



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ASPECTOS DAS LIBERAÇÕES DE DOPAMINA E
ACETILCOLINA MEDIADAS POR RECEPTORES
DE GLUTAMATO**

PAULO CESAR DE ARRUDA PAES

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Dr. José Roberto Rogero

**São Paulo
2002**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ASPECTOS DAS LIBERAÇÕES DE DOPAMINA E ACETILCOLINA MEDIADAS
POR RECEPTORES DE GLUTAMATO**

Paulo Cesar de Arruda Paes



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Dr. José Roberto Rogero

SÃO PAULO
2002

AGRADECIMENTOS

À Direção do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CNEN/SP, pela oportunidade e condições fornecidas para a realização deste trabalho;

À Chefia do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, Dra Catarina de Fátima P. Teixeira, pela possibilidade de utilização dos laboratórios;

Ao Dr. José Roberto Rogero, orientador, pelo exemplo, apoio e confiança constantes,

Ao Dr. Lanfranco R.P.Troncone, pelos ensinamentos e inesgotáveis incentivos,

À Dra. Maria Aparecida Camillo, pela inestimável colaboração, amizade e apoio desde a Iniciação Científica; até a conclusão do presente trabalho.

À Miriam Fussae Suzuki, pela ajuda com as referências bibliográficas e pela amizade.

Ao CNPq pela bolsa concedida, sem a qual seria impossível a conquista desta importante etapa na minha vida profissional.

À meus pais, irmãos, cunhados e parentes, pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

À Sheila Tomita Tibério, pelo amor, carinho e incentivos constantes.

À todos os amigos do Centro de Biologia Molecular do IPEN, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan e todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto, pela amizade, apoio e colaboração, durante todos esses anos de trabalho.

ASPECTOS DAS LIBERAÇÕES DE DOPAMINA E ACETILCOLINA MEDIADA POR RECEPTORES DE GLUTAMATO

Paulo Cesar de Arruda Paes

RESUMO

O corpo estriado de ratos esta envolvido no controle motor, assim como dos humanos. Diversos neurotransmissores estão presentes nesta estrutura e várias de suas relações funcionais têm sido descritas. Neste estudo empregamos a liberação de transmissores, radioativamente marcados, por tecido estriatal *in vitro* como método para avaliar a influência da transmissão por glutamato sobre as liberações de dopamina e acetilcolina. Foram obtidos os valores das Concentrações Efetivas 50% dos agonistas glutamato, NMDA, ácido kaínico, ácido quisquálico e AMPA para as liberações de dopamina e acetilcolina. Foi avaliado o efeito inibidor do magnésio, tetrodotoxina, MK-801, AP5 e MCPG, assim como o efeito da adição de glicina ao meio de perfusão. Observamos que a liberação da dopamina pode estar sob controle do glutamato através de receptores do tipo NMDA mas não kainato ou AMPA. Já a acetilcolina parece ser controlada pelo glutamato por meio destes três receptores. Os experimentos com tetrodotoxina sugeriram que os receptores de kainato estão distribuídos ao longo de todo o neurônio colinérgico, enquanto que os receptores do tipo AMPA e NMDA podem estar predominantemente no corpo celular. O magnésio bloqueou efetivamente os receptores do tipo NMDA e parcialmente o receptor AMPA. Este efeito não pode ser explicado por ação sobre receptores metabotrópicos pois não pode ser bloqueado por MCPG. O bloqueador MK-801 foi efetivo sobre receptores NMDA. Os resultados apontam para a importância da transmissão por glutamato no controle da liberação de dopamina e acetilcolina no corpo estriado de ratos.

ASPECTS OF DOPAMINE AND ACETYLCHOLINE RELEASE INDUCED BY GLUTAMATE RECEPTORS

Paulo Cesar de Arruda Paes

ABSTRACT

The basal ganglia play an important role in the motor control of rats and humans. This control involves different neurotransmitters and the mutual control of these key elements has been subject to several studies. In this work we determined the role of glutamate on the release of radioactively labelled dopamine and acetylcholine from chopped striatal tissue *in vitro*. The values of Effective Concentration 50% for glutamate, NMDA, kainic, quisqualic acids and AMPA on the release of dopamine and acetylcholine were obtained. The inhibitory effects of magnesium, tetrodotoxin, MK-801, AP5 and MCPG, as well as the effects of glycine were evaluated. The results suggested that dopamine is influenced by the NMDA type glutamate receptor while acetylcholine seems to be influenced by NMDA, kainate and AMPA receptors. Tetrodotoxin experiments suggested that kainate receptors are both present in cholinergic terminals and cell bodies while AMPA and NMDA receptors are preferentially distributed in cell bodies. Magnesium effectively blocked the NMDA stimulation and unexpectedly also AMPA- and quisqualate-induced acetylcholine release. The latter could not be blocked by MCPG ruling out the participation of metabotropic receptors. MK-801 also blocked NMDA-receptors. Results point out the importance of the glutamic acid control of dopamine and acetylcholine release in striatal tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF = Agente Farmacológico
AP-7 = ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico
AP-5 = ácido D-2-amino-7- fosfonopentanoico
7 CI Kyn = ácido 5,7-diCl-Kinureico
Ach = acetilcolina
ACPD = ácido trans-1amino ciclopentano 1-3-dicarboxílico
AMPA = ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil ioxizol-4-propionico
ATPA = ácido(RS)-2-amino-3-(3-hidroxi-5-tert-butilisoxazol-4-il)propionico
BHK = Baby hamster kidney
CHO = Chinese hamster ovary
CNQX = 6 ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
(S)-4CPG = (S)-4-carboxi-fenilglicina
CPP = ácido (+/-)3-(2-carboxipiperazin-4-il)propil-1-fosfonico
CPP-ene = ácido(SDZ EAA 494; 3-(2-carboxipiperazin-4-il)-1-propenil-1-fosfonico
CTZ = Ciclotiazida
DA = Dopamina
DCG-IV = (2S,1"S,2"S)-2 (carboxiciclopropil) - glicina
DNQX = 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
Glu = ácido glutâmico, glutamato
GYKI 52466 = 1-(4-amino-fenil)-4-metil-7,8metilenedioxi-5H-2,3-benzodiazepina
HA-966 = 3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidinona
HEK293 = células de fígado de embrião humano
Ibo = ácido ibotenato
IDRA21 = 7-cloro-3-metil-3-4-dihidro-2H-1,2,4 benzotiadiazina
IP3 = Inositol fosfato 3
iGluRs = receptores de glutamato ionotrópicos
JSTX = Toxina da aranha Joro (*Nephila clavata*)
Ka = ácido kaínico
KRB =Tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato
L AP-4 = ácido L(+)-2-amino-4-fosfonobutirico
L-CCG-I = 2-carboxiciclopropilglicina-1
LY 294486 = ácido(3SR, 4aRS, 6SR, 8aRS)-6-(((1H-tetrazol-5-il) metil)oxi)metil)-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-decahidroisoquinolina-3-carboxilico)
MAP-4 =ácido (S)2 amino2metil4fosfonobutanoico
MCCG = (2S,3S,4S)-2-metil-2(carboxiciclopropil) - glicina
MCPG = α metil-4-carboxifenilglicina
mGluRs = Receptores de glutamato metabotrópicos
MK 801 = (+)-5 metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-iminamaleato
NBQX = 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo-(F)-quinoxalinel
NMDA = N-metil-D-aspartato
Quis = ácido quisquálico
TTx = Tetrodotoxina
YM90K = 6-(1H-imidazol-1yl)-7-nitro-2,3(1H,4H)-quinoxalinediona

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1.Receptores Ionotrópicos	2
1.1.1.Receptores NMDA.....	2
1.1.2.Receptores AMPA	4
1.1.3.Receptores Kainato	6
1.2.Receptores metabotrópicos	8
1.3.Acetilcolina e dopamina	11
1.4.Acetilcolina e dopamina no corpo estriado.....	12
2.OBJETIVOS.....	15
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1.Materiais.....	16
3.2.Método in vitro de liberação de neurotransmissores.....	16
3.2.1.Preparação dos tecidos	18
3.2.2.Ensaio de liberação	19
3.2.3.Medida da radioatividade.....	19
3.2.4.Tratamento dos dados.....	20
3.2.5.Agentes de estímulos	21
3.2.6.Agentes farmacológicos	22
4.RESULTADOS	24
4.1. Agentes de estímulo - determinação da EC50.....	24
4.2.Agentes farmacológicos	27
5.DISSCUSSÃO	50
6.CONCLUSÕES	58
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Alguns aminoácidos, tais como, glutamato e aspartato, estão presentes no cérebro em concentrações relativamente altas e o envolvimento deles em processos bioquímicos e fisiológicos é estudado já há muito tempo, no entanto, ainda não estão totalmente conhecidos.

O glutamato é o principal mediador excitatório do sistema nervoso central e seus receptores estão diretamente relacionados ao fenômeno da excitotoxicidade. Estes estão envolvidos em diversas funções fisiológicas como o aprendizado e a memória e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento. Estão também envolvidos na morte de neurônios ocasionada por uma excessiva ativação de seus receptores em processos como isquemia, ataques epiléticos, traumatismos cranianos, etc (OZAWA e col., 1998).

Ao longo do tempo, diversos tipos de receptores de glutamato foram caracterizados, principalmente devido aos avanços na farmacologia, eletrofisiologia e principalmente biologia molecular. Foram separados em duas grandes classes: os **ionotrópicos** (iGluRs), da qual fazem parte os receptores formadores de canais iônicos permeáveis a cátions específicos, e os **metabotrópicos** (mGluRs), que são acoplados a proteínas-G (MICHAELIS, 1998; OZAWA e col., 1998). Os receptores ionotrópicos por sua vez são subdivididos em três grupos de acordo com a ação de agonistas específicos, que serão descritos abaixo assim como os receptores metabotrópicos, seguindo as revisões dos autores MICHAELIS, 1998; OZAWA e col., 1998; MORI & MISHINA, 1995; PIN & DUVOISIN, 1995; BLEAKMAN & LODGE, 1998.

1.1.Receptores Ionotrópicos

1.1.1.Receptor NMDA

Distribuição: O receptor NMDA é extensamente distribuído no cérebro e medula espinhal de mamíferos. Destacam-se regiões com alta densidade de receptores no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo, apresentando predominância de suas subunidades protéicas em uma ou outra região.

Estrutura Molecular: O receptor de NMDA é composto basicamente de duas subunidades protéicas; uma denominada NMDAR1(NR1), que pode apresentar 8 variantes, e outra NMDAR2 (NR2) que pode apresentar 4 variantes.

A subunidade NMDAR1 é fundamental para a formação dos receptores, já que quando expressa sozinha através de técnicas de clonagem e de expressão em ovócitos de *Xenopus* é capaz de reproduzir características funcionais do receptor.

A subunidade NMDAR2 não é capaz disto e atua como subunidade modulatória, podendo os receptores apresentarem diferentes propriedades dependendo da variante de NMDAR2 que for associada com NMDAR1. Foi observada alteração na sensibilidade a glicina, a antagonistas como 2-AP5 e ao Mg^{2+} , entre outros(Michaelis, 1998).

Farmacologia: O receptor de NMDA apresenta importantes propriedades de permeabilidade a íons. Metais alcalinos como Na^+ , K^+ e Cs^+ apresentam pequena permeação pelos canais com baixa seletividade; Ca^{2+} é altamente permeável e

Mg^{2+} é um potente bloqueador destes canais. O receptor de NMDA apresenta vários sítios de ligação para diferentes agentes, além daquele onde se liga o glutamato e o próprio NMDA. Estes são responsáveis pela abertura do canal de alta condutância permitindo a entrada de Na^+ e Ca^{2+} na célula. São antagonizados competitivamente por ácidos fosfonoaminos (2-AP5, 2-AP7, CPP, CPP-ene). A ligação com a glicina é de extrema importância para que o canal NMDA se abra durante a ligação do glutamato, é portanto um co-agonista do Glu, sendo seu efeito detectável em baixas concentrações ($ED_{50} = 0.1-0.7 \mu M$). A D-serina apresenta um efeito agonista similar ao da glicina, se ligando ao mesmo sítio e com ED_{50} quatro vezes menor. Seu efeito pode ser completamente inibido por 7CI Kynurenina e HA-966 que desloca a glicina de seu sítio por competição. Dentro do canal do receptor de NMDA existe outro sítio importante onde se liga a fenciclidina e antagonistas não competitivos como o MK-801 e a quetamina que agem mais efetivamente quando o canal esta aberto. O magnésio externo é um importante agente bloqueador desses canais, sendo responsável pela resposta lenta desses receptores quando estimulados por glutamato, entretanto pelo fato desse fenômeno de inibição ser dependente de voltagem, a rápida ativação de receptores do tipo kainato e AMPA pelo glutamato e a despolarização que ocorre na membrana pós-sináptica, diminui o efeito de bloqueio dos receptores NMDA pelo Mg^{2+} , levando a ativação desses receptores.

Existem ainda outros sítios presentes no receptor NMDA que influenciam a sua função, atuando principalmente como moduladores. São sítios para agentes redutores e oxidantes, para prótons, para Zn^{2+} (que se localiza próximo a entrada do canal e produz um bloqueio independente de voltagem) e um sítio ativado por espermina e espermidina. Essas poliaminas facilitam a transmissão mediada por

NMDA atuando como moduladores alostéricos e potenciadores destes receptores. Neste sentido é possível associar a participação desses sítios em processos neurodegenerativos como isquemia já que essas poliaminas são liberadas em grande quantidade durante esses processos causando uma potenciação dos efeitos. Este sítio para poliaminas pode ser antagonizado por feniletanolamina e derivados (como o ifenprodil e o eliprodil), tendo assim uma ação neuroprotetora durante esses processos patológicos.

1.1.2.Receptores AMPA

Esses receptores estão presentes em muitas sinapses no sistema nervoso e atuam em processos de neurotransmissão excitatória rápida, tendo como principais características funcionais a condução dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .

Distribuição: A presença de receptores do tipo AMPA é detectável por todo o sistema nervoso central, através de estudos utilizando $[\text{}^3\text{H}]$ AMPA. Podem ser encontrados em alta densidade principalmente nas regiões do hipocampo, giro denteado, camada molecular do cerebelo e córtex cerebral e em baixa densidade no diencéfalo, mesencéfalo, tronco cerebral. Uma determinação mais detalhada da localização foi possível após a caracterização das subunidades formadoras do receptor, revelando assim a distribuição regional da expressão dessas subunidades pelas regiões onde se encontram receptores AMPA.

Estrutura Molecular: Os receptores AMPA são oligômeros homoméricos ou heteroméricos formados por subunidades, apresentando cerca de 900 aminoácidos, já identificadas como GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4. Cada uma destas subunidades

pode se apresentar em duas formas criadas a partir de trocas de aminoácidos presentes em uma determinada região na estrutura da proteína, sendo denominadas de "Flip e Flop". As propriedades funcionais bem como a cinética de dessensibilização desses receptores são decorrentes da composição dessas subunidades. Assim como para receptores de NMDA estas subunidades possuem características particulares que determinam a ação do receptor, como por exemplo o papel dominante da subunidade GluR2 na determinação das propriedades de baixa permeabilidade ao Ca^{2+} e retificação, quando esta é associada com outras subunidades. Estas propriedades estão associadas à presença do aminoácido arginina em regiões da molécula, o que impede a permeação de cátions divalentes pelos receptores AMPA.

Farmacologia: O receptor AMPA apresenta em sua estrutura pelo menos três sítios de ligação onde podem agir agonistas ou antagonistas. Há um sítio de ligação do glutamato onde agem antagonistas competitivos seletivos para estes receptores, tais como NBQX, YM90K. Outros menos seletivos são CNQX, DNQX e LY 294486, que além de antagonizar receptores AMPA, agem também em receptores de kainato. Há ainda um potente antagonista não competitivo chamado GYKI 52466, que é um derivado de benzodiazepínicos.

Outro sítio importante é o relacionado à rápida dessensibilização que ocorre com os receptores AMPA. Substâncias como as ciclotiazidas (Diazóxida, IDRA21) e as pirrolidinonas (aniracetam, piracetam) funcionam como moduladores alostéricos e suprimem a dessensibilização, aumentando sua resposta.

O terceiro sítio de ligação envolve substâncias que se ligam no canal iônico e bloqueiam o fluxo de íons. Neste grupo estão toxinas de aranhas e vespas, tais como as JSTX, argiotoxina e filantotoxina que são conhecidas por bloquear a transmissão glutamatérgica. A JSTX é uma toxina isolada da aranha *Nephila clavata* formada por uma cadeia poliamínica ligada a um anel fenil contendo 2-3 cargas positivas em pH fisiológico. Tem sido mostrado que a JSTX bloqueia especialmente a retificação e a permeabilidade do Ca^{2+} nos receptores AMPA, sendo o seu efeito altamente dependente de voltagem. O sítio de ligação da toxina é localizado próximo a entrada intracelular do poro do canal, e a presença de cargas positivas na toxina é provavelmente um fator importante para o efeito de bloqueio. As demais toxinas citadas também bloqueiam a permeabilidade ao Ca^{2+} de maneira voltagem dependente. Em relação aos agonistas podemos citar o quisqualato, o kainato, o domoato e a willardina, sendo que o quisqualato também age como agonista em receptores metabotrópicos, dificultando a sua utilização como agonista seletivo de receptores AMPA.

1.1.3. Receptores de Kainato

Os receptores de kainato assim como os de AMPA são responsáveis pelo processo de transmissão sináptica rápida, sendo caracterizados por serem formadores de canais independentes de voltagem e facilmente distinguidos de receptores do tipo NMDA.

Distribuição: Por meio de técnicas variadas, utilizando kainato marcado radioativamente e biologia molecular, tem sido demonstrado que esses receptores são abundantes em todo o sistema nervoso central e especialmente em regiões

hipocampais e cerebelares. As subunidades formadoras desses receptores são expressas em diferentes regiões, como por exemplo, a subunidade KA1 é encontrada principalmente na região CA3 e giro denteado do hipocampo enquanto a KA2 possui uma distribuição mais abrangente. Desta maneira esses locais de expressão das subunidades coincide com o padrão de distribuição do kainato marcado, indicando que estes sítios representam os receptores preferenciais de kainato no sistema nervoso central.

Estrutura molecular: Esses receptores são hetero-oligômeros de constituição mal definida. As subunidades clonadas foram classificadas como GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2. As três primeiras possuem baixa afinidade pelo kainato e apresentam um tamanho similar entre si (900 a.a.). As duas últimas possuem alta afinidade e são um pouco maior, com cerca de 970 a.a. Todas essas subunidades possuem alguma homologia com as subunidades GluR1-GluR4, formadoras de receptores do tipo AMPA. Dessas cinco subunidades apenas GluR5 e GluR6 quando expressas sozinhas, são capazes de formar canais que podem ser ativados. O canal formado por GluR6 é capaz de ser ativado por kainato e não por AMPA, enquanto que GluR5 é capaz de ser ativado por kainato, domoato, glutamato e AMPA. As outras três subunidades contribuem de maneira funcional quando são expressas juntamente com GluR5 e GluR6. Assim, as diferentes combinações que podem ocorrer entre as subunidades resultam em diferentes propriedades apresentadas pelo receptores.

Farmacologia: Os receptores dos tipos AMPA e kainato apresentam altas homologias em relação a constituição estrutural de suas subunidades, dificultando a diferenciação destes receptores. Tal fato pode também ser observado pela ação do

antagonista clássico CNQX, (que afeta tanto receptores AMPA quanto receptores kainato). Muitas substâncias tem sido usadas como ferramentas com o intuito de se estudar separadamente cada receptor, bloqueando, ativando ou afetando a dessensibilização desses receptores. Desse modo tem-se usado agonistas de kainato em combinação com bloqueadores seletivos de AMPA como o GYKI 52466 que são ativados por kainato. Outras droga são o ATPA que é um análogo do AMPA que age como agonista de GluR5 e o LY294486 que antagoniza receptores de kainato que contenham GluR5 em sua estrutura, não afetando GluR6 e GluR7. A concavalina A bloqueia seletivamente a dessensibilização da resposta mediada pelo receptor de kainato mas não afeta a resposta mediada pelo AMPA, já o CTZ atua reduzindo a dessensibilização do receptor de AMPA pelo kainato aumentando assim a resposta do receptor AMPA ao kainato.

1.2. Receptores Metabotrópicos

Como foi dito anteriormente, não somente os receptores ionotrópicos são ativados pelo glutamato, mas também uma outra classe de receptores de glutamato denominados metabotrópicos. Estes receptores possuem proteína G acoplada e um sistema de segundo mensageiro como ativador da resposta sináptica; são os principais moduladores do sistema de transmissão com essas características do sistema nervoso central.

Os receptores metabotrópicos possuem oito subtipos descritos (mGluR1 – mGluR8). São classificados em três grupos, de acordo com o nível de conservação de suas seqüências de aminoácidos, farmacologia e mecanismos de transdução de

sinais. Dentro dos grupos a homologia da seqüência de aminoácidos entre os receptores é de 75 % e entre os grupos é de 45 %.

Dessa maneira tem-se o Grupo 1 composto por mGluR1 e mGluR5, cuja ativação leva a estimulação de fosfolipase C e formação de IP3 levando a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. O mGluR1 pode também estimular a formação de AMP cíclico causando a liberação de ácido araquidônico em células CHO ao contrário de mGluR5. Outra diferença entre esses dois subtipos de receptores diz respeito a sensibilidade à toxina pertússica. Esta é mais eficaz para mGluR1 do que mGluR5.

Os outros subtipos são divididos entre os Grupos 2 e 3 sendo assim, mGluR2 e mGluR3 formam o Grupo 2 e mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 o Grupo 3. Esses dois grupos estão ligados a inibição de adenilciclase. O Grupo 2 apresenta uma forte ativação pela forskolina induzindo formação de AMP cíclico e a intensa inibição dos receptores dos dois grupos pela toxina pertússica.

De um modo geral os mecanismos de transdução, ou seja as proteínas G e as subsequentes proteínas efetoras irão variar de acordo com o tipo de célula usado para a expressão desses sistemas.

Distribuição: Os receptores metabotrópicos estão distribuídos em todo o sistema nervoso central acompanhando a presença do neurotransmissor glutamato. Podem estar presentes tanto na membrana pré quanto na pós sináptica.

Estrutura molecular: Os mGluRs são proteínas relativamente grandes (854-1179 a.a.). Apresentam uma região N-terminal extracelular de 550 a.a., que apresenta sítios de glicosilação e onde se localiza possivelmente o sítio de ligação do glutamato, podendo ser também uma região de seletividade de agonistas. Um núcleo de 250 a.a., onde se encontram os sete domínios transmembrana, que formam as alças intracelulares do receptor, são regiões preservadas, sugerindo serem os domínios envolvidos com a ativação da proteína G; e finalmente uma região C-terminal intracelular, cujo tamanho varia para cada subtipo do receptor. Apresenta sítios de fosforilação, podendo atuar como determinante da potência de agonistas e possivelmente regulando os mecanismos de transdução dos receptores.

Em todos os subtipos de receptores metabotrópicos, 21 resíduos de cisteína são conservados sendo que 19 se encontram na região extracelular; sugerindo que a rígida conformação desta região é importante nas funções desempenhadas pelos receptores.

Farmacologia: O estudo farmacológico dos subtipos de receptores metabotrópicos tem sido conduzidos, em sistemas de expressão onde são transfectados clones dos mGluRs tais como ovócitos de *Xenopus*, células CHO, células BHK e células HEK 293. Algumas substâncias tem se mostrado eficientes na ativação dos receptores metabotrópicos tais como os análogos do glutamato, ACPD e L-AP4, que são específicos. Outros compostos como glutamato, quisqualato, ibotenato, são agonistas que também agem nos ionotrópicos.

Grupo 1: Em relação ao Grupo 1 pode-se ordenar esses agonistas de acordo com a potência: Quis > Glu \geq Ibo > ACPD. Nenhum antagonista específico para esse

grupo foi identificado. Compostos como (+)- MCPG, um derivado da fenilglicina, e (S)-4CPG são antagonistas que agem tanto em mGluR1 como em mGluR2, que são de grupos diferentes.

Grupo 2: Sobre o Grupo 2 tem-se o DCG-IV e o L-CCG-I como agonistas seletivos. Ordenando-os segundo a potência temos: DCG-IV \geq L-CCG-I > Glu > ACPD > Ibo > Quis. Como antagonistas existe o MCCG, que atua de forma seletiva sobre esses receptores.

Grupo 3: Os receptores do Grupo 3 são caracterizados pela sensibilidade ao L-AP4 e insensibilidade ao ACPD, tendo como antagonista sugerido o MAP4.

Apesar dos grupos 2 e 3 possuírem o mesmo mecanismo de transdução de sinais, ou seja, através da inibição da adenilciclase, o L-AP4 não ativa receptores do grupo 2. Esta é uma característica que indica uma forte variabilidade entre esses grupos de receptores.

1.3. Acetilcolina e Dopamina

A acetilcolina é uma molécula simples sintetizada a partir de colina e acetil-CoA pela enzima colina acetiltransferase. Os neurônios que sintetizam e liberam acetilcolina são chamados neurônios colinérgicos. Quando um potencial de ação alcança o botão terminal de um neurônio pré-sináptico, um canal de cálcio controlado pela voltagem é aberto. A entrada de íons cálcio, Ca^{2+} , estimula a exocitose de vesículas pré-sinápticas que contém acetilcolina, a qual é conseqüentemente liberada na fenda sináptica.

Uma vez liberada, a acetilcolina deve ser removida rapidamente para permitir que ocorra a repolarização; nessa etapa, a hidrólise, é realizada pela enzima acetilcolinesterase. Esta enzima encontrada nas terminações nervosas está ancorada à membrana plasmática através de um glicolípido.

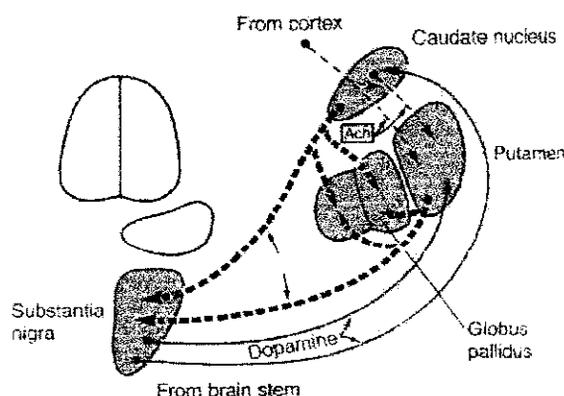
No caso da dopamina esta é formada como um subproduto da biossíntese das catecolaminas, tendo como seu precursor metabólico a diidroxifenilalanina (DOPA), sendo produzida a partir da ação da enzima DOPA-descarboxilase sobre DOPA. A dopamina é liberada na fenda sináptica e atua sobre receptores específicos D1 e D2. A dopamina é recapturada da fenda sináptica ou inativada pela enzima monoaminooxidase (MAO) e pela catecol-O-metiltransferase (COMT) tendo como principais metabólitos o ácido diidroxifenilacético e o ácido homovanílico.

1.4. Acetilcolina e dopamina no corpo estriado

O estriado foi o tecido escolhido para os estudos de liberação de neurotransmissores tritados porque a sua neuroanatomia e bioquímica são bem conhecidas (esquema 1).

A presença de neurônios colinérgicos no estriado também viabiliza em muito a sua utilização na observação de alterações no processo de liberação, hidrólise pela acetilcolinesterase e recaptura da acetilcolina. A acetilcolina está presente na placa motora e também é sintetizada e liberada em neurônios grandes do neostriado (Células de Golgi tipo 2), onde tem efeito excitatório.

A utilização do estriado em estudos de liberação de dopamina é adequada devido a presença de terminais dopaminérgicos e virtual ausência de norepinefrina. A dopamina está altamente concentrada na substância negra, onde é sintetizada, e no estriado, onde é liberada por neurônios da via nigro estriada.



Esquema 1- Esquema das vias neuronais que secretam diferentes substâncias neurotransmissoras como acetilcolina e dopamina no corpo estriado. Fonte: GUYTON & HALL., Textbook of Medical Physiology, ninth edition, p. 728, 1996).

Assim, este trabalho pode possibilitar uma melhor caracterização do método de liberação de neurotransmissores em relação ao comportamento de receptores de glutamato no estriado, facilitando a sua utilização no estudo de outras substâncias, como toxinas, novas drogas, etc, cuja ação esteja ligada a estes receptores.

A relação de receptores de glutamato com doenças neurodegenerativas é muito grande em diversas regiões do sistema nervoso, incluindo o estriado. Assim, com esse trabalho, gostaríamos de contribuir com novos conhecimentos que

possam ajudar no estudo dessas doenças bem como no desenvolvimento de alternativas terapêuticas.

Os receptores de glutamato e seus subtipos apresentam diversas propriedades fisiológicas e farmacológicas, e diversos agonistas e antagonistas (MICHAELIS, 1998). Os experimentos do presente trabalho foram baseados em informações farmacológicas obtidas da literatura, que na sua maioria são derivadas de experimentos com eletrofisiologia, sendo poucas as informações baseadas em experimentos de liberação de neurotransmissores.

2. OBJETIVOS

Geral: O objetivo foi conhecer melhor o papel do glutamato no controle das liberações de dopamina e acetilcolina no corpo estriado de ratos.

Específico: Acompanhando as alterações nas liberações, basais e estimuladas destes dois neurotransmissores, decorrentes de ações sobre os receptores de glutamato (iGluRs e mGluRs), este trabalho visou especificamente determinar:

- A potência de agonistas seletivos e não seletivos;
- A ação de antagonistas;
- A ação do magnésio.
- A ação da Tetrodotoxina

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Materiais

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de qualidade para análise.

Os animais de experimentação, procedentes do biotério do Centro de Biologia Molecular do IPEN, foram mantidos em gaiolas com maravalhas de pinho, recebendo ração comercial e água "ad libitum".

A água utilizada no preparo das soluções foi destilada e purificada em um aparelho Milli Q plus-Millipore.

A medida da radioatividade de ^3H e ^{14}C foram feitas em cintilador líquido Beckman 6500, com as seguintes características: as contagens feitas em DPM, tempo de contagens de 3 minutos e eficiência ao redor de 45%.

3.2 - Método *in vitro* de liberação de neurotransmissores

O método *in vitro* de liberação de neurotransmissores tritiados seguiu o procedimento descrito em MARIEN e col, 1983 e CAMILLO e col, 1995. As diferentes etapas do experimento serão descritas a seguir e estão ilustradas na foto 1.

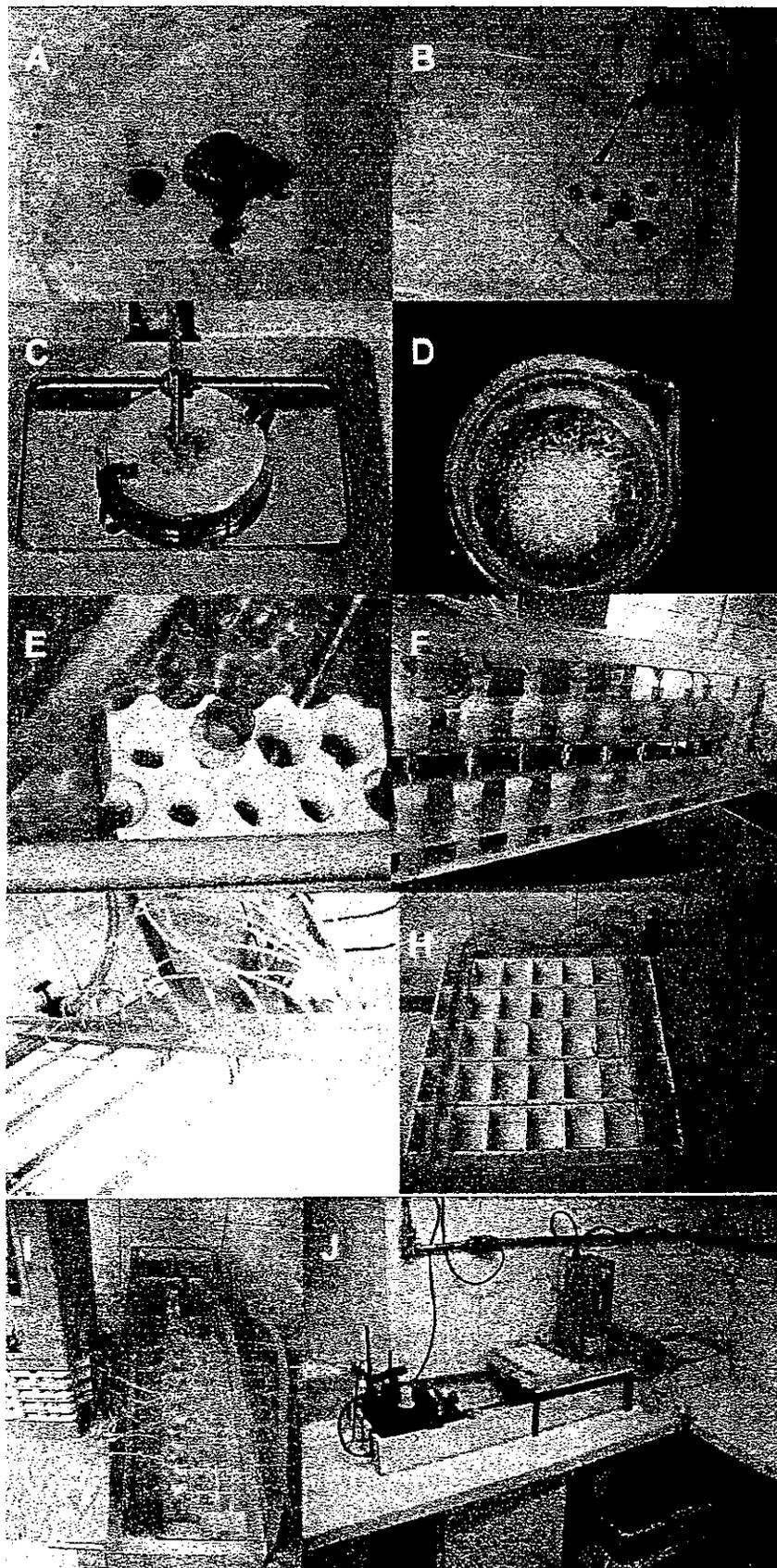


Foto 1: Principais etapas do experimento de liberação de neurotransmissores marcados. A - Cérebro isolado de rato, B - Estriado isolado (ponta da espátula), C - Estriado sendo picado, D - Estriado picado disperso em KRB, E - Estriado picado sendo incubado com neurotransmissor radioativo (37°C), F - Câmaras de perfusão contendo tecido estriatal imersas em banho a 37°C , G - Câmaras de perfusão, H - Sistema de aspiração e gaseamento das soluções a serem perfundidas, I - Amostras de neurotransmissores liberados sendo coletadas, J - Visão geral do sistema.

3.2.1 – Preparação do tecido

Ratos Wistar, adultos, machos pesando entre 200-250 gramas foram sacrificados por decapitação. O estriado foi dissecado e colocado em tampão Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) com a seguinte composição, em mM: NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4,8, CaCl₂ 1,2 e Glicose 10; pH 7,3. Durante o experimento foi mantido gaseamento constante com carbogênio (5%CO₂/95%O₂).

O estriado passou duas vezes pelo cortador de tecidos marca McIlwain; calibrado para cortes na espessura de 250 µm, em sentido transversal formando prismas. O tecido foi disperso com uma pipeta Pasteur e lavado duas vezes em 20 mL de KRB gelado; sendo finalmente transferido para um béquer contendo 3 mL de KRB e o neurotransmissor a ser ensaiado nas seguintes quantidades:

- a) 15 µL de [³H]dopamina (New England Nuclear / atividade específica 136,5 Bq/mMol) incubada na presença de 10 µM de pargilina para prevenir a sua degradação, ou
- b) 15 µL de [³H]colina (New England Nuclear / atividade específica 322,7 Bq/mMol) a partir da qual o tecido sintetizará o neurotransmissor [³H]acetilcolina.
- c) 100 µL de [¹⁴C]colina (Amershan Pharmacia Biotech), sendo esta utilizada juntamente com [³H]dopamina, em experimentos de dupla marcação

A incubação foi feita por 20 minutos a 37°C para que ocorresse a incorporação do neurotransmissor. O tecido foi, então, filtrado e lavado duas vezes com KRB gelado e distribuído em 10 câmaras de perfusão com volume interno de

0,25 mL. A perfusão se processou com um fluxo de 0,25 mL/min, controlado por uma bomba peristáltica de vários canais.

3.2.2 – Ensaio de liberação

Os 60 minutos iniciais de perfusão foram necessários para atingir uma linha basal de liberação, estável. Decorrido este tempo, foram coletadas três amostras sucessivas para quantificação deste basal, com 3 minutos de coleta para cada amostra. A perfusão com agentes de estímulo ocorreu a partir de 10 minutos (4ª coleta) e durou 2 minutos.

Um segundo estímulo idêntico foi induzido na 11ª coleta e mais seis amostras foram coletadas após esta liberação. No 19º intervalo, o tecido foi perfundido com uma solução de ácido clorídrico 0,1 N por dois períodos de 3 minutos para induzir a liberação total dos neurotransmissores ainda presentes no tecido.

A reprodutibilidade dos ensaios foi acompanhada pelo branco controle, ou seja, dois canais perfundidos apenas com tampão.

Todas as amostras foram ensaiadas, no mínimo, em duplicata

3.2.3 – Medida da radioatividade

Para a medida da radioatividade foi adicionado a cada amostra 6 mL de líquido de cintilação miscível com a seguinte composição 5% de PPO e 0.5% de POPOP em Tolueno com 33% de Triton X-100.

Foi utilizado programas que contam apenas ^3H ou $^3\text{H} + ^{14}\text{C}$ simultaneamente, com subtração automática do "Quenching".

3.2.4 – Tratamento dos dados

Os resultados foram expressos como liberação fracional, isto é, a porcentagem de neurotransmissores radioativos liberados em cada intervalo sobre o total contido no tecido no momento da coleta. A figura 1 apresenta um perfil de liberação típico neste sistema e nela foram esquematizados os parâmetros de cálculos. B1 e B2 expressam as liberações basais e S1 e S2 as estimuladas.

O efeito de fármacos e de toxinas foram avaliados pela razão S_2/S_1 ; sendo S_2 a liberação estimulada na presença do agente farmacológico e S_1 a liberação estimulada controle. A liberação basal na presença do agente farmacológico (B_2) e a liberação basal controle (B_1) foram utilizadas para a avaliação dos efeitos na liberação basal usando a razão B_2/B_1 .

S_n é calculado subtraindo B_n da liberação total obtida sob estímulo. B_1 corresponde a média das três amostras que precedem o estímulo S_1 e B_2 a última liberação fracional antes de S_2 .

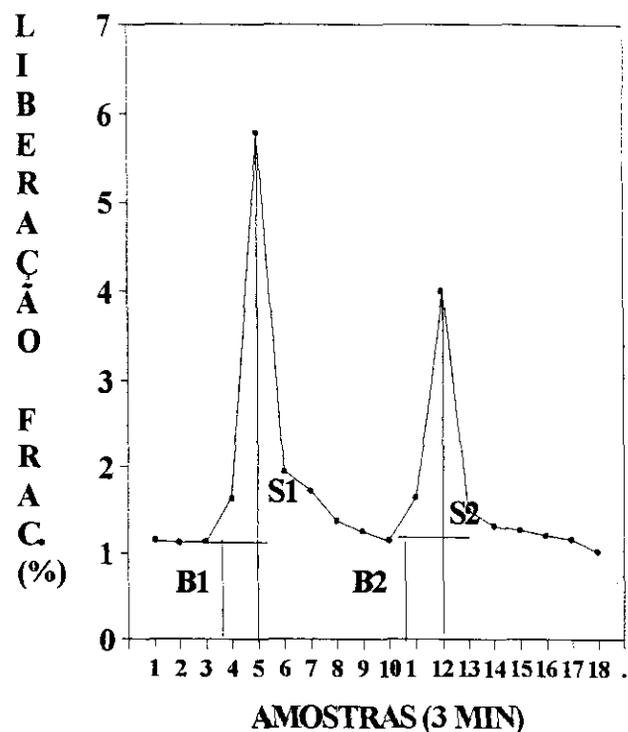


Figura 1. Perfil típico da liberação de neurotransmissores marcados com indicação dos parâmetros de cálculo B_1 , B_2 , S_1 e S_2

3.2.5 – Agentes de estímulo

Inicialmente foram realizados ensaios com os agonistas de receptores de glutamato em diferentes concentrações visando obter as curvas concentração X efeito para as liberações de DA e Ach. Os agonistas e as doses ensaiadas estão na tabela 1.

Os resultados da liberação fracional para cada agonista será analisado pelo modelo de regressão não linear/equação sigmoidal dose X resposta pelo software GraphPad Prisma. Com este tratamento matemático será possível obter a EC 50 de

cada agonista, para DA e Ach e utilizaremos estas concentrações para os ensaios subseqüente.

$$Y = V_{\min} + \frac{(V_{\max} - V_{\min})}{1 + 10^{\log EC_{50} - X}}$$

sendo : Y: Liberação fracional neurotransmissor marcado

V_{min}: Valor mínimo de Y

V_{max}: Valor máximo de Y

Log EC₅₀: Valor de X quando a resposta esta entre o max e o min de Y.

Tabela 1 – Agonistas de receptores de glutamato e suas concentrações

Acido quisquálico log [M]	AMPA log [M]	Ácido kaínico log [M]	NMDA log [M]	Glutamato log [M]
-6,0	-7,0	-6,0	-6,0	-6,0
-5,0	-6,0	-5,0	-5,5	-5,0
-4,0	-5,0	-4,0	-5,0	-4,0
-3,5	-4,0	-3,5	-4,5	-3,3
-3,0	-3,0	-3,0	-4,0	-3,0
-2,0	-2,0	-2,0	-3,5	-2,0
			-3,0	

3.2.6 – Agentes farmacológicos

Os próximos experimentos foram com os agentes farmacológicos, utilizando as concentrações esquematizadas na tabela 2 e os agonistas de receptores de glutamato como estímulos.

Alguns agentes farmacológicos (drogas caracterizadas quimicamente com atividade farmacológica e mecanismo de ação conhecidos) foram adicionados ao meio de perfusão na 8ª coleta e permaneceram até a 15ª .

Os agentes escolhidos e a dose em que cada um foi utilizado, estão na tabela 2. Nestes ensaios as concentrações dos agentes farmacológicos basearam-se em dados da literatura (também listados na tabela 2).

Tabela 2 - Agentes farmacológicos e agonistas de receptores de glutamato utilizados para o estudo.

	NT	AG.ESTÍMULO	AG.FARMACOLOGICO	REFS*
AF1	Dopamina	Glu 500 μ M	Glicina (1 μ M)	1
AF2	Dopamina	Glu 500 μ M	Magnésio (1,2 mM)	2
AF3	Acetilcolina	Glu 500 μ M	Glicina (1 μ M)	1
AF4	Acetilcolina	Glu 500 μ M	Magnésio (1,2 mM)	2
AF5	Acetilcolina	Glu 500 μ M	Tetrodotoxina (1 μ M)	3
AF6	Acetilcolina	Glu 500 μ M	AP5 (100 μ M)	4
AF7	Dopamina	NMDA 100 μ M	Glicina (1 μ M)	1
AF8	Dopamina	NMDA 100 μ M	Magnésio (1,2 mM)	2
AF9	Acetilcolina	NMDA 100 μ M	Glicina (1 μ M)	1
AF10	Acetilcolina	NMDA 100 μ M	Magnésio (1,2 mM)	2
AF11	Acetilcolina	NMDA 100 μ M	Tetrodotoxina (1 μ M)	3
AF12	Acetilcolina	NMDA 100 μ M	AP5 (100 μ M)	4
AF13	Acetilcolina	NMDA 100 μ M	MK-801 (100 μ M)	5
AF14	Acetilcolina	Ac.quisquálico 300 μ M	Glicina (1 μ M)	1
AF15	Acetilcolina	Ac.quisquálico 300 μ M	Tetrodotoxina (1 μ M)	3
AF16	Acetilcolina	Ac.quisquálico 300 μ M	Magnésio (1,2 mM)	2
AF17	Acetilcolina	Ac.quisquálico 300 μ M	MK-801 (100 μ M)	5
AF18	Acetilcolina	Ac.quisquálico 300 μ M	AP5 (100 μ M)	4
AF19	Acetilcolina	Ac.quisquálico 300 μ M	MCPG (100 μ M)	6
AF20	Acetilcolina	Ac.kaínico 300 μ M	Glicina (1 μ M)	1
AF21	Acetilcolina	Ac.kaínico 300 μ M	Tetrodotoxina (1 μ M)	3
AF22	Acetilcolina	Ac.kaínico 300 μ M	Magnésio (1,2 mM)	2
AF23	Acetilcolina	Ac.kaínico 300 μ M	MK-801 (100 μ M)	5
AF24	Acetilcolina	Ac.kaínico 300 μ M	AP5 (100 μ M)	4
AF25	Acetilcolina	AMPA 1mM	Magnésio (1,2 mM)	2
AF26	Acetilcolina	AMPA 1mM	Tetrodotoxina 1 μ M	3

* Referências: 1 - FORRAY e col, 1995, 2 - MARIEN e col, 1983, 3 - DOBREV e col, 1998, 4 - WANG e col, 1997, 5 - CAMILLO e col, 1995, 6 - THOMAS e col, 2000

4. RESULTADOS

4.1 – Agentes de estímulo: Determinação da EC₅₀

As curvas obtidas para a liberação de DA e Ach frente aos vários agonistas de receptores de glutamato estão na figura 2.

Tanto o ácido quisquálico como o ácido kaínico foram capazes de induzir a liberação de acetilcolina neste modelo experimental, com EC₅₀ de 368 μ M e 282 μ M respectivamente.

O Ka e Quis não foram capazes de estimular a liberação de dopamina. Já o glutamato e o NMDA foram capazes de estimular a liberação de ambas, acetilcolina e dopamina (Fig 1C e 1D). O EC₅₀ obtido foi 33 μ M de NMDA para liberação de acetilcolina e 213 μ M para liberação de dopamina. Para o ácido glutâmico, os valores de EC₅₀ foram muito próximos (EC₅₀ = 400 μ M para liberação de acetilcolina e EC₅₀ = 500 μ M para liberação de dopamina).

ANEXO 7 - TABELAS CONTENDO OS DADOS DE AJUSTE DAS CURVAS OBTIDOS PARA CADA UM DOS AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS

ACETILCOLINA

Equation	Guaranito	INIDA	Quilualetto	Kamato
Equation Variables	BOTTOM TOP LOGEC50 EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 EC50	BOTTOM TOP LOGEC50 EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 EC50	BOTTOM TOP LOGEC50 EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 EC50	BOTTOM TOP LOGEC50 EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 EC50
95% Confidence Intervals	-0.005611 2.311 -3.321 0.0000015 0.08714 0.09904 0.08292	-0.002063 2.866 -4.486 3.265e-005 0.1808 0.1909 0.1527	0.06238 2.305 -3.368 0.0064000 0.1266 0.09143	0.1213 2.421 -3.523 0.002997 0.1108 0.1330 0.09561
Goodness of Fit	-0.1855 to 0.1742 2.107 to 2.516 -3.682 to -3.360 0.0002033 to 0.0004771	-0.3782 to 0.3741 2.689 to 3.263 -4.804 to -4.168 1.372e-005 to 6.784e-005	-0.1430 to 0.2678 2.047 to 2.562 -3.544 to -3.212 0.0002807 to 0.0006138	-0.1866 to 0.3482 2.147 to 2.694 -3.720 to -3.327 0.0001806 to 0.0004712
Degrees of Freedom	24	21	34	26
Absolute Sum of Squares	0.9412	0.8934	0.8670	0.8903
Sy.x	1.049	2.806	2.791	1.802
Residuals	0.2091	0.3523	0.2865	0.2633
Points above curve	13	6	18	14
Points below curve	14	16	18	15
Number of runs	14	9	19	15
P value (runs test)	0.5056	0.1556	0.5000	0.5000
Deviation from Model	Not Significant	Not Significant	Not Significant	Not Significant
Data	9	6	9	9
Number of X values	16	16	16	16
Number of Y replicates	27	24	37	29
Total number of values	117	104	107	115
Number of missing values				

DOPAMINA

Equation	Guaranito	INIDA	Quilualetto	Kamato
Equation Variables	BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50	BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50	BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50	BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50 Std. Error BOTTOM TOP LOGEC50 HILLSLOPE EC50
95% Confidence Intervals	-0.1387 1.990 -3.27 0.6530 0.0002970 0.1324 0.2310 0.1441 0.3297	0.6745 3.068 -3.857 3.282 0.0002202 0.2166 0.5048 0.1285 1.634	0.1275 0.9075 -3.530 12.72 0.0002950 0.2807 0.2065 36.53 47960	-0.008337 0.2680 -3.957 10.75 0.0001104 0.08018 0.08018 61.41 14650
Goodness of Fit	-0.4656 to 0.1802 1.495 to 2.485 -3.836 to -3.218 0.2459 to 1.660 0.0001457 to 0.0006051	0.2099 to 1.109 1.987 to 4.152 -3.933 to -3.382 -0.2521 to 6.757 0.0001167 to 0.0004154	-0.5593 to 0.8143 0.4023 to 1.413 -92.91 to 85.85 -117400 to 117400	-0.1783 to 0.1616 0.09802 to 0.4580 -134.1 to 126.2 -31040 to 31060
Degrees of Freedom	14	14	6	15
Absolute Sum of Squares	0.9039	0.7374	0.5567	0.3412
Sy.x	0.8255	3.164	0.9712	0.8171
Residuals	0.2434	0.4754	0.4023	0.1964
Points above curve	6	7	5	8
Points below curve	10	11	5	12
Number of runs	8	7	6	12
P value (runs test)	0.2514	0.1448	0.9603	0.8174
Deviation from Model	Not Significant	Not Significant	Not Significant	Not Significant
Data	9	8	9	5
Number of X values	10	10	10	10
Number of Y replicates	16	18	10	10
Total number of values	72	62	80	70
Number of missing values				

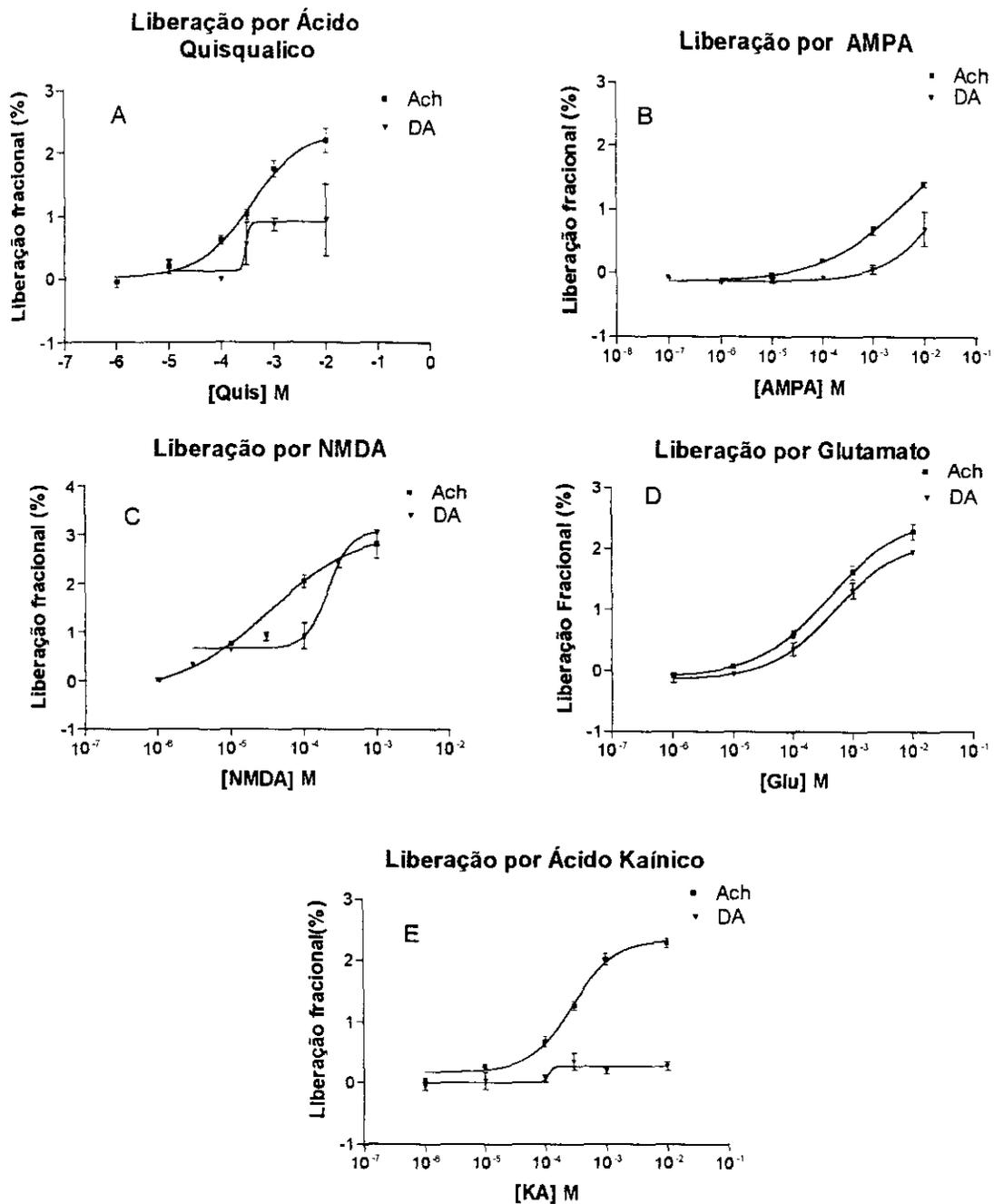


Figura 2 . Curvas concentração x efeito para liberação de dopamina ou de acetilcolina ocorrida frente a varias concentrações de agentes de estímulo de receptores de glutamato: ácido quisqualico (A), AMPA (B), NMDA (C), glutamato (D) e ácido káínico (E).

O estímulo com AMPA também causou liberação de dopamina e acetilcolina com o valor de EC_{50} para dopamina de 178 μ M e para acetilcolina 4,2 μ M. (Fig 1 B).

Os ajustes utilizando o modelo de regressão não linear apenas não apresentaram parâmetros aceitáveis para a curva de liberação de DA estimulada por ácido quisquálico e ácido kaínico. Para as demais o coeficiente de correlação (R^2) ficou entre 0,73 e 0,94 e o desvio do modelo não foi significativo, portanto, o modelo de ajuste utilizado foi aceito (Anexo 1).

4.2 – Agentes farmacológicos

As ações dos agentes farmacológicos nos perfis de liberações de Ach ou Da foram acompanhados pelas diferenças entre as liberações dos canais controle (em azul) e das amostras (outras cores).

Os valores obtidos para a razão dos basais ($B2/B1$) e dos estímulos ($S2/S1$) estão contidos nas tabelas ao final de cada seqüência de experimentos com determinado agonista glutamatérgico.

AF1 – Dopamina/Glu 500 μ M/Glicina 1 μ M

A figura 2 mostra o efeito da adição de glicina 1 μ M sobre a liberação de dopamina por Glu 500 μ M.

Como pode ser observado, não houve diferença entre a liberação controle (apenas com o estímulo de ácido glutâmico) e a liberação na presença de glicina.

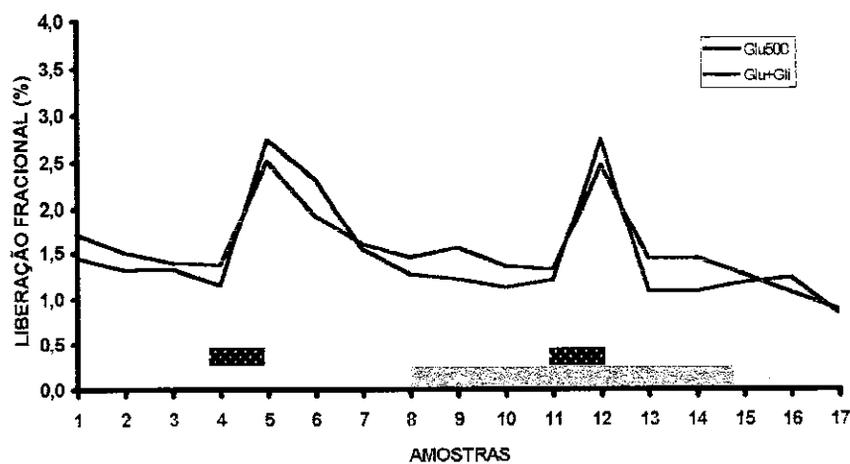


Figura 2 – Efeito da glicina 1 μ M sobre a liberação de [3 H] dopamina estimulada por ácido glutâmico. Legenda: glutamato ■■■ / glicina □□□

AF2 – Dopamina/Glu 500 μ M/ Magnésio 1,2 mM

A figura 3 mostra o efeito da adição de magnésio no meio de perfusão (a partir da 8ª coleta). É evidente o bloqueio da resposta do estímulo de glutamato para a liberação de dopamina frente estímulo com ácido glutâmico.

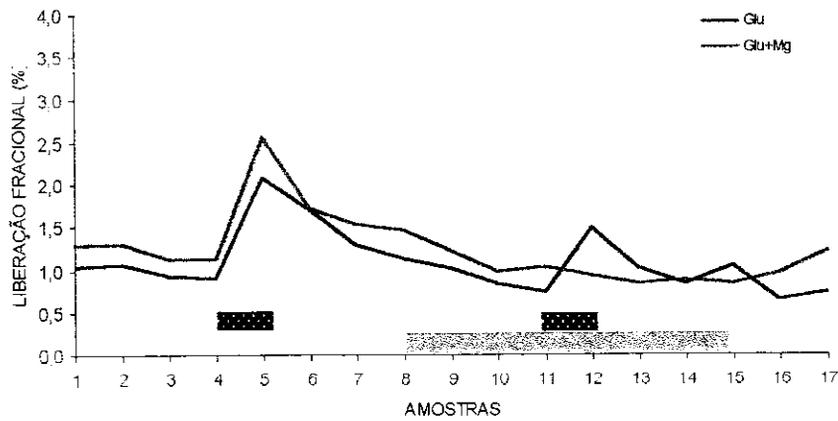


Figura 3. Efeito do magnésio 1,2 mM sobre a liberação de dopamina estimulada por ácido glutâmico. Legenda: glutamato ■■■ / magnésio ■■■■

AF3. Acetilcolina/ Glu 500 μ M/ Glicina 1 μ M

A figura 4 apresenta o perfil de liberação de acetilcolina após adição de glicina. Neste caso, também não foi observado alteração nas liberações basais e estimuladas.

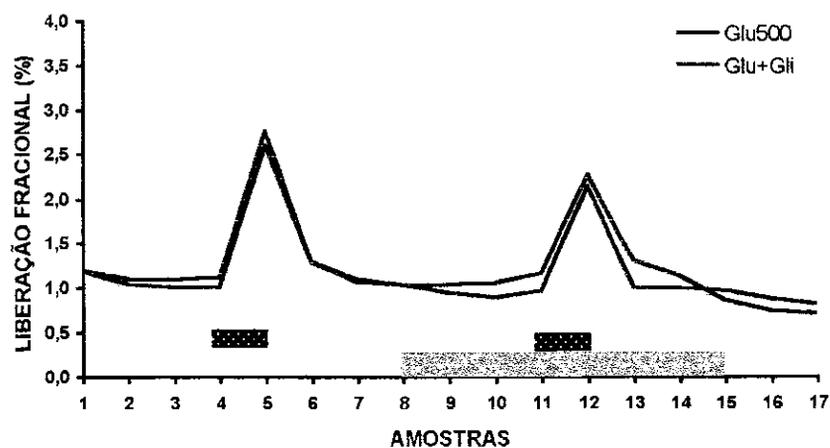


Figura 4. - Efeito da glicina $1 \mu M$ sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido glutâmico. Legenda: glutamato ■ / glicina ▨

AF4 – Acetilcolina/ Glu $500 \mu M$ / Magnésio $1,2 mM$

A figura 5 mostra o perfil de liberação de dopamina, na avaliação do efeito de bloqueio do estímulo induzido por magnésio. Com a adição do magnésio foi observado uma redução imediata da liberação basal. Com a retirada do magnésio ocorreu a reversão do efeito com retorno ao nível basal inicial. Observou-se ainda que o Mg^{2+} não bloqueou completamente o estímulo por glutamato.

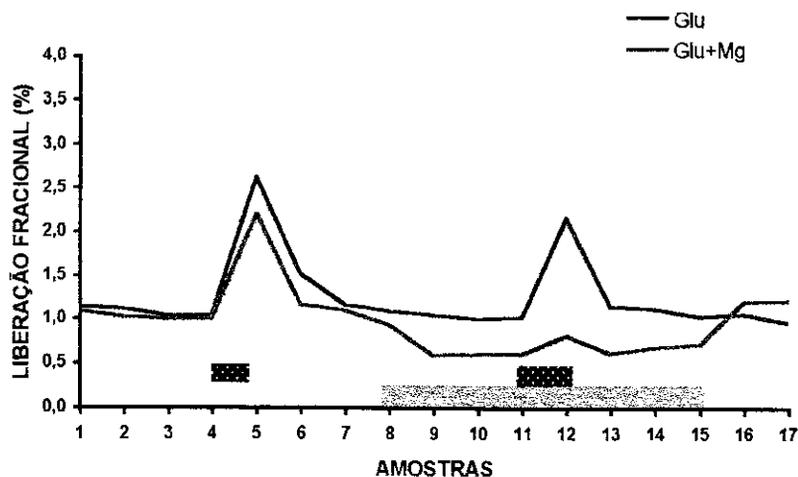


Figura 5. Efeito do magnésio 1,2 mM sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido glutâmico. Legenda: glutamato  / magnésio 

AF5 – Acetilcolina/ Glu 500 μ M/ Tetrodotoxina 1 μ M

A figura 6 apresenta o efeito de bloqueio produzido pela tetrodotoxina 1 μ M na resposta ao estímulo de glutamato para liberação de acetilcolina.

Com a introdução da toxina, foi observado uma redução da liberação basal. Com a saída da tetrodotoxina ocorreu o retorno ao basal inicial.

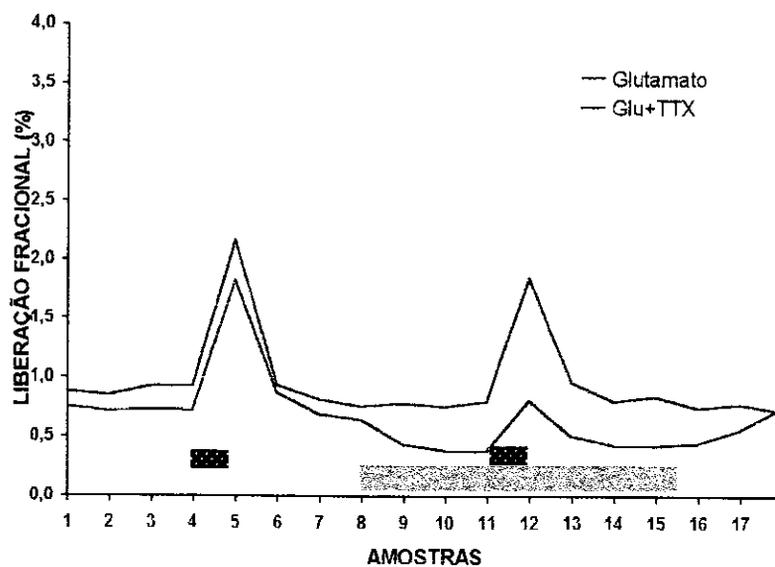


Figura 6. Efeito da tetrodotoxina 1 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido glutâmico. Legenda: glutamato  / TTx 

AF6. Acetilcolina/ Glu 500 μ M/ AP5 100 μ M

A figura 7 mostra o efeito da adição de AP5 100 μ M. Este agente farmacológico não causou altera es nas libera es de acetilcolina basais ou estimuladas para glutamato.

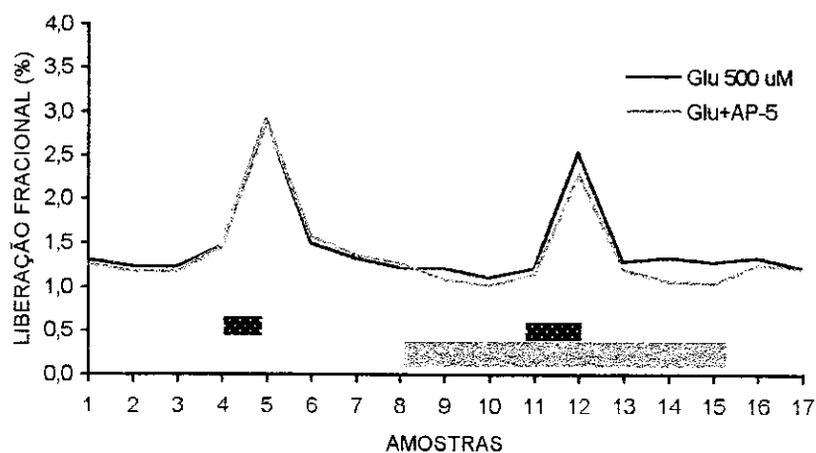


Figura 7. Efeito de AP5 100 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido glutâmico. Legenda: glutamato / AP5

Tabela 3: Valores das m dias e desvio padrão para as rela o B2/B1 e S2/S1 dos experimentos envolvendo ácido glutâmico como agonista.

NT/Est/Cond		Média	Média
		B2/B1	S2/S1
DA/Glu/Gli	controle	0,92 \pm 0,07	0,78 \pm 0,14
	teste	0,89 \pm 0,06	0,81 \pm 0,27
DA/Glu/Mg ²⁺	controle	0,76 \pm 0,14	0,69 \pm 0,30
	teste	0,83 \pm 0,16	-0,01 \pm 0,24
Ach/Glu/Gli	controle	0,91 \pm 0,01	0,76 \pm 0,02
	teste	1,03 \pm 0,07	0,68 \pm 0,03
Ach/Glu/Mg ²⁺	controle	0,94 \pm 0,09	0,79 \pm 0,15
	teste	0,58 \pm 0,04	0,15 \pm 0,05
Ach/Glu/TTx	controle	0,89 \pm 0,02	0,83 \pm 0,04
	teste	0,51 \pm 0,06	0,39 \pm 0,00
Ach/Glu/AP5	controle	0,93 \pm 0,12	0,82 \pm 0,08
	teste	0,91 \pm 0,02	0,69 \pm 0,02
N = 2 a 4			

A tabela 3 apresenta os valores de compara o das libera es basais (B2/B1) e estimuladas (S2/S1) relativas as figuras 1 a 7

AF7. Dopamina/ NMDA 100 μ M/ Glicina 1 μ M

Na figura 8 não foi observado diferenças entre as liberações controle com estímulo de NMDA e as obtidas na presença de glicina 1 μ M.

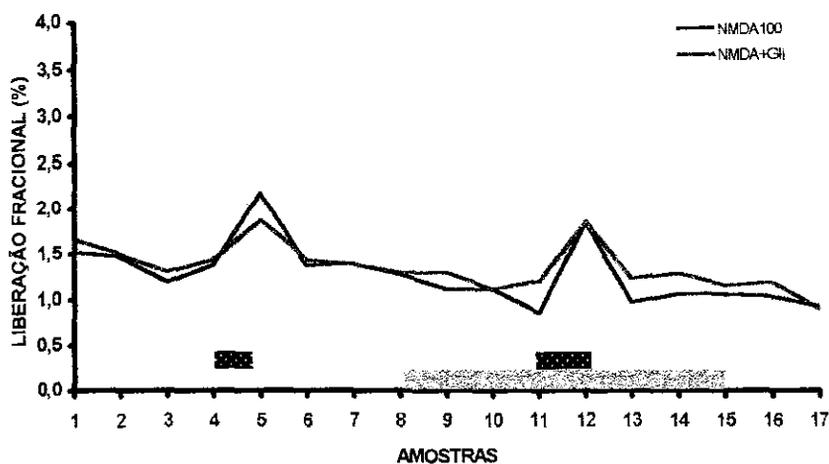


Figura 8. – Efeito da glicina 1 μ M sobre a liberação de dopamina estimulada por NMDA. Legenda: NMDA [linha contínua] / glicina [linha tracejada]

AF8-. Dopamina/ NMDA 100 μ M/ Magnésio 1,2 mM

Na figura 9 observa-se que o magnésio bloqueia a liberação de dopamina estimulada por NMDA.

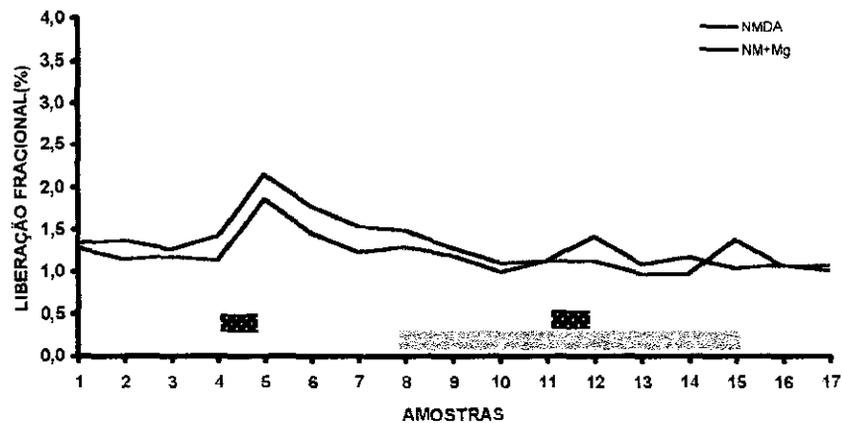


Figura 9. - Efeito do magnésio 1,2 mM sobre a liberação de dopamina estimulada por NMDA. Legenda: NMDA ■■■ / magnésio ■■■■

AF9. Acetilcolina/ NMDA 100 μM/ Glicina 1 μM

Na figura 10 não foi observada alteração na liberação de acetilcolina após adição de glicina. Resultado semelhante ao obtido para dopamina.

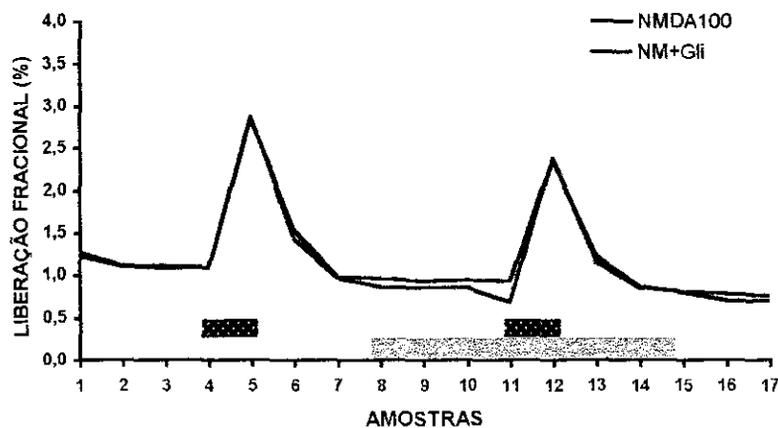


Figura 10. Efeito da glicina 1 μM sobre a liberação de acetilcolina estimulada por NMDA. Legenda: NMDA ■■■ / glicina ■■■■

AF10. Acetilcolina/ NMDA 100 μ M/ Magnésio 1,2 mM

A figura 11 evidencia a redução do basal logo após a adição do magnésio, assim como o bloqueio da liberação estimulada por NMDA. Com a saída do magnésio ocorre a volta ao basal inicial.

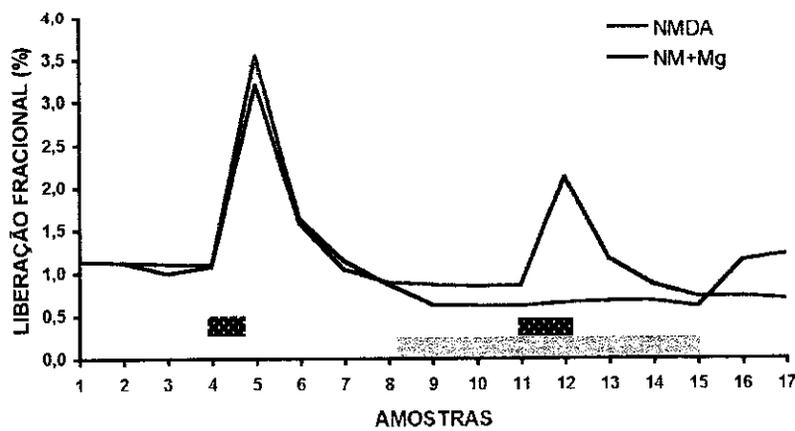


Figura 11. Efeito do magnésio 1,2 mM sobre a liberação de acetilcolina estimulada por NMDA. Legenda: NMDA ■■■ / magnésio ▨▨▨

AF11. Acetilcolina/ NMDA 100 μ M/ Tetrodotoxina 1 μ M

Na figura 12 observa-se uma redução do basal logo após a adição da tetrodotoxina(8ª coleta) ao meio de perfusão e um bloqueio parcial da resposta ao estímulo por NMDA.

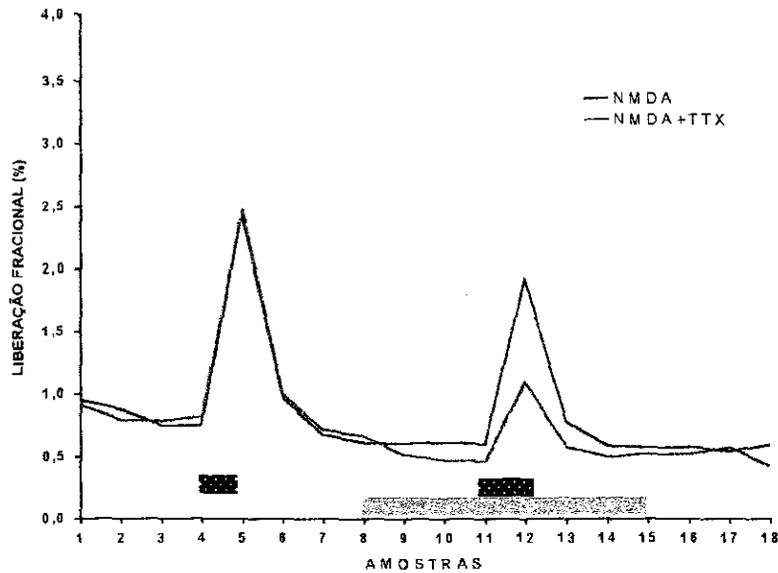


Figura 12. Efeito da tetrodotoxina $1 \mu M$ sobre a liberação de acetilcolina estimulada por NMDA. Legenda: NMDA / TTx

AF12. Acetilcolina/ NMDA $100 \mu M$ / AP5 $100 \mu M$

A figura 13 mostra que a adição de AP5 ao meio de perfusão não causou alterao do basal, porém houve um bloqueio parcial da resposta ao estímulo por NMDA.

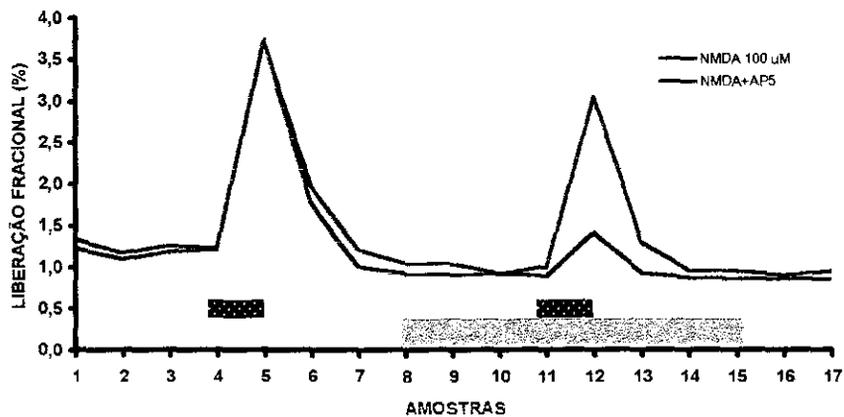


Figura 13. Efeito de AP5 $100 \mu M$ sobre a liberação de acetilcolina estimulada por NMDA. Legenda: NMDA / AP5

AF13. Acetilcolina/ NMDA 100 μ M / MK-801 100 μ M

A figura 14 mostra que a adição de MK-801 causou reduo na liberao basal e bloqueio total da resposta ao estímulo por NMDA..

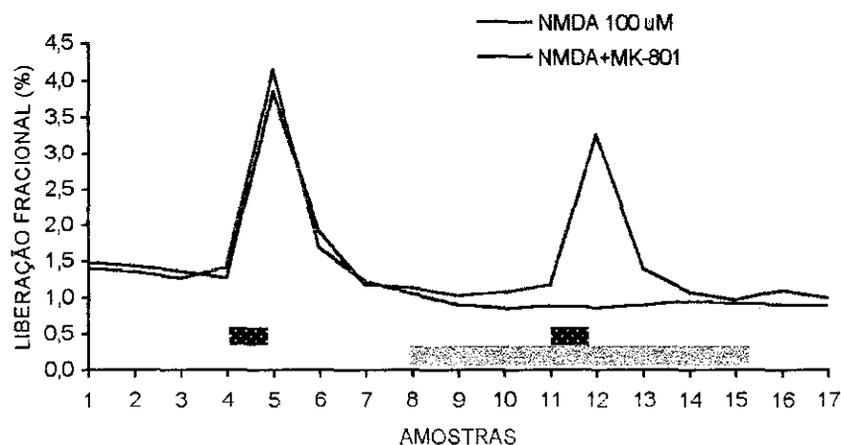


Figura 14. Efeito de MK-801 100 μ M sobre a liberao de acetilcolina estimulada por NMDA. Legenda: NMDA [caixa preta] / MK-801 [caixa hachurada]

A tabela 4 relaciona os valores da razão comparativa entre as liberaes basais (B2/B1) e estimuladas por NMDA (S2/S1). Estes valores expressam quantitativamente a ao dos diversos agentes farmacológicos estudados nas liberaes de dopamina e acetilcolina (figuras 8 a 14).

Tabela 4. Valores das médias e desvio padrão para as relação B2/B1 e S2/S1 dos experimentos envolvendo NMDA como agonista.

NT/Est/Cond.		Média B2/B1	Média S2/S1
DA/NMDA/Gli	controle	0,64±0.32	0,68±0.34
	teste	0,82±0.02	1,78±0.86
DA/NMDA/Mg ²⁺	controle	0,93±0.15	0,70±0.75
	teste	0,84±0.06	-0,04±0.09
Ach/NMDA/Gli	controle	0,58±0.27	0,97±0.16
	teste	0,82±0.01	0,83±0.04
Ach/NMDA/ Mg ²⁺	controle	0,80±0.04	0,58±0.19
	teste	0,56±0.01	0,01±0.00
Ach/NMDA/TTx	controle	0,76±0.08	0,82±0.02
	teste	0,55±0.04	0,29±0.12
Ach/NMDA/AP5	controle	0,80±0.02	0,83±0.02
	teste	0,75±0.08	0,21±0.00
Ach/NMDA/MK	controle	0,85±0.02	0,86±0.09
	teste	0,65±0.01	-0,01±0.01
N = 2 a 4			

AF14. Acetilcolina/ Acido quisqualico 300 μ M/ glicina 1 μ M

A figura 14 apresenta o perfil de liberação de acetilcolina na presença de glicina. Observou-se que não ocorreu alteração.

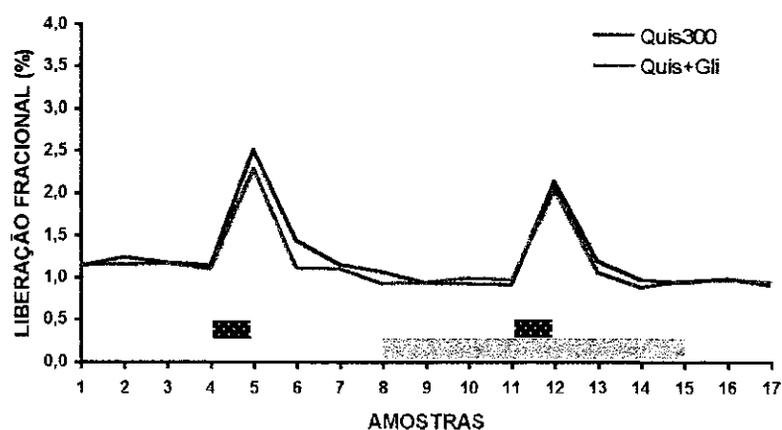


Figura 15. Efeito da glicina 1 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ác. Quisquálico. Legenda: Quis / glicina

AF15. Acetilcolina/ Acido quisquálico 300 μ M/ tetrodotoxina 1 μ M

A figura 16 mostra que com a adição de tetrodotoxina ao meio de perfusão ocorreu o bloqueio da liberação basal e bloqueio parcial da resposta do estímulo por ácido quisquálico.

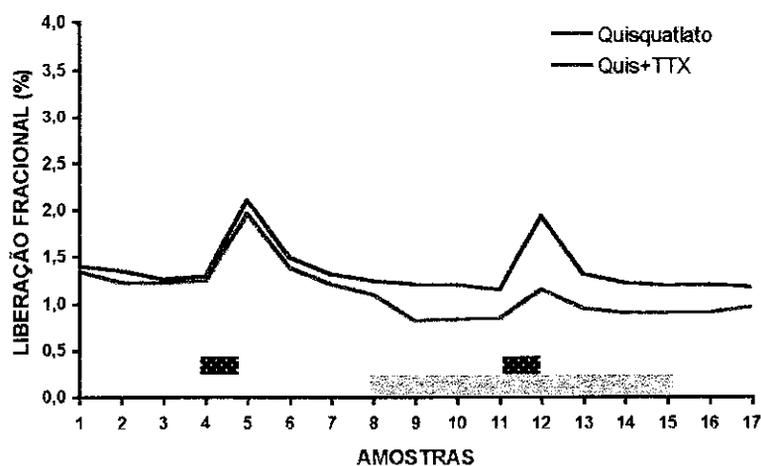


Figura 16. Efeito da tetrodotoxina 1 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ác. Quisquálico. Legenda: Quis  / TTx 

AF16. Acetilcolina/ Acido quisquálico 300 μ M/ Magnésio 1,2 mM

Na figura 17 observa-se que o magnésio 1,2 mM bloqueia totalmente a liberação de acetilcolina estimulada por ácido quisquálico.

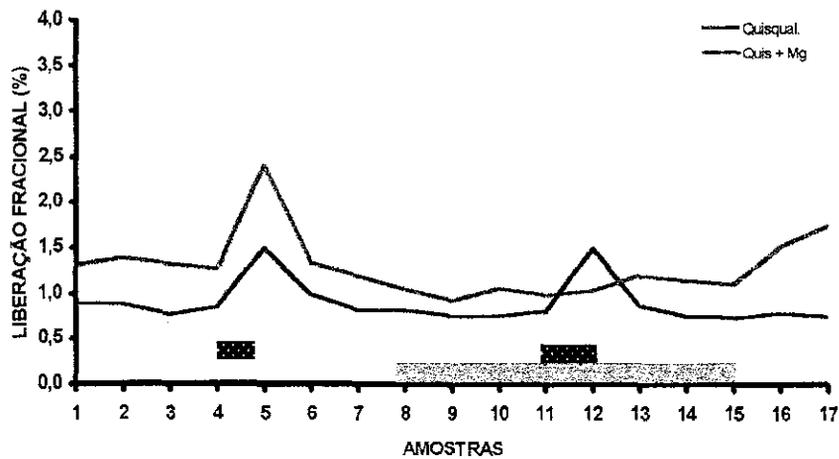


Figura 17. Efeito do magnésio 1,2 mM sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ác. Quisquálico. Legenda: Quis / magnésio

AF17. Acetilcolina/ Acido quisquálico 300 μ M/ MK801 100 μ M

A figura 18 mostra que com a adição do MK-801 não houve alteração das liberações basal ou estimulada.

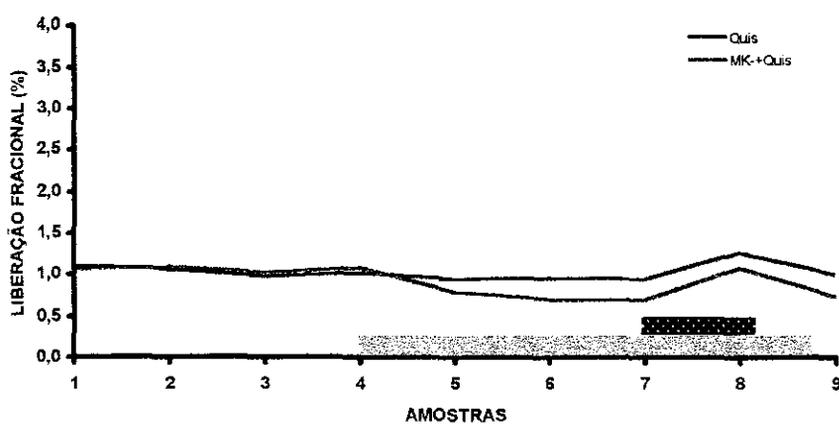


Figura 18. Efeito de MK801 100 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ác. Quisquálico. Legenda: Quis / MK-801

AF18. Acetilcolina/ Acido quisquálico 300 μ M/ AP5 100 μ M

A figura 19 evidencia que a adição de AP5 ao meio de perfusão não ocasionou alterações significantes das liberações basal ou estimulada.

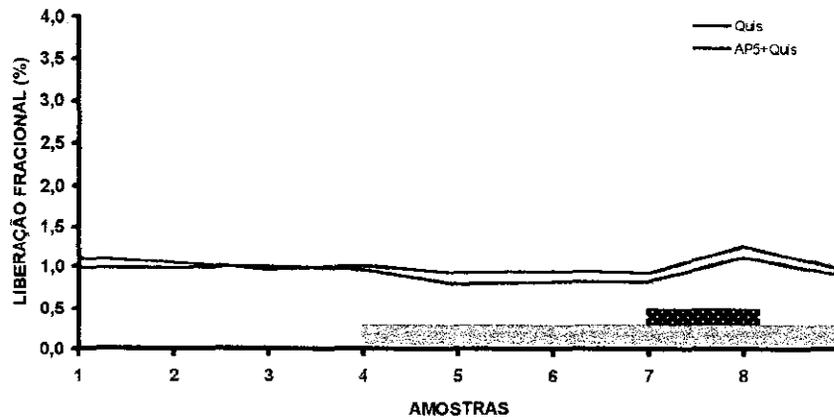


Figura 19. Efeito de AP5 100 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ác. Quisquálico. Legenda: Quis ■■ / AP5 ▨▨

AF19. Acetilcolina/ Acido quisquálico 300 μ M / MCPG 100 μ M

A figura 20 mostra que o perfil de liberação de acetilcolina por ácido quisquálico não foi alterado pela adição de MCPG.

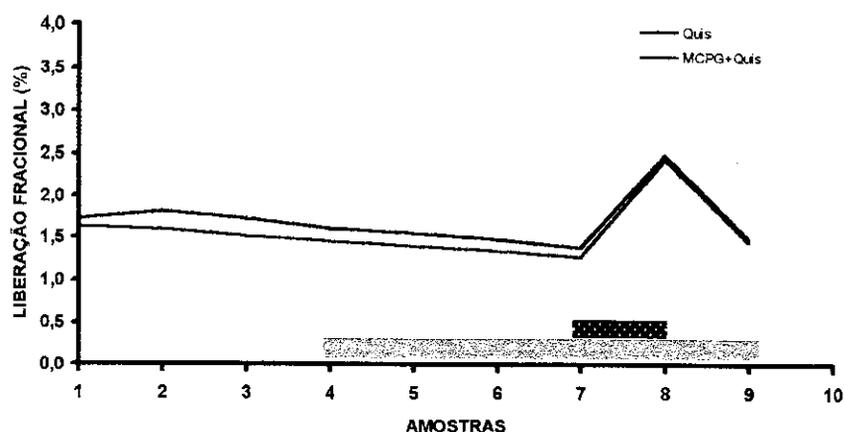


Figura 20. Efeito de MCPG $100 \mu M$ sobre a liberação de acetilcolina estimulada por  c. Quisquálico. Legenda: Quis / MCPG

A tabela 5 relaciona os valores comparativos para as altera es nos basais (B2/B1) e nas respostas aos estímulos por ácido quisquálico (S2/S1) na presença de diferentes agentes farmacológicos (figuras 15 a 20)

Tabela 5. Valores das m dias e desvio padrão para as rela o B2/B1 e S2/S1 dos experimentos envolvendo ácido quisquálico como agonista.

NT/Est/Cond.		Média	Média
		B2/B1	S2/S1
Ach/Quis/Gli	controle	0.78±0.08	1.00±0.43
	teste	0.84±0.06	1.35±0.24
Ach/Quis/TTx	controle	0.87±0.03	0.96±0.11
	teste	0.67±0.03	0.52±0.26
Ach/Quis/ Mg ²⁺	controle	0.93±0.10	1.13±0.29
	teste	0.69±0.07	0.05±0.04
Ach/Quis/MK	controle	0.91±0.05	N/D
	teste	0.68±0.01	N/D
Ach/Quis/AP5	controle	0.91±0.05	N/D
	teste	0.83±0.01	N/D
Ach/Quis/MCPG	controle	0.87±0.00	N/D
	teste	0.86±0.02	N/D
N = 2 a 4			

AF20. Acetilcolina/ Acido kaínico 300 μ M/ Glicina 1 μ M

A figura 21 mostra o perfil de liberação de acetilcolina na presença e ausência da glicina. Observa-se que não ocorreram interferências nas liberações basais ou estimuladas por ácido kaínico.

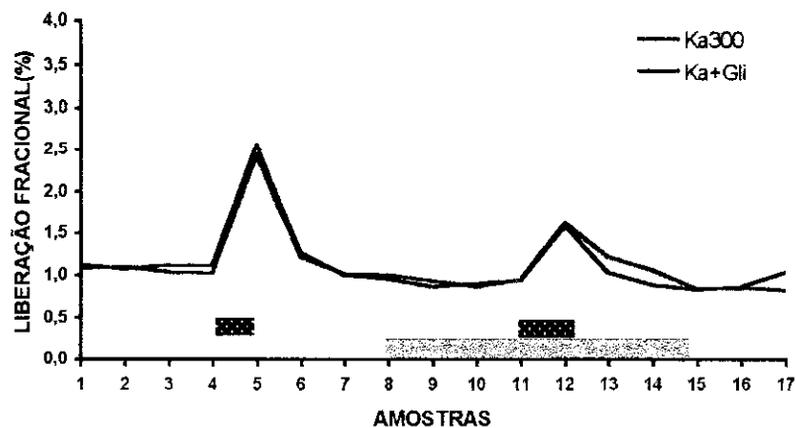


Figura 21. Efeito da glicina 1 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ác. Kaínico. Legenda: Ka / glicina

AF21. Acetilcolina/ Acido kaínico 300 μ M/ Tetrodotoxina 1 μ M

Na figura 22 observa-se o efeito de bloqueio ocasionado pela adição da tetrodotoxina ao meio de perfusão na 8ª coleta. O bloqueio foi observado na liberação basal e ocorreu parcialmente na resposta ao estímulo.

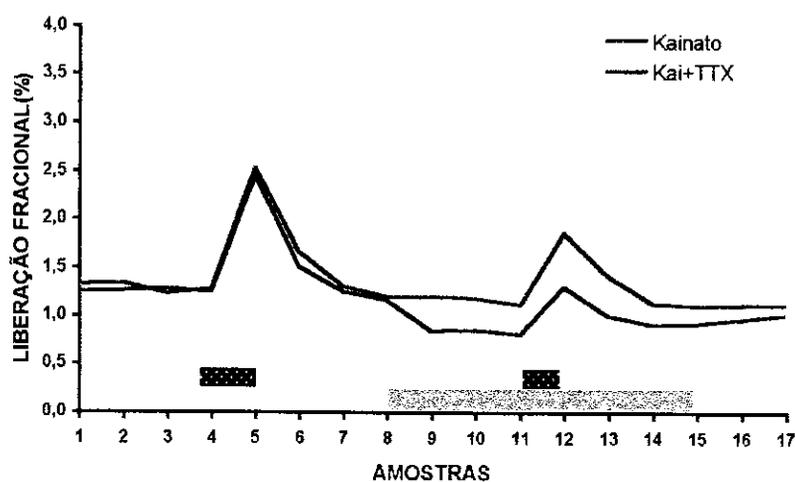


Figura 22. Efeito da tetrodotoxina 1 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por c. Kaínico. Legenda: Ka ■■ / TTx ■■■■

AF22. Acetilcolina/ Acido kaínico 300 μ M/ Magnésio 1,2 mM

Na figura 23 observa-se que o magnésio bloqueou parcialmente a liberação de acetilcolina estimulada por ácido kaínico.

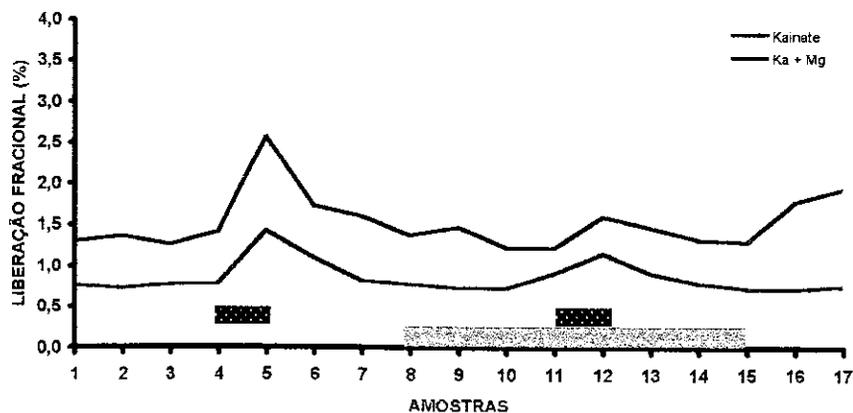


Figura 23. Efeito do magnésio 1,2 mM sobre a liberação de acetilcolina estimulada por c. Kaínico. Legenda: Ka ■■ / magnésio ■■■■

AF23. Acetilcolina/ Acido kaínico 300 μ M/ MK801 100 μ M

A figura 24 mostra que não houveram alterações das liberações basal ou estimulada, após a adição de MK-801.

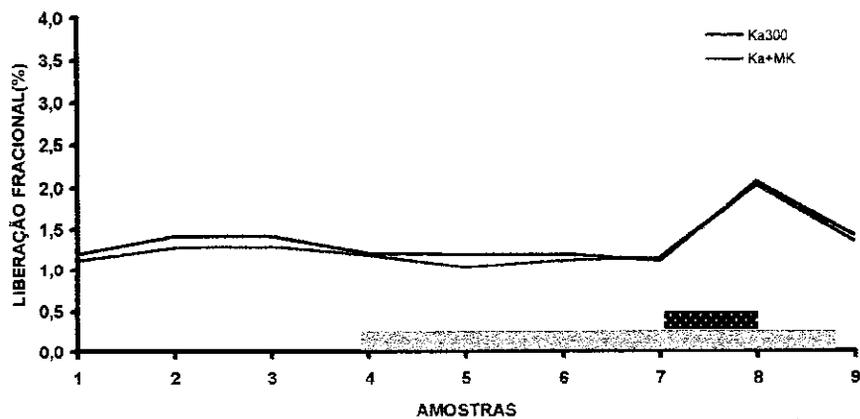


Figura 24. Efeito de MK801 100 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido kaínico. Legenda: Ka  / MK-801 

AF24. Acetilcolina/ Acido kaínico 300 μ M/ AP5 100 μ M

A figura 25 mostra que não houveram alterações das liberações basal ou estimulada, após a adição de AP5 ao meio de perfusão.

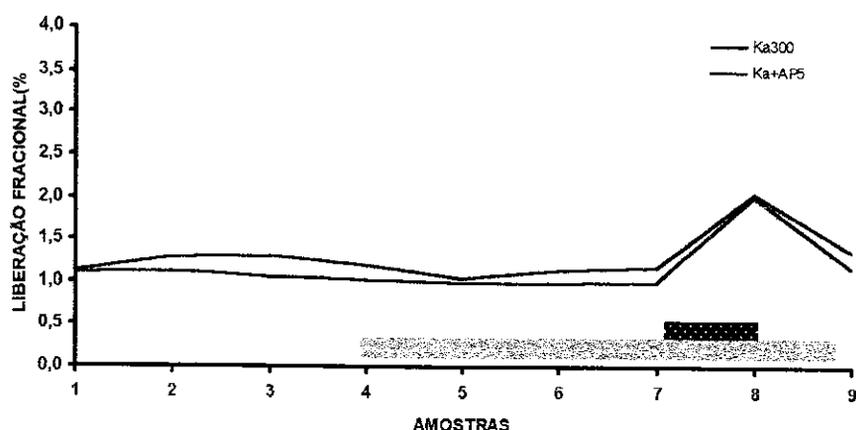


Figura 25. Efeito de AP5 100 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por cido Ka300. Legenda: Ka300 / AP5

A tabela 6 apresenta os valores comparativos para as alterações nos basais (B2/B1) e nas respostas aos estímulo por ácido ka300 (S2/S1) na presença de diferentes agentes farmacológicos (figuras 21 a 25)

Tabela 6. Valores das mdias e desvio padrão para as relação B2/B1 e S2/S1 dos experimentos envolvendo ácido ka300 como agonista.

NT/Est/Cond.		Média B2/B1	Média S2/S1
Ach/Ka/Gli	controle	0,74±0.23	0.86±0.53
	teste	0,85±0.05	0.45±0.17
Ach/Ka/TTx	controle	0.83±0.09	0.62±0.11
	teste	0.60±0.04	0.34±0.12
Ach/Ka/ Mg ²⁺	controle	0.92±0.06	0.63±0.00
	teste	0.89±0.05	0.29±0.15
Ach/Ka/MK	controle	0.91±0.00	N/D
	teste	0.90±0.07	N/D
Ach/Ka/AP5	controle	0.91±0.00	N/D
	teste	0.93±0.08	N/D
N = 2 a 4			

AF25. Acetilcolina/ AMPA 1 mM / Magnésio 1,2 mM

A figura 26 mostra o bloqueio quase total da resposta ao estímulo de liberação de acetilcolina por AMPA. Não houve alteração no basal.

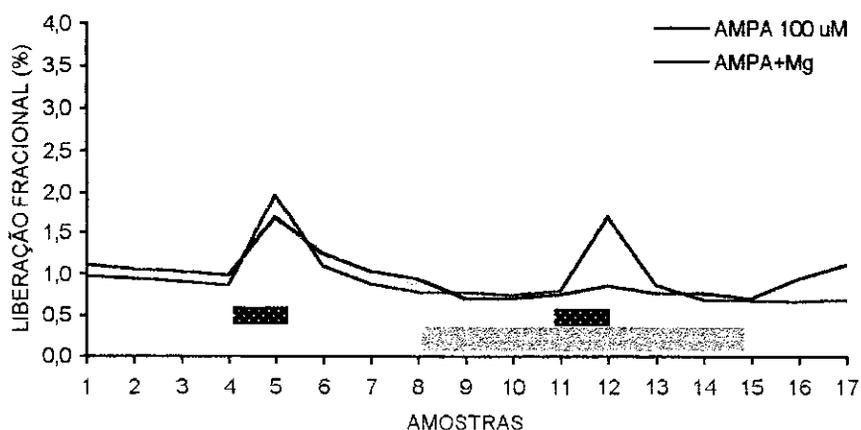


Figura 26. Efeito do magnésio 1,2 mM sobre a liberação de acetilcolina estimulada por AMPA. Legenda: AMPA  / magnésio 

AF26. Acetilcolina/ AMPA 1 mM / Tetrodotoxina 1 µM

Na figura 27 observa-se uma redução da liberação basal após a adição de tetrodotoxina e um bloqueio quase total à resposta ao estímulo por AMPA

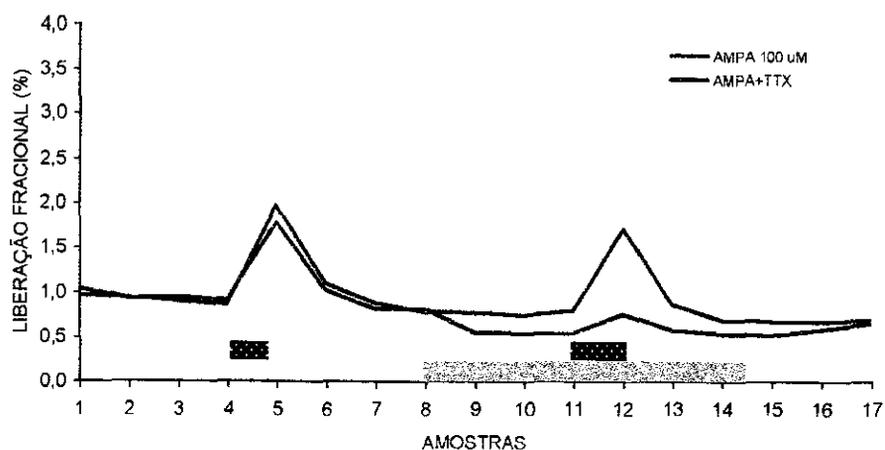


Figura 27. Efeito da Tetrodotoxina 1 μ M sobre a liberação de acetilcolina estimulada por AMPA. Legenda: AMPA / TTx

A tabela 7 apresenta os valores comparativos para as alteraçoes nos basais (B2/B1) e nas respostas aos estimos por AMPA (S2/S1) na presença de diferentes agentes farmacológicos (figuras 26 a 27)

Tabela 7. Valores das medias e desvio padrão para as relação B2/B1 e S2/S1 dos experimentos envolvendo AMPA como agonista.

NT/Est/Cond		Media	Media
		B2/B1	S2/S1
Ach/AMPA/ Mg ²⁺	controle	0.87±0.08	0.87±0.17
	teste	0.72±0.02	0.17±0.02
Ach/AMPA/TTx	controle	0.87±0.08	0.87±0.17
	teste	0.56±0.05	0.26±0.02
N = 2 a 4			

5. DISCUSSÃO

A ação de aminoácidos como neurotransmissores foi observada pela primeira vez na década de 50, quando o glutamato aplicado topicamente no córtex motor causou convulsão tônica (HAYASHI *apud* MICHAELIS, 1998, p. 370). Da década de 50 para os dias atuais o glutamato como neurotransmissor excitatório, assim como seus diferentes subtipos de receptores, foram amplamente estudados, como pode ser visto na INTRODUÇÃO deste trabalho.

O glutamato (principal neurotransmissor excitatório), da mesma maneira que o GABA (principal neurotransmissor inibitório), é distribuído de forma ampla e uniforme no Sistema Nervoso Central. Possui importantes papéis no metabolismo e na neurotransmissão controlada por enzimas transaminases que catalisam a conversão do glutamato e do alfa-oxoglutarato. A principal fonte de glutamato e aspartato é o ciclo de Krebs, mas a glutamina também atua como uma fonte alternativa.

A ação de substâncias sobre o sistema nervoso central pode ser avaliada pela interferência no padrão normal de liberação dos neurotransmissores; neste sentido o método escolhido foi adequado e sensível para evidenciar a ação de diversos agentes farmacológicos.

A medida da liberação de neurotransmissores por perfusão permite avaliar a interferência de agentes inibidores e estimuladores de maneira direta, sem a interposição de barreiras de difusão, como a barreira hematoencefálica. Os experimentos iniciais de liberação voltaram-se para estabelecer o padrão de

liberação e confirmar a presença de receptores de glutamato no estriado, da mesma forma que outros autores em estudos de distribuição, utilizando técnicas de autoradiografia, hibridização "in situ" e clonagem molecular de receptores de glutamato e suas subunidades, determinaram a presença destes receptores em regiões dos gânglios da base, mais especificamente no núcleo caudado-putamen. (SUBRAMANIAM & McGONIGLE, 1991; MONAGHAN e col.; 1989; MONAGHAN e col., 1984; OLSEN e col., 1987; WISDEN & SEEBURG, 1993; BAILEY e col., 2001).

Conforme apresentado na figura 2, as curvas de liberação de acetilcolina e dopamina decorrente de estímulos crescentes de agonistas glutamatérgicos, determinam a influência de receptores de glutamato e seus subtipos sobre a liberação destes neurotransmissores além de permitir a determinação da EC_{50} para os diferentes agonistas utilizados.

As curvas de liberação de acetilcolina estimulada por Kainato, Quis, AMPA e NMDA apresentaram valores aceitáveis de ajuste ao modelo utilizado sugerindo que estes subtipos de receptores de glutamato têm um papel no controle da liberação de acetilcolina.

Com os resultados da liberação de dopamina foi possível propor que esta é influenciada por receptores do tipo NMDA mas não os do tipo Kainato ou AMPA.

O glutamato atuou sobre as duas liberações produzindo curvas concentração X resposta bastante semelhantes para a liberação de dopamina e

acetilcolina; resultado este coerente com seu papel de agonista natural destes receptores.

Os dados obtidos com os agentes farmacológicos foram similares para os dois neurotransmissores. O primeiro AF estudado foi a glicina na resposta aos diversos agonistas glutamatérgicos. JOHNSON & ASCHER (1987) demonstraram a ação potenciadora da glicina sob os receptores tipo NMDA, utilizando cultura de neurônios cerebrais de camundongo. Mais tarde, concluiu-se que a glicina é necessária para ativação deste tipo de receptor e da abertura de seu canal iônico, agindo como um co-agonista. Este efeito é detectado em baixas concentrações, (EC_{50} de 0,1-0,7 μ M) e não é inibido pela estricnina, portanto, atuam em sítios de ligações diferentes (JOHNSON & ASCHER, 1987; KLECKNER & DINGLEDINE, 1988).

KLECKNER & DINGLEDINE (1988) demonstraram ainda que várias soluções usadas em experimentos em que não foi adicionado glicina, apresentaram mesmo assim uma concentração de 20-50 nM deste aminoácido, permitindo a resposta do receptor NMDA. Esta "contaminação" pode ser diminuída com o tratamento da vidraria com altas temperaturas. Neste caso ocorre a destruição da glicina e a ausência de resposta do receptor tipo NMDA.

Neste trabalho, observou-se que a glicina potencializou apenas a ação do NMDA. A atuação sobre os demais agonistas glutamatérgicos, não ocorreu talvez porque o tecido empregado já contenha as quantidades necessárias de glicina para o efeito máximo. Como esperado, o efeito da glicina sobre estímulos com agonistas de receptores AMPA e kainato não foi observado confirmando que esse

é um fenômeno exclusivo de receptores do tipo NMDA (JOHNSON & ASCHER, 1987).

Uma das principais propriedades apresentadas pelos receptores NMDA é a de serem bloqueados por íons magnésio. Este é um fenômeno dependente de voltagem, ou seja, ocorre quando a célula encontra-se em estado polarizado e desaparece quando ocorre despolarização (MAYER e col., 1984; NOWAK e col., 1984; BEKKERS & STEVENS, 1989). Esse bloqueio voltagem-dependente do magnésio atua como regulador neuronal negativo e a glicina como regulador positivo. Os receptores do tipo NMDA, ao contrário dos receptores AMPA e kainato, estão envolvidos em respostas excitatórias mais lentas, atuando no controle da plasticidade sináptica, através de um complexo efeito de controle da entrada de cálcio. O efeito de desbloqueio do receptor NMDA por parte do magnésio, faz parte de um importante evento relacionado aos receptores glutamatérgicos, principalmente o NMDA, que é o processo de potenciação de longo prazo, possivelmente relacionado com a memória e a aprendizagem.

Na atividade sináptica rápida, o glutamato ativa particularmente os receptores de AMPA sendo sua quantidade insuficiente para ativar os receptores metabotrópicos, estando os receptores de NMDA bloqueados pelo magnésio. Após uma série de estímulos, e uma despolarização sustentada, o glutamato em quantidade suficiente é liberado para ativar os receptores metabotrópicos, além de remover o bloqueio do Mg^{2+} com ativação do receptor NMDA e permitindo a entrada de Ca^{2+} na célula. Esta elevação intracelular de cálcio ativa as proteína-quinases aumentando a sensibilidade dos receptores AMPA que realizam o processo de transmissão normal. Os receptores metabotrópicos levam à

formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol, aumentando os níveis intracelulares de cálcio, com mais ativação da enzima proteína-quinase C, que participa na manutenção da potenciação de longa duração.

Em nossos experimentos observamos que o Mg^{2+} bloqueou a liberação de acetilcolina e dopamina quando estimuladas por glutamato e NMDA, confirmando as expectativas baseadas nos dados da literatura. (vide experimentos AF2, AF4, AF8 e AF10). Para o estímulo com o próprio glutamato observamos que o Mg^{2+} bloqueou totalmente a liberação de dopamina mas apenas bloqueou parcialmente a liberação de acetilcolina, devido, provavelmente a presença e atuação de receptores dos tipos Kainato e AMPA nos neurônios colinérgicos. Por vezes, notou-se uma queda na liberação basal após a entrada do magnésio em contato com o tecido, provavelmente devido a um desequilíbrio iônico do meio, uma vez que o Mg^{2+} compete com o Ca^{2+} . O Mg^{2+} não bloqueou a liberação de acetilcolina frente a estimulação de receptores de Kainato, como era esperado (vide experimento AF 22), promovendo apenas um bloqueio parcial.

No caso da estimulação de receptores tipo AMPA o que se esperava era a ineficácia do Mg^{2+} em bloquear o estímulo com ácido quisquálico e AMPA, mas o que ocorreu foi um bloqueio parcial da liberação de acetilcolina (vide experimento AF 16). Este resultado nos levou a aventar algumas hipóteses, sendo que neste trabalho avaliamos experimentalmente duas delas.

Uma das hipóteses foi que o ácido quisquálico estaria agindo na pré-sinapse liberando glutamato e este por sua vez estaria agindo como agente de estímulo e dessa forma sendo bloqueado pelo magnésio. Para verificar esta

possibilidade foram realizados experimentos utilizando antagonistas específicos de receptores NMDA:

- o MK-801 - um antagonista não competitivo que bloqueia o canal associado ao receptor, cujo efeito clássico pode ser visto no experimento AF13 e
- o AP-5 - um antagonista que compete pelo sítio de ligação do glutamato no receptor NMDA, bloqueando parcialmente a resposta ao estímulo por NMDA (experimento AF12).

No entanto, nenhum dos dois antagonistas foi capaz de bloquear a liberação estimulada pelo ácido quisquálico, descartando essa hipótese. (vide experimentos AF 17 e AF 18). Não foi possível notar o bloqueio da liberação estimulada por ácido glutâmico pelo AP5 talvez porque o glutamato também age nos outros subtipos de receptores glutamatérgicos (Vide experimentos AF 6). Estes antagonistas também não inibiram o estímulo por ácido kaínico (vide experimentos AF 23 e AF 24) talvez pelo mesmo motivo.

O ácido quisquálico além de ser um agonista ionotrópico, também é um potente agonista metabotrópico do grupo I. Deste modo, a utilização do MCPG um antagonista metabotrópico que age em receptores do grupo I e II (EATON e col., 1993; HAYASHI e col., 1994) permitiu avaliar se a liberação observada foi decorrente da estimulação de receptores metabotrópicos. Os resultados mostraram que o MCPG não foi capaz de antagonizar o estímulo por ácido quisquálico sobre a liberação de acetilcolina (vide experimento AF 19), contrariando assim a hipótese de envolvimento de receptores metabotrópicos nesta liberação.

Essa hipótese foi ainda descartada pelo fato do mesmo bloqueio ter sido observado quando utilizou-se o próprio AMPA como estímulo (experimento AF 25).

Outras possibilidades relacionadas a estes resultados, tais como as alterações do equilíbrio iônico entre o magnésio e o cálcio influenciando no processo de excitação assim como a participação do magnésio no processo de potenciação a longo prazo, onde há uma importante ligação entre receptores glutamatérgicos de vários tipos, estarão sendo verificadas em trabalho futuro.

Nos experimentos com liberação de acetilcolina, por estímulo sobre os receptores glutamatérgicos na presença de tetrodotoxina, houve uma queda na liberação basal e estimulada devido a ação da tetrodotoxina bloqueando os canais de Na^+ voltagem-dependente, impedindo o influxo de sódio e portanto a propagação dos impulsos nervosos pelo axônio (MEBS & HUCHO, 1990). A relação S2/S1 quando comparadas com os controles expressa uma diminuição de cerca de 50% para os estímulos com ácido glutâmico (experimento AF 5), ácido quisquálico (experimento AF 15) e ácido kaínico (experimento AF 21). Estes dados parecem indicar a presença de receptores de glutamato tanto no corpo celular quanto no terminal colinérgico.

Para os receptores do tipo AMPA e kainato, essa porcentagem obtida não pôde ser diretamente relacionada à posição dos receptores na célula uma vez que o primeiro também é agonista de receptores metabotrópicos e o segundo também é agonista de receptores AMPA.

Quando utilizou-se AMPA (experimento AF 26) como estímulo, a tetrodotoxina bloqueou em cerca de 30% a liberação sugerindo assim, uma maior presença de receptores do tipo AMPA no corpo celular.

Quando utilizou-se NMDA como estímulo (experimento AF 11) foi obtido cerca de 35% do bloqueio na liberação causada pela tetrodotoxina, sugerindo também um predomínio de receptores NMDA no corpo celular das células colinérgicas.

A redução da liberação basal em todos os experimentos utilizando tetrodotoxina, confirma o seu efeito sobre a célula, bloqueando a comunicação entre o corpo celular e o terminal no axônio, reduzindo a liberação espontânea decorrente dos disparos neuronais.

Já para liberação de dopamina os resultados não foram conclusivos uma vez que apenas o terminal está presente no estriado e os resultados experimentais não foram suficientemente reprodutíveis (resultados não apresentados).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que :

- A liberação de dopamina no estriado foi influenciada claramente por receptores do tipo NMDA.
- A liberação de acetilcolina no estriado foi influenciada claramente por receptores dos tipos NMDA, Kainato e AMPA.
- AP5 foi capaz de inibir a liberação de acetilcolina estimulada por NMDA.
- MK-801 bloqueou todas as ações sobre os receptores NMDA;
- o magnésio bloqueou todas as ações sobre receptores NMDA;
- A liberação de acetilcolina estimulada por AMPA e quisqualato mostrou-se sensível ao magnésio, independentemente dos receptores metabotrópicos dos tipos I e II.
- A tetrodotoxina reduziu em 35% as liberações de acetilcolina estimuladas por NMDA, 55% aquelas estimuladas por Kainato e 30% aquelas estimuladas por AMPA, sugerindo que os receptores do tipo AMPA e NMDA estão localizados predominantemente no corpo celular da célula colinérgica e os demais apresentam distribuição mais equilibrada entre os terminais e o corpo celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, A.; KELLAND, E.E.; THOMAS, A.; BIGGS, J.; CRAWFORD, D.; KITCHEN, I.; TOMS, N.J. Regional mapping of low affinity kainate receptors in mouse brain using [³H](2S,4R) – 4-methylglutamate autoradiography. *Eur. J. Pharmac.*, v. 431, p. 305-310, 2001.
- BEKKERS, J.; STEVENS, C.F. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature*, v. 341, p. 230-233, 1989.
- BETTLER, B.; MULLE, C. Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, v. 34, n. 2, p. 123-139, 1995.
- BLEAKEMAN, D.; LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, v. 37, p. 1187-1204, 1998.
- CAMILLO, M.A.P.; TRONCONE, L.R.P.; ROGERO, J.R. In vitro labelled neurotransmitters release for the study of neurotoxins. In: MEETING NUCLEAR APPLICATIONS, 3., August 7-11, 1995, Águas de Lindóia, SP. *Proceedings...* 1995. p.963-968.
- DOBREV, D., MILDE, A. S., ANDREAS, K., RAVENS, U. Voltage-activated calcium channels involved in veratridine-evoked [³H] dopamine release in striatal tissue. *Neuropharmacology*, v. 37, n. 8, p. 973-982, 1998.

- EATON, S.A.; JANE, D.E.; JONES, P.L.S.J.; PORTER, R.H.P.; POOK, P.C.-K.; SUNTER, D.C.; UDVARHELYI, P.M.; ROBERTS, P.J.; SALT, T.E.; WATKINS, J.C. Competitive antagonism at metabotropic glutamate receptors by (S)-4-carboxyphenyl-glycine and (RS)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine. *Eur. J. Pharmac.*, v. 244, p. 195-197, 1993.
- FORRAY, M. I., ANDRES, M. E., BUSTUS, G., GYSLING, K. Regulation of endogenous noradrenaline release from the bed nucleus of stria terminalis. *Biochem. Pharmacol.*, v. 49, n. 5, p. 687-692, 1995.
- HAYASHI, Y.; SEKIYAMA, N.; NAKANISHI, S.; JANE, D.E.; SUNTER, D.C.; BIRSE, E.F.; UDVARHELYI, P.M.; WATKINS, J.C. Analyses of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *J. Neurosci.*, v. 14, p. 3370-3377, 1994.
- JOHNSON, J.; ASHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature (London)*, v. 325, p. 529-531, 1987.
- KLECKNER, N.W.; DINGLELINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus Oocytes*. *Science*, v. 241, p. 835-837, 1988.
- MARIEN, M.; BRIEN, K; JHAMADAS, K. Regional release of [3H] dopamine from rat brain in vitro effects of opioids on release induced by K⁺, nicotine and L-glutamic acid. *Can. J. Physiol. Pharmac.*, v. 61, p. 43-60, 1983.

- MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L.; GUTHRIE, P. B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature (London)*, v. 309, p. 261-263, 1984.
- MEBS, D.; HUCHO, F. Toxins acting on ions channels and synapses. In: SHIER; W.T.; MEBS, D. *Handbook of toxicology*. New York, NY: Marcel Dekker Inc., 1990. p. 493-599.
- MICHAELIS, E.K. Molecular Biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.*, v. 54, p. 369-415, 1998.
- MONAGUAN, D.T.; COTMAN, C.W. The distribution of [3H] kainic acid binding sites in rats CNS as determined by autoradiography. *Brain Res.*, v. 252, p. 91-100, 1982.
- MONAGUAN, D.T.; YAO, D.; COTMAN, C.W. Distribution of [3H] AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *Brain Res.*, v. 324, p. 160-164, 1984.
- MORI, H.; MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, v. 34, n. 10, p. 1219-1237, 1995.
- NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature (London)*, v. 307, p. 462-465, 1984.

- OLSEN, O.W.; SZAMRAJ, O.; HOUSER, C. R. [3H] AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain. *Brain Res.*, v. 402, p. 243-254, 1987.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.
- PIN, J.-P.; DUVOISIN, R. Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology*, v. 34, n. 1, p. 1-26, 1995.
- SUBRAMANIAM, S.; MCGONIGLE, P. Quantitative autoradiographic characterization of the binding of (+)-5 methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5,10-imine ([3H] MK-801) in rat brain: regional effects of polyamines. *J. Pharmacol. Ther.*, v. 256, p. 811-819, 1991.
- THOMAS, L. S., JANE, D .E., HARRIS, J. R., CROUCHER, M. J. Metabotropic glutamate autoreceptors of the mGlu(5) subtype positively modulate neuronal glutamate release in the rat forebrain in vitro. *Neuropharmacology*, v. 39, n.9, p.1554-1566, 2000.
- TRONCONE, L.R.P.; LEBRUN, I.; MAGNOLI, F.; YAMANE, T. Biochemical and pharmacological studies on a lethal neurotoxic polypeptide from Phoneutria nigriventer spider venom. *Neurochem. Res.*, v. 20, n. 7, p. 879-883, 1995.

WANG, Y., ROWAN, M. J., ANWYL, R. Induction of LTD in the dentate gyrus in vitro is NMDA receptor independent, but dependent on Ca²⁺ influx via low-voltage-activated Ca²⁺ channels and release of Ca²⁺ from intracellular stores. *J. Neurophysiol.*, v. 77, n. 2, p. 812-825, 1997.

WISDEN, W.; SEEBURG, P.H. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.*, v. 13, p. 3582-3598, 1993.