese, uma despolarização do potencial de membrana poderia favorecer os disparos dos potenciais uma vez que seria necessária menor quantidade de corrente para atingir o limiar de excitação. Para testar isso, utilizamos histogramas dos valores do potencial de membrana para determinar qual o potencial de repouso da célula e verificar a existência de uma despolarização pela aplicação de DHPG.

Na **Figura 7A** apresentamos o registro dos potenciais de ação em melhor resolução, mostrando a atividade durante as condições controle, na presença de DHPG e após a lavagem. Devido à constante e rítmica atividade destes neurônios, a identificação de um potencial de repouso é problemática. Para realizarmos esta identificação, utilizamos histogramas de trechos de 60 s e definimos valor do  $V_m$  que corresponde ao pico do histograma como sendo o valor correspondente às breves pausas do potencial de membrana entre cada potencial de ação. Para fins metodológicos, este valor será denominado como potencial de repouso. Como demonstrado na **Figura 7B**, podemos observar uma pequena despolarização do potencial de repouso quando comparadas as condições de controle e na presença de DHPG com o retorno para valores controle após a lavagem. Esse efeito repetiu-se em três experimentos independentes, e os valores do potencial de repouso nas três condições (controle, DHPG, lavagem) para os três experimentos estão representados na **Figura 7C**. A aplicação do agonista DHPG promoveu uma despolarização em média de  $1.8 \pm 0.03$  mV ( $n=3$ ,  $p=0.03$ ), como podemos observar na **Figura 7D**.

Como foi identificada uma leve despolarização por DHPG, buscamos identificar a relação entre o valor do potencial de membrana e a frequência de disparos correspondente, o que possibilitará verificar se a hipótese de que o aumento da frequência de disparos promovido pela aplicação de DHPG era resultante simplesmente da despolarização dos neurônios. Testamos esta hipótese realizando registros com protocolo de rampa de corrente (**Figura 8**). Dentro de um intervalo de 10 segundos as células receberam uma injeção de corrente que variou de forma linear de -30 a +30 pA, gerando potenciais de membrana inicialmente hiperpolarizados, passando para potenciais ligeiramente despolarizados. O resultado é uma alteração gradativa na frequência de disparo dos potenciais de ação como consequência da alteração no potencial de membrana (**Figura 8A**). Analisamos a relação entre o potencial de repouso e a frequência dos potenciais de ação em cada trecho da rampa. Nota-se, a partir da **Figura 8B**, que existe uma região da curva na qual pequenas alterações no potencial de membrana podem, de fato, resultar em aumento na frequência de disparos. Na **Figura 8C** quantificamos o aumento desta frequência pela alteração no potencial de membrana, identificando um aumento de  $0.7 \pm 0.11$  Hz/mV (n=2).

Quando comparados a despolarização promovida por DHPG e a relação entre o potencial de membrana e a taxa de disparo dos potenciais, fica evidente que a despolarização está envolvida no mecanismo promovido por DHPG. Contudo, o aumento dos disparos correspondente a despolarização justifica apenas parte do efeito observado pela aplicação de DHPG.



**Figura 7. DHPG despolariza o potencial de membrana, aumentando a frequência dos potenciais.** A) Trechos de registro *Whole-cell current clamp* evidenciando o aumento na frequência dos potenciais na presença de DHPG. B) Histogramas correspondentes a imagem anterior identificando os valores do potencial de repouso. C) Resumo de três experimentos mostrando o potencial de repouso em controle, DHPG e após a lavagem. D) Efeito médio da despolarização causada pelo DHPG.

**Figura 8. Relação entre potencial de membrana e frequência dos potenciais de ação** A) Exemplo representativo de um experimento no qual foi injetada corrente em rampa lenta para determinar a relação entre o potencial de repouso e a frequência dos potenciais de ação. B) Gráfico derivado dos dados ilustrados no Painel A, mostrando a relação entre potencial de repouso e a frequência dos potenciais de ação. A linha é o melhor ajuste de uma curva sigmoide aos dados. C) Inclinação máxima, obtido pelo ajuste da curva sigmoide aos dados, da relação entre o potencial de repouso e a frequência do potencial de ação (N=2).

### 5.3 DHPG promove, de forma concentração-dependente, uma corrente de entrada

Outra abordagem utilizada neste projeto são os experimentos de Whole-cell na modalidade *Voltage clamp*. Utilizamos estes experimentos para identificar a corrente responsável para o efeito excitatório mediados por receptores mGluR-I. O potencial de membrana dos neurônios do LC foi fixado em -60 mV. Dessa forma, não há disparos de potenciais de ação nestes registros.

Os experimentos realizados nessa modalidade identificaram uma corrente de entrada de característica transiente na presença de DHPG. Como podemos observar na **Figura 9A** o efeito possui instalação rápida seguido de uma dessensibilização. A latência entre o início de aplicação do DHPG e o início da corrente se deve, em parte, pelo tempo necessário para a droga passar pelas linhas e difundir dentro da fatia. O efeito máximo de DHPG permanece por aproximadamente ~100 segundos, em seguida, a corrente gradualmente reduz ainda na presença do agonista, alcançando valores semelhantes à condição de controle, caracterizando assim, uma dessensibilização dos receptores mGluR-I.

Para análise foram utilizados histogramas em trechos de sessenta segundos antes da aplicação do agonista e do seu efeito máximo. A corrente  $I_{DHPG}$  foi determinada pela diferença dos valores medidos em condições DHPG e controle.

Uma vez demonstrada a corrente promovida pela aplicação de DHPG nos neurônios do Locus Coeruleus, uma questão relevante a ser tratada é a relação concentração-resposta deste agonista. A definição de uma curva dose-resposta supri nosso projeto com informações como o seu efeito máximo e o  $EC_{50}$ , que corresponde a uma resposta equivalente a ativação de 50% dos receptores, sendo o parâmetro utilizado para determinar a potência de um ligante para determinado receptor.

Utilizando diferentes concentrações do agonista DHPG em experimentos na modalidade Whole-cell *voltage clamp* identificamos diferentes valores para a corrente  $I_{DHPG}$ . Como podemos observar na **Figura 9B** a aplicação de DHPG demonstra exercer corrente em concentrações a partir de 3  $\mu$ M. O acréscimo na concentração resulta em valores maiores na corrente que, quando plotados em

escala logarítmica, apresentam a formação de uma função sigmoide. A análise dos dados foi feita ajustando a equação de Hill, que nos fornece como EC<sub>50</sub> o valor de 7.3 µM e um efeito máximo de -35 pA.

#### **5.4 Aplicação de antagonistas para mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub> inibe o efeito promovido por DHPG**

O composto DHPG é um agonista seletivo para os receptores metabotrópicos do Grupo I. As isoformas pertencentes a esse Grupo são o mGlu<sub>1</sub> e o mGlu<sub>5</sub>, logo a ação de DHPG pode ser promovida por um ou por ambos os receptores, uma vez que o agonista não faz distinção entre estas isoformas. Para averiguar se o efeito de fato ocorre pela ativação destes receptores e investigar o impacto de cada uma das isoformas utilizamos os antagonistas seletivos LY367385 e MPEP para mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub>, respectivamente.

Utilizamos experimentos Whole Cell *voltage clamp* para identificar a ativação dos receptores e o efeito de cada isoformas. A concentração de 30 µM foi designada para estes registros devido ao seu efeito máximo. Como demonstrado na **Figura 9C**, observamos que registros realizados com as mesmas concentrações de DHPG apresentavam valores reduzidos da corrente I<sub>DHPG</sub> quando na presença dos antagonistas LY367385 (160 µM) e MPEP (20 µM). Demonstrando, dessa forma, que o efeito observado na presença de DHPG é resultante da ativação dos receptores mGluR-I. O uso individual de LY367385 (160 µM) foi igualmente efetivo. Concluímos, portanto que o agonista DHPG age nos neurônios do Locus Coeruleus através dos receptores metabotrópicos mGlu<sub>1</sub>.

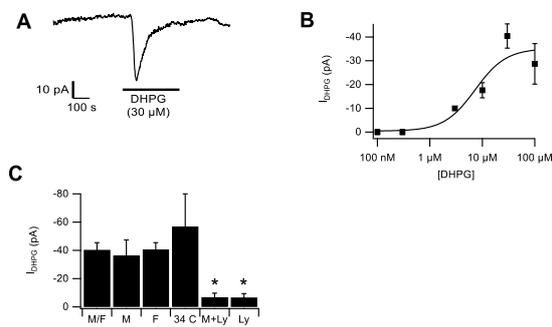
#### **5.5 Efeito do agonista DHPG em animais machos e fêmeas**

Como descrito na Introdução, o locus Coeruleus é um núcleo que apresenta dimorfismo sexual (Bangasser et al. 2011). Logo, consideramos importante comparar o impacto da aplicação de DHPG em fatias obtidos de animais de ambos os sexos. Os experimentos de *voltage clamp* descritos acima foram repetidos com fatia obtidos de animais machos e fêmeas. Não foram observadas divergências na corrente basal dos neurônios LC, no tempo para

obtenção do efeito de DHPG, nem da sua duração ou a cinética da corrente observada. Na **Figura 9C**, foi contabilizada as médias das correntes promovidas por DHPG. Análises estatísticas não demonstraram nenhuma diferença significativa. Portanto, concluímos que a corrente promovida por DHPG não sofre diferença pelo sexo do animal.

## **5.6 Efeito do agonista DHPG em temperatura próximas ao fisiológico**

Por motivos técnicos, a maioria dos registros desse trabalho foram feitos na temperatura ambiente. Para certificarmos que o efeito ainda se mantém em temperaturas mais perto da fisiológica, repetimos os experimentos de voltage clamp usando um controle da temperatura em 34°C. Nessas condições, não detectamos nenhuma diferença significativa da amplitude, cinética ou dessensibilização da corrente ativado por DHPG (**Fig 9C**, N=2).



**Figura 9. Experimentos realizados na modalidade *voltage clamp*.** A) Trecho de registro simplificado, evidenciando a corrente  $I_{DHPG}$ . B) Curva dose-resposta da corrente promovida pela aplicação de DHPG. C) Relação entre os diferentes registros realizados em *voltage clamp* com aplicação de DHPG (30 μM). M/F todas as células testadas em temperatura ambiente sem antagonista (N=18); M- Machos (N=6); F- Fêmeas (N=6); 34 C Temperatura próxima da fisiológica (N=2); M+Ly Aplicação prévia de 160 μM LY367385 e 20 μM MPEP (N=4); Ly Aplicação prévia de 160 μM LY367385 (N=2)

## 6. Discussão

Neste trabalho nós descrevemos, pela primeira vez, a modulação da atividade de neurônios do Locus Coeruleus pela ativação de receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I. A atividade do neurônio foi alterada de diversas formas. A aplicação do agonista seletivo para mGluR-I, DHPG, em experimentos *current clamp* ocasionou um aumento da taxa de disparos espontâneos, diminuindo os valores do intervalo entre os potenciais. Outro efeito observado foi uma pequena despolarização no valor do potencial de membrana correspondente aos períodos de repouso da célula entre os potenciais de ação (i.e. potencial de repouso). Protocolos de rampa lenta de corrente evidenciaram uma dependência da frequência dos potenciais de ação pelos valores do potencial de repouso das células. Contudo, quando comparado, a despolarização justificava apenas parte do efeito promovido pela aplicação do agonista DHPG. Em experimentos *voltage clamp*, foi observado um deslocamento na corrente necessária para fixar o potencial de membrana dos neurônios do LC em -60 mV, caracterizando uma corrente de entrada. O caráter concentração-dependente do efeito foi evidenciado utilizando concentrações a partir de 1  $\mu\text{M}$  até 100  $\mu\text{M}$ . A utilização dos antagonistas seletivos para as isoformas mGluR<sub>1</sub> e mGluR<sub>5</sub> forneceu fortes evidências da ativação destes receptores pela aplicação de DHPG, sendo o mGluR<sub>1</sub> o principal contribuinte.

Em nossos experimentos, utilizamos animais neonatos com idade entre 6-8 dias. O uso de animais neonatos para investigações com o núcleo Locus Coeruleus é comum na literatura (Li and Putnam 2013). Durante esta fase o Sistema Nervoso Central ainda está em desenvolvimento (Pinos 2001). Processos ativos como a mielinização ainda não aconteceram o que permite, nas fatias, uma melhor visualização dos neurônios. Para o núcleo Locus Coeruleus, este período é caracterizado como uma janela de alta atividade dos neurônios. Estudos demonstram que a atividade espontânea dos neurônios é reduzida de acordo com a idade do animal (Nakamura et al. 1987). Buscas realizadas no banco de dados Allen Brain Map, mostram evidências da expressão dos receptores na fase adulta (Lein et al. 2007) e estudos em macacos rhesus evidenciam a expressão dos receptores mGluR-I no LC (Noriega et al. 2007), porém devido às divergências na atividade de acordo com

a idade do animal não é possível afirmar que o efeito observado neste estudo ocorre em animais adultos, necessitando mais estudos sobre o efeito.

Todas as soluções utilizadas na cirurgia e durante o registro foram borbulhadas com carbogênio pelo tempo mínimo de cinco minutos. Este é um ponto importante a ser tratado em nossos experimentos uma vez que todas as soluções aCSF são borbulhadas constantemente. A caracterização do núcleo LC como quimiossensível foi dada por Hartzler (2008), demonstrando a modulação na sua atividade devido a hipercapnia. Como o alvo de nossos experimentos envolvia a análise da atividade basal dos neurônios o uso do carbogênio precisou ser revisado e protocolado para evitar maior variabilidade dos resultados. O borbulhamento prévio de todas as soluções pelo tempo mínimo de cinco minutos permitiu a saturação do ambiente, reduzindo as possíveis alterações devido a diferenças do fluxo de borbulhamento em cada linha de perfusão.

Experimentos em Whole Cell consistem em utilizar uma pipeta de vidro preenchida com solução que mimetize as condições intracelulares. Durante o período do registro ocorre a difusão dos componentes do interior da pipeta para a célula e vice-versa (Pusch and Neher 1988). Esta característica dos registros pode influenciar na resposta promovida pela célula diante do agonista DHPG. Uma alternativa para verificar o efeito de maneira não-invasiva é através de registros extracelulares. A técnica utiliza pipetas preenchidas com a mesma solução aCSF presente no banho e permite a visualização dos potenciais de ação através das correntes geradas próximas à pipeta. Em dados não mostrados, nós realizamos experimentos extracelulares e observamos, assim como nos registros whole cell, o aumento da taxa de disparos dos potenciais e a dessensibilização desse efeito. Dessa forma, entendemos que o uso da técnica *Whole-Cell* não interfere, de forma importante, com a atividade dos receptores mGluR-I nessas células.

Os neurônios do LC são células excitáveis que possuem uma atividade espontânea. Ou seja, um conjunto de correntes nos neurônios do LC favorece a despolarização e o disparo dos potenciais de ação. Recentemente, um estudo identificou como principais correntes envolvidas na atividade marca-passo do LC um balanço entre correntes de Na<sup>+</sup> sensíveis a TTX e correntes de K<sup>+</sup> sensíveis

à altas concentrações de TEA (de Oliveira et al. 2010). Durante nossos registros na modalidade *voltage clamp* identificamos a presença de oscilações rítmicas na corrente. A comparação do disparo dos potenciais com estas oscilações nos permitiu presumir que se tratavam das correntes responsáveis pelo disparo dos potenciais de ação. Uma observação interessante durante nossos registros foi de que a aplicação do agonista DHPG além de provocar a corrente de entrada demonstrada na **Figura 9A**, também foi observado um aumento na frequência destes eventos. Contudo, dois pontos de vista devem ser levados em consideração:

1. O experimento de *voltage clamp* consiste na regulação do potencial de membrana da célula para valores determinados pelo amplificador utilizando injeção de corrente. Sendo assim, o potencial da membrana pode ser fixado em uma área limitada pelo alcance da injeção de corrente (Halliwell et al.1994). Pelo fato dos neurônios do Locus Coeruleus possuírem longas prolongações dendríticas uma possibilidade da origem das oscilações observadas é a atividade espontânea do neurônio em regiões além do alcance do *voltage clamp*.
2. Outra possibilidade é que, de fato, estas oscilações sejam as correntes marca-passo dos neurônios do LC. Neste caso podemos presumir que DHPG está provocando um efeito dual nos neurônios do Locus Coeruleus que consiste em na geração da corrente de entrada e na alteração das correntes marca-passo.

Para confirmar as condições acima, uma alternativa é realizar o registro de neurônios do Locus Coeruleus em cultura de células dissociadas. A atividade tônica dos neurônios pode ser observada nestas condições (Marshall et al. 1984; Finlayson and Marshall 1988) e as prolongações dendríticas podem ser observadas em diferentes intervalos de cultura.

Observando os neurônios do LC na modalidade *current clamp*, vimos que a aplicação de DHPG resultou em um aumento significativo na atividade dos potenciais espontâneos que dessensibilizou ainda na presença do agonista (Fig. 1). Efeitos similares foram reportados em outras células com atividade espontânea. Em 2014, os pesquisadores Dong e Ennis investigaram os efeitos da aplicação de DHPG em células tufadas do bulbo olfatório. Assim como o

Locus Coeruleus, estas células possuem atividade rítmica que foi aumentada na presença do agonista. Além deste núcleo, estudos recentes também demonstram modulação do receptor em células do gânglio da retina e neurônios do globus pallidus (Sun et al. 2012; Li et al. 2017).

A aplicação do agonista DHPG promoveu efeitos que foram rapidamente dessensibilizados. Nossa estratégia experimental consistiu em aplicar o agonista DHPG por longos períodos, dessa forma, garantindo atingir a concentração desejada no banho e visualizar respostas estacionárias em um registro estável. As **Figuras 6B e 9A** mostram exemplos da instalação do efeito do DHPG (em *current clamp* ou *voltage clamp*, respectivamente) por um breve período seguido de uma forte dessensibilização. Para os nossos experimentos, esta dessensibilização significou que o agonista só poderia ser aplicado uma única vez em cada fatia. A dessensibilização dos receptores mGluR-I envolve fatores como o bloqueio na ativação de PLC através de reguladores da sinalização da proteína G (RSG) (Saugstad et al. 1998) e a internalização do receptor através da interação com beta-arrestina e clatrina (Dale et al. 2002).

Observando o efeito do agonista durante experimentos na modalidade *voltage clamp* fica evidente a alteração nos valores da corrente para valores mais negativos, caracterizando uma corrente de entrada. Esta resposta foi identificada como concentração-dependente e o valor para  $EC_{50}$  corresponde a  $6.5 \mu\text{M}$ . A partir desse dado, escolhemos a concentração de  $30 \mu\text{M}$  para experimentos com os antagonistas por dois motivos: 1) apresentava de acordo com a curva dose-resposta um efeito máximo; 2) correspondia a mais que três vezes a concentração de  $EC_{50}$ . Dessa forma, analisamos uma resposta plena da ativação dos receptores. A concentração dos antagonistas foi escolhida de acordo com o caráter de cada composto. MPEP é um antagonista potente para mGluR5 e não competitivo (Gasparini et al. 1999). Em diversas preparações foi reportado o uso do antagonista na concentração de  $10 \mu\text{M}$  (Song et al. 2009). Por outro lado o LY367385 é um antagonista competitivo e por esse motivo foi utilizada a concentração ~5 vezes maior que a determinada para o agonista DHPG.

Uma questão relacionada ao uso dos antagonistas era se existia alguma atividade basal dos receptores mGluR-I no LC, sem a adição de agonistas como o DHPG (Heinbockel et al. 2004). Isso foi testado utilizando ambos os

antagonistas LY367385 e MPEP previamente a aplicação de DHPG em registros voltage clamp. Caso os receptores fossem tonicamente ativados deveria ser observado, quando na presença dos antagonistas, um deslocamento na corrente de membrana para valores positivos. Nossos experimentos não evidenciaram nenhuma modificação na atividade dos neurônios LC quando adicionados LY367385 e MPEP, demonstrando, portanto, que os receptores mGluR-I não são tonicamente ativados nestas sinapses. O uso de LY367385 separadamente demonstra que no LC os receptores mGlu<sub>1</sub> tem a maior participação nos efeitos observados pela aplicação de DHPG. Existem evidências para a coexpressão das duas isoformas, mGlu<sub>1</sub> e mGlu<sub>5</sub>, no LC de roedores (Lein et al, 2007) e macacos rhesus (Noriega et al., 2007). Nossos medidos da atividade elétrica neuronal não detectaram efeitos dependentes de mGlu<sub>5</sub>. Isso não descarta a possibilidade destes receptores promoverem efeitos não detectáveis através de técnicas eletrofisiológicas. Futuros experimentos poderiam esclarecer o papel desses receptores no LC.

O LC é um núcleo que possui dimorfismo sexual. Alguns estudos mostram que o número de neurônios no LC de fêmeas é maior do que em machos (Garcia-Falgueras et al. 2005). A explicação desta diferença advém da neurogênese do núcleo que permanece em atividade mesmo após o nascimento. Diferente dos machos, fêmeas apresentaram a neurogênese até durante a puberdade o que resultou em núcleos maiores e mais volumosos (Pinos et al. 2001). Diferenças morfológicas também são encontradas nas projeções dendríticas, existindo mais ramificações em fêmeas que em machos. A consequência destas diferenças são a maior responsividade à estímulos estressantes por parte das fêmeas que os machos (Bangasser and Valentino 2012). Apesar dessas diferenças conhecidas, nós não observamos diferenças significativas entre neurônios de animais machos e fêmeas no que diz respeito as ações excitatórias de receptores mGluR-I. Nossos experimentos foram realizados em animais sexualmente imaturos. Futuros experimentos devem testar essa hipótese em animais adultos.

## 7. Perspectivas

A descoberta da modulação da excitabilidade dos neurônios do LC por receptores mGluR-I abre espaço para várias questões. Qual é a localização celular dos receptores responsáveis? Qual é a via de sinalização ativada e a base biofísica desse efeito? Qual é a significância fisiológica dessa modulação?

Numerosos estudos apontam para os receptores mGluR-I uma expressão majoritária na membrana pós-sináptica (revisado por Ribeiro et al. 2010). No entanto, os nossos dados não permitem especular sobre a localização dos receptores responsáveis para os efeitos no LC. Como a fatia mantém os circuitos neuronais intactas, é possível que os receptores mGluR-I ativado pelo DHPG em nossos experimentos estejam localizados não em neurônios do LC e sim em neurônios que projetam entradas sinápticos para o LC e assim modula a sua excitabilidade. Tentamos responder essa pergunta aplicando o DHPG em condições de baixo  $Ca^{2+}$  com o intuito de inibir a liberação de neurotransmissores, mas, infelizmente, não conseguimos registros estáveis nessas condições. Uma possível alternativa seria a utilização de um coquetel de antagonistas de outros receptores (CNQX para receptores AMPA, MK801 para receptores NMDA, etc). O problema com essa abordagem é o grande número de possíveis receptores que teriam que ser bloqueados.

Como descrito na introdução, os receptores mGluR-I podem acoplar a diferentes vias de sinalização, dependentes e independentes de Proteína G. Futuros experimentos devem explorar essas vias para determinar o papel de cada um nas respostas descritos acima. Por exemplo, existem inibidores de PLC que podem ser utilizados para determinar a importância dessa via canônica. A necessidade de um transiente de  $Ca^{2+}$  pode ser testado pelo uso de BAPTA ou outro quelante de  $Ca^{2+}$  na solução de pipeta. Utilizando o BAPTA na solução de pipeta, caso o efeito seja bloqueado, também seria uma evidência da localização dos receptores mGluR-I no próprio LC (ver discussão acima).

A maior pergunta que surge com os resultados do nosso trabalho é o papel fisiológico da modulação do LC pelos receptores mGluR-I. Em qual situação esses receptores podem ser ativados e qual é a consequência funcional desta ativação? A principal projeção glutamatérgica para o LC são os neurônios do núcleo paragigantocelularis (PGi). Se o glutamato liberado dessas sinapses

ativasse receptores mGluR-I presentes em neurônios do LC, a previsão, baseado nos dados apresentados, é a geração de uma corrente de entrada sensível a LY367385 ou outro antagonista mGlu<sub>1</sub>. Os neurônios do LC projetam innervação noradrenérgica para vastas regiões do encéfalo. O primeiro passo para entender a relevância dos receptores mGluR-I nesse processo seria medir seu papel na liberação de noradrenalina. Isso pode ser feito em fatias utilizando a técnica de voltametria com fibras de carbono (Hawes et al. 2017).

## 8. Conclusão

A partir da análise destes experimentos e comparação com dados presentes na literatura foi possível aferir as seguintes conclusões.

A ativação de receptores metabotrópicos de glutamato em neurônios do LC de ratos neonatos promove um aumento na frequência dos potenciais espontâneos. DHPG também promove uma corrente de entrada transiente que dessensibiliza ainda durante a presença do agonista. O efeito da corrente de entrada é dose-dependente e o EC50 corresponde a 7.3  $\mu$ M.

A isoforma de maior participação no efeito de DHPG é o mGlu<sub>1</sub>. Uma vez que LY367385 inibiu a maior parte da corrente gerado aplicação do agonista, e o cotratamento com MPEP não aumentou esta inibição.

O efeito de DHPG não possui distinção por gênero, promovendo com mesma intensidade a corrente de entrada.

Nosso estudo inclui o Grupo I dos receptores mGluR na lista de receptores que conhecidamente modulam os neurônios do Locus Coeruleus. Estudos futuros devem identificar as bases iônicas, os canais iônicos responsáveis, e a significância fisiológica desses achados.

## 9. Referências

- Abe T, Sugihara H, Nawa H, et al (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction.
- Aghajanian GK (1978) Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 276:186–188.
- Anwyl R (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev* 29:83–120.
- Aramori I, Nakanishi S (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8:757–65. doi: 10.1016/0896-6273(92)90096-V
- Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, et al (1986) The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234:734–7.
- Bangasser DA, Valentino RJ (2012) Sex Differences in Molecular and Cellular Substrates of Stress. *Cell Mol Neurobiol* 32:709–723. doi: 10.1007/s10571-012-9824-4
- Bangasser DA, Wiersielis KR, Khantsis S (2016) Sex differences in the locus coeruleus-norepinephrine system and its regulation by stress. *Brain Res.* 1641:177–188.
- Bangasser DA, Zhang X, Garachh V, et al (2011) Sexual dimorphism in locus coeruleus dendritic morphology: A structural basis for sex differences in emotional arousal. *Physiol Behav* 103:342–351. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.037
- Bennett MR (1999) The early history of the synapse: From plato to sherrington. *Brain Res. Bull.* 50:95–118.
- Beqollari D, Kammermeier PJ (2010) Venus Fly Trap Domain of mGluR1 Functions as a Dominant Negative Against Group I mGluR Signaling. *J Neurophysiol* 104:439–448. doi: 10.1152/jn.00799.2009
- Berg AP, Sen N, Bayliss DA (2007) TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for metabotropic glutamate receptor signaling in rat striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 27:8845–56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0551-07.2007
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33–84.
- Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315–321. doi: 10.1038/312315a0
- Bird SJ, Kuhar MJ (1977) Iontophoretic application of opiates to the locus coeruleus. *Brain Res* 122:523–33.

- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56:2–5. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.063
- Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mud?? G, et al (2003) Cellular expression of connexins in the rat brain: Neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *Eur J Neurosci* 18:1807–1827. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02910.x
- Conn PJ, Pin J-P (1997) PHARMACOLOGY AND FUNCTIONS OF METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205
- Cooper AJL, Jeitner TM (2016) Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules* 6:
- Curtis AL, Bethea T, Valentino RJ (2006) Sexually Dimorphic Responses of the Brain Norepinephrine System to Stress and Corticotropin-Releasing Factor. *Neuropsychopharmacology* 31:544–554. doi: 10.1038/sj.npp.1300875
- Curtis DR, Watkins JC (1961) Analogues of glutamic and gamma-amino-n-butyric acids having potent actions on mammalian neurones. *Nature* 191:1010–1011. doi: 10.1038/1911010a0
- Dale LB, Babwah A V, Ferguson SSG (2002) Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitization: role in the patterning of effector enzyme activation. *Neurochem Int* 41:319–26.
- de Carvalho D, Patrone LGA, Taxini CL, et al (2014) Neurochemical and electrical modulation of the locus coeruleus: contribution to CO<sub>2</sub>drive to breathe. *Front Physiol* 5:288. doi: 10.3389/fphys.2014.00288
- de Oliveira RB, Howlett MCH, Gravina FS, et al (2010) PACEMAKER CURRENTS IN MOUSE LOCUS COERULEUS NEURONS. *Neuroscience* 170:166–177. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.028
- Dölen G, Carpenter RL, Ocain TD, Bear MF (2010) Mechanism-based approaches to treating fragile X. *Pharmacol Ther* 127:78–93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.02.008
- Doré AS, Okrasa K, Patel JC, et al (2014) Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* 511:557–562. doi: 10.1038/nature13396
- Dubois M, Scuvée-Moreau J, Dresse A (1976) [Recording of the electrophysiological activity of the locus coeruleus in the rat]. *Neuropsychobiology* 2:203–10.
- Erecińska M, Silver IA (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35:245–96.
- Finlayson PG, Marshall KC (1988) Synchronous bursting of locus coeruleus neurons in tissue culture. *Neuroscience* 24:217–225. doi: 10.1016/0306-4522(88)90325-9

- Fiorillo CD, Williams JT (1998) Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* 394:78–82. doi: 10.1038/27919
- Fonnum F (1984) Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. *J Neurochem* 42:1–11. doi: 10.1111/j.1471-4159.1984.tb09689.x
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63:844–914.
- Fuxe K (1965) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopisch* 59:573–596. doi: 10.1007/BF00337069
- Gao SH, Wen HZ, Shen LL, et al (2016) Activation of mGluR1 contributes to neuronal hyperexcitability in the rat anterior cingulate cortex via inhibition of HCN channels. *Neuropharmacology*. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.01.036
- Garcia-Falgueras A, Pinos H, Collado P, et al (2005) The expression of brain sexual dimorphism in artificial selection of rat strains. *Brain Res* 1052:130–138. doi: 10.1016/j.brainres.2005.05.066
- Gasparini F, Lingenhohl K, Stoehr N, et al (1999) 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 38:1493–1503. doi: 10.1016/S0028-3908(99)00082-9
- Gerber U, Gee CE, Benquet P (2007) Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 7:56–61. doi: 10.1016/j.coph.2006.08.008
- Greenstein GR (2007) *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (14th edition) Edited by Maryadele J. O’Neil. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (14th edition) . Whitehouse Station, NJ: Merck & Co. 2006. , IS. Ref Rev 21:40–40. doi: 10.1108/09504120710775534
- Grzanna R, Molliver ME (1980) The locus coeruleus in the rat: An immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5:21–40. doi: 10.1016/0306-4522(80)90068-8
- Guérineau NC, Bossu JL, Gähwiler BH, Gerber U (1995) Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* 15:4395–407.
- Halliwel J V, Plant TIMD, Robbins JON, Standen NB (1994) Voltage clamp techniques. In: D O (ed) *Microelectrode Techniques The Plymouth Workshop Handbook*. pp 17–35 doi: 10.1016/B978-1-4831-6743-5.50012-5
- Hawes SL, Salinas AG, Lovinger DM, Blackwell KT (2017) Long-term plasticity of corticostriatal synapses is modulated by pathway-specific co-release of opioids through  $\kappa$ -opioid receptors. *J Physiol*. doi: 10.1113/JP274190
- Heinbockel T, Heyward P, Ennis M, Heyward P (2004) Regulation of Main

- Olfactory Bulb Mitral Cell Excitability by Metabotropic Glutamate Receptor mGluR1. 3085–3096.
- Heuss C, Gerber U (2000) G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 23:469–75.
- Hille B, Dickson EJ, Kruse M, et al (2014) Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1851:844–856. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.09.010
- Holets VR, Hökfelt T, Rökaeus Å, et al (1988) Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. *Neuroscience* 24:893–906. doi: 10.1016/0306-4522(88)90076-0
- Horne AL, Simmonds MA (1989) The pharmacology of quisqualate and ampa in the cerebral cortex of the rat in vitro. *Neuropharmacology* 28:1113–1118. doi: 10.1016/0028-3908(89)90125-1
- Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, et al (1991) Cloning, Expression, and Gene Structure of a G Protein-Coupled Glutamate Receptor from Rat Brain. *Science* (80- ) 252:1318–1321.
- Ishibashi H, Nakahata Y, Eto K, Nabekura J (2009) Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone. *J Physiol* 587:5709–5722. doi: 10.1113/jphysiol.2009.181420
- Jian K, Cifelli P, Pignatelli A, et al (2010) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Res* 1354:47–63. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.104
- Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K (2003) Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr. Opin. Neurobiol.*
- Jones BE (1991) Noradrenergic locus coeruleus neurons: their distant connections and their relationship to neighboring (including cholinergic and GABAergic) neurons of the central gray and reticular formation. *Prog Brain Res* 88:15–30.
- Kammermeier PJ (2012) The orthosteric agonist 2-chloro-5-hydroxyphenylglycine activates mGluR5 and mGluR1 with similar efficacy and potency. *BMC Pharmacol* 12:6. doi: 10.1186/1471-2210-12-6
- Köhler S, Bär K-J, Wagner G (2016) Differential involvement of brainstem noradrenergic and midbrain dopaminergic nuclei in cognitive control. *Hum Brain Mapp* 37:2305–2318. doi: 10.1002/hbm.23173
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* (80- ) 260:95–97. doi: 10.1126/science.8096653
- Krebs HA, Hans BY, Krebs A (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 29:1951–1969. doi: 10.1042/bj0291951
- Krieger J, Bahar I, Greger IH (2015) Structure, Dynamics, and Allosteric

- Potential of Ionotropic Glutamate Receptor N-Terminal Domains. *Biophys J* 109:1136–1148. doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.061
- Kubota H, Nagao S, Obata K, Hirono M (2014) mGluR1-mediated excitation of cerebellar GABAergic interneurons requires both G protein-dependent and Src-ERK1/2-dependent signaling pathways. *PLoS One* 9:e106316. doi: 10.1371/journal.pone.0106316
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The Gap Junction Review Communication Channel. *Cell* 84:381–388. doi: S0092-8674(00)81282-9 [pii]
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, et al (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168–176. doi: 10.1038/nature05453
- Li K-Y, Putnam RW (2013) Transient outwardly rectifying A currents are involved in the firing rate response to altered CO<sub>2</sub> in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 305:R780–R792. doi: 10.1152/ajpregu.00029.2013
- Li Q, Cui P, Miao Y, et al (2016) Activation of group I metabotropic glutamate receptors regulates the excitability of rat retinal ganglion cells by suppressing Kir and I<sub>h</sub>. *Brain Struct Funct* 222:813–830. doi: 10.1007/s00429-016-1248-3
- Li Q, Cui P, Miao Y, et al (2017) Activation of group I metabotropic glutamate receptors regulates the excitability of rat retinal ganglion cells by suppressing Kir and I<sub>h</sub>. *Brain Struct Funct* 222:813–830. doi: 10.1007/s00429-016-1248-3
- Llorca-Torralba M, Borges G, Neto F, et al (2016) Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience* 338:93–113. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.05.057
- Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R (1986) Efferent projections of nucleus locus coeruleus: Morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307–319. doi: 10.1016/0306-4522(86)90156-9
- Luque JM, De Bias MR, Segovia S, Guillamón A (1992) Sexual dimorphism of the dopamine-β-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus coeruleus. *Dev Brain Res* 67:211–215.
- M. Ribeiro F, Paquet M, P. Cregan S, S. G. Ferguson S (2010) Group I Metabotropic Glutamate Receptor Signalling and its Implication in Neurological Disease. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* 9:574–595. doi: 10.2174/187152710793361612
- Maeda T (2000) The locus coeruleus: history. *J Chem Neuroanat* 18:57–64.
- Marshall KC, Garber CB, Finlayson PG (1984) Noradrenergic actions of purkinje and locus coeruleus neurons in culture. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 8:515–520. doi: 10.1016/0278-5846(84)90009-5
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, et al (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349:760–765. doi:

10.1038/349760a0

- Mello-Carpes PB, da Silva de Vargas L, Gayer MC, et al (2016) Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiol Learn Mem* 127:84–92. doi: 10.1016/j.nlm.2015.11.014
- Mourão-Júnior, C. A., & Abramov, D. M. (2011). Plasticidade. In: C. A. Mourão-Júnior & D. M. Abramov. *Fisiologia essencial* (pp. 46-57). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan
- Murai Y, Akaike T (2005) Orexins cause depolarization via nonselective cationic and K<sup>+</sup> channels in isolated locus coeruleus neurons. *Neurosci Res* 51:55–65. doi: 10.1016/j.neures.2004.09.005
- Nakamura S, Kimura F, Sakaguchi T (1987) Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. *J Neurophysiol* 58:510–24.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597–603. doi: 10.1126/science.1329206
- Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, et al (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 26:230–235.
- Netzeband JG, Gruol DL (2008) mGluR1 agonists elicit a Ca<sup>2+</sup> signal and membrane hyperpolarization mediated by apamin-sensitive potassium channels in immature rat purkinje neurons. *J Neurosci Res* 86:293–305. doi: 10.1002/jnr.21493
- Noriega NC, Garyfallou VT, Kohama SG, Urbanski HF (2007) Glutamate receptor subunit expression in the rhesus macaque locus coeruleus. *Brain Res* 1173:53–65. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.007
- Pereda AE (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci* 15:250–263. doi: 10.1038/nrn3708
- Perry TL, Berry K, Hansen S, et al (1971) Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. *J Neurochem* 18:513–9.
- Pin J-P, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1–26. doi: 10.1016/0028-3908(94)00129-G
- Pinos H, Collado P, Rodríguez-Zafra M, et al (2001) The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res Bull* 56:73–78. doi: 10.1016/S0361-9230(01)00540-8
- Pusch M, Neher E (1988) Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 411:204–211. doi: 10.1007/BF00582316
- Rabacchi S, Bailly Y, Delhay-Bouchaud N, Mariani J (1992) Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science* 256:1823–1825. doi: 10.1126/science.1352066
- Rainnie DG, Holmes KH, Shinnick-Gallagher P (1994) Activation of

- Postsynaptic Metabotropic Glutamate Receptors by Trans-ACPD Hyperpolarizes Neurons of the Basolateral Amygdala. *J Neurosci* 14:7208–7220.
- Romano C, Yang WL, O'Malley KL (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 271:28612–6.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, et al (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359–1400. doi: 10.1152/physrev.00007.2003
- Sara SJ (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:211–223. doi: 10.1038/nrn2573
- Saugstad JA, Marino MJ, Folk JA, et al (1998) RGS4 inhibits signaling by group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* 18:905–13.
- Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14:13–20. doi: 10.1016/0165-6147(93)90107-U
- Schwarz LA, Luo L (2015) Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.039
- Sears RM, Fink AE, Wigstrand MB, et al (2013) Orexin/hypocretin system modulates amygdala-dependent threat learning through the locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci* 110:20260–20265. doi: 10.1073/pnas.1320325110
- Seibt F, Schlichter R (2015) Noradrenaline-mediated facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord involves interlaminar communications. *Eur J Neurosci* 42:2654–2665. doi: 10.1111/ejn.13077
- Shim HG, Jang S-S, Jang DC, et al (2016) mGlu<sub>1</sub> receptor mediates homeostatic control of intrinsic excitability through  $I_h$  in cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 115:2446–2455. doi: 10.1152/jn.00566.2015
- Sladeczek F, Pin JP, Récasens M, et al (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317:717–9.
- Song J-H, Park E-S, Han S-M, et al (2009) Signal transduction mechanisms underlying group I mGluR-mediated increase in frequency and amplitude of spontaneous EPSCs in the spinal trigeminal subnucleus oralis of the rat. *Mol Pain* 5:50. doi: 10.1186/1744-8069-5-50
- Sugiyama D, Hur SW, Pickering AE, et al (2012) In vivo patch-clamp recording from locus coeruleus neurones in the rat brainstem. *J Physiol* 590:2225–2231. doi: 10.1113/jphysiol.2011.226407
- Sun X-R, Chen L, Chen W-F, Yung W-H (2012) Electrophysiological and behavioral effects of group I metabotropic glutamate receptors on pallidal neurons in rats. *Brain Res* 1477:1–9. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.027
- Swanson lw (1976) Te locus coeruleus: A cytoarchtectonic, golgi and immunohistochemical study in the albino rat. *Brain res* 110:39–56.

- Szawka, R. E., Helena, C. V. V., Rodovalho, G. V., Monteiro, P. M., Franci, C. R., & Anselmo-Franci, J. A. (2005). Locus Coeruleus Norepinephrine Regulates the Surge of Prolactin During Oestrus. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(10), 639–648.
- Takahashi K, Tsuchida K, Tanabe Y, et al (1993) Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. *J Biol Chem* 268:19341–19345.
- Travagli RA, Wessendorf M, Williams JT (1996) Dendritic arbor of locus coeruleus neurons contributes to opioid inhibition. *J Neurophysiol* 75:2029–35.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405–96. doi: 10.1124/pr.109.002451
- Trulson ME, Arasteh K (1986) Morphine increases locus coeruleus noradrenergic neuronal activity in vitro. *Eur J Pharmacol* 124:189–92.
- Urwyler S (2011) Allosteric Modulation of Family C G-Protein-Coupled Receptors: from Molecular Insights to Therapeutic Perspectives. *Pharmacol Rev*. doi: 10.1124/pr.109.002501
- Wiśniewski K, Car H (2002) (S)-3,5-DHPG: a review. *CNS Drug Rev* 8:101–16.
- Zeisel SH (2012) A brief history of choline. *Ann Nutr Metab* 61:254–8. doi: 10.1159/000343120
- Zuber B, Nikonenko I, Klauser P, et al (2005) The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proc Natl Acad Sci* 102:19192–19197. doi: 10.1073/pnas.0509527102