

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

Rita Isabel Pedro Aroeira

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

Rita Isabel Pedro Aroeira

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada pela Doutora Cláudia Valente
e pelo Doutor Pedro Lima

2009

O trabalho experimental que conduziu à elaboração desta dissertação foi realizado no Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa e Unidade de Neurociências do Instituto de Medicina Molecular.

Índice:

Agradecimentos	vii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Quadros	xvii
1. Introdução Teórica	1
1.1. O Sistema Nervoso Central	1
1.2. Perspectiva Histórica da Glicina e do seu Receptor	1
1.3. A Glicina	2
1.4. A Glicina no terminal pré-sináptico	3
1.5. Transportadores da Glicina	5
1.6. O Receptor da Glicina	7
1.7. O Receptor da Glicina durante o Desenvolvimento – Despolarização vs Hiperpolarização	9
1.8. O Receptor da Glicina na Espinal Medula	10
1.9. O Receptor da Glicina no Hipocampo	11
1.10. O Hipocampo	12
1.11. O Receptor da Glicina e a Epilepsia	14
1.12. Farmacologia do Receptor da Glicina	15
2. Objectivos	17
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Reagentes	19
3.2. Animais	19
3.3. Extracção de amostras biológicas	19
3.3.1. Extracção da espinal medula	20
3.3.2. Extracção do cérebro	20
3.3.3. Extracção do hipocampo	21
3.4. Técnicas	22
3.4.1. <i>Western Blot</i> – Descrição teórica	22
3.4.1.1. Obtenção de homogenatos de espinal medula e hipocampo para <i>Western Blot</i>	26
3.4.1.2. Quantificação de proteína	26
3.4.1.3. <i>Western Blot</i> – metodologia utilizada	26
3.4.1.4. Tratamento estatístico	27

3.4.2. RT-PCR – Descrição teórica	28
3.4.2.1. Obtenção de homogenatos de espinal medula e hipocampo para RT-PCR	31
3.4.2.2. Extracção de RNA total do tecido e quantificação	31
3.4.2.3. Transcrição do RNA em cDNA <i>in vitro</i>	32
3.4.2.4. PCR	32
3.4.2.5. Tratamento estatístico	33
3.4.3. Imunohistoquímica – Descrição teórica	33
3.4.3.1. Fixação do cérebro e espinal medula	36
3.4.3.2. Fixação do cérebro por perfusão	36
3.4.3.3. Parafinação do tecido e obtenção de fatias	37
3.4.3.4. Desparafinação e recuperação do antigénio	38
3.4.3.5. Imunohistoquímica – metodologia utilizada	39
3.5. Anticorpos	41
3.6. <i>Primers</i>	42
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Expressão do receptor da glicina	43
4.1.1. Análise da expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato	43
4.1.2. Discussão	45
4.2. Expressão das subunidades do receptor da glicina	50
4.2.1. Extracção do RNA total e análise da sua integridade	50
4.2.2. Determinação do número de ciclos adequado para o PCR	51
4.2.3. Análise dos fragmentos de DNA obtidos por RT-PCR	53
4.2.4. Discussão	56
4.3. Localização subcelular do receptor da glicina no hipocampo de rato	59
4.3.1. Análise da evolução da citoarquitECTURA do hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento	59
4.3.2. Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT no hipocampo ao longo do desenvolvimento	60
4.3.3. Discussão	68
5. Conclusões	73
6. Perspectivas Futuras	75
7. Referências Bibliográficas	77
8. Anexos	85

Agradecimentos:

Em primeiro lugar gostaria de agradecer profundamente aos meus orientadores, Doutora Cláudia Valente de Castro e Doutor Pedro Afonso Lima. À Doutora Cláudia Valente por todos os ensinamentos, paciência, conselhos e amizade. Ao Doutor Pedro Lima pela simpatia e disponibilidade. Gostaria também de expressar os meus agradecimentos ao Professor Joaquim Alexandre Ribeiro e à Professora Ana Sebastião. Ao Professor Joaquim Alexandre Ribeiro, por me ter recebido no seu laboratório e à Professora Ana Sebastião por todos os ensinamentos e esclarecimentos.

Não posso deixar passar esta oportunidade sem agradecer a todos os colegas de laboratório que ao longo das semanas se foram tornando amigos e com quem partilhei experiências, discussões científicas, bons e maus momentos. Gostaria também de expressar os meus agradecimentos à Alexandra, à Cristina e à Elvira por toda a ajuda, disponibilidade e amizade e ao Sr. João por toda a assistência na manipulação dos animais.

Agradeço também à Ana Isabel Cunha do Laboratório de Histologia do Instituto de Medicina Molecular por todos os esclarecimentos e ensinamentos prestados aquando da implementação da técnica de imunohistoquímica.

É necessário ainda agradecer a todos os colegas e amigos pela sua amizade e apoio. Agradeço em especial ao André por toda a paciência, incentivos e boa disposição.

Gostaria também de expressar os meus agradecimentos à minha família, especialmente à minha mãe, por todo o apoio incondicional e compreensão.

Por fim, gostaria de agradecer às instituições que financiaram todo o trabalho desenvolvido. Ao Instituto de Medicina Molecular (IMM) do qual recebi uma Bolsa de Investigação (IMM/BI/26-2009), no âmbito do projecto “Receptores de membrana e mediadores envolvidos nas alterações plásticas induzidas por agressões neuronais: implicações para a neuroprotecção” (PTDC/SAU-FCF/68607/2006), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). Ao Dr. Bruno Gasnier (Paris) que gentilmente doou o anticorpo que reconhece o VIAAT e ao Dr. Tiago Outeiro (Lisboa) que amavelmente cedeu os *primers* utilizados para a amplificação da β -actina no RT-PCR.

Lista de Abreviaturas:

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

APS - ammonium persulfate

ATP - adenosine-5'-triphosphate

BSA - bovine serum albumin

CA 1-4 - Cornu Ammonis 1 - 4

cDNA - complementary DNA

CLC2 - voltage-gated chloride channel 2

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA - deoxyribonucleic acid

DTT - dithiothreitol

EDTA - ethylenediamine tetraacetic acid

GABA - gamma-amino butyric acid

GABA_AR - GABA_A receptor

GCS - glycine cleavage system

GD - gyrus dentatus

Glu - glutamate

Gly - glycine

GlyR - glycine receptor

GlyT1 - glycine transporter 1

GlyT2 - glycine transporter 2

GTP - guanosine-5'-triphosphate

HRP - horseradish peroxidase

KCC2 - K⁺-Cl⁻ cotransporter 2

MAP2 - microtubule-associated protein 2

mRNA - messenger ribonucleic acid

NKCC1 - Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1

NMDA - N-metil-D-aspartato

NP40 - nonyl phenoxylpolyethoxylethanol

P - Postnatal

PBS - phosphate buffered saline

PCR - polymerase chain reaction

PFA - paraformaldehyde

RIPA - radio immunoprecipitation assay

RNA - ribonucleic acid

RT-PCR - reverse transcriptase polymerase chain reaction

SDS - sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SNARE - soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment receptor

TAE - Tris-acetate-EDTA

TBS-T - tris buffered saline Tween-20

TEMED - N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine

TM1-4 - transmembrane 1 - 4

VDCC - voltage-deependent calcium channel

VIAAT - vesicular inhibitory amino-acid transporter

Resumo:

A inibição no sistema nervoso central é mediada pelo GABA e pela glicina. No hipocampo, a maioria das sinapses inibitórias são GABAérgicas e as glicinérgicas, predominantemente importantes na espinal medula, têm sido ignoradas.

Os receptores da glicina pertencem à família de receptores ionotrópicos, estão localizados na membrana do terminal pós-sináptico e formam um canal pentamérico composto por dois tipos de subunidades (α e β) permeável a iões Cl^- .

O principal objectivo deste trabalho é efectuar uma caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato em diferentes estadios de desenvolvimento.

Os resultados obtidos por *Western Blot* indicaram um aumento estatisticamente significativo de 9-10 vezes na expressão do receptor da glicina desde o nascimento (P0) até ao sétimo dia de vida (P7). De P7 em diante, a sua expressão diminuiu de uma forma dependente da idade.

Os resultados do RT-PCR mostraram que a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$ aumenta ao longo do desenvolvimento, que os níveis de mRNA da subunidade $\alpha 2$ predominam nos estadios imaturos e que o mRNA da subunidade β é igualmente expresso durante os estadios de desenvolvimento pós-natais.

A imunohistoquímica revelou que a localização subcelular do receptor da glicina ao longo do desenvolvimento não é idêntica. Nos estadios imaturos, este receptor é essencialmente expresso em redor do corpo celular. Nos estadios maduros, o receptor da glicina tem uma localização predominantemente dendrítica, sináptica e extrasináptica, no *stratum radiatum* das *cornu ammonis 1/3* e no *stratum moleculare* do *gyrus dentatus*. Os receptores da glicina sinápticos estão próximos de terminais pré-sinápticos, confirmando a sua localização pós-sináptica enquanto que os extrasinápticos encontram-se sob a forma de agregados.

Estes resultados evidenciam, pela primeira vez, que o receptor da glicina é amplamente expresso no hipocampo em diversos estadios de desenvolvimento, sugerindo assim um importante papel para a neurotransmissão glicinérgica no hipocampo.

Palavras-chave: Receptor da glicina; hipocampo; desenvolvimento; imunohistoquímica; microscopia confocal.

Abstract:

The inhibition in central nervous system is mediated by GABA and glycine. In hippocampus most inhibitory synapses are GABAergic, and glycinergic ones, predominantly important in spinal cord, have been largely ignored.

Glycine receptors belong to the superfamily of ligand-gated ion channels, are localized in the postsynaptic membrane and form pentameric channels composed of two different subunits (α and β) permeable to Cl^- ions.

The principal aim of the present study was to perform a spatial-temporal characterization of glycine receptor in rat hippocampus in different developmental stages.

Western blot analysis showed that there was a 9-10 statistically significant fold-increase in glycine receptor expression from birth (P0) to seven days postnatal (P7). From P7 on, glycine receptor expression decreased in an age dependent manner.

RT-PCR data demonstrated that $\alpha 1$ subunit mRNA expression increases with development, while $\alpha 2$ subunit mRNA seems to predominate at early developmental stages. β subunit mRNA is equally expressed during all postnatal developmental stages.

Immunohistochemistry revealed that glycine receptor subcellular localization over development is not identical. In immature stages, glycine receptor expression was found to delineate the cell bodies. In more mature stages, glycine receptor has a synaptic and extrasynaptic localization in dendritic areas, namely in *stratum radiatum* of Cornus Ammonis 1 and 3 and in *stratum moleculare* of Dentate Gyrus. Synaptic glycine receptors are apposed to inhibitory presynaptic boutons confirming its postsynaptic location while the extrasynaptic glycine receptors are arranged in clusters that freely diffuse in the cellular membrane.

These results elucidate, for the first time, that glycine receptors are widely expressed in the hippocampus in several stages of development, supporting a role for the importance of glycinergic neurotransmission in hippocampus.

Key words: Glycine receptor; hippocampus; development, immunohistochemistry; confocal microscopy.

Índice de Figuras:

Introdução Teórica:

Figura 1 – Biossíntese da glicina a partir da serina pelo enzima serina hidroximetiltransferase.	3
Figura 2 – Representação esquemática do transportador da glicina do espaço extracelular para o citosol e do citosol para as vesículas pré-sinápticas.	4
Figura 3 - A sinapse glicinérgica.	6
Figura 4 – Diagrama esquemático do receptor da glicina.	8
Figura 5 – A expressão precoce de NKCC1 e a expressão tardia de KCC2 determinam as mudanças ao longo do desenvolvimento da $[Cl]_i$.	10
Figura 6 – Representação do hipocampo.	14

Materiais e Métodos:

Figura 7 – Extração do cérebro de rato.	20
Figura 8 – Extração do hipocampo do cérebro de rato.	21
Figura 9 – Esquema simplificado de um ciclo de PCR que envolve a desnaturação, hibridação e alongação.	29
Figura 10 – Termociclador usado na transcrição <i>in vitro</i> e no PCR.	32
Figura 11 – Representação esquemática da perfusão.	37
Figura 12 – Processador automático de tecidos.	37
Figura 13 – Obtenção dos cortes do tecido no bloco de parafina usando o micrótomo.	38
Figura 14 – Microscópio confocal.	40

Resultados:

Figura 15 - Alteração da expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato em diferentes estadios de desenvolvimento.	44
Figura 16 – Acção sinérgica dos receptores GABA _A , NMDA e AMPA em neurónios imaturos.	46

Figura 17 – Estudo da integridade do RNA total isolado de homogenatos do hipocampo e da espinal medula.	50
Figura 18 – Estudo dos produtos de PCR obtidos em função do número de ciclos para cada gene estudado.	51/52
Figura 19 – Estudo dos produtos de PCR obtidos para os principais genes ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) da subunidade do receptor da glicina nos vários estadios de desenvolvimento.	54/55
Figura 20 – Evolução da citoarquitettura do hipocampo ao longo do desenvolvimento.	59
Figura 21 – Representação das áreas do hipocampo onde as imagens foram obtidas.	61
Figura 22 – Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT no hipocampo de rato.	63
Figura 23 – Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT no hipocampo de rato para os estadios pós-natais compreendidos entre P14 e 9 semanas.	65
Figura 24 – Detecção do MAP2 no hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento.	66
Figura 25 – Imagens obtidas para os controlos utilizados na imunohistoquímica.	67

Anexos:

Figura 26 – Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT nas zonas dendríticas do hipocampo de rato para os estadios pós-natais compreendidos entre P14 e 9 semanas.	85
---	----

Índice de Quadros:

Materiais e Métodos:

Quadro I – Preparação do gel resolvente 12% e do gel de concentração 5% para <i>Western Blot</i> .	27
Quadro II – Descrição dos anticorpos usados para imunohistoquímica e <i>Western Blot</i> .	41
Quadro III - Descrição dos <i>primers</i> utilizados para RT-PCR.	42

1. Introdução Teórica:

1.1. O Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso é composto por neurónios e por células da glia, entre elas os astrócitos e oligodendrócitos. Este pode ser dividido em sistema nervoso central, constituído pelo cérebro e espinal medula, e sistema nervoso periférico que inclui o sistema nervoso somático e o sistema nervoso autónomo (Zigmond *et al.*, 1999).

Os neurónios são considerados as células base do sistema nervoso e comunicam entre si através da geração e propagação de impulsos nervosos e da libertação, por exocitose, de moléculas químicas - os neurotransmissores – que são usadas para amplificar e modular sinais entre dois neurónios e entre neurónios e outras células (Dumoulin *et al.*, 1999).

As principais funções do sistema nervoso são a coordenação de toda a actividade muscular e movimentos de órgãos, assim como a iniciação e finalização de estímulos e acções, devendo sempre existir um equilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória (Zigmond *et al.*, 1999).

A transmissão inibitória no sistema nervoso central é mediada pelo GABA (*gamma-amino butyric acid*) e pela glicina, sendo o GABA o principal neurotransmissor inibitório no cérebro e a glicina, por sua vez, na espinal medula e tronco cerebral. Por outro lado, a transmissão excitatória no cérebro ocorre devido à acção do glutamato e do aspartato (Siegel *et al.*, 1989).

1.2. Perspectiva Histórica da Glicina e do seu Receptor

Em 1965, Aprison e Werman descobriram que a concentração da glicina na espinal medula era bastante elevada (Aprison e Werman, 1965). Associando este facto ao publicado alguns anos antes por Curtis e Watkins, que mostraram que a aplicação de glicina a neurónios da espinal medula originava uma inibição da transmissão sináptica (Curtis e Watkins, 1960), começaram a surgir indícios que a glicina poderia ter aí um importante papel como neurotransmissor.

Nos anos seguintes, foram muitos os estudos que envolveram a glicina não só a nível molecular, mas também a nível electrofisiológico. É de salientar o trabalho feito por Curtis e colaboradores que demonstraram que em neurónios da espinal medula, a glicina originava uma hiperpolarização, (sensível à estriquinina) (Curtis, Hosli e Johnston, 1967), que é devida a um aumento da condutância do ião cloreto (Cl⁻) (Curtis *et al.*, 1968). Estas descobertas, em conjunto com os trabalhos publicados no início da década de 70, em que foi demonstrado que

1. Introdução Teórica

a glicina podia ser sintetizada (Shank e Aprison, 1970) e libertada pelos neurónios após a aplicação de um estímulo (Hopkin e Neal, 1970), originaram pela parte da comunidade científica, um elevado interesse pela glicina e pelas suas funções como neurotransmissor químico.

Entre os vários estudos da época, surgiram as primeiras evidências que demonstravam a existência de transportadores da glicina, que se pensou serem responsáveis pela terminação da sua actividade sináptica (Logan e Snyder, 1971; Bennett *et al.*, 1973). Também emergiram estudos pioneiros que mostraram que o convulsionante alcalóide estriquinina seria um potente e relativamente selectivo antagonista do receptor da glicina (Young e Snyder, 1973).

Posteriormente, foi descoberto que a [³H]-estriquinina podia-se ligar irreversivelmente ao receptor da glicina, o que deu início a um conjunto de experiências que culminaram no seu isolamento numa matriz de afinidade contendo 2-amino-estriquinina-agarose, detectando-se três polipéptidos com massas de 48, 58 e 93 kDa (Pfeiffer *et al.*, 1982).

Em 1966, Werman enumerou um conjunto de critérios que são aceites como características que uma molécula deverá possuir para ser considerada um neurotransmissor, nomeadamente a sua concentração, a capacidade de ser sintetizada pelos neurónios e libertada após estimulação, a existência de mecanismos que a inactivem e a presença de receptores específicos sensíveis à acção de antagonistas (Werman, 1966). Assim, a glicina preenche todos os critérios referidos, sendo considerada pela comunidade científica um importante neurotransmissor.

1.3. A Glicina

A glicina é um aminoácido não essencial com uma estrutura bastante simples (Nelson e Cox, 2000) e que desempenha dois papéis fundamentais no sistema nervoso central: um deles é como neurotransmissor químico, particularmente importante nas sinapses inibitórias da espinal medula e tronco cerebral (Siegel *et al.*, 1989) e o outro é como co-agonista da transmissão excitatória no cérebro através da activação dos receptores NMDA (*N-metil-D-aspartato*), pertencentes à família dos receptores de glutamato, que apresentam uma resposta extremamente potenciada pela glicina (Johnson e Ascher, 1987).

A glicina pode participar em diversos processos metabólicos e é sintetizada a partir da glucose, apesar do seu precursor imediato ser a serina (Figura 1). Vários estudos usando precursores radioactivos sugerem que a grande maioria da glicina encontrada no cérebro é originada pela síntese *de novo* a partir da serina e não pelo transporte através do sangue (Siegel *et al.*, 1989).

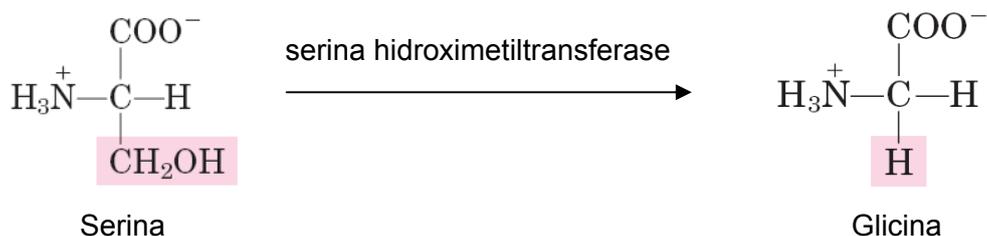


Figura 1 – **Biossíntese da glicina a partir da serina pelo enzima serina hidroximetiltransferase.** Ambas as fórmulas estruturais (serina e glicina) representam o estado de ionização que predomina a pH 7. A fracção seleccionada (a rosa) identifica o grupo R característico de cada um dos aminoácidos, enquanto que a restante estrutura é comum a todos eles (Adaptado de Nelson e Cox, 2000).

O responsável pela síntese da glicina a partir da serina é o enzima serina hidroximetiltransferase (EC 2.1.2.1.) (Figura 1). No entanto, a actividade deste enzima não pode servir para avaliar os neurónios que sintetizam e libertam a glicina, pois pensa-se que a sua velocidade de formação seja constante em várias áreas, não parecendo existir uma correlação com os neurónios glicinérgicos (Siegel *et al.*, 1989).

1.4. A Glicina no terminal pré-sináptico

A glicina apresenta funções de neurotransmissor e, como tal, é armazenada em vesículas sinápticas. O transporte da glicina para a vesícula é mediado directamente pelo VIAAT (*vesicular inhibitory amino-acid transporter*) (57 kDa), que é um transportador localizado na membrana das vesículas (Sagné *et al.*, 1997) com doze domínios transmembranares (Figura 2A), e que pode assim ser visto como um marcador de terminais pré-sinápticos inibitórios (revisto em Legendre, 2001). Por outro lado, a entrada da glicina para as vesículas sinápticas está dependente de uma bomba de prótons que os transporta do citosol para o lúmen da vesícula, acidificando-o. Esta bomba utiliza como fonte de energia a hidrólise de moléculas de ATP (*adenosine-5'-triphosphate*), sendo assim denominada de ATPase vacuolar (Figura 2) (Dumoulin *et al.*, 1999). Deste modo, é possível ao VIAAT efectuar a troca da glicina citosólica por prótons que se encontram no lúmen vesicular, carregando as vesículas sinápticas com glicina (Sagné *et al.*, 1997). Todavia, este transportador não é específico para a glicina, pois também pode transportar GABA, estando presente em terminais puramente glicinérgicos, gabaérgicos ou mistos (glicinérgicos e GABAérgicos) (Dumoulin *et al.*, 1999). A capacidade do VIAAT transportar um dos dois neurotransmissores inibitórios está relacionada com a sua concentração no citosol, estando esta dependente quer dos enzimas que sintetizam a glicina e

1. Introdução Teórica

o GABA, quer dos transportadores específicos para cada um dos neurotransmissores que existem na membrana dos terminais pré-sinápticos (revisto em Legendre, 2001) (Dumoulin *et al.*, 1999).

Após a introdução do neurotransmissor nas vesículas sinápticas, estas são encaminhadas para junto da membrana do terminal pré-sináptico. Essa orientação é feita por um conjunto de proteínas denominadas de sinapsinas, que interagem com os microtúbulos, e pela acção de proteínas Rab. As proteínas Rab estão integradas numa família específica de proteínas que hidrolisam o GTP (*guanosine-5'-triphosphate*), as GTPases (Purves *et al.*, 2008).

As vesículas sinápticas ficam ancoradas à membrana do terminal pré-sináptico através da formação de um complexo de proteínas usualmente conhecidas como proteínas SNARE (*soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment receptor*). Este complexo proteico é constituído por proteínas membranares, quer vesiculares quer do terminal pré-sináptico. Assim, existe a acumulação das vesículas em zonas onde posteriormente ocorrerá a fusão destas com a membrana do terminal pré-sináptico (Purves *et al.*, 2008).

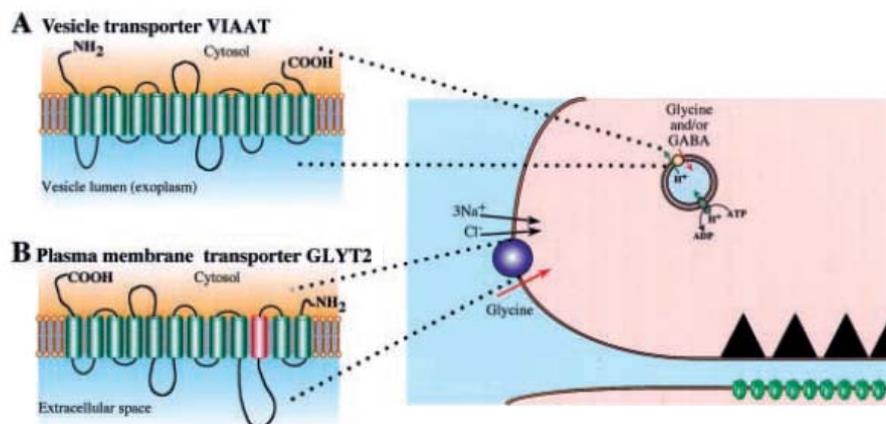


Figura 2 – Representação esquemática do transportador da glicina do espaço extracelular para o citosol e do citosol para as vesículas pré-sinápticas. (A) - Transportador vesicular do GABA e da glicina - VIAAT (*vesicular inhibitory amino-acid transporter*) - com os 12 domínios transmembranares. (B) - Transportador situado na membrana dos terminais pré-sinápticos específico para a glicina - GlyT2 (*glycine transporter 2*) - que também tem 12 domínios transmembranares (Adaptado de Legendre, 2001).

Quando o terminal pré-sináptico recebe um potencial de acção, dá-se a despolarização da membrana, o que origina alterações no seu potencial e a consequente abertura dos canais de cálcio (Ca²⁺) dependentes da voltagem. Devido ao gradiente de concentrações do ião Ca²⁺ na membrana do terminal pré-sináptico, ocorre o influxo dos iões Ca²⁺. Estes iões vão-se ligar à

sinaptotagmina, uma proteína presente na membrana das vesículas sinápticas, catalisando a fusão das vesículas com a membrana plasmática. Forma-se assim o poro de fusão, levando à extrusão completa (ou parcial) do conteúdo das vesículas para a fenda sináptica. Por fim, ocorre a reciclagem das vesículas por endocitose mediada pela clatrina.

Este processo é bastante importante para a célula, uma vez que os precursores das vesículas sinápticas são originalmente produzidos no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, que se situam nos corpos celulares dos neurónios. No entanto, devido à longa distância que existe entre o corpo celular e os terminais pré-sinápticos da maioria dos neurónios, o transporte das vesículas sinápticas desde o local onde são produzidas até ao local de acção, não permitiria a sua rápida substituição durante a actividade neuronal contínua. Assim, torna-se imperativo a existência de um processo de reciclagem de vesículas no terminal pré-sináptico (Purves *et al.*, 2008).

Uma vez na fenda sináptica, a glicina pode-se ligar aos seus transportadores característicos localizados quer na membrana dos terminais pré-sinápticos quer na membrana dos astrócitos ou, por outro lado, pode-se ligar aos seus receptores específicos situados na membrana dos terminais pós-sinápticos (Dumoulin *et al.*, 1999).

1.5. Transportadores da Glicina

A terminação da actividade sináptica ocorre através da remoção da glicina da fenda sináptica por transportadores específicos (Guastella *et al.*, 1992), sendo estes responsáveis pela regulação da concentração da glicina no exterior da célula (Vandenberg *et al.*, 2007).

Para a glicina são conhecidos, até ao momento, dois tipos de transportadores, o GlyT1 (*glycine transporter 1*), localizado na membrana dos astrócitos, (Guastella *et al.*, 1992) e o GlyT2 (*glycine transporter 2*) que existe na membrana dos terminais pré-sinápticos (Figura 2B) (Liu *et al.*, 1993). Ambos promovem a entrada da glicina nas células acompanhada do co-transporte de iões sódio (Na^+) e Cl^- (Zafra *et al.*, 1995; Roux e Supplisson, 2000).

O GlyT1 permite a entrada da glicina para os astrócitos acompanhada por dois iões Na^+ e um ião Cl^- (Roux e Supplisson, 2000), onde esta é hidrolisada por um eficiente sistema de degradação aí existente composto por vários enzimas denominado de GCS (*glycine cleavage system*) (Figura 3) (Sato *et al.*, 1991). Este transportador é muito expresso no cerebelo e no bulbo olfactivo, sendo também expresso na espinal medula e no tronco cerebral, assim como em várias regiões do cérebro, apesar de ser em níveis pouco elevados (Guastella *et al.*, 1992). O GlyT1 está também presente nas sinapses que possuem receptores NMDA, mais até do que

1. Introdução Teórica

nas sinapses glicinérgicas ou mistas, o que evidencia o seu papel na regulação da concentração da glicina e na provável modulação da função dos receptores NMDA nas sinapses excitatórias (Smith *et al.*, 1992).

O GlyT2 difere do GlyT1 na sua estrutura molecular, na especificidade do tecido e nas suas características farmacológicas. Este transportador é altamente expresso na espinal medula e tronco cerebral, regiões do sistema nervoso central onde se sabe que a glicina tem um papel fundamental, e pouco expresso no cerebelo e cérebro (Liu *et al.*, 1993). Uma vez que já foram detectados níveis elevados de GlyT2 nos terminais glicinérgicos (Zafra *et al.*, 1995), estas moléculas podem assim ser consideradas um marcador importante destes terminais (Poyatos *et al.*, 1997).

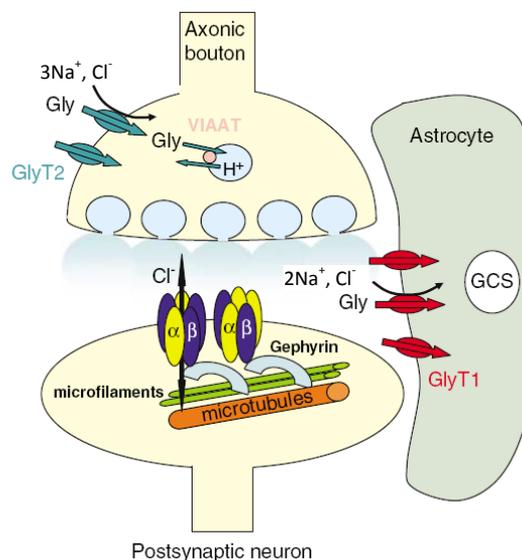


Figura 3 - **A sinapse glicinérgica.** A glicina é armazenada em vesículas sinápticas via VIAAT (*vesicular inhibitory amino-acid transporter*). Os receptores da glicina são apresentados como pentâmeros com uma estequiometria de $3\alpha:2\beta$ e também $2\alpha:3\beta$ e estão ancorados através da subunidade β à gephyrina que interacciona com os microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto. A glicina pode ser sequestrada pelos seus transportadores (GlyT1 - *glycine transporter 1* ou GlyT2 - *glycine transporter 2*) sendo depois re-empacotada nas vesículas ou hidrolisada via GCS (*glycine cleavage system*). Gly (*glycine*). (Adaptado de Bowery e Smart, 2006).

O GlyT2 é o principal transportador responsável pela terminação do efeito inibitório provocado pela glicina (Liu *et al.*, 1993), pois retira-a da fenda sináptica para o terminal pré-sináptico, acompanhada do co-transporte de três iões Na^+ e um ião Cl^- (Roux e Supplisson, 2000),

podendo esta ser re-empacotada nas vesículas sinápticas (Figura 3) (revisto em Bowery e Smart, 2006).

Estes transportadores são muitas vezes vistos como importantes alvos terapêuticos, pois ao serem bloqueados por inibidores específicos podem modular a função neuronal, através do aumento do tempo de permanência da glicina na fenda sináptica, aumentando a duração da sua acção (Guastella *et al.*, 1992).

1.6. O Receptor da Glicina

Existem muitos paralelismos no estudo do receptor da glicina e dos receptores de GABA. Porém, se por um lado estão abundantemente descritos receptores para o GABA do tipo ionotrópico (GABA_A e GABA_C) e metabotrópico (GABA_B), para a glicina apenas é conhecido, até ao momento, um receptor ionotrópico pós-sináptico, desconhecendo-se qualquer receptor do tipo metabotrópico (Purves *et al.*, 2008).

O receptor da glicina e o receptor GABA_A pertencem à mesma família de receptores, a família de receptores ionotrópicos *Cys-loop*, pois ambos apresentam regiões homólogas no local de ligação aos respectivos ligandos e partilham a mesma topologia transmembranar e características estruturais e funcionais, estando envolvidos na mediação da transmissão rápida que ocorre nas sinapses (Jensen *et al.*, 2005).

O receptor da glicina é composto por cinco subunidades que formam um canal pentamérico (Figura 4) (Langosch *et al.*, 1988) permeável a aniões, especialmente ao ião Cl⁻. Quando a glicina se liga ao seu receptor, induz a abertura do canal o que faz com que o ião Cl⁻ entre para o terminal pós-sináptico levando a uma hiperpolarização e uma consequente inibição da transmissão sináptica (Young-Pearse *et al.*, 2006).

Cada uma das cinco subunidades é constituída por proteínas que possuem quatro domínios transmembranares (TM1-4), estando os terminais amina e carboxilo virados para o espaço extracelular, neste caso para a fenda sináptica, sendo o terminal amina muito maior que o terminal carboxilo (Figura 4). No terminal amina estão identificados quatro resíduos de cisteína que estão envolvidos na formação de ligações persulfureto, dando assim nome a esta família. No lado citoplasmático existe um pequeno *loop* entre o domínio TM1 e o TM2 e um *loop* envolvendo um maior número de aminoácidos entre o domínio TM3 e o TM4 (revisto em Kirsch, 2006), o qual é substrato para fosforilações por numerosas cinases e também desempenha um papel fundamental para a ancoragem do receptor na sinapse e no tráfego de e para a membrana celular (revisto em Bowery e Smart, 2006). O domínio TM2 é bastante importante pois é ele que forma o poro do canal (Figura 4) (Jensen *et al.*, 2005).

1. Introdução Teórica

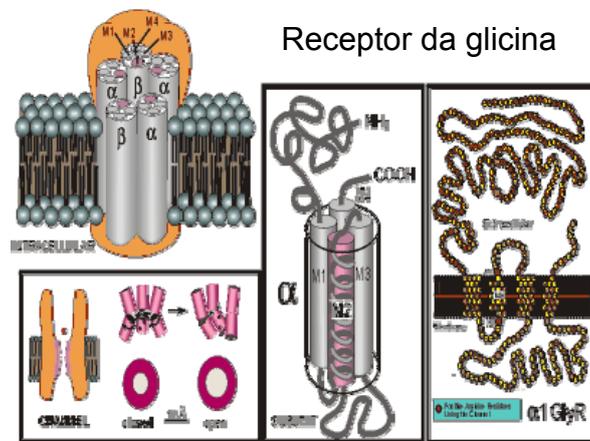


Figura 4 – **Diagrama esquemático do receptor da glicina.** É de realçar o mecanismo sugerido para a abertura do canal ionotrópico e a estrutura e aminoácidos da subunidade $\alpha 1$ evidenciando os seus quatro domínios transmembranários (M1-4), assim como os *loops* citoplasmáticos entre os domínios M1 e M2 e entre os domínios M3 e M4. GlyR (*glycine receptor*).

(Adaptado de www.biophysics.org.au/About/index.html).

O receptor da glicina é constituído pelas subunidades alfa (α) e beta (β) com 48 e 58 kDa, respectivamente (revisto em Bowery e Smart, 2006). Durante muito tempo pensou-se que o receptor da glicina era constituído por três subunidades α e duas β ($3\alpha:2\beta$) (Kuhse *et al.*, 1993) mas, estudos recentes revelam a existência de receptores da glicina compostos por duas subunidades α e três β ($2\alpha:3\beta$) (Grudzinska *et al.*, 2005).

Até ao momento foram já detectados quatro genes que codificam a subunidade α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) enquanto que para a subunidade β apenas foi detectado um gene. A diversidade nas subunidades do receptor da glicina pode ainda ser gerada por *splicing* alternativo (revisto em Kirsch, 2006). As subunidades $\alpha 1$ (48 kDa) e $\alpha 2$ (49 kDa) são consideradas subunidades de elevada importância e são muito expressas no sistema nervoso, apesar de a sua expressão ser altamente regulada e parecer ser distinta em diferentes fases do desenvolvimento e em diferentes órgãos, o que origina alterações na fisiologia e farmacologia do receptor da glicina (Takahashi *et al.*, 1992). Por outro lado, as subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ são consideradas subunidades de menor importância e pouco abundantes. Enquanto que a subunidade $\alpha 4$ parece ser a mais rara, a subunidade $\alpha 3$ parece ter um papel fundamental na transmissão da dor causada por uma inflamação mediada por prostaglandinas em neurónios da espinal medula (Harvey *et al.*, 2004).

A subunidade β é bastante expressa no sistema nervoso e a sua expressão não se correlaciona com a expressão da subunidade α , o que poderá indicar outras funções para esta

subunidade, uma vez que por si só é incapaz de formar receptores de glicina homoméricos (revisto em Bowery e Smart, 2006). A principal função da subunidade β é assegurar a interacção do receptor da glicina com a gefirina (Figura 3) (Meyer *et al.*, 1995), uma proteína citoplasmática pós-sináptica com 93 kDa (Schmitt *et al.*, 1987), que corresponde ao polipéptido com maior massa molecular que foi isolado em 1982 (Pfeiffer *et al.*, 1982).

A acumulação dos receptores de glicina nos locais pós-sinápticos das sinapses glicinérgicas ou mistas (Figura 3) pode ser vista como um processo que envolve dois passos: a formação prévia e independente de agregados de receptores de glicina que se difundem por toda a membrana plasmática e a associação de alguns destes agregados à gefirina (Meier *et al.*, 2000). Esta, por sua vez, interage com proteínas do citoesqueleto, sendo assim responsável pelo recrutamento do receptor para a membrana pós-sináptica (Figura 3) (Kirsch *et al.*, 1991).

1.7. O Receptor da Glicina durante o Desenvolvimento – Despolarização vs Hiperpolarização

À semelhança do que acontece para os receptores de GABA, também está descrito que em neurónios imaturos, a activação do receptor da glicina causa despolarização em vez da hiperpolarização observada em neurónios maduros, o que indica que algures no desenvolvimento, existirá uma alteração da função do receptor da glicina, passando este de excitatório para inibitório (revisto em Ben-Ari, 2002).

Esta alteração parece estar relacionada com a variação da concentração intracelular do ião Cl^- originada por dois tipos de transportadores, um que promove o seu influxo acompanhado do ião Na^+ e do ião potássio (K^+), denominado de NKCC1 (*$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter 1*) (Delpire, 2000), e um segundo transportador que promove o efluxo do ião Cl^- com o co-transporte do ião K^+ , denominado de KCC2 (*$\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransporter 2*) (Delpire, 2000).

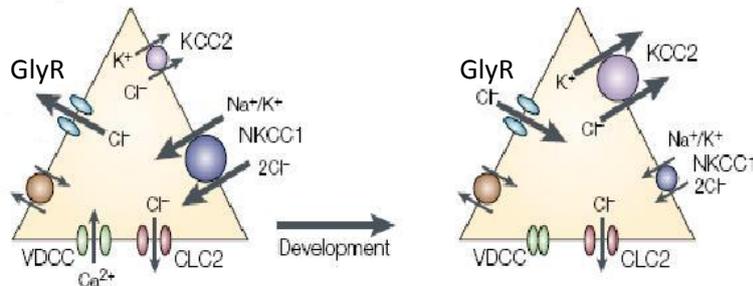
O NKCC1 é altamente expresso na altura do nascimento diminuindo a sua expressão com o desenvolvimento (Plotkin *et al.*, 1997) enquanto que o KCC2 é pouco expresso à nascença, aumentando a sua expressão com o crescimento (Clayton *et al.*, 1998). A expressão diferenciada destes transportadores é consistente com a diminuição da concentração intracelular do ião Cl^- observada durante o desenvolvimento e, parece ser responsável pela mudança de direcção das correntes do ião Cl^- no receptor da glicina (Delpire, 2000). A sua activação, nos neurónios imaturos, gera o efluxo do ião Cl^- das células, despolarizando-as e originando uma actividade excitatória (Figura 5A) (Flint *et al.*, 1998) enquanto que, no caso dos neurónios maduros, promove o influxo do ião Cl^- das células, hiperpolarizando-as e levando,

1. Introdução Teórica

consequentemente, a uma inibição da transmissão sináptica (Figura 5B) (revisto em Ben-Ari, 2002).

(A) Elevada $[Cl^-]_i$ (neurónios imaturos)

(B) Baixa $[Cl^-]_i$ (neurónios maduros)



Despolarização - Transmissão excitatória

Hiperpolarização - Transmissão inibitória

Figura 5 – **A expressão precoce de NKCC1 e a expressão tardia de KCC2 determinam as mudanças ao longo do desenvolvimento da $[Cl^-]_i$.** Diagrama esquemático evidenciando o co-transportador de $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ denominado de NKCC1, o co-transportador de $K^+ - Cl^-$ designado de KCC2, as correntes do ião cálcio dependentes da voltagem e as correntes do ião cloreto dependentes do gradiente de concentração. (A) - A expressão de NKCC1 predomina em neurónios imaturos, nos quais a $[Cl^-]_i$ é relativamente elevada. (B) - A expressão de KCC2 predomina em neurónios maduros, nos quais a $[Cl^-]_i$ é relativamente baixa. NKCC1 (*Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1*); KCC2 (*K⁺-Cl⁻ cotransporter 2*); GlyR (*glycine receptor*); CLC2 (*voltage-gated chloride channel 2*); VDCC (*voltage-dependent calcium channel*); $[Cl^-]_i$ (concentração intracelular do ião cloreto) (Adaptado de Ben-Ari, 2002).

1.8. O Receptor da Glicina na Espinal Medula

No sistema nervoso central, o receptor da glicina é altamente expresso na espinal medula e tronco cerebral, tendo também já sido detectado no tálamo, hipotálamo, cerebelo, córtex e hipocampo, sendo ainda de referir a expressão acentuada deste receptor na retina (revisto em Lynch, 2004).

Devido ao papel bastante importante da transmissão glicinérgica na espinal medula, o receptor da glicina tem aí sido alvo de diversos estudos e caracterizações entre eles ao nível da expressão proteica e ao nível da expressão do RNA (*ribonucleic acid*) mensageiro (mRNA – *messenger ribonucleic acid*).

Estudos de expressão proteica das várias subunidades do receptor da glicina evidenciaram que, ao longo do desenvolvimento, parece existir uma alteração na sua constituição, nomeadamente a passagem de uma forma imatura homomérica, composta apenas por

subunidades $\alpha 2$, para a forma madura heteromérica composta por subunidades $\alpha 1$ e β (Becker *et al.*, 1988).

Uma análise posterior feita por hibridação *in situ* do mRNA das várias subunidades do receptor da glicina demonstrou que, nos neurónios imaturos (embrionários), a subunidade $\alpha 2$ tem um elevado nível de expressão, que diminui após o nascimento e que, em contraste, a expressão do mRNA das subunidades $\alpha 1$ e β é baixa nos neurónios imaturos e aumenta rapidamente após o nascimento (Malosio *et al.*, 1991), o que parece estar concordante com a análise efectuada à expressão proteica.

Esta mudança na constituição do receptor da glicina está completa pelo vigésimo dia após o nascimento. Porém, esta ocorrência origina a coexistência de várias isoformas do receptor da glicina e existem mesmo evidências que a subunidade $\alpha 2$ poderá não desaparecer como inicialmente se pensava, mas sim continuar a ser expressa ao longo de toda a vida (revisto em Lynch, 2004).

A localização dos receptores homoméricos e heteroméricos parece não ser idêntica, pois os receptores heteroméricos são constituídos pelas subunidades α e β , proporcionando esta última a ligação à gefirina (Meyer *et al.*, 1995), que é indispensável para que os receptores da glicina se localizem na zona sináptica. Por outro lado, os receptores da glicina homoméricos difundem livremente pela membrana plasmática sendo considerados receptores extrasinápticos (Sola *et al.*, 2004).

Os receptores localizados nos terminais pós-sinápticos são maioritariamente responsáveis pela neurotransmissão rápida e fásica enquanto que os receptores extrasinápticos parecem estar envolvidos na modulação lenta e tónica da actividade neuronal (Muller *et al.*, 2008).

1.9. O Receptor da Glicina no Hipocampo

No cérebro, onde o GABA é considerado o neurotransmissor inibitório por excelência, pouco está descrito sobre a função da glicina e do seu receptor. No entanto, um estudo relativamente recente revela a existência de sinapses mistas de GABA/glicina e de sinapses puramente glicinérgicas no hipocampo, apesar de evidenciar que a expressão do receptor da glicina no hipocampo é cerca de 5-9 vezes menor do que na espinal medula (Danglot *et al.*, 2004).

Porém, a composição do receptor da glicina no hipocampo é diferente da existente na espinal medula, pois uma análise feita à abundância relativa dos mRNA's das várias subunidades deste receptor mostrou que as subunidades $\alpha 2$ e β e, em menor quantidade, a subunidade $\alpha 3$ estão presentes nos neurónios maduros do hipocampo, o que é bastante diferente do

1. Introdução Teórica

observado na espinal medula em que os neurónios maduros parecem ter uma abundante expressão das subunidades $\alpha 1$ e β (Malosio *et al.*, 1991).

À semelhança do que ocorre na espinal medula, também nos neurónios do hipocampo está descrita a presença de receptores de glicina homoméricos, que parecem ser compostos apenas por subunidades $\alpha 2$, nos locais extrasinápticos e receptores de glicina heteroméricos, aparentemente compostos por subunidades $\alpha 2$ e β , nos locais sinápticos (Chattipakorn e McMahon, 2002).

1.10. O Hipocampo

O hipocampo é uma pequena estrutura pertencente ao sistema límbico que se encontra localizada nos lobos temporais do córtex cerebral (Figura 6). Esta região é bastante importante na aprendizagem e na memória e pensa-se que esteja envolvida em várias situações patológicas, tais como a epilepsia ou a doença de Alzheimer (Andersen *et al.*, 2007).

Os mamíferos têm dois hipocampos, um em cada hemisfério cerebral, e a sua característica aparência curvilínea, em forma de cavalo-marinho à qual deve o seu nome (do grego *hippos* – cavalo e *kampi* - curva), permite a sua fácil identificação. A sua importância fisiológica e patológica faz com que seja das estruturas cerebrais mais intensamente estudadas hoje em dia (Andersen *et al.*, 2007).

O hipocampo é uma estrutura heterogénea no que diz respeito ao tipo celular, às camadas celulares e aos terminais nervosos. É composto por duas camadas de tecido cortical, ligadas entre si, constituídas por dois tipos principais de células: as células granulares do *gyrus dentatus* (GD) e as células piramidais da *cornu ammonis* (CA). A zona CA é usualmente dividida em quatro áreas denominadas de CA1-4, sendo a CA1 a área mais próxima do córtex cerebral e a CA4 a área que contacta directamente com as células do GD. Após a área CA1 segue-se uma estrutura específica conhecida como subículo (Andersen *et al.*, 2007).

Apesar de os neurónios piramidais serem os que estão em maior quantidade no hipocampo, além dos neurónios granulares aí existentes, está também presente um terceiro tipo de neurónios denominados de interneurónios. Os interneurónios são um grupo muito heterogéneo de neurónios que se localizam entre as várias camadas existentes e são positivos para os marcadores de GABA, pelo que se pensa que estes neurónios serão predominantemente GABAérgicos (Andersen *et al.*, 2007).

Mais detalhadamente, no que diz respeito à organização das células, podem ser encontradas três camadas laminares, semelhantes em toda a zona CA (Figura 6A). A principal camada é denominada de *stratum pyramidale* e é onde se encontra a maioria dos corpos celulares dos

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

neurónios piramidais, bastante abundantes nesta zona. Estes neurónios são predominantemente excitatórios e realizam essa função através da libertação de glutamato. No lado externo do *stratum pyramidale* reside uma outra camada usualmente conhecida como *stratum oriens*. Esta zona contém poucos corpos celulares, sendo abundante em dendrites das células piramidais e vários interneurónios. No lado interno do *stratum pyramidale* situa-se a última camada laminar, geralmente chamada de *stratum radiatum*. Esta zona contém vários axónios e dendrites que a atravessam para fazer a comunicação com outras zonas do hipocampo e, é também aqui que estão localizados muitos dos terminais sinápticos dos neurónios. Esta camada, à semelhança da *stratum oriens*, é praticamente isenta de corpos celulares e contém muitos interneurónios (Andersen *et al.*, 2007).

A organização laminar do GD, tal como acontece para a CA, é também feita em várias camadas (Figura 6A). A principal camada desta zona é denominada de *stratum granulosum* e é aí que se encontra a grande maioria dos corpos celulares dos neurónios do GD. A cobrir toda esta área existe uma outra camada conhecida como *stratum moleculare*, que é uma zona pouco abundante em corpos celulares. O *stratum moleculare* é rico em axónios provenientes dos corpos celulares que se localizam no *stratum granulosum* e é uma zona abundante em terminais sinápticos, sendo aí também observados interneurónios. No interior da camada *stratum granulosum*, existe uma zona usualmente designada de *hilus* onde também se localizam alguns interneurónios e alguns terminais sinápticos (Andersen *et al.*, 2007).

No interior do hipocampo existe um vasto e importante circuito de vias. As três principais vias deste circuito são usualmente conhecidas como: *Perforant Pathway*, *Mossy Fibres Pathway* e *Schaffer Collateral Pathway* (Figura 6B). Este circuito pode ser visto como uma rede unidireccional que tem início no córtex entorrinal.

Os neurónios da camada II do córtex entorrinal enviam axónios para os neurónios do GD e da CA3 através de uma via denominada de *Perforant Pathway*, que pode ser dividida em lateral e central. Esta via é a principal forma de entrada de axónios no hipocampo. A camada III do córtex entorrinal envia ainda axónios directamente para os neurónios da CA1 e do subículo (Andersen *et al.*, 2007).

Os neurónios do GD comunicam, através dos seus axónios, com os neurónios da CA3 formando assim uma via independente geralmente conhecida como *Mossy Fibres Pathway* (Andersen *et al.*, 2007).

Por sua vez, os neurónios da CA3 comunicam com os neurónios da CA1 através de uma das vias mais conhecidas e estudadas do hipocampo, usualmente chamada *Schaffer Collateral Pathway*. Estes neurónios também comunicam com os neurónios da CA1 do hipocampo contralateral através da *Associational Commissural Pathway*. Os neurónios da CA1 têm axónios que se prolongam até ao subículo, sendo esta a forma predominante de saída de

1. Introdução Teórica

dendrites do hipocampo. Estes neurónios, por outro lado, comunicam directamente com o córtex entorrinal formando assim um *loop* (Andersen *et al.*, 2007).

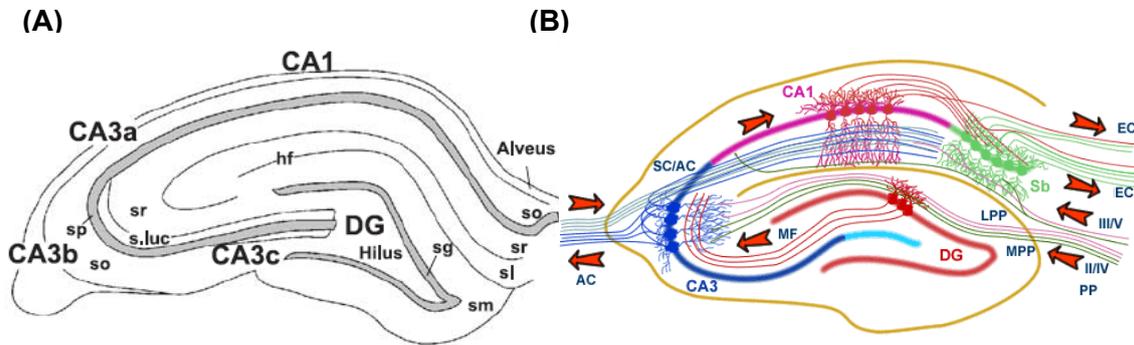


Figura 6 – **Representação do hipocampo.** (A) Representação esquemática das células do hipocampo. (Adaptado de Danglot *et al.*, 2004). (B) Circuito das vias existentes no hipocampo. (Adaptado de www.bristol.ac.uk/synaptic/info/pathway/hippocampal.htm).

CA1 – CA3 (Cornu ammonis 1 – 3); DG (dentate gyrus); So (stratum oriens); Sr (stratum radiatum); Sm (stratum moleculare); Sg (stratum granulosum); Hf (hippocampal fissure); Sp (stratum pyramidale); S.luc (stratum lucidum); EC (Entorhinal Cortex); PP (Perforant Pathway); LPP (Lateral Perforant Pathway); MPP (Medial Perforant Pathway); MF (Mossy Fibres); SC (Schaffer Collateral); AC (Associational Commissural) e Sb (Subiculum).

As diversas áreas do hipocampo são relativamente fáceis de reconhecer. No entanto, para comparar os dois tipos principais de células num mesmo animal, e entre animais diferentes, é preciso não esquecer que os cérebros têm de ser cuidadosamente orientados (Palkovits e Brownstein, 1988).

O hipocampo é uma das partes do cérebro mais excitáveis e, talvez por isso, seja frequentemente o local onde se desencadeiam as crises epiléticas. No entanto, ainda permanece por esclarecer se a epilepsia é causada por alterações anómalas no hipocampo ou se o hipocampo é danificado pelo efeito cumulativo das crises epiléticas (Andersen *et al.*, 2007).

1.11. O Receptor da Glicina e a Epilepsia

Existem vários indícios de que a neurotransmissão mediada pela glicina pode ter um papel importante em doenças relacionadas com o controlo motor tal como a epilepsia (Brackmann *et al.*, 2004).

A epilepsia é uma doença rara mas potencialmente fatal, que afecta o sistema nervoso central e que pode envolver mutações no receptor da glicina (Rajendra e Schofield, 1995). Esta desordem consiste em alterações na actividade eléctrica do cérebro caracterizadas por uma hiperexcitabilidade e uma actividade eléctrica hipersincronizada (Delpire, 2000) que originam manifestações motoras descritas por contracções involuntárias das extremidades do corpo, por convulsões incontroláveis e até pela perda da consciência (Purves *et al.*, 2008). Uma das hipóteses para essa excitabilidade anómala é o funcionamento anormal da transmissão inibitória mediada pelo GABA (Delpire, 2000).

Assim, são vários os estudos de genética molecular que descobriram que mutações na subunidade $\alpha 1$ do receptor da glicina - nomeadamente na ligação entre os domínios TM1 e TM2, no próprio TM2 e na ligação entre os domínios TM2 e TM3 - (Rajendra e Schofield, 1995); na subunidade β ; na gefirina (Rees *et al.*, 2002) e no GlyT2 (Gomez *et al.*, 2003) estão relacionadas com a epilepsia. Estas mutações podem ter vários efeitos que levam, em última análise, à redução da sensibilidade e da condutância do receptor da glicina ao ião Cl^- , ou seja, à diminuição do número de receptores funcionais na membrana celular, ou mesmo a uma atenuação da sua expressão (revisto em Bowery e Smart, 2006).

Por outro lado, outros estudos realizados num modelo animal de epilepsia demonstraram que a administração de glicina pode diminuir os ataques epilépticos (Cherubini *et al.*, 1981) e que os agonistas do receptor da glicina no hipocampo, nomeadamente a taurina, diminuem as descargas epilépticas, podendo assim ser considerados potenciais anticonvulsionantes (Kirchner *et al.*, 2003). Estes dados sugerem um importante papel para o receptor da glicina na epilepsia, tornando esta área de investigação bastante promissora.

1.12. Farmacologia do Receptor da Glicina

O antagonista mais potente do receptor da glicina é a estriquinina (Curtis *et al.*, 1968; Young e Snyder, 1973) que se liga irreversivelmente à subunidade $\alpha 1$ (Ruiz-Gomez *et al.*, 1990). No entanto, esta ligação é bloqueada pela própria glicina, o que sugere uma possível relação entre os locais de ligação a agonistas e antagonistas (Graham *et al.*, 1983). Um outro antagonista dos receptores da glicina é a picrotoxina que também é usada como antagonista dos receptores GABA_A . O que este antagonista tem de peculiar é que consegue distinguir entre os receptores de glicina homoméricos e heteroméricos, sendo mais potente nos homoméricos (Pribilla *et al.*, 1992).

Os principais agonistas do receptor da glicina são, para além da glicina, a β -alanina e a taurina, por ordem decrescente de potência (Lewis *et al.*, 2003). Apesar de ser uma área onde ainda há

1. Introdução Teórica

muita controvérsia, estudos relativamente recentes identificaram o local onde ocorre a ligação dos agonistas ao receptor da glicina na interface entre as subunidades $\alpha 1$ e β (Grudzinska, 2005).

2. Objectivos:

O principal objectivo deste trabalho é realizar uma caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato em diferentes estadios de desenvolvimento, tendo os seguintes objectivos específicos:

- Avaliar a expressão proteica do receptor da glicina por *Western Blot* em diversos estadios de desenvolvimento;
- Analisar a expressão do mRNA das principais subunidades do receptor da glicina ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) por *reverse transcriptase polymerase chain reaction* ao longo do desenvolvimento;
- Efectuar uma localização subcelular do receptor da glicina nas várias áreas do hipocampo (GD, CA3 e CA1) em diferentes estadios de desenvolvimento.

2. Objetivos

3. Materiais e Métodos:

3.1. Reagentes

Os reagentes e consumíveis utilizados neste trabalho, salvo indicação em contrário, foram fornecidos pelos seguintes distribuidores: *AnalaR*, *BDH Chemicals Ltd*, *CalBiochem*, *Fluka*, *Merck* e *Sigma*.

3.2. Animais

Os animais da estirpe *Sprague-Dawley* com o tempo de gestação conhecido foram encomendados à *Harlan* (Espanha) e guardados no Biotério do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa. Aí permaneceram e tiveram as respectivas crias. Nas diferentes fases de desenvolvimento pós-natal (P) estudadas neste trabalho: no dia do nascimento (P0), sete (P7), catorze (P14) e vinte e um dias (P21) após o nascimento e, por fim, quando os animais são já considerados jovens adultos, com nove semanas de idade (9 semanas), os animais foram então sacrificados.

Para o estudo da fase pré-natal, os animais foram sacrificados ao décimo oitavo dia de gestação e os embriões (E18) retirados.

Todo o tratamento e manipulação dos animais foram feitos de acordo com as Leis Portuguesas e com as Directivas da União Europeia (86/609/EEC).

3.3. Extracção de amostras biológicas

Os animais foram anestesiados com uma mistura de isoflurano 30% (*Abbott*) em 1,2 – propanediol e sacrificados por decapitação na guilhotina (à excepção daqueles que vão ser perfundidos).

Todo o procedimento relativo à extracção e preparação de amostras biológicas foi feito, sempre que possível, em gelo ou em soluções geladas, de modo a que a temperatura seja baixa e, assim, diminuir o metabolismo das células e inibir a acção de proteases e ribonucleases.

3.3.1. Extracção da espinal medula

O corpo do animal (P21) foi disposto com a sua superfície ventral para baixo. Foi inserida uma tesoura no pescoço do animal e foi feito um corte na sua pele ao longo de toda a região dorsal. Os músculos dorsais foram afastados de modo a expor a coluna vertebral e o canal vertebral foi cuidadosamente aberto com uma pequena tesoura. A espinal medula aí alojada foi extraída com uma espátula através do corte dos nervos espinhais, de modo a isolar completamente a espinal medula. Por fim, as meninges e os vasos sanguíneos foram gentilmente removidos.

3.3.2. Extracção do cérebro

A cabeça do animal foi colocada com a sua superfície ventral para baixo e a pele do topo da cabeça foi cortada com o intuito de exhibir o crânio. Foi então introduzida uma tesoura no *foramen magnum* de modo a cortar o osso occipital e expor o cerebelo (Figura 7A), o que deve ser feito pressionando a tesoura contra o osso para não danificar o tecido cerebral. De seguida, foi feito um corte na área da sutura sagital, entre os dois ossos parietais, até à zona da bregma (Figura 7B). Os dois ossos parietais foram gentilmente puxados para o lado, expondo assim o cérebro que foi cuidadosamente levantado com uma espátula. Os nervos ópticos, que impediam a remoção do cérebro, foram cortados e a cabeça do animal foi colocada com o nariz para cima, ficando o cérebro apenas preso pelos nervos trigémos. Estes foram finalmente cortados possibilitando assim a remoção completa do cérebro (Figura 7C) (Palkovits e Brownstein, 1988).

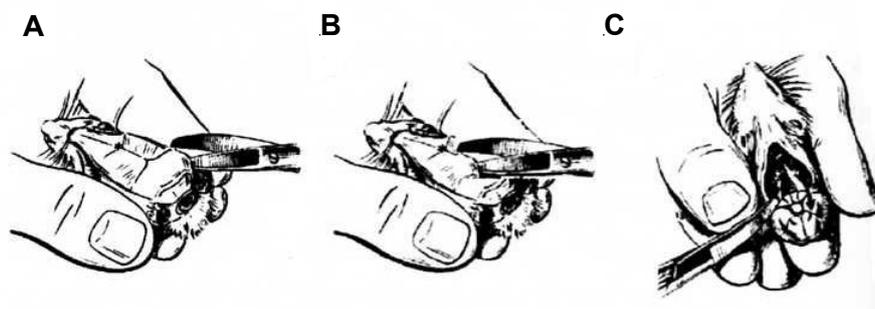


Figura 7 – **Extracção do cérebro de rato.** (A) - Introdução de uma tesoura no *foramen magnum* para cortar o osso occipital. (B) – Corte da sutura digital até à zona da bregma para separar os ossos parietais. (C) - Corte dos nervos trigémos que permitem a extracção completa do cérebro. (Adaptado de Palkovits e Brownstein, 1983).

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

O cérebro foi imediatamente colocado numa caixa de petri contendo PBS gelado (*phosphate buffered saline*) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄·2H₂O e 1,5 mM KH₂PO₄), que foi várias vezes substituído para se efectuarem várias lavagens ao cérebro.

Para o estudo da fase de desenvolvimento pré-natal, os embriões (E18) foram colocados numa caixa de petri com PBS gelado, tendo-se procedido à extracção dos cérebros e ao isolamento dos hipocampos usando a metodologia referida.

3.3.3. Extracção do hipocampo

Foi feito um corte com um bisturi pela *midline* do *corpus callosum* de modo a separar parcialmente os dois hemisférios cerebrais e revelar assim a ligação do hipocampo ao septo através da fimbria. Foi introduzida uma pequena espátula e uma pequena pinça no ventrículo lateral para puxar gentilmente o neocórtex que cobre o hipocampo, com o objectivo de expor a sua superfície, tal como indicado na figura 8A pelas setas. De seguida, foi colocada uma espátula gentilmente por baixo da fimbria e do hipocampo, tal como evidenciado na figura 8B pelas setas, de modo a isolar o hipocampo do cérebro levantando-o um pouco e puxando-o com a ajuda de uma pinça (Figura 8C). Por fim, dado que o hipocampo vai ser homogeneizado, é necessário ter o cuidado de garantir que todo o tecido que não pertence ao hipocampo é removido, incluindo as meninges que o cobrem (Shahar *et al.*, 1989).

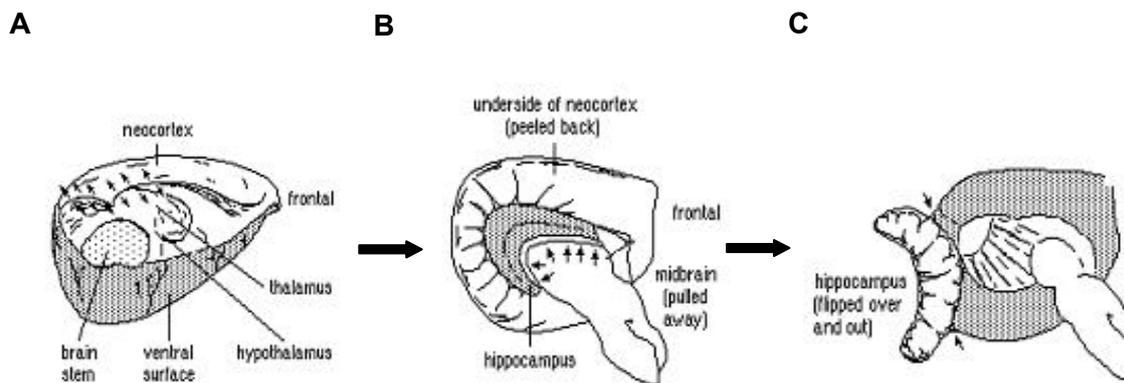


Figura 8 – **Extracção do hipocampo do cérebro de rato.** (A) – Remoção do neocórtex de modo a expor o hipocampo. (B) – Início da extracção do hipocampo. (C) – Isolamento total do hipocampo do resto do cérebro. (Adaptado de Palkovits e Brownstein, 1983).

3.4. Técnicas

3.4.1. *Western Blot* – Descrição teórica

O *Western Blot* é uma técnica muito utilizada em biologia molecular para a identificação de proteínas num homogenato, através do seu reconhecimento por um anticorpo (Harlow e Lane, 1999).

O procedimento de um *Western Blot* pode ser dividido em quatro etapas: a) preparação da amostra proteica, b) separação das proteínas por electroforese num gel de poliacrilamida, c) transferência das proteínas para um suporte sólido (normalmente membranas de nitrocelulose) e, finalmente, d) a detecção da proteína (antigénio) (Harlow e Lane, 1999).

Há dois tipos principais de anticorpos, os anticorpos monoclonais e os anticorpos policlonais. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, uma vez que foram produzidos somente por uma linha clonal de células B e reconhecem apenas um epítopo de um antigénio. Os anticorpos policlonais são derivados de uma linha celular composta por diferentes linhagens de células B, sendo assim uma mistura de anticorpos que reconhecem vários epítomos de um antigénio, obtendo-se um sinal bastante forte. No entanto, são mais propícios a reacções inespecíficas pelo que, sempre que possível, deverá ser utilizado um anticorpo monoclonal, apesar de poder ter um sinal mais fraco (Harlow e Lane, 1999).

As interacções anticorpo-antigénio podem ser detectadas através da marcação do anticorpo com, por exemplo, um enzima, tal como o peroxidase (EC 1.11.1.7) de rábano (HRP - *horseradish peroxidase*), ou com um fluoróforo e ser visualizado por microscopia de fluorescência (Harlow e Lane, 1999), (ver subcapítulo 3.4.3. Imunohistoquímica – Descrição teórica).

A electroforese é o estudo do movimento de partículas carregadas sob a acção de um campo eléctrico e é muito utilizada na análise de proteínas e ácidos nucleicos.

Quando as amostras são sujeitas à acção de um campo eléctrico, as que possuem carga positiva vão migrar para o cátodo (eléctrodo negativo) e as que possuem carga negativa vão migrar para o ânodo (eléctrodo positivo), isto é, o tipo de carga da amostra determina o seu sentido de migração. A carga de uma amostra é devida à ionização de um ou mais grupos químicos, processo este que é bastante condicionado pelo pH da solução tampão. Esta solução também é bastante importante para promover a condução da corrente eléctrica entre

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

os dois eléctrodos através dos iões presentes no tampão. Por outro lado, a velocidade de migração da amostra está dependente do valor da sua carga, do campo eléctrico aplicado e ainda dos efeitos causados pelo atrito entre a própria amostra (que está relacionado com o seu tamanho) e o meio de suporte. Porém, dado que numa electroforese o campo eléctrico aplicado é mantido constante, a migração da amostra ocorre, essencialmente, de acordo com a sua razão carga/massa. Assim, é possível separar os componentes de uma amostra através das suas diferentes mobilidades electroforéticas (Wilson e Walker, 2005).

As técnicas electroforéticas podem ainda ser úteis na determinação da massa molecular de uma proteína em estudo, através da comparação da distância percorrida por esta com a distância percorrida, no mesmo gel, por proteínas de massa molecular conhecida (marcadores) (Wilson e Walker, 2005).

Uma das formas de analisar as proteínas de uma amostra, é através da separação em gel de poliacrilamida desnaturante contendo SDS (*sodium dodecyl sulfate*), vulgarmente conhecida como SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Neste tipo de separação, o principal cuidado a ter é escolher um anticorpo que reconheça as proteínas desnaturadas (Harlow e Lane, 1999).

Antes da aplicação no gel, as proteínas são desnaturadas pela acção do calor e pelo SDS presente no tampão de amostra. O SDS liga-se fortemente às proteínas conferindo-lhes carga negativa e, conseqüentemente, quando sujeitas à acção do campo eléctrico, migrem para o ânodo. Também está presente no tampão de amostra um reagente tiólico, usualmente o β -mercaptoetanol ou o DTT (*dithiothreitol*) que é usado para reduzir as ligações persulfureto. Outro dos constituintes do tampão de amostra é o glicerol que é utilizado para aumentar a densidade da amostra e assim mantê-la no fundo do poço aquando a aplicação no gel. Para visualizar a migração das proteínas é aplicado a este tampão um corante, geralmente o azul de bromofenol que, sendo aniónico e pequeno, irá migrar mais rapidamente do que qualquer componente da mistura a separar, originando assim uma frente de migração que permite monitorizar todo o processo de separação (Wilson e Walker, 2005).

Os géis de poliacrilamida são muito usados em electroforese de proteínas, pois apresentam uma elevada resolução, originando uma boa separação dos componentes da amostra em estudo, que depende também do tamanho dos poros causados pela estrutura do gel. Estes géis são preparados através da polimerização do radical livre acrilamida com o agente de ligações cruzadas N,N'-metileno-bisacrilamida. A reacção de polimerização é iniciada pelo agente iniciador APS (*ammonium persulfate*) e pelo catalisador TEMED (*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*). Os géis são, assim, redes tridimensionais de cadeias de hidrocarbonetos ligadas por grupos metilenos (Wilson e Walker, 2005).

3. Materiais e Métodos

Neste trabalho, a electroforese foi realizada por um sistema vertical descontínuo, em que o tampão utilizado na preparação dos géis é diferente daquele que é usado no reservatório electroforético. Este tipo de sistema é composto por dois géis de composição distinta (concentração de acrilamida, pH e força iónica) mas contíguos. O primeiro gel é um gel com poros largos que fica na parte superior do sistema e é um gel de concentração. O segundo, fica na parte inferior, é um gel resolvente que permite a separação das amostras, tendo assim poros mais apertados.

A diferença que existe nos valores de pH entre os dois géis é importante, pois é através dessa diferença que ocorre a concentração da amostra no gel de concentração, o que faz com que seja possível usar volumes maiores de amostra num sistema descontínuo do que num sistema contínuo, pois este não possui géis concentradores (Wilson e Walker, 2005).

O valor da concentração de acrilamida na mistura de polimerização determina o tamanho dos poros do gel, diminuindo o tamanho do poro à medida que a concentração de acrilamida aumenta. Assim, a escolha do valor de concentração de acrilamida é muito importante para se obter uma boa separação da amostra (Wilson e Walker, 2005).

Após a separação das proteínas, ocorre a transferência destas sob a acção de um campo eléctrico, para uma membrana, usualmente de nitrocelulose, que será uma réplica exacta da separação que ocorreu no gel. É então esta membrana, que contém as proteínas aí imobilizadas, que vai ser incubada com os anticorpos específicos, o que vai permitir a identificação e a posterior semi-quantificação das proteínas em estudo. A transferência pode ocorrer por um sistema “molhado” que é o que foi usado neste trabalho, em que os géis estão totalmente submersos no tampão de transferência, ou por um sistema “semi-seco” em que os géis são colocados entre papel de filtro completamente embebido no tampão de transferência (Harlow e Lane, 1999).

O processo de detecção de uma proteína numa membrana é composto essencialmente por três fases: a) bloqueio da membrana, b) ligação ao anticorpo e c) visualização do sinal. Uma vez que as membranas utilizadas na técnica de *Western Blot* têm uma elevada afinidade para proteínas, é necessário bloquear as membranas com uma solução rica em proteínas como, por exemplo, leite magro, de modo a evitar a adsorção inespecífica entre o anticorpo e a membrana (Harlow e Lane, 1999).

Após o bloqueio é feita a incubação da membrana com o anticorpo primário, que é específico para a proteína (antigénio) em estudo, e com o anticorpo secundário que, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. O anticorpo secundário está conjugado com uma molécula que facilita a sua identificação, geralmente o peroxidase (EC 1.11.1.7) de rábano. Deste modo, a proteína de interesse pode ser detectada através de uma reacção catalisada pelo enzima

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

peroxidase (EC 1.11.1.7) de rábano, que leva à formação de um produto luminescente (Harlow e Lane, 1999).

A reacção de visualização foi feita através de um *kit* específico que é baseado na formação do radical superóxido a partir do peróxido de hidrogénio numa reacção catalisada pelo enzima peroxidase (EC 1.11.1.7). O radical superóxido, por sua vez, provoca a oxidação do luminol que é acompanhada pela emissão de radiação, com o máximo de emissão a 430 nanómetros. Esta radiação vai então impressionar um filme autoradiográfico, cujo sinal corresponderá à zona da membrana onde se formou o complexo antigénio/anticorpo primário/anticorpo secundário/enzima (Harlow e Lane, 1999).

Para garantir que as possíveis diferenças observadas na expressão da proteína em estudo nas várias amostras analisadas é devida efectivamente à amostra em si, é necessário assegurar que a quantidade de proteína que está a ser aplicada em cada poço é sempre a mesma e, para isso, é utilizado um controlo positivo à técnica. Também deve sempre ser feito um controlo positivo à amostra em estudo que se baseia num homogenato com concentração abundante da proteína que se pretende analisar, de modo a comprovar que o protocolo é eficiente e correcto e que o anticorpo reconhece o antigénio-alvo (Harlow e Lane, 1999).

Para se proceder à quantificação prévia das proteínas na amostra antes de se realizar o *Western Blot* existem vários métodos disponíveis, sendo que o mais conhecido é o método de Lowry (Lowry, 1951). Neste trabalho, uma vez que a quantificação de proteínas é feita após a solubilização com detergentes, foi utilizado o método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1979). Assim, a quantificação de proteínas foi realizada através de um ensaio colorimétrico segundo as recomendações descritas no manual (*Bio-Rad DC Protein Assay*) e baseou-se na reacção das proteínas existentes no homogenato com uma solução alcalina de cobre, seguida de uma reacção com o reagente de Folin. A formação do ião cobre (Cu^+), causada pela oxidação das ligações peptídicas vai, então, ser responsável pela redução do reagente de Folin. O aparecimento da cor é devido à presença de várias espécies reduzidas que apresentam um azul característico que tem um máximo de absorvência a 750 nm e um mínimo a 405 nm.

3.4.1.1. Obtenção de homogenatos de espinal medula e hipocampo para *Western Blot*

Após a extração, os tecidos isolados foram imediatamente congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C.

Os hipocampus e a espinal medula (que servirá como controlo positivo à amostra) foram homogeneizados mecanicamente com um pistão de *Teflon* em tampão RIPA (*radio immunoprecipitation assay*) (50 mM Tris base pH 8, 1 mM EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*), 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 1% Nonidet® P40 *substitute* (*nonyl phenoxypolyethoxylethanol*)), suplementado com inibidores de proteases (*Complete Mini-EDTA free - Roche*), de modo a lisar as células e solubilizar as proteínas. O homogenato foi centrifugado a 11000 g (Centrifuga *Heraeus Biofuge Fresco*) durante 10 minutos a 4°C, obtendo-se um precipitado que é desprezado enquanto que o sobrenadante, correspondente à fracção solúvel, é armazenado a -20°C.

3.4.1.2. Quantificação de proteína

A quantidade de proteínas nos homogenatos foi determinada de acordo com o método de Peterson seguindo as instruções descritas no manual (*Bio-Rad DC Protein Assay*). A absorvência foi lida a 620 nanómetros (Leitor de placas *Anthos Lit 3*) usando BSA (*bovine serum albumin*) para fazer uma recta de calibração compreendida entre 0 e 1 mg/ml.

Foram utilizados dois hipocampus para todos os estadios pós-natais analisados e seis hipocampus para o estadio embrionário E18.

3.4.1.3. *Western Blot* – metodologia utilizada

As amostras foram desnaturadas usando o tampão de amostra (70 mM Tris pH 6,8, 6% glicerol, 2% SDS, 120 mM DTT e 0,0024% azul de bromofenol) e fervidas a 100°C durante 10 minutos. Foi utilizado um marcador de proteínas com pesos moleculares conhecidos (*Precision Plus Protein Standards Dual Color – Bio-Rad*). A electroforese foi realizada em gel de SDS-PAGE, num sistema vertical descontínuo, segundo a técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). As proteínas (70 µg no caso dos homogenatos de hipocampo e 5 µg no caso dos homogenatos de espinal medula) foram concentradas num gel de concentração 5% (Quadro I) e separadas num gel de resolução 12% (Quadro I) em presença do tampão de electroforese (12,5 mM Tris base,

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

96 mM glicina e 0,1% SDS). Foram depois transferidas para membranas de nitrocelulose usando o tampão de transferência (24 mM Tris base, 183 mM glicina e 20% metanol). As membranas foram bloqueadas com uma solução de leite magro 5% (em TBS-T (*tris buffered saline Tween-20*) - 20 mM Tris base, 137 mM NaCl e 0,1% *Tween-20*) durante 1 hora a temperatura ambiente. Após as lavagens em TBS-T, as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários diluídos em BSA 3% em TBS-T com 0,02% NaNO₃: anticorpo monoclonal de rato para o receptor da glicina (diluição 1:250; Quadro II) ou anticorpo policlonal de coelho para alfa-tubulina (diluição 1:5000; Quadro II).

A alfa-tubulina vai servir, neste caso, como controlo positivo à técnica, pois é uma proteína abundante nas células e expressa igualmente em todos os estadios de desenvolvimento estudados.

No dia seguinte, as membranas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, com os respectivos anticorpos secundários acoplados ao enzima peroxidase (EC 1.11.1.7) de rábano diluídos em leite magro 5% (em TBS-T): anticorpo de cabra anti IgG de coelho (diluição 1:5000; Quadro II) e anticorpo de cabra anti IgG de rato (diluição 1:5000; Quadro II).

As proteínas de interesse foram visualizadas seguindo as intruções do *kit* de detecção (*GE Healthcare, Amersham - ECL Western Blotting Detection Reagents*).

Quadro I – Preparação do gel resolvente 12% e do gel de concentração 5% para *Western Blot*.

	Gel resolvente 12%	Gel de concentração 5%
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	380 mM	-
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-	125 mM
Acrilamida	12%	5%
SDS	0,1%	0,1%
TEMED	0,04%	0,1%
APS	0,1%	0,1%

3.4.1.4. Tratamento estatístico

A intensidade de cada banda foi calculada usando o programa de tratamento e análise de imagem *ImageJ*. Os valores apresentados para cada uma das amostras foram obtidos através da normalização pelo controlo positivo, alfa-tubulina, e da normalização relativa ao menor tempo para o qual foi detectada expressão do receptor da glicina (P0).

3. Materiais e Métodos

Para comparar a expressão do receptor da glicina em diferentes experiências, foi feita uma análise de variância simples (*one way ANOVA* - *analysis of variance*) seguida de um teste de *Bonferroni*. Os valores de *p-value* obtidos inferiores a 0,001 representam diferenças estatisticamente significativas.

3.4.2. RT-PCR – Descrição teórica

A técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) revolucionou a biologia molecular ao permitir amplificar selectivamente, *in vitro*, segmentos de DNA (*deoxyribonucleic acid*) a partir de uma quantidade mínima de DNA molde. Essa amplificação de uma cadeia de DNA ocorre usando duas pequenas sequências de oligonucleótidos (*primer forward* e *primer reverse*), cada uma delas complementar a uma das cadeias do DNA molde (Strachan e Read, 2004).

O PCR desenvolve-se em três etapas: a desnaturação, a hibridação e a elongação. A desnaturação consiste na separação da dupla cadeia de DNA em duas cadeias simples, de modo a que a região a amplificar fique acessível e, tipicamente, ocorre a temperaturas entre 93 e 95°C. A hibridação é a fase onde ocorre a ligação dos *primers*, que vão flanquear o segmento de DNA a ser amplificado, às suas sequências complementares nas cadeias de DNA simples. Ocorre a temperaturas entre 50 e 70°C, dependendo da temperatura de *melting* dos *primers* (temperatura à qual apenas metade das cadeias de DNA estão em dupla hélice) que, por sua vez, depende da sua composição. A elongação consiste na acção do enzima DNA polimerase (EC 2.7.7.7) que promove a elongação da nova cadeia de DNA por complementaridade de bases (disponíveis no meio reaccional) a partir da cadeia de DNA molde e ocorre tipicamente a temperaturas entre 70 e 75°C (Strachan e Read, 2004).

Assim, o PCR ocorre em ciclos consecutivos (cerca de 30-40 vezes) (Figura 9) destas três etapas e tem lugar num aparelho designado por termociclador. O termociclador é programável de acordo com as reacções em estudo, sendo a temperatura um parâmetro bastante importante para o sucesso do PCR. Um outro parâmetro relevante para a reacção é o número de ciclos, sendo que há que ter sempre em conta que um número maior de ciclos promove a obtenção de mais produto, mas também promove a formação de produtos inespecíficos. Porém, com o aumento do número de ciclos, a relação com a quantidade de produto formada não é sempre linear, pois a determinada altura começa a ocorrer um efeito *plateau*. Esse efeito corresponde à atenuação na taxa exponencial da acumulação de produto nos últimos estados do PCR e pode ser causado pela degradação dos reagentes (nucleótidos e enzimas), pela

depleção de reagentes (*primers* e nucleótidos), pela inibição por produto final ou pela competição pelos reagentes por produtos não específicos (Sambrook e Russell, 2001).

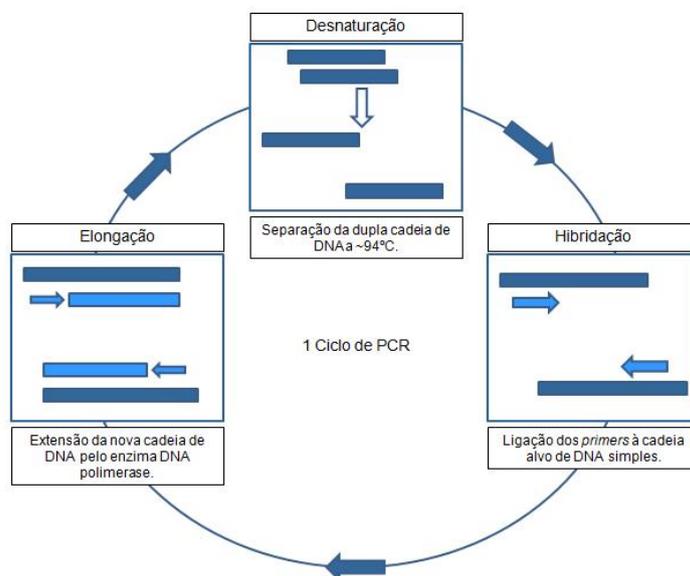


Figura 9 – Esquema simplificado de um ciclo de PCR que envolve a desnaturação, hibridação e alongação. PCR (*polymerase chain reaction*); DNA (*deoxyribonucleic acid*). (Adaptado de Wilson e Walker, 2005).

Para se realizar um PCR é, deste modo, necessário que esteja presente no meio reaccional a cadeia de DNA molde, os *primers*, o enzima DNA polimerase (EC 2.7.7.7), os nucleótidos, o ião magnésio (Mg^{2+}) e a solução tampão do PCR. O ião Mg^{2+} é fundamental, pois é ele que vai estimular a actividade do enzima DNA polimerase (EC 2.7.7.7), sendo importante também para aumentar a interacção DNA molde/*primer* (Sambrook e Russell, 2001).

A escolha dos *primers* é um factor muito importante numa reacção de PCR. O comprimento dos dois *primers*, o conteúdo em guaninas e citosinas, a temperatura de *melting*, que deverá ser semelhante para ambos, a complementaridade e especificidade, pois cada *primer* apenas se deverá ligar a uma zona do DNA, são todas elas características fulcrais para o sucesso do PCR. É ainda necessário ter em conta que os *primers* deverão ser complementares com a região de DNA a amplificar, mas não deverão ser complementares entre si, uma vez que isso impediria o sucesso do PCR (Wilson e Walker, 2005).

A técnica original do PCR deu origem a muitas variantes, entre elas a técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) que é bastante útil no caso de se pretender analisar sequências de DNA codificante. Neste caso, o DNA de partida é usualmente o cDNA

3. Materiais e Métodos

(*complementary DNA*), que foi obtido através do mRNA. Para isso, foi necessário proceder ao isolamento do RNA total, de um tecido ou linha celular que, por sua vez, foi sujeito a uma transcrição *in vitro*, usando o enzima transcriptase reversa (EC 2.7.7.49) originando assim o cDNA. Esta técnica pode, então, ser dividida em duas partes: a síntese do cDNA tendo o mRNA como cadeia molde pelo enzima transcriptase reversa (EC 2.7.7.49) e a amplificação do cDNA através do PCR propriamente dito (Strachan e Read, 2004).

A electroforese de ácidos nucleicos, ao contrário da electroforese de proteínas, é usualmente feita em géis de agarose (um polissacárido linear), uma vez que os géis de poliacrilamida, devido à dimensão reduzida dos seus poros, não permitem a separação de compostos com massas moleculares elevadas, tais como fragmentos de ácidos nucleicos. Assim, a electroforese em géis de agarose é um método muito utilizado para separar, identificar e purificar este tipo de moléculas (Wilson e Walker, 2005).

Os ácidos nucleicos, a pH neutro, vão ter carga negativa, o que faz com que as amostras, quando sujeitas a um campo eléctrico migrem para o ânodo. À semelhança dos géis de poliacrilamida, a agarose vai funcionar como uma rede cujos poros deixam passar mais facilmente os fragmentos de ácidos nucleicos mais pequenos, que vão assim migrar mais do que os de maiores dimensões. O tamanho dos poros do gel é controlado pela concentração inicial de agarose, habitualmente em concentrações entre 2 e 3%, sendo que quanto maior a concentração de agarose mais apertado é o poro. Uma vez que os géis de agarose separam as moléculas de ácidos nucleicos de acordo com o seu tamanho, é possível através da comparação da distância percorrida pela amostra em estudo com a percorrida por fragmentos de tamanho conhecido (marcadores), estimar o tamanho de cada fragmento da amostra a analisar, tal como acontece na electroforese de proteínas. Estes géis também permitem ainda distinguir as diferentes formas moleculares de DNA (superenrolada, circular e linear), uma vez que cada uma delas migra de forma distinta (Wilson e Walker, 2005).

Apesar de, à semelhança do que ocorre para a electroforese de proteínas, existirem muitos tipos de sistemas electroforéticos, o mais simples e mais usado é o sistema de gel horizontal, que fica completamente submerso no tampão de electroforese. O gel é feito através da dissolução da agarose numa solução tampão, sendo posteriormente adicionado brometo de etídeo. Este agente fluorescente incorpora-se entre as bases dos ácidos nucleicos, e permite a sua visualização quando exposto a luz ultravioleta (Wilson e Walker, 2005).

Tal como acontece para a electroforese de proteínas, também neste caso, antes de as amostras serem aplicadas no gel, estas são preparadas com o tampão de amostra que contém glicerol e azul de bromofenol, de modo a aumentar a sua densidade e originar uma frente de migração, respectivamente (Wilson e Walker, 2005).

A integridade e qualidade do RNA isolado podem ser analisadas imediatamente após a extração através de uma electroforese em gel de agarose. Apesar de serem três os principais tipos de RNA (RNA ribossomal, RNA de transferência e RNA mensageiro), o único que consegue ser detectado é o RNA ribossomal que corresponde a cerca de 80% do RNA total. Uma vez que o mRNA corresponde apenas a 5% do RNA total não consegue ser detectado. No entanto, a electroforese em gel de agarose é um método bastante utilizado para avaliar a integridade do RNA extraído, assumindo que a qualidade do RNA ribossomal reflecte a de toda a população de RNA. Idealmente deverão ser observadas duas bandas características do RNA ribossomal (18S e 28S), sendo a banda de 28S cerca de duas vezes mais intensa do que a banda de 18S. Porém, no caso de a amostra estar contaminada, é possível observar bandas mais pesadas que correspondem a DNA genómico ou, por outro lado, se a amostra estiver degradada, podem ser visíveis bandas menos pesadas devidas a produtos de degradação (Wilson e Walker, 2005).

3.4.2.1. Obtenção de homogenatos de espinal medula e hipocampo para RT-PCR

Após a extração, os tecidos isolados foram imediatamente congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C.

Os hipocampos e a espinal medula (que servirá como controlo positivo à amostra) foram homogeneizados mecanicamente com um pistão de Teflon com o tampão de lise pertencente ao *kit* de extração de RNA, de acordo com as instruções do mesmo (*GE Healthcare RNAspin Mini RNA Isolation Kit*).

3.4.2.2. Extração de RNA total do tecido e quantificação

Foi feito o isolamento do RNA total do tecido seguindo as instruções do *kit* de extração (*GE Healthcare RNAspin Mini RNA Isolation Kit*). O RNA total foi quantificado no *Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer)*. As amostras foram preparadas no tampão de amostra (60% (v/v) glicerol e 0,3% azul de bromofenol). Foi feita uma electroforese em gel de agarose 3% em tampão de electroforese TAE (*Tris-acetate-EDTA*) (20 mM ácido acético glacial, 40 mM Tris base e 1 mM EDTA) pH 8, com 0,4 µg/ml de brometo de etídeo. 2 µg de RNA foram visualizados por um transiluminador (*Vilber Lourmat*) e as bandas obtidas foram fotografadas com uma câmara digital (*Kodak*).

3.4.2.3. Transcrição do RNA em cDNA *in vitro*

Na reacção de transcrição *in vitro* usou-se 1 µg de RNA, seguindo as indicações do *kit* de transcrição (*SuperScript First Strand - Invitrogen*). A mistura reaccional (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl e 3 mM MgCl₂) continha 2,5 ng/µl de *random primers*, 0,5 mM de cada nucleótido, 0,01 M de DTT (tudo do *kit SuperScript First Strand - Invitrogen*) e o enzima transcriptase reversa (200 U/µl) (EC 2.7.7.49) (*SuperScript II - Invitrogen*). As misturas reaccionais foram colocadas num termociclador (*MyCycler – Bio-Rad*) (Figura 10) e submetidas ao seguinte programa: 65°C durante 5 minutos, 25°C durante 2 minutos, 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 60 minutos e, finalmente, 72°C durante 20 minutos. Para cada RNA efectuou-se um controlo negativo (sem o enzima transcriptase reversa (EC 2.7.7.49)) para garantir que o cDNA transcrito não era oriundo de DNA genómico que estivesse a contaminar a amostra.



Figura 10 – Termociclador (*MyCycler – Bio-Rad*) usado na transcrição *in vitro* e no PCR.

3.4.2.4. PCR

O cDNA obtido foi amplificado numa mistura reaccional contendo uma solução tampão com 0,8 µM de cada *primer* (*Invitrogen*), 0,05 mM de cada nucleótido, 1 mM de MgCl₂ e o enzima *Taq* DNA polimerase (1 U/µl) (*Promega*). As amostras foram colocadas num termociclador (Figura 10) com o seguinte programa: 94°C durante 2 minutos, 25 - 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 90 segundos e 72°C durante 60 segundos e, por fim, 72°C durante 15 minutos. Os *primers* (Quadro III) para amplificação das várias subunidades do receptor da

glicina (Heck *et al.*, 1996) e da beta-actina (gentilmente cedidos pelo Dr. Tiago Outeiro) utilizados nas reacções de PCR foram sintetizados pela *Invitrogen*.

As amostras foram preparadas no tampão de amostra. Foi realizada uma electroforese em gel de agarose 1,5-2% em tampão TAE com 0,4 µg/ml de brometo de etídeo para analisar os produtos do PCR. As bandas obtidas foram visualizadas por um transiluminador e fotografadas com uma câmara digital. Foi utilizado um marcador com fragmentos de ácidos nucleicos de tamanho conhecido (*Hyperladder I – Bioline*).

Foi feito um controlo positivo à técnica, usando o mRNA da beta-actina, pois é uma proteína abundante nas células e expressa igualmente em todos os estadios de desenvolvimento estudados.

3.4.2.5. Tratamento estatístico

Para calcular a intensidade de cada banda foi usado o programa de tratamento e análise de imagem *ImageJ*. Os valores apresentados para cada uma das amostras foram obtidos através da normalização pelo controlo positivo, beta-actina, e da normalização em relação ao menor tempo estudado (E18).

3.4.3. Imunohistoquímica – Descrição teórica

A imunohistoquímica é, tal como o *Western Blot*, uma técnica que se baseia na interacção entre a proteína de interesse (o antigénio) e um anticorpo que a reconhece. É assim possível localizar proteínas num determinado tecido através das interacções específicas anticorpo-antigénio (Harlow e Lane, 1999).

Para detectar o antigénio de interesse num tecido, podem ser utilizados dois métodos distintos: o método directo e o método indirecto. No método directo é utilizado um anticorpo primário marcado que se liga directamente ao antigénio. A principal vantagem deste método é a obtenção de sinais mais límpidos. Porém, este método apresenta algumas desvantagens, nomeadamente a pouca ampliação do sinal e de ser necessário mais tempo para marcar e estudar cada antigénio. No método indirecto, não é o anticorpo primário que está marcado, mas sim o anticorpo secundário que, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. O anticorpo secundário tem, assim, de ser obrigatoriamente dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal onde foi produzido o anticorpo primário. Este método possui as vantagens de ser mais

3. Materiais e Métodos

sensível, apresentando um sinal mais forte. É também um método mais versátil, bastando possuir um anticorpo secundário marcado que se pode ligar a vários primários, o que faz com que seja normalmente escolhido para estudos de imunohistoquímica em detrimento do método directo. Porém, também apresenta desvantagens, como por exemplo, o facto de ter mais ruído de fundo o que requer mais controlos (Harlow e Lane, 1999; Polak e Van Noorden, 1997).

Além dos controlos positivos à técnica, que garantem que os reagentes utilizados estão em boas condições, que foram adicionados na ordem correcta e que estão nas diluições pretendidas, é ainda necessário ter sempre um controlo negativo. Este consiste no uso do anticorpo secundário sem o anticorpo primário, tendo como objectivo identificar possíveis reacções inespecíficas (Harlow e Lane, 1999; Polak e Van Noorden, 1997).

As interacções anticorpo-antígeno podem ser visualizadas através da utilização de um anticorpo marcado com, por exemplo, um enzima, tal como o peroxidase (EC 1.11.1.7) de rábano, que é o que acontece na técnica de *Western Blot*, ou com um fluoróforo e ser visualizado por microscopia de fluorescência (Harlow e Lane, 1999).

Os fluoróforos são moléculas que estão normalmente no nível mais baixo de energia que, quando excitadas com fotões de determinado comprimento de onda, transitam para um nível superior de energia. Posteriormente, a molécula regressa ao nível mais baixo de energia, emitindo fotões (cor) com um comprimento de onda superior ao de excitação. Essa emissão pode ser visualizada por microscopia de fluorescência (Nelson e Cox, 2000).

A microscopia de fluorescência exige um equipamento dispendioso. No entanto, tem as vantagens de ser altamente específica e de permitir visualizar várias proteínas em simultâneo, pois diferentes anticorpos (que deverão ser de espécies distintas para evitar reacções cruzadas entre eles) podem estar marcados com diferentes sondas fluorescentes, permitindo assim a sua detecção simultânea. Este tipo de microscopia também permite o estudo de uma proteína *in vivo*, através de organismos ou células geneticamente modificados que expressam a proteína de interesse na forma de uma proteína de fusão, que consiste na proteína de interesse acoplada a uma proteína fluorescente. Estas proteínas de fusão fluorescentes podem então ser visualizadas por microscopia de fluorescência. Porém, possui a grande desvantagem de não apresentar uma marcação permanente, pois há perda de sinal com o tempo. É ainda possível usar este tipo de microscopia em conjunto com a microscopia confocal (Polak e Van Noorden, 1997; Wegerhoff, Weidlich e Kässens).

A microscopia confocal tem uma resolução bastante elevada, pois ilumina, através de um laser, apenas um ponto do tecido, o que permite obter uma melhor qualidade de imagem. O sistema elimina automaticamente a luz emitida por outras áreas que não estão no plano de focagem, sendo a luz emitida pelo fluoróforo capturada por um detector bastante sensível. Este tipo de

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

microscopia também permite obter imagens a diferentes profundidades do tecido (Wegerhoff, Weidlich e Kässens).

A técnica de imunohistoquímica usada pode ser dividida em quatro passos: a) fixação dos tecidos, b) preparação do tecido e adesão a um suporte sólido, c) permeabilização das células e ligação aos anticorpos e, por fim, d) montagem das preparações e visualização das interações anticorpo-antígeno por microscopia confocal (Harlow e Lane, 1999).

A fixação é um processo que tem como função preservar a morfologia celular e a arquitectura dos tecidos, mantendo-os o mais próximo possível das características *in vivo*. É um procedimento determinante para os passos que se seguem, pois uma incorrecta fixação leva à desintegração das fatias de tecido. O agente fixador vai prevenir a autólise, inibindo (através da desnaturação) os enzimas dos lisossomas e inibe também o crescimento de fungos e bactérias que podem promover reacções de putrefacção. O tipo de agente fixador utilizado depende do tipo de antígeno em estudo. Para as proteínas, é recomendável, entre outros reagentes derivados do formol, o uso de PFA (*paraformaldehyde*) que fixa os tecidos através da remoção dos lípidos e desidratação das células, estabilizando as proteínas na arquitectura celular (Borges-Ferro, 2007).

Para fazer todo o processamento dos tecidos é utilizada a técnica da parafinação que consiste no uso da parafina como matriz de inclusão, a qual permite obter fatias do tecido mantendo a sua morfologia celular.

O processo de parafinação é fácil de efectuar e pouco dispendioso. Esta técnica consiste na passagem dos tecidos por uma concentração crescente de alcóois que vão desidratar o tecido. Este passo é necessário, pois para que a parafina vá ocupar o espaço primeiramente ocupado pela água, esta deverá ter sido completamente removida do tecido, uma vez que a parafina e a água são imiscíveis e os tecidos ficarão deformados se a amostra não estiver convenientemente desidratada. Antes da passagem dos tecidos por parafina líquida, estes devem ainda passar por um recipiente contendo xilol que é miscível com o álcool e com a parafina, servindo assim como meio de transição. O xilol torna, assim, os tecidos translúcidos e também os limpa de todo o álcool antes da passagem por parafina. Após a formação do bloco de parafina (ponto de fusão entre 50 e 70°C), que permite orientar o tecido, ocorre então a execução dos cortes do tecido no micrótomo. É assim possível obter fatias de tecido num suporte sólido, seguindo-se uma incubação, a temperaturas de cerca de 60-70°C para que a parafina derreta e para promover a aderência total do tecido ao suporte sólido. De seguida, é imprescindível efectuar um processo de desparafinação, que é o processo inverso da parafinação, consistindo na passagem dos tecidos por xilol, por concentrações decrescentes de álcool e, finalmente, por água para os re-hidratar. Dado que o processo de

3. Materiais e Métodos

parafinação/desparafinação pode ser muito agressivo para os antigénios, alterando ou mascarando o seu epítipo, é necessário fazer um passo adicional de recuperação do antigénio (Bancroft e Gamble, 2002; Borges-Ferro, 2007).

É igualmente importante fazer a permeabilização das células, de modo a permitir a entrada dos anticorpos. A ligação inespecífica do anticorpo primário ao tecido é prevenida com uma incubação com uma solução de bloqueio rica em gelatina (Polak e Van Noorden, 1997). Após a ligação ao anticorpo primário e ao anticorpo secundário é então feita a incubação com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*), um fluoróforo, que intercala as cadeias de DNA das células marcando, assim, o seu núcleo (Strachan e Read, 2004), e permitindo a identificação do hipocampo devido ao aspecto característico das células que o constituem (Figura 6A). Por fim, é feita a montagem das lâminas com o meio de montagem adequado e as fatias são visualizadas por microscopia de fluorescência.

3.4.3.1. Fixação do cérebro e espinal medula

Após a remoção do cérebro e da espinal medula (que servirá como controlo positivo à amostra), os tecidos foram fixados em PFA 4% (em PBS) a temperatura ambiente durante uma semana.

3.4.3.2. Fixação do cérebro por perfusão

Para a análise dos cérebros dos animais com mais de 14 dias, foi necessário efectuar um protocolo de fixação por perfusão de modo a garantir que o PFA 4% (em PBS) penetrasse no cérebro.

Alguns dias antes de se proceder à perfusão dos animais estes foram manipulados com o objectivo de evitar possíveis efeitos de stress nos resultados obtidos.

No dia da perfusão, os animais foram pesados e, de acordo com o seu peso, foram anestesiados intraperitonealmente com a dose recomendada de pentobarbital (60 mg/Kg) (*Hikma*). Foram então colocados com a superfície ventral virada para cima e os seus membros superiores e inferiores foram imobilizados com fita adesiva. Foi feito um corte ao longo da superfície torácica de modo a expor o fim do esterno. Através da execução de uma incisão ao longo do esterno, a caixa torácica foi aberta e foi usada uma tesoura para, gentilmente, cortar o diafragma lateralmente (Figura 11A). De seguida, foi utilizado um afastador de costelas para

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

expor os pulmões, o coração e os grandes vasos sanguíneos (aorta, veias cavas, artérias e veias pulmonares). Foi então feita a inserção da cânula, que estava ligada ao sistema de perfusão, no ventrículo esquerdo do coração do animal (Figura 11B), para garantir que a solução perfundida chegava ao cérebro através da aorta e, foi feito um pequeno furo na aurícula direita. A bomba de perfusão (*Miniplus 3 – Gilson*) foi então ligada a uma velocidade de 13,3 ml/min e o animal foi intracardialmente perfundido primeiro com PBS para limpar os vasos, depois com o anticoagulante heparina (5000 U.I. / ml) (*B. Braun*), 0,5% em PBS, e por fim, com cerca de 200-250 ml de PFA 4% (em PBS). Foi então feita a extracção do cérebro, como descrito anteriormente, e colocado em PFA 4% (em PBS) a temperatura ambiente durante duas semanas.

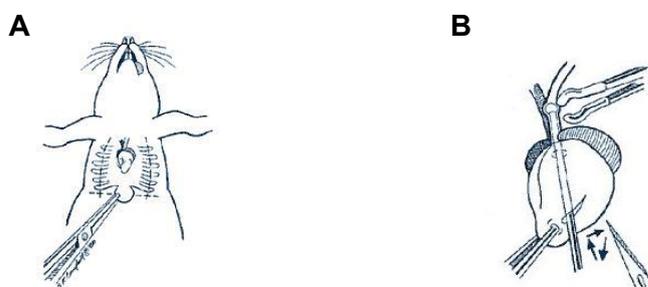


Figura 11 – **Representação esquemática da perfusão.** (A) – Corte do externo para expor a caixa torácica. (B) – Inserção da cânula no ventrículo esquerdo do coração do animal (Adaptado de www.neuroscienceassociates.com/perf-protocol.htm).

3.4.3.3. Parafinação do tecido e obtenção de fatias



Figura 12 – **Processador automático de tecidos** (*Leica TP 1020*).

3. Materiais e Métodos

Os tecidos foram colocados em cassetes próprias (*Roth*) e submetidos à parafinação. A parafinação consistiu no processamento dos tecidos num processador automático (*Leica TP 1020*) (Figura 12), que promoveu a passagem do tecido por uma concentração crescente de alcóois (70%, 95% (ambos da *AGA*) e 100% (*Panreac*)), por xilol (*VWR*) e por parafina líquida (*Merck*).

Posteriormente, foi feita a inclusão do tecido em parafina (*Leica EG 1150H*) formando um bloco sólido e definitivo de parafina/tecido. Os tecidos foram cortados no micrótomo (*Leica RM 2145*) (Figura 13) obtendo-se fatias da espinal medula e fatias coronais do cérebro, numa área relativa às coordenadas estereotáxicas compreendidas entre -5,20 mm e -5,60 mm (relativamente à bregma) (Paxinos e Watson, 1998), com uma espessura de 5 μ m. As fatias foram colocadas em lâminas aderentes próprias para o efeito (*Thermo-Scientific*) e submetidas a um banho-maria de 60°C durante poucos segundos, seguindo-se uma incubação na estufa a 70°C durante 30 minutos.



Figura 13 – Obtenção dos cortes do tecido no bloco de parafina usando o micrótomo (*Leica RM 2145*).

3.4.3.4. Desparafinação e recuperação do antigénio

As fatias de tecido foram submetidas a um processo de desparafinação que envolve a passagem por xilol, por concentrações decrescentes de álcool (100%, 95% e 70%) e, finalmente, por água.

A recuperação do antigénio consistiu em colocar as fatias num recipiente com a solução de recuperação adequada, neste caso o tampão Ácido Bórico pH 7 (0,02 M H_3BO_3 e 2 mM NaOH), e aquecê-las a altas temperaturas (95 – 100 °C) durante 15 minutos. As fatias foram,

de seguida, colocadas em PBS e estão prontas para iniciar a imunohistoquímica propriamente dita.

3.4.3.5. Imunohistoquímica – metodologia utilizada

Após ser retirado o PBS das fatias, estas foram permeabilizadas com uma solução de 1% *Triton X-100* e 0,1% gelatina em PBS durante 10 minutos. Foram feitas as lavagens com PBS e, apenas para as fatias que vão ser utilizadas para a detecção do receptor da glicina, foi efectuada uma incubação com metanol durante 10 minutos a -20°C. De seguida, fizeram-se as lavagens necessárias com PBS, e bloquearam-se as fatias com 0,25% gelatina em PBS durante 30 minutos. Os tecidos foram depois incubados durante a noite, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal de rato para MAP2 (*microtubule-associated protein 2*) (diluição 1:500; Quadro II) através de uma marcação simples, e anticorpo monoclonal de rato para o receptor da glicina (diluição 1:500; Quadro II) em simultâneo com o anticorpo policlonal de coelho para VIAAT (diluição 1:200; Quadro II), efectuando assim uma marcação dupla.

A detecção de MAP2 foi utilizada como controlo positivo, uma vez que as proteínas MAP2 estão envolvidas na neurogénese e são altamente expressas ao longo do desenvolvimento.

No dia seguinte, foram feitas as lavagens com 0,1% de *Tween-20* em PBS e as fatias foram incubadas durante 2 horas com os anticorpos secundários: anticorpo anti IgG de rato Alexa Fluor 568 e/ou anti IgG de coelho Alexa Fluor 488 (diluição 1:400; Quadro II) de acordo com o respectivo anticorpo primário, a temperatura ambiente. Posteriormente, foram feitas as lavagens com 0,1% de *Tween-20* em PBS e as fatias foram incubadas durante 5 minutos com DAPI (diluição 1:15000). Foram novamente feitas as lavagens necessárias com 0,1% de *Tween-20* em PBS e, por fim, foram feitas as montagens das fatias em Moviol (3,4 mM Moviol, 21% de glicerol e 0,1M tampão Tris base pH 8). A fluorescência foi finalmente visualizada pelo microscópio confocal (*Zeiss LSM 510 META*) (Figura 14) e as imagens foram obtidas em zonas correspondentes às seguintes coordenadas estereotáxicas: para o GD, as coordenadas laterais foram entre 2,5 e 3 mm e as coordenadas relativas à profundidade foram de 3,8 mm, para a zona CA3, as coordenadas laterais foram de 4 mm e as coordenadas relativas à profundidade foram de 7 mm e, por fim, para a zona CA1, as coordenadas laterais foram de 4 mm e as coordenadas relativas à profundidade foram de 3 mm. Todas estas coordenadas são relativas à bregma (Paxinos e Watson, 1998).

3. Materiais e Métodos

Todas as soluções de anticorpos usados para a imunohistoquímica foram preparadas em 0,1% gelatina em PBS e, no caso dos controlos negativos, é com esta solução que é feita a incubação das fatias em detrimento do anticorpo primário.



Figura 14 – **Microscópio confocal** (Zeiss LSM 510 META).

3.5. Anticorpos

Quadro II – Descrição dos anticorpos usados para imunohistoquímica e *Western Blot*.

Anticorpos primários	Distribuidor	Diluição	Técnica
Monoclonal de ratinho para o receptor da glicina (mAb4a)	<i>Synaptic Systems</i>	1:500	Imunohistoquímica
		1:250	<i>Western Blot</i>
Policlonal de coelho para o VIAAT	*Gentilmente cedido pelo Dr. Bruno Gasnier, Paris	1:200	Imunohistoquímica
Monoclonal de ratinho para MAP2	<i>Chemicon</i>	1:500	Imunohistoquímica
Policlonal de coelho para alfa-tubulina	<i>Abcam</i>	1:5000	<i>Western Blot</i>
Anticorpos secundários	Distribuidor	Diluição	Técnica
Cabra Anti IgG de ratinho Alexa Fluor 568	<i>Invitrogen</i>	1:400	Imunohistoquímica
Cabra Anti IgG de coelho Alexa Fluor 488	<i>Invitrogen</i>	1:400	Imunohistoquímica
Cabra Anti IgG de coelho acoplado a HRP	<i>Bio-Rad</i>	1:5000	<i>Western Blot</i>
Cabra Anti IgG de ratinho acoplado a HRP	<i>Bio-Rad</i>	1:5000	<i>Western Blot</i>

3. Materiais e Métodos

3.6. Primers

Quadro III - Descrição dos *primers* utilizados para RT-PCR.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Número de ciclos	Tamanho do fragmento (pb)
Beta-actina	<i>Forward</i> : AGCCATGTACGTAGCCATCC	62	25	228
	<i>Reverse</i> : CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	62		
α 1	<i>Forward</i> : GGAAGCGGCGACATCACAA	60	40	300
	<i>Reverse</i> : TGGACATCCTCTCTCCGGAC	64		
α 2	<i>Forward</i> : CAGAGTTCAGGTTCCAGGG	60	30	330
	<i>Reverse</i> : TCCACAACTTCTTCTTGATAG	60		
β	<i>Forward</i> : CTGTTTCAATCAAGCACTTTGC	62	30	223
	<i>Reverse</i> : GGGATGACAGGCTTGGCAG	62		

4. Resultados e Discussão:

4.1. Expressão do receptor da glicina

4.1.1. Análise da expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato

Para tentar caracterizar a ainda desconhecida expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento, foi feita uma análise por *Western Blot* de homogenatos de hipocampus provenientes de animais com diferentes idades. Também foram analisados homogenatos de espinal medula de ratos com vinte e um dias que foram utilizados como controlo positivo às restantes amostras.

A identificação do receptor da glicina foi efectuada através da interacção com um anticorpo monoclonal previamente caracterizado (Pfeiffer *et al.*, 1984), que reconhece especificamente todas as subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) do receptor da glicina. Porém, quer nos extractos de hipocampo analisados provenientes de estadios de desenvolvimento pós-natais (70 $\mu\text{g/poço}$), quer no extracto de espinal medula (5 $\mu\text{g/poço}$), apenas foi detectada uma banda com cerca de 48-49 kDa (Figura 15A) correspondente às subunidades α , não sendo visíveis quaisquer outras bandas. Quanto à fase de desenvolvimento embrionário estudada (E18), a expressão do receptor da glicina não foi detectada.

Por outro lado, nos homogenatos de espinal medula (EM), é possível observar uma banda muito mais intensa do que as obtidas para os homogenatos de hipocampo, apesar da quantidade de proteína aplicada ser bastante inferior (Figura 15A).

Ao realizar uma análise semi-quantitativa para comparar a expressão do receptor da glicina nas diversas fases de desenvolvimento pós-natais analisadas, é possível observar que existe um aumento significativo de 9-10 vezes ($p < 0,001$) da expressão do receptor da glicina no hipocampo entre P0 e P7 (Figura 15B). Porém, após esta altura, e tendo em conta os estadios estudados, a expressão do receptor da glicina começa a diminuir de uma forma dependente da idade. Até P21 mantém-se com níveis significativamente superiores ($p < 0,001$) ao determinado para P0. Contudo, o mesmo não parece acontecer no animal jovem adulto (9s), em que o nível de expressão do receptor da glicina não é estatisticamente diferente do determinado a P0

4. Resultados e Discussão

($p > 0,001$). De notar ainda que a diminuição na expressão do receptor da glicina é mais acentuada de P14 para P21 do que de P7 para P14.

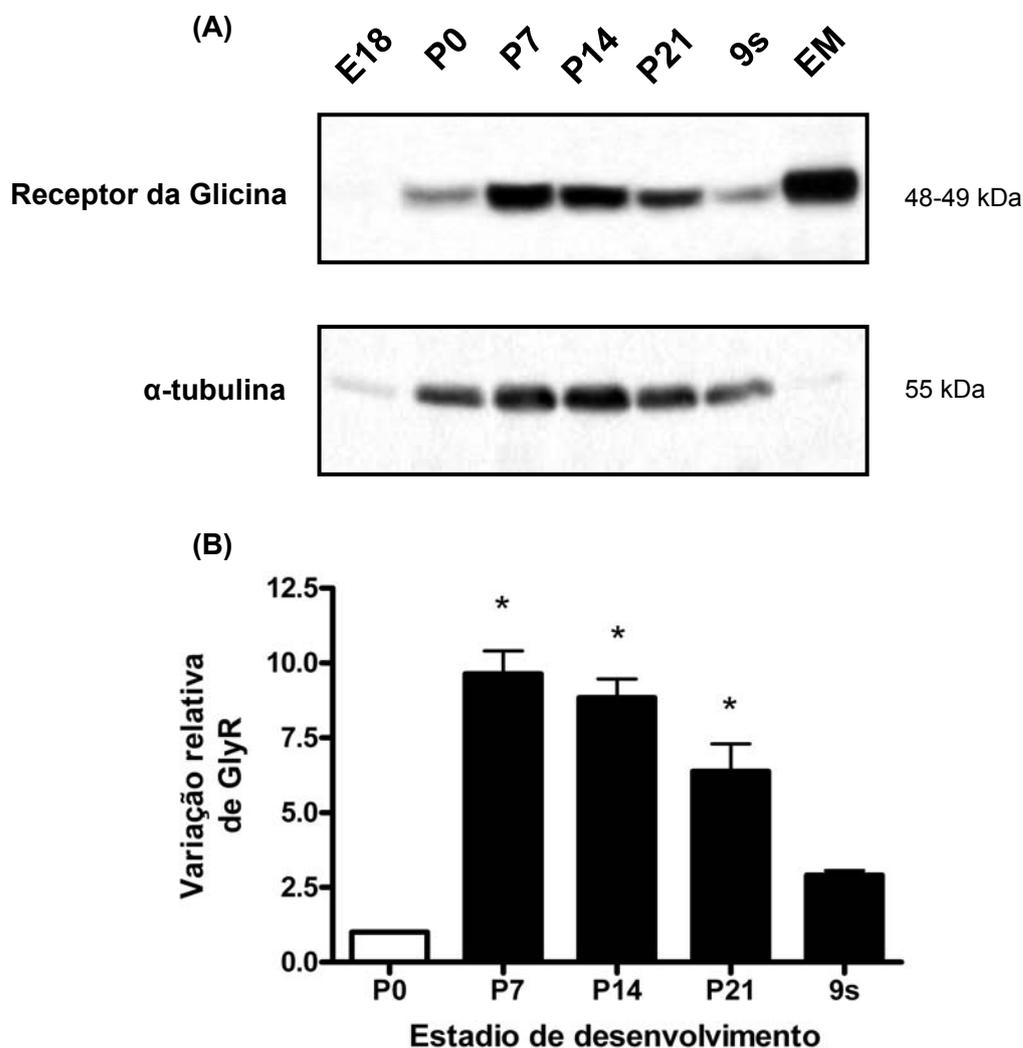


Figura 15 – Alteração da expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato em diferentes estadios de desenvolvimento. (A) *Western Blot* do receptor da glicina (48-49 kDa) e da alfa-tubulina (55 kDa), utilizada como controlo à técnica. Foram analisados homogenatos de hipocampo de rato extraído de um estadio embrionico (E18), à nascença (P0), sete (P7), catorze (P14) e vinte e um (P21) dias após o nascimento e com 9 semanas de idade (9s), e homogenatos de espinal medula (EM) de um rato com vinte e um dias. (B) Média da densidade do receptor da glicina ($n=3$). Todos os valores apresentados correspondem à média \pm erro padrão. * $p < 0,001$ em relação a P0 (análise de variância simples - ANOVA - seguida de um teste de *Bonferroni*). GlyR (*glycine receptor*)

4.1.2. Discussão

Os resultados apresentados evidenciam claramente a presença do receptor da glicina no hipocampo em várias fases de crescimento, o que até aqui não tinha sido completamente elucidado, e mostram ainda que a sua expressão não é constante ao longo do desenvolvimento. Mais concretamente, analisando os resultados, é possível inferir que, de todos os estadios de desenvolvimento estudados, é em P7 que existe o máximo de expressão deste receptor, sendo cerca de 9-10 vezes superior à expressão neonatal (P0) (Figura 15B). No entanto, é preciso realçar que estes resultados são uma consequência de uma análise semi-quantitativa e que, por isso mesmo, têm de ser analisados com os cuidados inerentes a este tipo de quantificação.

O aumento da expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato detectado durante a primeira semana de vida poderá estar relacionado com os co-transportadores de iões, NKCC1 e KCC2. Em neurónios imaturos, ambos os neurotransmissores principais inibitórios, GABA e glicina, têm uma acção excitatória, ao contrário do papel inibitório que os caracteriza em neurónios maduros. Essa alteração na função do GABA e da glicina parece estar relacionada com a expressão de NKCC1 e KCC2 e com a variação da concentração intracelular do ião Cl^- (revisto em Ben-Ari, 2002).

O transportador NKCC1 é responsável pelo influxo dos iões Na^+ , K^+ e Cl^- e é altamente expresso na altura do nascimento. Uma análise dos níveis de mRNA deste transportador revelou que a sua expressão no hipocampo é elevada na primeira semana de vida, diminuindo posteriormente ao longo do desenvolvimento (Plotkin *et al.*, 1997). Por outro lado, o transportador KCC2 tem como função o efluxo dos iões K^+ e Cl^- e é pouco expresso à nascença e nos primeiros dias de vida, aumentando a sua expressão após a primeira semana (Clayton *et al.*, 1998). Assim sendo, o receptor da glicina tem uma elevada expressão enquanto tem uma função excitatória mas, ao diminuir a expressão de NKCC1 com o consequente aumento de KCC2, o receptor da glicina torna-se inibitório e a sua expressão diminui.

Porém, o mecanismo que leva à expressão regulada destes dois transportadores ainda não foi elucidado. São vários os trabalhos que tentam contribuir para o esclarecimento desta alteração na função do GABA e da glicina. Um desses estudos, feito em culturas de neurónios do hipocampo, mostra que ao bloquear o receptor ionotrópico de GABA no hipocampo, GABA_AR (*GABA_A receptor*), o transportador KCC2 não é expresso, continuando o GABA a ter, mesmo em neurónios maduros, uma acção excitatória. Pelo contrário, quando os receptores de glutamato são bloqueados não existem alterações nos transportadores NKCC1 e KCC2. Deste

4. Resultados e Discussão

modo, os investigadores concluíram que o aumento da expressão de KCC2 parece estar dependente da activação dos receptores de GABA (Ganguly *et al.*, 2001).

O GABA tem ainda um papel fundamental na estimulação do desenvolvimento, incluindo migração neuronal, divisão celular e crescimento dendrítico (Owens e Kriegstein, 2002). Assim, é particularmente interessante que, apesar da importância dos receptores de glutamato, nomeadamente os NMDA, em diversos processos cerebrais, como por exemplo na plasticidade, estes não estejam directamente envolvidos nestas tarefas nem na alteração da função dos neurotransmissores GABA e glicina de excitatórios para inibitórios.

A excitação observada em neurónios imaturos do hipocampo devido à activação dos receptores de GABA é consequência de uma despolarização da membrana celular. Essa despolarização é suficiente para remover o ião magnésio (Mg^{2+}) que está a bloquear os receptores de glutamato NMDA, existindo assim um efeito excitatório cumulativo causado pelo GABA e pelo glutamato (Figura 16). Porém, esta relação entre o GABA e as sinapses glutamatérgicas pode causar um *loop* extremamente bem regulado que origina uma progressiva redução nas capacidades excitatórias do GABA, devido à maturação dos neurónios e ao aparecimento da transmissão glutamatérgica (revisto em Ben-Ari, 2002). Estes dados vêm assim confirmar que, tal como já tinha sido descrito, as sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas são formadas sequencialmente, sendo que as GABAérgicas são originadas antes das glutamatérgicas (Ben-Ari *et al.*, 1989) que, por sua vez, se desenvolvem progressivamente ao longo da primeira semana de vida (Delpire, 2000).

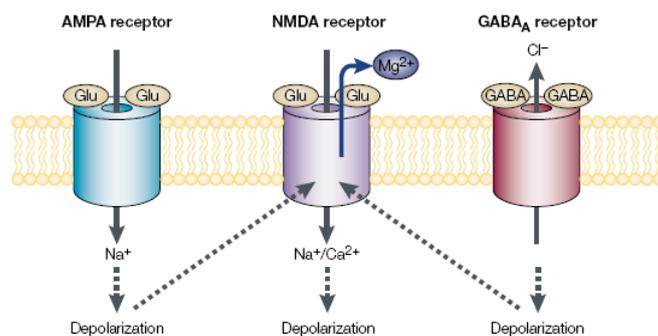


Figura 16 – **Acção sinérgica dos receptores GABA_A, NMDA e AMPA em neurónios imaturos.** A activação do receptor de GABA, GABA_AR, em neurónios imaturos do hipocampo origina uma despolarização capaz de remover o ião magnésio (Mg^{2+}) que está a bloquear os receptores de glutamato do sub-tipo NMDA. O desbloqueio destes receptores leva à sua activação, o que origina um aumento da concentração intracelular do ião Ca^{2+} . A activação do receptor AMPA tem um efeito sob o receptor NMDA semelhante ao descrito para o receptor GABA_AR. Glu (*glutamate*); AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*); NMDA (*N-metil-D-aspartato*); GABA_AR (*gamma-amino butyric acid A receptor*) (Adaptado de Ben-Ari, 2002).

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

Quando já existe uma densidade suficiente de sinapses mediadas pelo GABA e pelo glutamato e se torna necessário uma transmissão inibitória, então a expressão dos co-transportadores é alterada, passando a prevalecer o KCC2 que leva ao efluxo do íão Cl^- e à consequente hiperpolarização da membrana celular. Nesta altura, o GABA e a glicina começam então a exercer as suas funções inibitórias, passando a transmissão excitatória a ocorrer preferencialmente através do glutamato (revisto em Ben-Ari, 2002). No entanto, permanece por esclarecer a relação entre os co-transportadores NKCC1 e KCC2 e a alteração na função de excitatório para inibitório do receptor da glicina, pelo que mais estudos nesta área são necessários.

Os receptores NMDA têm a sua acção potenciada pela glicina (Johnson e Ascher, 1987). No entanto, a glicina que tem uma função de neurotransmissor inibitório e que é sintetizada no neurónio pré-sináptico a partir da serina origina uma neurotransmissão inibitória rápida e fásica através da activação dos receptores da glicina. A glicina responsável pelo aumento da acção dos receptores NMDA tem outra origem sendo, possivelmente, libertada paracrinamente por células adjacentes não neuronais (Muller *et al.*, 2008).

Por outro lado, é necessário não esquecer que no cérebro adulto existe a prevalência da transmissão inibitória GABAérgica em detrimento da glicinérgica, o que poderá levar também a uma diminuição da expressão do receptor da glicina. No entanto, ainda está por esclarecer se essa diminuição será devida a uma eliminação da transmissão glicinérgica ou a uma substituição por parte da GABAérgica.

A diminuição da expressão dos receptores da glicina poderá ser devida à sua internalização e/ou degradação ou causada pela atenuação da sua síntese devida à acção de um repressor da transcrição.

A diminuição acentuada da expressão do receptor de glicina no hipocampo após P14 (Figura 15A) pode assim explicar os resultados obtidos por Ito e Cherubini em 1991. Estes autores publicaram um trabalho de electrofisiologia que mostra que o receptor da glicina no hipocampo é activado pela glicina até à segunda semana de vida, não se registando qualquer activação após esse período (Ito e Cherubini, 1991). Estes resultados de electrofisiologia poderão estar assim correlacionados com os resultados aqui obtidos.

Por outro lado, um outro estudo efectuado no cérebro de rato mostrou, por ensaios de ligação em que foi utilizada a especificidade da ligação da estriquinina ao receptor da glicina, que existia um pico de expressão ao quinto dia de vida, diminuindo após este período até atingir níveis constantes quando o animal é já adulto (Benavides *et al.*, 1981). Apesar de no trabalho aqui descrito o estadio P5 não ter sido analisado, os resultados obtidos por Benavides e seus

4. Resultados e Discussão

colegas mostram um padrão de expressão do receptor da glicina no cérebro (Benavides *et al.*, 1981) semelhante ao aqui obtido para este receptor no hipocampo.

Para complementar o trabalho aqui discutido, poderia ser feita uma caracterização da expressão do receptor da glicina que compreendesse mais estádios de desenvolvimento, isto é, que tivessem um menor tempo de intervalo entre si.

Tal como já foi referido, os resultados aqui discutidos são apenas referentes a estádios pós-natais, apesar de também ter sido analisado um estádio embrionário (E18), para o qual não se obteve qualquer sinal. O facto de em E18 não ter sido detectado o receptor da glicina, apesar de se terem usado homogenatos obtidos de um número superior de hipocampos (6 hipocampos para E18 vs 2 hipocampos para os estádios pós-natais), poderá ser explicado por um nível de expressão abaixo do limite de detecção da técnica. No entanto, não se pode afirmar a ausência de expressão, uma vez que estudos de imunohistoquímica mostram a localização do receptor da glicina no hipocampo de E18, como será discutido nos próximos capítulos.

A identificação do receptor da glicina apenas originou uma banda correspondente às subunidades α (Figura 15A), não se conseguindo separar a subunidade α_1 (48 kDa) da subunidade α_2 (49 kDa) e, não sendo visível qualquer banda respectiva à subunidade β (58 kDa), à semelhança de outros trabalhos publicados (Danglot *et al.*, 2004) (Brackmann *et al.*, 2004). Possivelmente isso acontece devido ao anticorpo reconhecer com muito mais afinidade as subunidades α do que a subunidade β .

Deste modo, os resultados apresentados não são um indicador da expressão proteica de todas as subunidades do receptor da glicina mas apenas das subunidades α_1 e α_2 . No entanto, atendendo a que todos os sub-tipos de receptores descritos até ao momento, heteroméricos ou homoméricos, possuem subunidades α , esta análise poderá ser vista como uma avaliação da expressão do receptor da glicina.

Quanto à análise do receptor da glicina na espinal medula (5 μ g), é visível uma banda muito mais intensa do que as obtidas para os hipocampos (70 μ g) (Figura 15A), embora a quantidade de proteína aplicada tenha sido bastante inferior, o que vem confirmar a expressão acentuada deste receptor na espinal medula e a abundância da transmissão glicinérgica. Por outro lado, o facto de em qualquer dos casos, o anticorpo reconhecer uma única banda, é indicador da sua elevada especificidade.

Por fim, é ainda de salientar que cada observação efectuada (n) corresponde a uma ninhada de animais, provenientes do mesmo cruzamento e, sendo assim irmãos entre si, de modo a eliminar possíveis diferenças quer genéticas quer ambientais.

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

Em resumo, a identificação do receptor da glicina no hipocampo de rato por *Western Blot* revelou que a expressão deste receptor varia com o desenvolvimento, apresentando, de entre os estadios de desenvolvimento estudados, um pico de expressão a P7, o que poderá sugerir um importante papel para a transmissão glicinérgica em neurónios imaturos.

4.2. Expressão das subunidades do receptor da glicina

4.2.1. Extracção do RNA total e análise da sua integridade

Com o objectivo de investigar a expressão do mRNA das principais subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) do receptor da glicina no hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento, foi efectuada uma análise por RT-PCR de homogenatos de hipocampo de animais com diferentes idades. Foram também usados homogenatos de espinal medula de ratos com vinte e um dias de idade, que foram utilizados como controlo positivo às restantes amostras.

Tal como é possível observar na figura 17, em todos os homogenatos de hipocampo analisados correspondentes aos vários estadios de desenvolvimento, assim como no homogenato de espinal medula, são visíveis as duas bandas relativas ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo que a banda de 28S é mais intensa do que a de 18S. De notar ainda a ausência de bandas de degradação e de bandas mais pesadas, correspondentes a uma possível contaminação com DNA genómico.

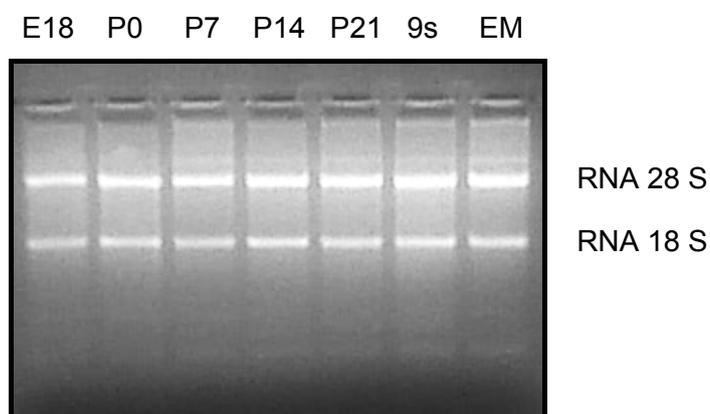
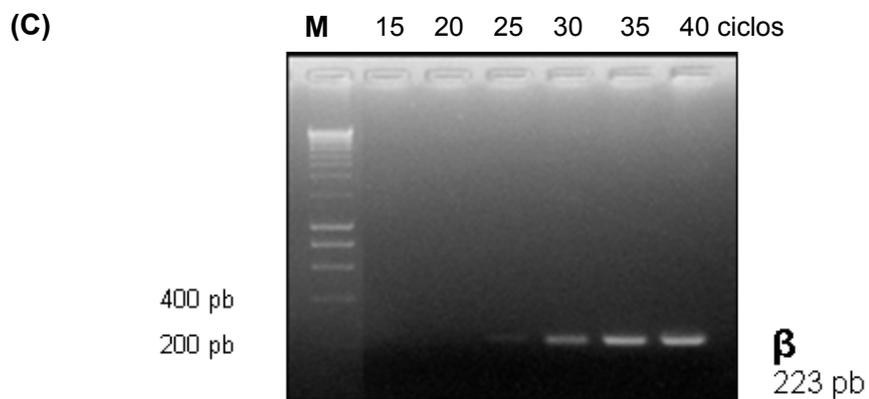
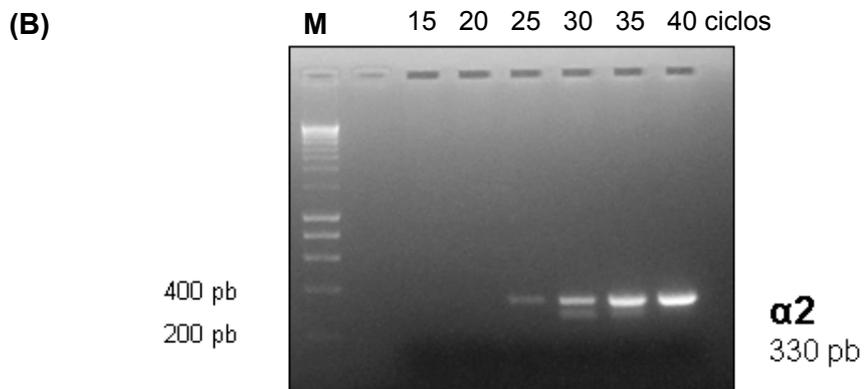
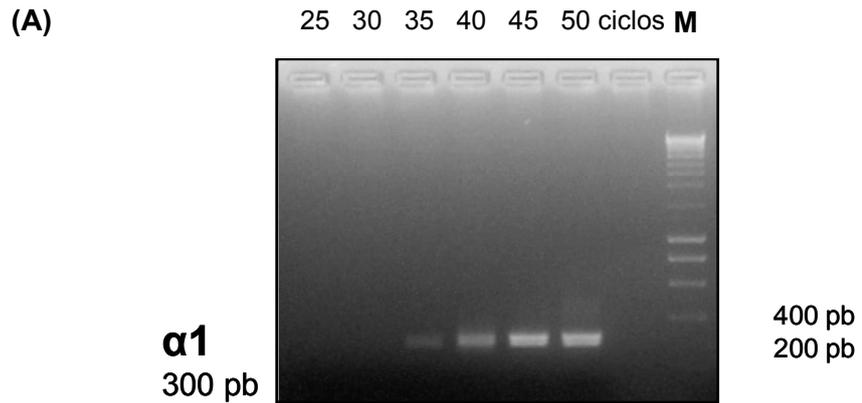


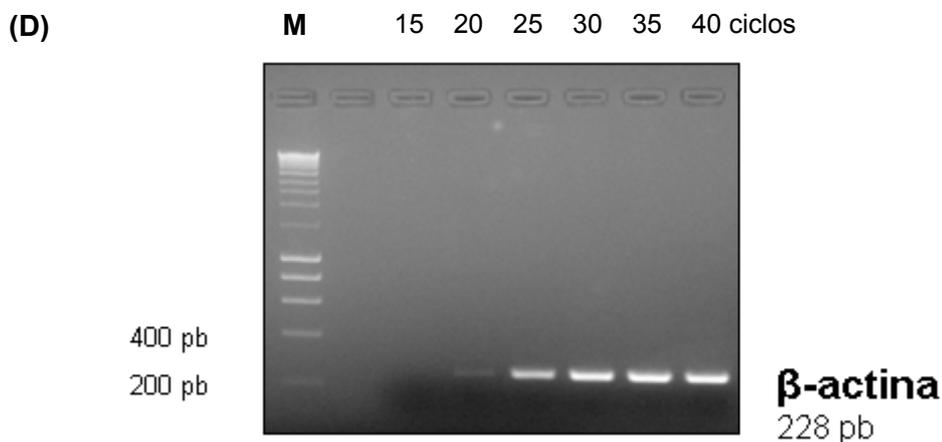
Figura 17 – **Estudo da integridade do RNA total isolado de homogenatos do hipocampo e da espinal medula.** Gel de agarose 3% do RNA total de homogenatos do hipocampo de embriões de rato (E18), de ratos no dia do nascimento (P0), sete (P7), catorze (P14) e vinte e um (P21) dias após o nascimento e com 9 semanas de idade (9s) e em homogenatos de espinal medula (EM) de um rato com vinte e um dias.

4.2.2. Determinação do número de ciclos adequado para o PCR

Antes de se realizar o PCR é necessário determinar qual o número de ciclos adequado a cada gene, de modo a que a reacção não ocorra nem na zona inicial da curva de amplificação do transcrito nem na zona saturada.



4. Resultados e Discussão



(E)

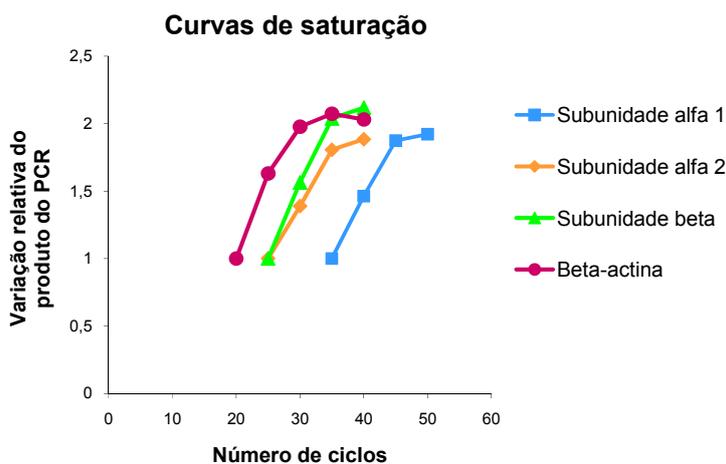


Figura 18 – Estudo dos produtos de PCR obtidos em função do número de ciclos para cada gene estudado. (A-D) Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos para as subunidades $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B) e β (C) do receptor da glicina e para a beta-actina (D). O PCR foi efectuado a partir de homogenatos de hipocampo de ratos com 6 semanas. (E) Curvas de saturação obtidas para as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e β do receptor da glicina e para a beta-actina. A intensidade de cada banda foi calculada usando o programa de tratamento de imagem *ImageJ* e os valores apresentados para cada uma das amostras foram obtidos através da normalização pelo menor número de ciclos onde foi detectado produto: 35 ciclos para a subunidade $\alpha 1$, 25 ciclos para as subunidades $\alpha 2$ e β e 20 ciclos para a beta-actina. M (marcador).

Assim, para calcular o número de ciclos de PCR adequado a cada gene, foram utilizados hipocampos provenientes do mesmo estadio de desenvolvimento. Neste caso, foram usados hipocampos oriundos de um animal com 6 semanas. Foi escolhido um animal com esta idade de modo a que a expressão do receptor da glicina se encontrasse entre a expressão detectada a P21 e a detectada a 9 semanas, o que foi confirmado por *Western Blot*.

Não poderiam ser utilizados animais em que a expressão do receptor da glicina fosse máxima ou mínima, pois isso levaria a falsos positivos e a um cálculo incorrecto do número de ciclos para cada gene. O número de ciclos determinado para a realização do PCR para cada um dos genes foi escolhido por se encontrar na fase ascendente da curva de saturação.

Observando as curvas de saturação (Figura 18E), o número de ciclos adequado é 25 ciclos para a beta-actina, 30 ciclos para as subunidades $\alpha 2$ e β do receptor da glicina e 40 ciclos para a subunidade $\alpha 1$ do receptor da glicina.

4.2.3. Análise dos fragmentos de DNA obtidos por RT-PCR

Para se efectuar a análise da expressão dos genes das principais subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) do receptor da glicina no hipocampo de ratos com várias idades, foi feita uma análise por RT-PCR. Todos os controlos negativos efectuados, isto é, em que a transcrição *in vitro* foi completada na ausência do enzima transcriptase reversa (EC 2.7.7.49), não revelaram qualquer DNA genómico que pudesse estar a contaminar a amostra.

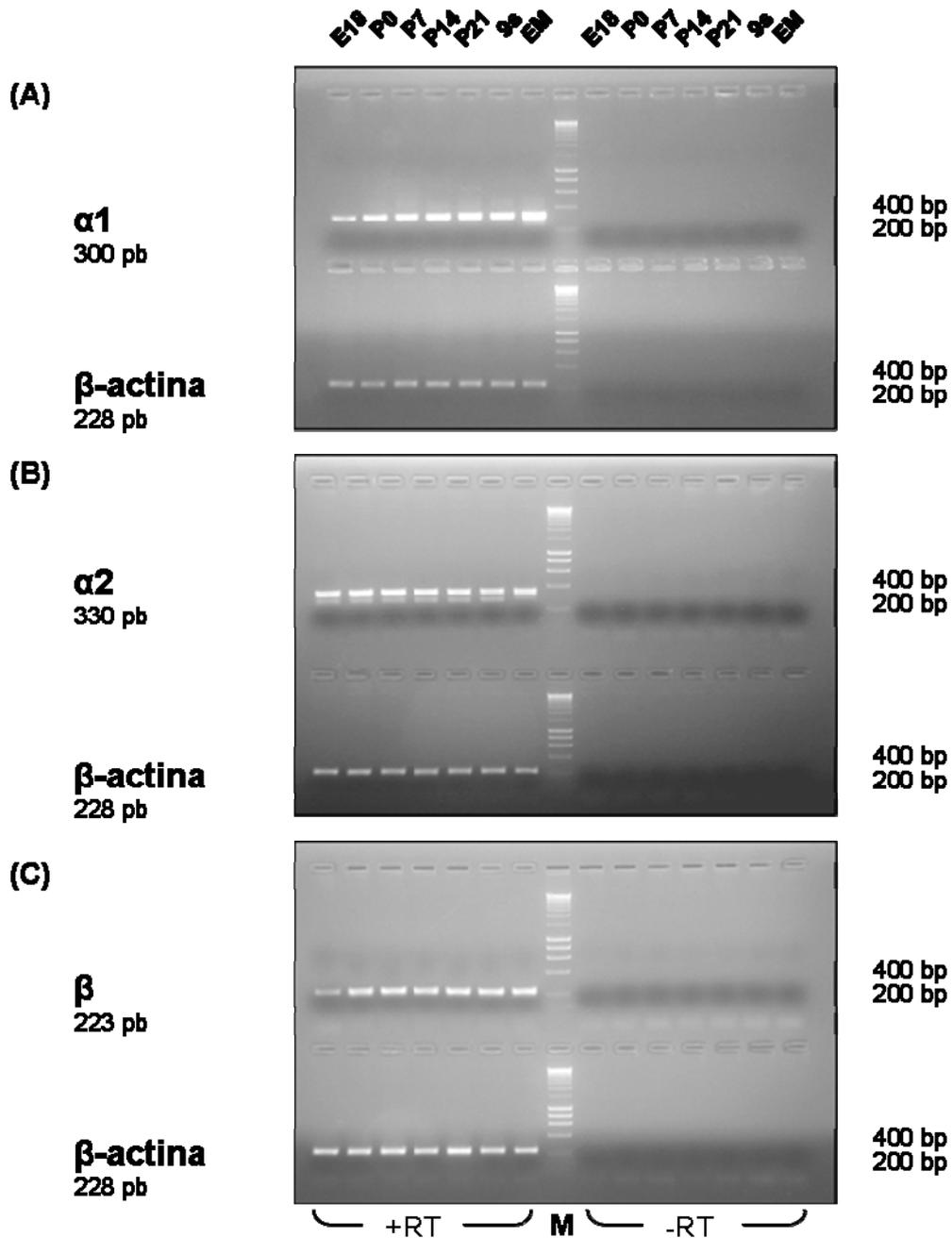
Os resultados mostram uma variação (Figura 19), ainda que pouco acentuada, na expressão das três subunidades do receptor da glicina ao longo do desenvolvimento. Analisando a figura 19, é possível observar um aumento da expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$ (Figura 19A) ao longo do desenvolvimento e um aumento da expressão do mRNA da subunidade $\alpha 2$ (Figura 19B) até cerca da primeira semana de vida, começando depois a diminuir. No caso da subunidade β (Figura 19C), observa-se um aumento entre o estadio E18 e P0 mantendo-se constante nos estadios seguintes.

Também é de salientar que em estadios embrionários (E18), a subunidade $\alpha 2$ é mais expressa do que a subunidade $\alpha 1$ (1,12 vs 0,86 - ambas normalizadas pelas respectivas actinas). No estadio embrionário foi também já detectado o mRNA da subunidade β (Figura 19A-C). Comparando a expressão dos mRNA's das principais subunidades do receptor da glicina ($\alpha 1$:0,86; $\alpha 2$:1,12 e β :0,6 - normalizadas pelas respectivas actinas) no estadio embrionário é

4. Resultados e Discussão

possível observar uma maior expressão do mRNA da subunidade $\alpha 2$, o que poderá indicar a predominância de receptores da glicina homoméricos, contituídos apenas por subunidades $\alpha 2$, neste estado de desenvolvimento.

Por outro lado, ao comparar a expressão do mRNA das subunidades α em estadios mais maduros (9s), a subunidade $\alpha 1$ é mais expressa do que a subunidade $\alpha 2$ (1,3 vs 0,97 - ambas normalizadas pela respectiva actina) (Figura 19A-B).



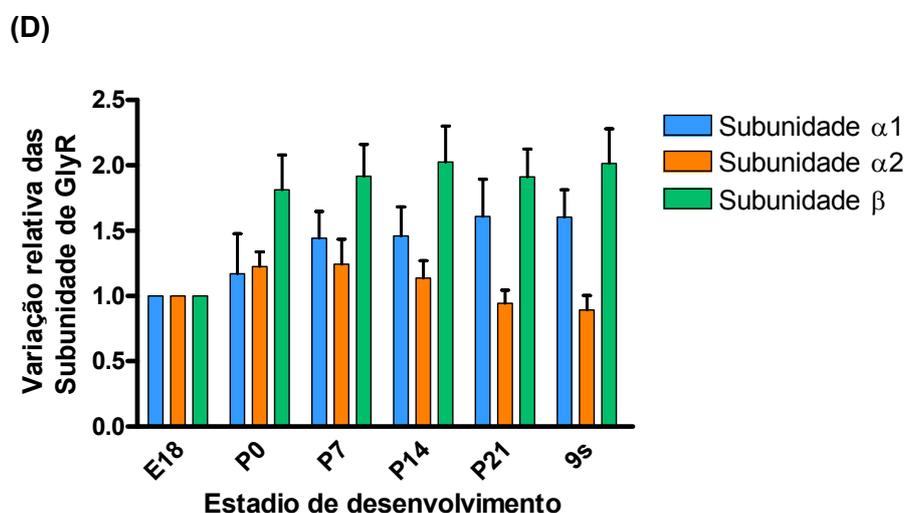


Figura 19 – Estudo dos produtos de PCR obtidos para os principais genes ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) da subunidade do receptor da glicina nos vários estadios de desenvolvimento. (A-C) Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos para as subunidades $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B) e β (C) do receptor da glicina. Foram analisados homogenatos de hipocampo de ratos extraídos de um estadio embrionico (E18), à nascença (P0), sete (P7), catorze (P14) e vinte e um (P21) dias após o nascimento e com 9 semanas de idade (9s) e homogenatos de espinal medula (EM) de ratos com vinte e um dias. (D) Média da densidade de cada uma das subunidades do receptor da glicina (n=4). Todos os valores apresentados foram calculados em relação a E18 e correspondem à média \pm erro padrão. GlyR (*glycine receptor*); RT (*reverse transcriptase*); M (marcador).

Nos homogenatos da espinal medula e que servem como controlo às restantes amostras, é possível observar que existe uma expressão das três subunidades em estudo ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β), sendo que comparando as duas subunidades α , existe uma maior expressão da subunidade $\alpha 1$ em relação à subunidade $\alpha 2$ (1,74 vs 1 - ambas normalizadas pela respectiva actina) (Figura 19A-C).

A análise semi-quantitativa dos resultados obtidos (Figura 19D) mostra que parece ser em P7 que a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$ transpõe a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 2$ no hipocampo. De salientar também que analisando o gráfico obtido (Figura 19D) parece existir um predomínio da subunidade β em relação às subunidades α ao longo de todo o desenvolvimento.

4.2.4. Discussão

Os resultados apresentados sugerem uma variação da expressão do mRNA das três principais subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) do receptor da glicina no hipocampo de rato ao longo dos vários estadios de desenvolvimento estudados. Mais concretamente, desde o estadio embrionico estudado (E18) até aos vários estadios pós-natais analisados, parece existir um aumento da expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$. A expressão do mRNA da subunidade $\alpha 2$, por outro lado, parece aumentar na primeira semana de vida e diminuir em estadios posteriores. Os níveis de expressão da subunidade β aumentam até P0 e, após este estadio, parecem ser relativamente constantes (Figura 19A-C).

Estes resultados indicam assim que o receptor da glicina tem uma expressão pré-natal, sendo a expressão dos mRNA's das principais subunidades do receptor da glicina detectada a E18 (Figura 19A-C), o que poderá indicar um importante papel da transmissão glicinérgica na formação de sinapses e/ou no amadurecimento neuronal.

A análise da expressão do mRNA por RT-PCR das várias subunidades do receptor da glicina no hipocampo durante o desenvolvimento revela, por um lado, que o padrão de expressão das subunidades α não se correlaciona com o da subunidade β . Por outro lado, os resultados obtidos também parecem mostrar que, no hipocampo de um animal adulto, existe uma maior expressão de $\alpha 1$ do que de $\alpha 2$. Estes resultados não estão de acordo com o que está descrito por outros autores que, através da análise da distribuição do mRNA das várias subunidades do receptor da glicina por hibridação *in situ* (Malosio *et al.*, 1991), observaram que o mRNA da subunidade $\alpha 2$ era detectado no hipocampo em níveis moderados, enquanto que o mRNA da subunidade $\alpha 1$ não era sequer detectado. Esta discrepância nos resultados obtidos, poderá dever-se ao facto de terem sido utilizadas técnicas diferentes, poderá estar relacionada com uma possível inespecificidade das sondas utilizadas na hibridação *in situ* ou, poderá ainda estar relacionada com fenómenos de *splicing* alternativo. Por *splicing* alternativo podem ser geradas outras variantes de $\alpha 1$ e $\alpha 2$, o que leva a uma possível heterogeneidade nos mRNA's detectados pelas sondas usadas na hibridação *in situ*, o que poderá não ter sido tomado em consideração. Todos estes factores, juntamente com o facto das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ possuírem uma homologia de cerca de 80 a 90% (revisto em Lynch, 2004), poderão ter causado inespecificidade nos resultados obtidos na década de 90 (Malosio *et al.*, 1991), o que poderá justificar as diferenças observadas.

É igualmente de referir que trabalhos de electrofisiologia efectuados em fatias de hipocampo de ratos adultos revelaram a presença de receptores da glicina sensíveis à estriquinina (Chattipakorn e McMahon, 2002). Uma vez que a estriquinina se liga irreversivelmente à

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

subunidade $\alpha 1$ (Ruiz-Gomez *et al.*, 1990), estes estudos são indicativos da presença de receptores compostos por subunidades $\alpha 1$ no hipocampo de um animal adulto, o que está de acordo com os resultados aqui obtidos.

Adicionalmente, um outro estudo de electrofisiologia (Thio *et al.*, 2003), mas que também utilizou a técnica de RT-PCR para confirmar a presença do receptor da glicina no cérebro de um ratinho adulto, mostrou que aí existe uma maior expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$ do que do mRNA da subunidade $\alpha 2$, tal como se obteve para o hipocampo de rato.

Ao analisar a expressão do mRNA das várias subunidades do receptor da glicina na espinal medula e comparando a expressão do mRNA das duas subunidades α , são detectados níveis mais elevados da subunidade $\alpha 1$ do que da subunidade $\alpha 2$ (Figura 19A-B). Estes resultados vêm confirmar que, contrariamente ao que se pensava inicialmente (revisto em Lynch, 2004), a subunidade $\alpha 2$ do receptor da glicina continua a ser expressa na espinal medula após o nascimento.

Para analisar as bandas de PCR obtidas foi efectuada uma análise semi-quantitativa (Figura 19D). Porém, existe um método de quantificação por excelência para produtos de PCR, o *Real-Time* PCR, que é um dos objectivos a ser realizado brevemente.

No entanto, a análise semi-quantitativa (Figura 19D) permitiu obter um perfil de expressão para cada uma das principais subunidades do receptor da glicina. Assim, é possível observar uma prevalência da subunidade β quando comparada com as subunidades α , em todos os estadios de desenvolvimento pós-natais estudados. Essa abundância da subunidade β poderá ser indicadora da predominância de receptores da glicina heteroméricos em detrimento dos homoméricos (abundantes em estadios imaturos) nos estadios pós-natais. A localização dos receptores heteroméricos, compostos por subunidades α e β , nas zonas pós-sinápticas, apenas pode ocorrer porque a subunidade β permite a ligação à gefirina e a posterior formação de aglomerados de receptores da glicina (Meyer *et al.*, 1995). Deste modo, provavelmente, poder-se-á inferir que os receptores de glicina no hipocampo maduro são na sua maioria heteroméricos e, por isso, se encontram maioritariamente localizados nas zonas sinápticas. A semi-quantificação realizada, poderá ser igualmente indicadora de um possível *switch* no hipocampo, à semelhança do que ocorre na espinal medula, entre as subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 1$ (Becker *et al.*, 1988). Esse *switch* parece ocorrer a P7, que é o estadio de desenvolvimento onde a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$ transpõe a do mRNA da subunidade $\alpha 2$ (Figura 19D).

4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos por RT-PCR poderão estar correlacionados com os resultados detectados por *Western Blot*, que revelam que a expressão das subunidades α do receptor da glicina é máxima a P7. Analisando os resultados obtidos por RT-PCR (Figura 19D), parece ser também a P7 que é detectado um maior número total de mRNA's das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$, o que poderá estar na base dessa possível relação.

É também de referir que, à semelhança do que acontece para o *Western Blot*, cada observação efectuada (n) equivale a uma ninhada de animais, oriundos do mesmo cruzamento, sendo assim irmãos entre si, de modo a anular quaisquer diferenças genéticas ou ambientais que pudessem influenciar os resultados. Também é de salientar que, sempre que possível, o mesmo n foi utilizado para análise para ambos os procedimentos, *Western Blot* e RT-PCR.

O estudo prévio da integridade do RNA total feito por electroforese é fundamental e revelou a presença de duas bandas, correspondentes ao RNA ribossomal, o que indica que o RNA extraído se encontra em boa qualidade e pode ser utilizado para a transcrição *in vitro* e para o PCR posterior.

É ainda de referir que na figura 19B, é visível uma banda mais leve que a da subunidade $\alpha 2$ do receptor da glicina que, possivelmente, será devida a uma outra variante da subunidade $\alpha 2$, uma vez que já se sabe que por *splicing* alternativo, são geradas várias isoformas das subunidades do receptor da glicina (revisto em Kirsch, 2006).

Essa banda não corresponde a uma possível inespecificidade causada pela subunidade $\alpha 1$, uma vez que, para todos os *primers* utilizados neste trabalho, foi efectuada uma pesquisa de homologia, não tendo sido detectado nenhum caso de inespecificidade. As sequências do mRNA das três principais subunidades ($\alpha 1$: NM 013133.1, $\alpha 2$: NM 012568.2 e β : NM 053296.1) do receptor da glicina e da β -actina (NM 031144.2) de rato (*Rattus norvegicus*) foram todas retiradas da base de dados *PubMed* (www.pubmed.org).

Deste modo, em resumo, os resultados obtidos por RT-PCR para as principais subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) do receptor da glicina no hipocampo, parecem indicar que, ao longo do desenvolvimento, existe um aumento na expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$. Por outro lado, a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 2$ aumenta nos primeiros dias de vida e diminui nos restantes estadios, enquanto que a expressão do mRNA da subunidade β também aumenta entre E18 e P0, mantendo-se constante nos estadios posteriores. Assim, estes resultados sugerem uma possível variabilidade na constituição do receptor da glicina no hipocampo ao longo do desenvolvimento.

4.3. Localização subcelular do receptor da glicina no hipocampo de rato

4.3.1. Análise da evolução da citoarquitECTURA do hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento

Com o intuito de caracterizar a localização subcelular do receptor da glicina nas principais áreas do hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento, foi efectuada uma análise por imunohistoquímica usando fatias de cérebro (5 µm) obtidos de animais com diferentes idades. Ao longo do desenvolvimento existe uma evolução do hipocampo que inclui o aumento do seu tamanho e a diferenciação das células aí existentes (Figura 20). É possível observar um amadurecimento de todas as zonas do hipocampo, o que possibilita a identificação das suas principais regiões, especificamente o GD e as células piramidais das áreas CA.

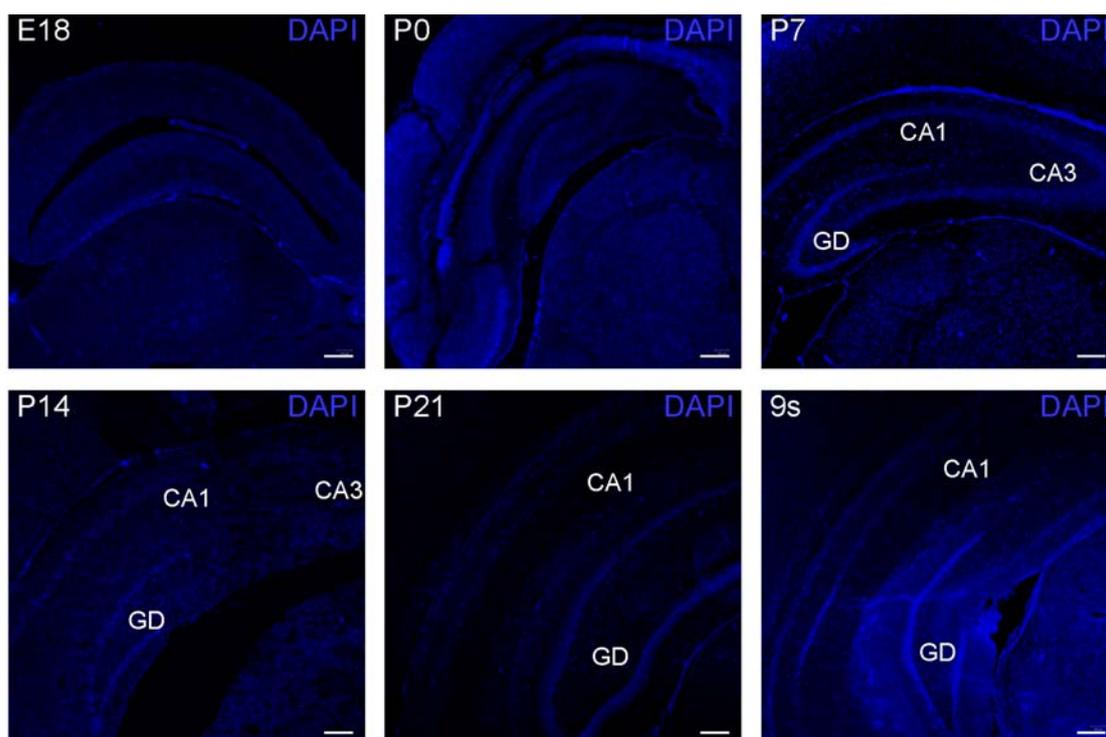


Figura 20 - **Evolução da citoarquitECTURA do hipocampo ao longo do desenvolvimento.** Detecção do DAPI (1:15000) no hipocampo de rato em vários estadios de desenvolvimento. Foram utilizadas fatias de cérebro (5 µm) de ratos extraídos ao décimo oitavo dia de gestação (E18), à nascença (P0), sete (P7), catorze (P14) e vinte e um (P21) dias após o nascimento e com 9 semanas de idade (9s). As imagens foram obtidas com uma objectiva de 5x. A barra da escala corresponde a 200 µm. GD (*gyrus dentatus*); CA1/CA3 (*cornu ammonis 1/3*).

4. Resultados e Discussão

A marcação nuclear com DAPI permite observar e identificar os núcleos das células piramidais de CA1 e CA3, que se localizam na zona do *stratum pyramidale*, e também das células granulares do GD que se encontram na área do *stratum granulosum*. É ainda possível identificar alguns núcleos localizados nas regiões do *stratum radiatum* das zonas CA1/CA3 e do *stratum moleculare* do GD que correspondem a interneurónios (Figura 20).

No estadio embrionário (E18) só é possível distinguir a forma característica e única do hipocampo, não se conseguindo distinguir as suas áreas essenciais, nomeadamente o GD e CA. A P0, apesar de já se identificarem as áreas do hipocampo, estas ainda não estão totalmente definidas. É apenas a P7 que é possível observar uma definição total do hipocampo (Figura 20).

4.3.2. Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT no hipocampo ao longo do desenvolvimento

Para se caracterizar espacialmente e temporalmente a expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato, foi feita uma análise por imunohistoquímica em diversas áreas do hipocampo, nomeadamente nas regiões do GD, da CA1 e da CA3, em vários estadios de desenvolvimento. Foram simultaneamente analisadas fatias de espinal medula de ratos com vinte e um dias que foram usadas como controlo positivo às marcações efectuadas.

Foi efectuada uma análise por imunohistoquímica com marcação dupla, de modo a detectar simultaneamente o receptor da glicina e o VIAAT, que é um marcador de terminais pré-sinápticos inibitórios (Dumoulin *et al.*, 1999), com o objectivo de determinar a localização subcelular do receptor da glicina (somática, sináptica ou extrasináptica).

De salientar que todas as imagens de microscopia confocal de cada uma das áreas em estudo, CA1, CA3 e GD, foram obtidas sempre na mesma zona com o intuito de possibilitar uma comparação de estadio para estadio o mais correcta possível. Foi também tida em conta a visualização de duas camadas laminares em cada área, uma rica em corpos celulares e outra abundante em terminais sinápticos. Assim, para as imagens correspondentes à área do GD as imagens foram retiradas captando parte da camada *stratum granulosum* e *stratum moleculare* (Figura 21). Para as áreas CA1 e CA3 as imagens foram obtidas de modo a incluírem parte do *stratum pyramidale* e do *stratum radiatum* (Figura 21).

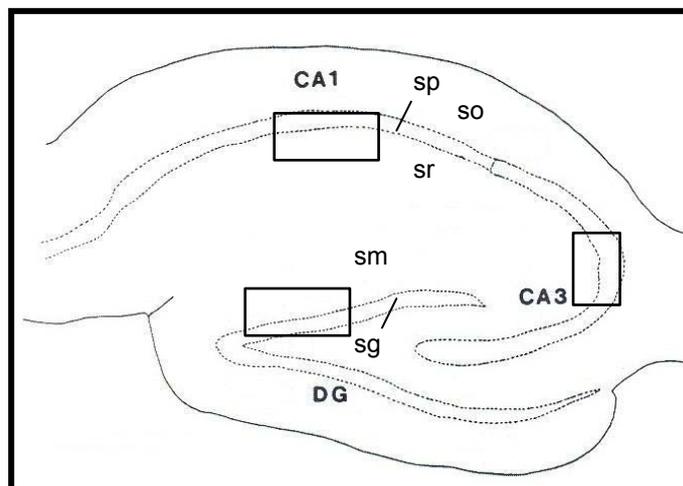


Figura 21 - **Representação das áreas do hipocampo onde as imagens foram obtidas.** As áreas delineadas identificam as regiões do *gyrus dentatus* (GD) e da *cornu ammonis* 1 e 3 (CA1 e CA3), onde as imagens de microscopia confocal foram retiradas. DG (*dentate gyrus*); so (*stratum oriens*); sr (*stratum radiatum*); sm (*stratum moleculare*); sg (*stratum granulosum*); sp (*stratum pyramidale*). (Adaptado de Andersen *et al.*, 2007).

Comparando a expressão do receptor da glicina e do VIAAT ao longo do desenvolvimento, é possível observar que, em ambos os casos, a sua localização subcelular não é idêntica.

No estadio embrionário E18, em que ainda não é possível distinguir as zonas CA1, CA3 ou GD, quer o receptor da glicina (marcado a vermelho) quer o VIAAT (marcado a verde), parecem ter uma expressão em redor do corpo celular dos neurónios (Figura 22A1).

No estadio neonatal, o receptor da glicina tem uma expressão abundante em redor dos corpos celulares dos neurónios piramidais, granulares e também de alguns interneurónios tendo assim uma elevada expressão nas zonas do *stratum pyramidale* e do *stratum granulosum*, que fazem parte da CA1/CA3 (Figuras 22B2-3) e GD (Figura 22B1), respectivamente. Deste modo, o receptor da glicina no hipocampo de um animal extraído à nascença (P0) parece ser pouco expresso nas zonas do *stratum radiatum* da CA1/CA3 (Figuras 22B2-3) e *stratum moleculare* do GD (Figura 22B1). No caso do VIAAT, ao contrário do receptor da glicina, a sua expressão parece ocorrer maioritariamente nas zonas dendríticas, nomeadamente, no *stratum radiatum* e no *stratum moleculare*, pertencentes às áreas das CA1/CA3 (Figuras 22B2-3) e GD (Figura 22B1). Também é visível a expressão do VIAAT na membrana de alguns interneurónios, que são tipicamente GABAérgicos. Assim, o VIAAT parece estar praticamente ausente das zonas onde se localizam a maioria dos corpos celulares, nomeadamente, no *stratum pyramidale* das zonas CA1/CA3 e no *stratum granulosum* do GD ao contrário do receptor da glicina.

4. Resultados e Discussão

Em P7, já é possível observar o início da migração do receptor da glicina das zonas abundantes em corpos celulares, o *stratum pyramidale* da CA1/CA3 (Figuras 22B5-6) e o *stratum granulosum* do GD (Figura 22B4), onde a sua expressão diminui quando comparada com P0, para as zonas onde se localizam maioritariamente os terminais sinápticos dos neurónios do hipocampo, nomeadamente o *stratum radiatum* da CA1/CA3 (Figuras 22B5-6) e o *stratum moleculare* do GD (Figura 22B4). Nessas zonas a expressão do receptor da glicina aumenta, quando comparada com P0. De notar também a expressão do receptor da glicina na forma de agregados maioritariamente localizados na membrana celular dos interneurónios das três zonas analisadas (indicados pelos triângulos nas Figuras 22B4a-6a). Em relação à expressão do VIAAT, é possível também observar diferenças na sua expressão, quando comparada com P0, sendo visível uma marcação mais intensa na zona do *stratum pyramidale* das zonas CA1/CA3 (Figuras 22B5-6) assim como na zona do *stratum granulosum* do GD (Figura 22B4), além da marcação dos interneurónios e dos terminais sinápticos localizados nas zonas do *stratum radiatum* e *stratum moleculare*, pertencentes às CA1/CA3 (Figuras 22B5-6) e ao GD (Figura 22B4), respectivamente.

Nos estadios mais imaturos, a expressão do receptor da glicina e do VIAAT não ocorre nas mesmas camadas laminares. No entanto, a partir de P7, analisando a marcação simultânea do receptor da glicina e do VIAAT, é visível, na zona dendrítica das três principais áreas do hipocampo (CA1, CA3 e GD), uma proximidade entre o receptor da glicina (marcado a vermelho) e o VIAAT (marcado a verde) (indicada pelas setas nas Figuras 22B4a-6a e 23A1a-9a), uma vez que não se observa co-localização (marcação amarela resultante da sobreposição do verde e do vermelho). Poderá ser obtida uma melhor visualização das zonas ampliadas da Figura 23 (Figuras 23A1a-A9a) através da consulta da secção 8 relativa aos Anexos (Figura 26).

A partir de P14, a migração do receptor da glicina das zonas do *stratum pyramidale* da CA1/CA3 (Figuras 23A2, 3, 5, 6, 8, 9) e do *stratum granulosum* do GD (Figuras 23A1, 4, 7), onde a sua expressão praticamente desaparece, para as zonas dendríticas do *stratum radiatum* e do *stratum moleculare*, pertencentes às CA1/CA3 (Figuras 23A2, 3, 5, 6, 8, 9) e GD (Figuras 23A1, 4, 7), respectivamente, parece estar completa e ser directamente dependente do desenvolvimento. O que parece acontecer é que, ao longo do desenvolvimento, existe um aumento da expressão do receptor da glicina nas zonas onde se localizam os terminais sinápticos e os interneurónios, ou seja, no *stratum radiatum* da CA1/CA3 (Figuras 23A2, 3, 5, 6, 8, 9) e *stratum moleculare* do GD (Figuras 23A1, 4, 7), e uma diminuição da expressão do receptor da glicina nas zonas onde estão maioritariamente os corpos celulares dos neurónios, nas zonas do *stratum pyramidale* da CA1/CA3 (Figuras 23A2, 3, 5, 6, 8, 9) e do *stratum granulosum* do GD (Figuras 23A1, 4, 7).

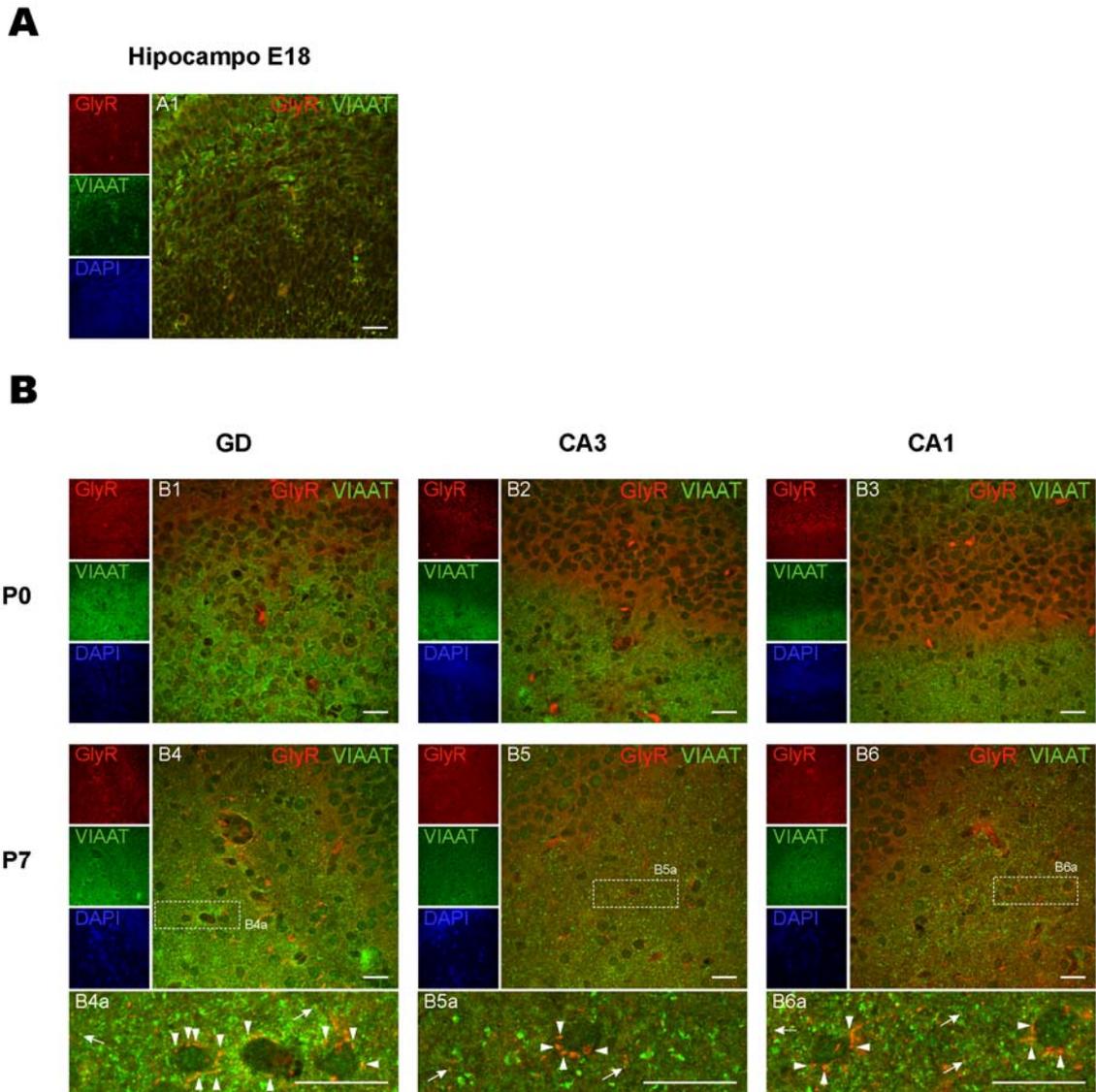


Figura 22 – Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT no hipocampo de rato. (A) Estadio embrionário (E18). (B) Estadios pós-natais P0 e P7. Foram utilizadas fatias de cérebro (5 μ m) de ratos extraídos ao décimo oitavo dia de gestação (E18) (A1), à nascença (P0) (B1-B3) e sete (P7) (B4-B6) dias após o nascimento. Os painéis (B4a-B6a) são ampliações das janelas assinaladas. Os anticorpos primários usados foram: anticorpo monoclonal de rato para o receptor da glicina (1:500) e anticorpo policlonal de coelho para o VIAAT (1:200). Os anticorpos secundários utilizados foram: anticorpos de cabra anti-IgG de rato Alexa Fluor 568 e anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (1:400). Em todos os casos, o receptor da glicina está marcado a vermelho e o VIAAT a verde. Os núcleos foram marcados com DAPI usando uma diluição de 1:15000. As imagens foram obtidas com uma objectiva de imersão em óleo 63x. A barra da escala corresponde a 20 μ m. As setas indicam a proximidade entre o receptor da glicina e o VIAAT. Os triângulos indicam a presença de aglomerados extrasinápticos de receptor da glicina. GlyR (*glycine receptor*); VIAAT (*vesicular inhibitory amino-acid transporter*); GD (*gyrus dentatus*); CA1-3 (*cornu ammonis 1-3*).

4. Resultados e Discussão

De referir também que, ao longo do desenvolvimento, continua a ser visível a presença de aglomerados extrasinápticos do receptor da glicina nas zonas dendríticas das CA1/CA3 e GD, incluindo as membranas dos interneurónios (indicados pelos triângulos nas Figuras 23A1a-9a).

A partir de P14, é possível observar que a expressão do VIAAT é abundante quer nas zonas onde, por excelência, se localizam os interneurónios e os terminais sinápticos, ou seja, no *stratum radiatum* da CA1/CA3 (Figuras 23A2, 3, 5, 6, 8, 9) e *stratum moleculare* do GD (Figuras 23A1, 4, 7), quer nas zonas onde se localizam maioritariamente os corpos celulares dos principais neurónios do hipocampo, *stratum pyramidale* e *stratum granulosum*, das zonas da CA1/CA3 (Figuras 23A2, 3, 5, 6, 8, 9) e GD (Figuras 23A1, 4, 7), respectivamente. No entanto, parece existir uma maior expressão do VIAAT do que do receptor da glicina no hipocampo. Nomeadamente, parecem existir muitos terminais inibitórios pré-sinápticos (identificados pelo VIAAT) que não estão próximos de terminais pós-sinápticos que contêm o receptor da glicina. Provavelmente, esses terminais inibitórios pré-sinápticos estão próximos de terminais pós-sinápticos GABAérgicos.

Nos estadios pós-natais estudados, o receptor da glicina é expresso de forma distinta nas três áreas do hipocampo (Figuras 22B/23). Nomeadamente, nos estadios de desenvolvimento mais maduros, parece existir uma expressão mais abundante do receptor da glicina no GD. Por outro lado, o VIAAT é detectado com uma expressão semelhante nas três áreas do hipocampo (Figuras 22B/23).

Para os controlos efectuados à técnica, todas as imagens de microscopia confocal obtidas ao longo dos vários estadios de desenvolvimento foram retiradas do GD, com o cuidado de incluírem quer a zona do *stratum granulosum* quer do *stratum moleculare*.

Analisando os controlos realizados, em que foi usado um anticorpo que reconhece especificamente a MAP2, uma proteína que estabiliza os microtúbulos, é possível observar que a expressão obtida é bastante diferente da marcação do receptor da glicina e do VIAAT. Adicionalmente, a MAP2 apresenta uma expressão mais abundante na zona do *stratum moleculare* do que na zona do *stratum granulosum* do GD (Figura 24).

Por outro lado, nas imagens correspondentes a fatias da espinal medula (EM) é possível observar uma expressão de MAP2 (Figura 25A) bastante diferente da que se obtém para o receptor da glicina ou para o VIAAT, à semelhança do que acontece no hipocampo.

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

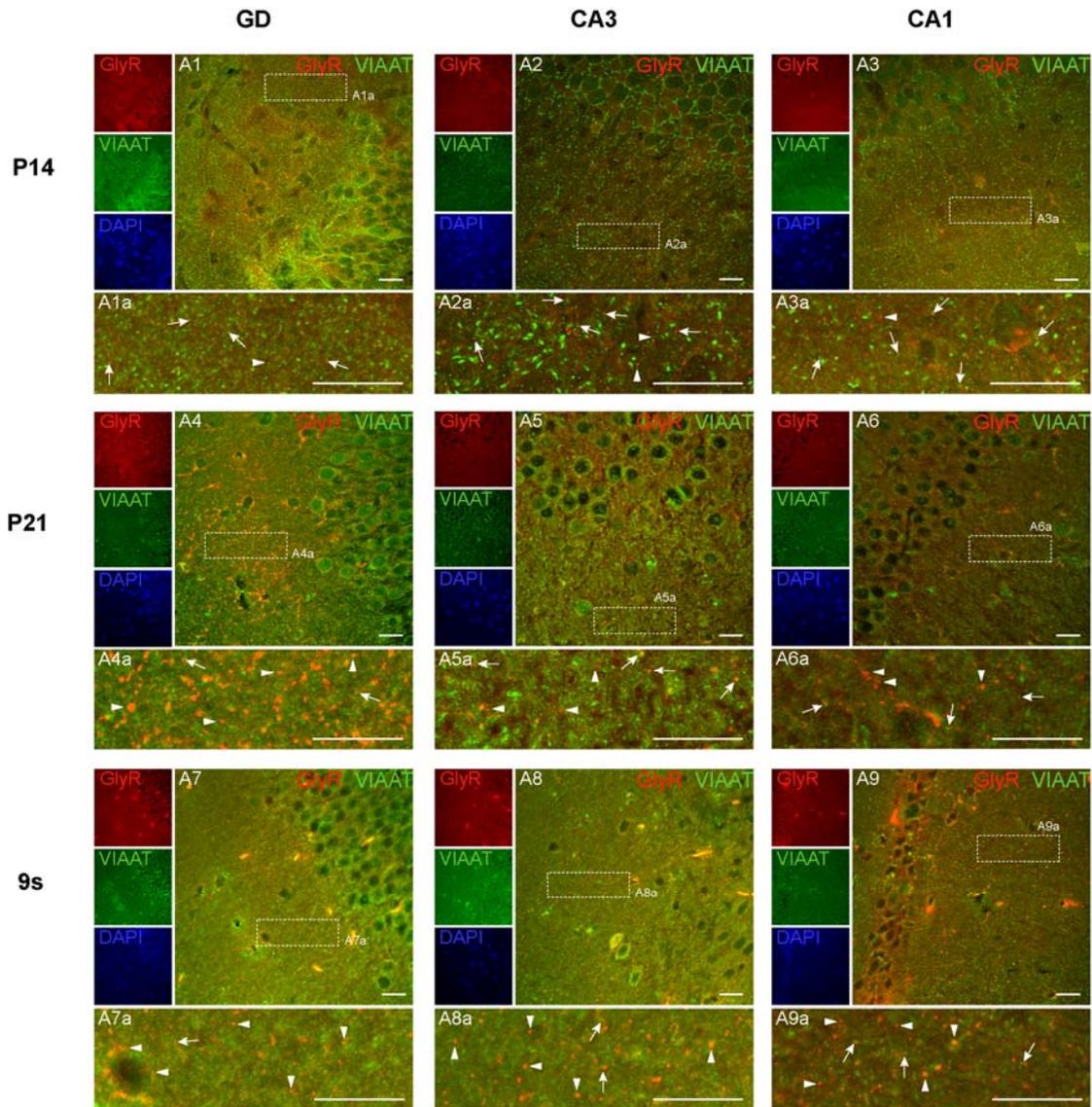


Figura 23 – Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT no hipocampo de rato para os estádios pós-natais compreendidos entre P14 e 9 semanas. Foram utilizadas fatias de cérebro (5 μ m) de ratos extraídos com catorze (P14) (A1-A3) e vinte e um (P21) (A4-A6) dias após o nascimento e com 9 semanas de idade (9s) (A7-A9). Os painéis (A1a-A9a) são ampliações das janelas assinaladas. Os anticorpos primários usados foram: anticorpo monoclonal de rato para o receptor da glicina (1:500) e anticorpo policlonal de coelho para o VIAAT (1:200). Os anticorpos secundários utilizados foram: anticorpos de cabra anti-IgG de rato Alexa Fluor 568 e anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (1:400). Em todos os casos, o receptor da glicina está marcado a vermelho e o VIAAT a verde. Os núcleos foram marcados com DAPI usando uma diluição de 1:15000. As imagens foram obtidas com uma objectiva de imersão em óleo 63x. A barra da escala corresponde a 20 μ m. As setas indicam a proximidade entre o receptor da glicina e o VIAAT. Os triângulos indicam a presença de aglomerados extrasinápticos de receptor da glicina. GlyR (*glycine receptor*), VIAAT (*vesicular inhibitory amino-acid transporter*); GD (*gyrus dentatus*); CA1-3 (*cornu ammonis 1-3*).

4. Resultados e Discussão

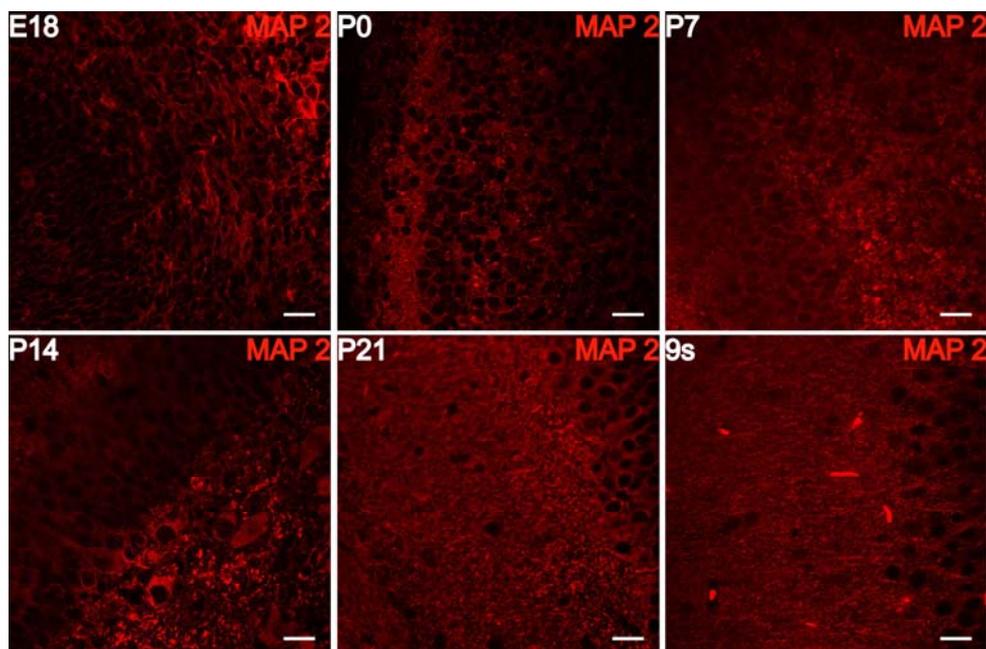


Figura 24 – **Deteção do MAP2 no hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento.** Deteção obtida para o estadio embrionário (E18) e para os diversos estadios pós-natais estudados. Foram utilizadas fatias (5 µm) de cérebro de ratos extraídos ao décimo oitavo dia de gestação (E18), à nascença (P0), sete (P7), catorze (P14) e vinte e um (P21) dias após o nascimento e com 9 semanas de idade (9s). Foi usado o seguinte anticorpo primário: anticorpo monoclonal de ratinho para MAP2 (1:500). O anticorpo secundário utilizado foi: anticorpo de cabra Anti IgG de ratinho Alexa Fluor 568 (1:400). As imagens foram obtidas com uma objectiva de imersão em óleo 63x. A barra da escala corresponde a 20 µm. MAP2 (*microtubule-associated protein 2*).

Quanto à análise feita por imunohistoquímica usando uma marcação dupla em fatias de espinal medula (EM), de modo a detectar simultaneamente o receptor da glicina e o VIAAT, é possível observar uma expressão mais abundante do receptor da glicina na espinal medula do que no hipocampo (Figura 25B). É ainda possível observar, à semelhança do que ocorre no hipocampo, uma expressão abundante de VIAAT sendo que é também notória a ausência de co-localização, pois não é observada uma marcação amarela (resultante da sobreposição do verde e do vermelho), mas sim uma proximidade entre o receptor da glicina (marcado a vermelho) e o VIAAT (marcado a verde) (indicada pelas setas na Figura 25B).

Também é de salientar que existe uma maior densidade de receptores da glicina na espinal medula do que no hipocampo, o que vem confirmar a importância da transmissão glicinérgica na espinal medula. Essa diferença na expressão do receptor da glicina é observada quer na

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

densidade dos receptores quer na sua intensidade da marcação, pois na espinal medula são visíveis bastantes agregados de receptores da glicina (Figura 25B).

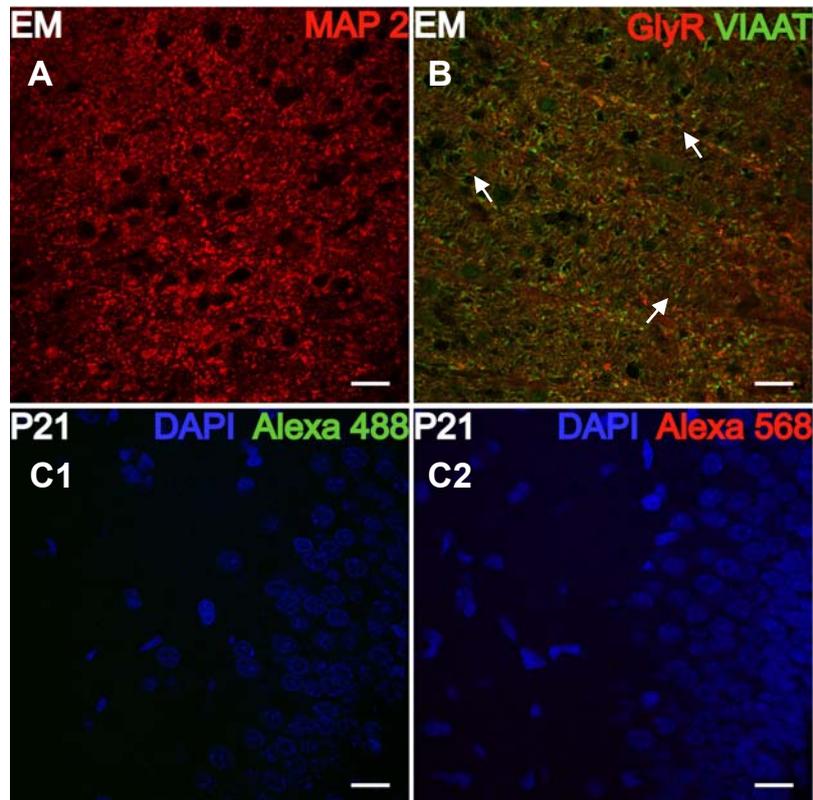


Figura 25 – **Imagens obtidas para os controlos utilizados na imunohistoquímica.** (A) Detecção de MAP2 em fatias (5 μm) da espinal medula (EM). (B) Dupla detecção do VIAAT e do receptor da glicina em fatias (5 μm) da espinal medula (EM). (C) Controlos negativos efectuados em fatias de cérebro (5 μm) de rato com vinte e um dias (P21) de idade para o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (C1) e para o Alexa Fluor 568 (C2). Estas imagens correspondem à zona do *gyrus dentatus* (GD). Os controlos negativos são feitos suprimindo o anticorpo primário. Os anticorpos primários usados foram: anticorpo monoclonal de rato para o receptor da glicina (1:500), anticorpo policlonal de coelho para o VIAAT (1:200) e anticorpo monoclonal de rato para MAP2 (1:500). Os anticorpos secundários utilizados foram: anticorpo de cabra Anti IgG de rato Alexa Fluor 568 e Cabra Anti IgG de rato Alexa Fluor 488 (1:400). O receptor da glicina está marcado a vermelho e o VIAAT a verde. Os núcleos foram marcados com DAPI usando uma diluição de 1:15000. As imagens foram obtidas com uma objectiva de imersão em óleo 63x. A barra da escala corresponde a 20 μm . As setas indicam a proximidade entre o receptor da glicina e o VIAAT. MAP2 (*m*icrotubule-*a*ssociated *p*rotein 2); VIAAT (*v*esicular *i*nhibitory *a*mino-*a*cid *t*ransporter); GlyR (*g*lycine *r*eceptor).

4. Resultados e Discussão

Para os controlos negativos efectuados, em que o anticorpo primário é omitido da reacção, as imagens também foram retiradas no GD incluindo a zona do *stratum granulosum* e a do *stratum moleculare*. Assim, é possível observar uma ausência de marcação quer para o caso do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Figura 25C1), quer para o caso do Alexa Fluor 568 (Figura 25C2), o que evidencia a sua especificidade.

4.3.3. Discussão

Os resultados da análise da localização subcelular do receptor da glicina, mostram que este é expresso nas três principais áreas do hipocampo: CA1, CA3 e GD, ao longo do desenvolvimento, o que até aqui não tinha sido esclarecido, evidenciando um papel para a transmissão glicinérgica no hipocampo. Porém, o receptor da glicina não parece ter uma localização subcelular idêntica em todos os estádios de desenvolvimento, nem parece ter uma expressão semelhante nas três áreas do hipocampo analisadas, sendo mais expresso no GD. É igualmente surpreendente que o receptor da glicina seja expresso em vários tipos de células do hipocampo, nomeadamente nas células piramidais das áreas CA1/CA3, nas células granulares do GD e ainda nos interneurónios. Analisando os resultados, pode-se concluir que, ao longo do desenvolvimento a distribuição subcelular do receptor da glicina e do VIAAT é diferente. Em estádios mais imaturos o receptor da glicina localiza-se abundantemente em redor dos corpos celulares dos neurónios do hipocampo, enquanto que em estádios mais maduros se localiza na zona dendrítica. Por outro lado, o VIAAT apresenta, nos estádios mais imaturos, uma expressão apenas na zona onde, tipicamente, ocorrem as sinapses. Ao longo do desenvolvimento essa expressão é alterada passando o VIAAT também a ser expresso no *stratum pyramidale* da CA1/CA3 e no *stratum granulosum* do GD. Ainda é de referir que, uma vez que o VIAAT é um marcador de terminais inibitórios pré-sinápticos (Dumoulin *et al.*, 1999), e que não existe co-localização das duas proteínas estudadas, se pode concluir que o receptor da glicina se encontra localizado na membrana dos terminais pós-sinápticos.

A análise efectuada por imunohistoquímica revela que, quer o receptor da glicina quer o VIAAT, começam a ser expressos ainda nos estádios embrionários, uma vez que a E18 são já detectados (Figura 21A1). Estes resultados estão de acordo com os obtidos para a análise do mRNA das principais subunidades do receptor da glicina feita por RT-PCR.

No estadio neonatal, o receptor da glicina é expresso em redor dos corpos celulares, que se localizam no *stratum pyramidale* da CA1/CA3 (Figura 22B2-3) e no *stratum granulosum* do GD

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

(Figura 22B1). Essa expressão difusa pela membrana dos corpos celulares dos neurónios poderá ocorrer devido ao receptor da glicina ser, em estadios imaturos, maioritariamente do tipo homomérico, isto é, composto apenas por subunidades α , tal como é observado na espinal medula (Lynch, 2004), o que está de acordo com os resultados obtidos por RT-PCR. Estes resultados mostram uma expressão mais elevada dos mRNA's das subunidades α quando comparada com a expressão do mRNA da subunidade β no estadio embrionário. Assim, é necessária a presença da subunidade β e a posterior formação de receptores de glicina do tipo heteromérico, compostos por subunidades α e β , para os receptores da glicina se localizarem nas zonas sinápticas (Meyer *et al.*, 1995; Kirsch *et al.*, 1991). Por outro lado, nesta fase ainda existem muito poucas sinapses formadas e os receptores da glicina ainda não migraram para os terminais neuronais. Estes resultados poderão indicar uma possível alteração na constituição do receptor da glicina, passando de uma expressão preferencialmente homomérica nos estadios mais imaturos a uma expressão homomérica e heteromérica nos estadios mais maduros. Ao longo do desenvolvimento parece continuar a existir a formação de aglomerados homoméricos do receptor da glicina que se localizam nas zonas extrasinápticas, e que depois serão recrutados para as zonas sinápticas (Muller *et al.*, 2008), o que evidencia que os receptores do tipo homoméricos não são totalmente substituídos pelos heteroméricos. É ainda de referir que a P0, o receptor da glicina apresenta uma função excitatória, em contraste com o papel inibitório exercido em neurónios mais maduros (revisto em Ben-Ari, 2002), pelo que poderá também ser por essa razão que a expressão deste receptor, neste estadio, é abundante na membrana celular de neurónios que estão descritos como sendo excitatórios.

Com o amadurecimento, os neurónios vão-se diferenciando e existe simultaneamente a formação e o desenvolvimento de projecções dos neurónios (dendrites e axónios). Assim, ao longo do desenvolvimento, alguns receptores da glicina migram do corpo celular dos neurónios para os terminais pós-sinápticos que se localizam maioritariamente nas zonas do *stratum moleculare* e *stratum radiatum*, respectivamente pertencentes ao GD e às áreas CA1/CA3 (Figura 22B-23).

Os resultados obtidos são concordantes com outros resultados publicados em que a técnica de imunohistoquímica é utilizada para a determinação da expressão do receptor da glicina no hipocampo de um rato adulto (Brackmann *et al.*, 2004; Chattipakorn e McMahon, 2002; Danglot *et al.*, 2004).

Nos estadios imaturos pós-natais, a expressão do VIAAT parece ser predominante nas zonas onde se encontram os terminais sinápticos, isto é, nas zonas do *stratum moleculare* do GD e *stratum radiatum* da CA1/CA3, enquanto que ao longo do desenvolvimento, a expressão do

4. Resultados e Discussão

VIAAT parece não ficar restrita apenas a essas zonas. A partir de P14 começa a ser evidente o aparecimento de VIAAT nas zonas do *stratum pyramidale* da CA1/CA3 e do *stratum granulosum* do GD (Figura 22B-23). Possivelmente, essa expressão é indicadora da presença do VIAAT nas sinapses axo-somáticas, isto é, entre axónios (terminais pré-sinápticos) e o corpo celular (pós-sinápticos) das células piramidais da CA1/CA3 e células granulares do GD. As sinapses axo-somáticas aparecem apenas durante a segunda e terceira semana de vida (Ben-Ari *et al.*, 1989), o que poderá assim explicar os resultados observados. Deste modo, o VIAAT estará localizado nos axónios que comunicam com os neurónios piramidais e granulares. Essa comunicação será predominantemente inibitória e é essencial para equilibrar a função excitatória desses neurónios.

A técnica de imunohistoquímica revelou uma expressão do receptor da glicina em vários tipos de células do hipocampo, nomeadamente nas células piramidais da CA1/CA3, nas células granulares do GD e nos interneurónios. Esta expressão ubíqua do receptor da glicina poderá ser devida a uma necessidade do hipocampo possuir outros mecanismos inibitórios, além da transmissão GABAérgica, de modo a manter o correcto funcionamento da transmissão excitatória necessária ao funcionamento do hipocampo. Assim, o que parece acontecer é que, quer os neurónios inibitórios quer os excitatórios expressam receptores de glicina, e o efeito desta activação depende do estadio de desenvolvimento e do tipo de célula.

A análise feita por imunohistoquímica ao receptor da glicina parece mostrar que a expressão do receptor da glicina é diferente nas principais áreas do hipocampo. Nomeadamente, parece existir uma relação directa do aumento da expressão do receptor da glicina com o amadurecimento no GD, sendo nesta zona que a sua expressão é maior, o que está de acordo com outros estudos realizados em ratos adultos (Danglot *et al.*, 2004).

O GD é uma região do hipocampo vulnerável à actividade epiléptica (Parent e Lowenstein, 2002), pelo que estes resultados poderão contribuir para o estabelecimento definitivo da importância da transmissão glicinérgica na epilepsia. Actualmente, parece ser aceite pela comunidade científica que a perda da transmissão inibitória mediada pelo GABA no GD poderá estar envolvida em vários processos patológicos, nomeadamente na epilepsia (Dalby e Mody, 2001). A presença da transmissão inibitória é essencial em todos os processos, de modo a equilibrar a transmissão excitatória. Assim, estando a transmissão GABAérgica comprometida, parece provável que existam mecanismos de adição e/ou compensação, possivelmente através da transmissão glicinérgica (Chattipakorn e McMahon, 2003), o que sugere um importante papel do receptor da glicina na epilepsia. Concretamente, a activação dos receptores de glicina diminui a hiperexcitabilidade no GD quando a inibição mediada por GABA está comprometida (Chattipakorn e McMahon, 2003). Adicionalmente, já foi mostrado que a aplicação exógena de glicina pode diminuir as crises epilépticas num modelo animal de

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

epilepsia (Cherubini *et al.*, 1981). Por outro lado, estudos envolvendo agonistas do receptor da glicina no hipocampo, mais concretamente a taurina, provaram que era possível diminuir as descargas epiléticas, o que revela o seu importante papel como antiepilético (Kirchner *et al.*, 2003). No entanto, não é só a activação única do receptor da glicina que parece estar envolvida na epilepsia, pois a administração de glicina potencia os efeitos anti-epiléticos de agonistas do receptor de GABA, GABA_AR (Seiler e Sarhan, 1984). Assim, quer apenas a activação do receptor da glicina quer a activação conjunta destes com os receptores de GABA, poderão ser mecanismos que se revelem importantes alvos terapêuticos para o tratamento da epilepsia, o que torna encorajador investigações futuras nesta área.

Uma vez que os resultados obtidos mostram que o VIAAT se encontra próximo do receptor da glicina, é possível inferir que este receptor se localiza nos terminais pós-sinápticos. Uma das formas de complementar estes resultados seria através de uma marcação dupla de imunohistoquímica com um marcador pós-sináptico das sinapses glicinérgicas, nomeadamente a gefirina, que é uma proteína que já se sabe estar ancorada à subunidade β do receptor da glicina (Meyer *et al.*, 1995).

Por outro lado, os resultados obtidos não permitem distinguir sinapses puramente glicinérgicas de sinapses mistas (GABAérgicas e glicinérgicas) nem a constituição do receptor da glicina. Assim, para complementar estes estudos poderia ser efectuada uma análise por imunohistoquímica utilizando anticorpos que reconhecem cada uma das subunidades do receptor da glicina.

Em resumo, os resultados obtidos por imunohistoquímica revelam uma distribuição subcelular heterogénea do receptor da glicina no hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento. Mais concretamente, o receptor da glicina localiza-se em redor dos corpos celulares dos neurónios nos estadios mais imaturos enquanto que se localiza nos terminais pós-sinápticos nos estadios mais maduros. Estes resultados mostram claramente que o receptor da glicina é expresso nas diversas áreas do hipocampo em vários estadios de desenvolvimento, particularmente no GD, o que sugere um importante papel para a transmissão glicinérgica no hipocampo.

4. Resultados e Discussão

5. Conclusões:

O principal objectivo deste trabalho era caracterizar a expressão do receptor da glicina no hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento. Essa caracterização foi feita pelo estudo dos níveis de mRNA das principais subunidades do receptor da glicina por RT-PCR e pela análise da expressão proteica do receptor da glicina, recorrendo às técnicas de *Western Blot* e imunohistoquímica.

Os resultados aqui apresentados e discutidos mostram que o receptor da glicina é amplamente expresso no hipocampo de rato ao longo do desenvolvimento, o que sugere um importante papel para a neurotransmissão glicinérgica nesta área cerebral. Mais concretamente, observou-se, pela primeira vez, que o receptor da glicina tem uma expressão mais acentuada no hipocampo de rato nos primeiros dias de vida, nomeadamente a P7, e que a sua expressão varia com o desenvolvimento. Paralelamente, a análise do mRNA de cada uma das principais subunidades do receptor da glicina revelou que poderá existir um *switch* na sua expressão ao longo do desenvolvimento, pois as subunidades preponderantes são diferentes entre estadios imaturos e maduros. Esse *switch* poderá promover uma possível alteração na composição do receptor da glicina, o que conduzirá a uma variabilidade na sua constituição e, conseqüentemente, função. É também possível concluir que, apesar da sua localização subcelular depender do estadio de desenvolvimento, nos estadios mais maduros o receptor da glicina é maioritariamente expresso nas zonas dendríticas, com particular ênfase para o *stratum moleculare* do GD, localizando-se nos terminais pós-sinápticos. Também é possível observar a presença de aglomerados de receptores da glicina localizados extrasinápticamente. Porém, apesar de aqui ter sido elucidado por completo que o receptor da glicina está presente no hipocampo de rato, muitas questões, envolvendo a transmissão mediada pela glicina, permanecem sem resposta. Uma das questões mais pertinentes que estes resultados podem suscitar está certamente relacionada com o papel fisiológico da transmissão glicinérgica no cérebro, e em particular no hipocampo, uma região cerebral onde a transmissão inibitória é predominantemente mediada pelo GABA. A descoberta da existência de vesículas sinápticas mistas, as quais permitem a libertação simultânea de ambos os neurotransmissores inibitórios, veio contribuir para a hipótese de uma possível acção conjunta do GABA e da glicina e para a possível interacção entre os seus receptores. Esta acção concomitante do GABA e da glicina poderá levar a um controlo mais eficiente e preciso da actividade neuronal, explorando as diferentes cinéticas e condutâncias dos respectivos receptores.

5. Conclusões

Por outro lado, parece teoricamente possível que a transmissão glicinérgica possa ser importante aquando a existência de uma falha na transmissão GABAérgica no hipocampo, substituindo-a. Fisiologicamente, existem muitas evidências que a transmissão glicinérgica e, em particular os receptores da glicina, poderão ter um papel fundamental na epilepsia, através da modulação da hiperexcitabilidade característica desta patologia, podendo ser vistos como novos alvos terapêuticos para a terapia anti-epiléptica.

Assim, o trabalho aqui descrito contribui para o início, do ponto de vista molecular, da compreensão da neurotransmissão glicinérgica no hipocampo. No entanto, muitas perguntas continuam sem resposta e, apesar das muitas possibilidades e hipóteses colocadas, o papel do receptor da glicina no hipocampo permanece desconhecido. Deste modo, ainda muito continua por esclarecer sobre a neurotransmissão inibitória mediada pela glicina no hipocampo, pelo que se torna imperativo a continuação destes estudos.

6. Perspectivas Futuras:

O trabalho descrito clarifica alguns dos pontos que envolvem a sinapse glicinérgica no hipocampo de rato. No entanto, são necessários mais estudos com o objectivo de aprofundar a função da glicina e o papel do seu receptor na neurotransmissão inibitória no hipocampo.

O receptor da glicina é um dos constituintes da sinapse glicinérgica e a sua acção reflecte-se no funcionamento da célula. Tal como já foi discutido, existe uma relação entre a função do receptor da glicina (excitatório vs inibitório) e os co-transportadores de iões NKCC1 e KCC2. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de interacção entre estes transportadores e, sobretudo, de que forma é que a sua expressão relativa é regulada ao longo do desenvolvimento e, conseqüentemente, influencia a alteração da função do receptor da glicina. Assim, seria interessante a realização de mais estudos envolvendo estes transportadores e o receptor da glicina no hipocampo, de modo a tentar elucidar os mecanismos de relação entre eles.

Por outro lado, e de uma perspectiva da análise do mRNA, seria importante complementar o trabalho aqui descrito e discutido, com uma análise quantitativa dos produtos de PCR obtidos, de modo a esclarecer se efectivamente existe, ou não, um *switch* entre as subunidades α do receptor da glicina semelhante ao existente na espinal medula e, se sim, quando é que ocorre. Para completar os estudos efectuados por RT-PCR poderia ainda ser realizado um *Western Blot* em que seriam utilizados anticorpos específicos para cada uma das principais subunidades do receptor da glicina.

Uma vez que a análise feita por PCR apenas contribui para a determinação da quantidade de mRNA de cada uma das principais subunidades do receptor da glicina existentes no hipocampo, seria igualmente importante determinar a sua localização subcelular. Assim, a hibridação *in situ* é uma técnica que poderia ser utilizada para localizar o mRNA de cada uma das subunidades do receptor da glicina nos neurónios do hipocampo. Adicionalmente, poderia ser feita uma imunohistoquímica após a hibridação *in situ*, o que permitiria a localização subcelular simultânea do mRNA e da proteína de cada uma das subunidades do receptor da glicina, elucidando qual a constituição dos receptores sinápticos e extrasinápticos.

Ao nível da análise da proteína, uma das questões que permanece por esclarecer é a quantidade de receptores de glicina existentes no hipocampo. Assim, à semelhança da quantificação dos níveis de mRNA de cada uma das subunidades, poderia ainda ser efectuada a quantificação do receptor da glicina com o recurso a ensaios de ligação, utilizando o antagonista específico do receptor da glicina, a estriquinina, marcada radioactivamente.

6. Perspectivas Futuras

A sinapse glicinérgica é composta por intervenientes do terminal pós-sináptico, nos quais se inclui o receptor da glicina, mas também inclui moléculas do terminal pré-sináptico, tais como o transportador da glicina, GlyT2. Existem já várias evidências que defendem que vários participantes da sinapse glicinérgica poderão estar comprometidos na epilepsia. Assim, a investigação dos vários constituintes desta sinapse e da forma como estes actuam para controlar a eficácia da actividade neuronal mediada pela glicina, poderia ser útil no tratamento da epilepsia proporcionando novas perspectivas e abordagens terapêuticas. Seria assim fundamental investigar o papel dos transportadores de glicina no hipocampo, uma vez que estes têm como principal função terminar a acção inibitória da glicina retirando-a da fenda sináptica, pelo que o seu estudo seria útil para a eventual criação de abordagens terapêuticas anti-epilépticas.

Tendo como premissa o papel da transmissão glicinérgica na epilepsia, seria importante efectuar estudos comparativos entre animais saudáveis (grupo controlo) e animais em que se induziria epilepsia (grupo epiléptico). Estes estudos permitiriam a comparação quer a nível de expressão, localização, quantificação e funcionalidade do receptor da glicina no hipocampo entre os dois grupos de animais. Este trabalho comparativo seria realizado a nível molecular e electrofisiológico, impulsionando fortemente a investigação da sinapse glicinérgica no hipocampo. Estes ensaios seriam de grande importância uma vez que pouco se sabe do papel da neurotransmissão mediada pela glicina no hipocampo e do seu envolvimento na epilepsia, sendo assim uma área de investigação bastante promissora.

7. Referências Bibliográficas:

- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. e O'Keefe, J. (Editores), (2007), *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, E.U.A.
- Aprison, M.H. e Werman, R. (1965). The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci.* 4:2075–2083.
- Bancroft, J.D. e Gamble, M. (Editores), (2002), *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5ª Ed., Churchill Livingstone, E.U.A.
- Becker, C.M., Hoch, W. e Betz, H. (1988). Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J.* 7:3717–3726.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3:728–739.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. e Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)*. 416:303–325.
- Benavides, J., Lopez-Lahoya, J., Valdivieso, F. e Ugarte, M. (1981). Postnatal development of synaptic receptors in normal and hyperglycemic rats. *J. Neurochem.* 37:315-320.
- Bennett, J.P., JR., Logan, W.J. e Snyder, S. H. (1973). Amino Acids as Central Nervous Transmitters: The Influence of Ions, Amino Acid Analogues, and Ontogeny on Transport Systems for L-Glutamic and L-Aspartic Acids and Glycine into Central Nervous Synaptosomes of the Rat. *J. Neurochem.* 21:1533-1550.
- Borges-Ferro, A., (2007), *Técnicas Imunocitoquímicas*. Recuperado a 8-10-2008 do site - Amadeu Borges Ferro – Docente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa: <http://www.amadeuferro.pt.vu/>.
- Bowery, N.G. e Smart, T.G. (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br. J. Pharmacol.* 147:S109–S119.
- Brackmann, M., Zhao, C., Schmieden, V. e Braunewell, K.H. (2004). Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:1137–1142.

8. Anexos

- Chattipakorn, S.C. e McMahon, L.L., (2002). Pharmacological characterization of glycine-gated chloride currents recorded in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 87:1515–1525.
- Chattipakorn, S.C. e McMahon, L.L. (2003). Strychnine-sensitive glycine receptors depress hyperexcitability in rat dentate gyrus, *J. Neurophysiol.* 89:1339–1342.
- Cherubini, E., Bernardi, G., Stanzione, P., Marciani, M.G. e Mercuri, N. (1981). The action of glycine on rat epileptic foci. *Neuroscience Lett.* 21:93–97.
- Clayton, G.H., Owens, G.C., Wolf, J.S. e Smith, R.L. (1998). Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. *Dev. Brain Res.* 109:281–292.
- Curtis, D.R. e Watkins, J.C. (1960). The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6:117–141.
- Curtis, D.R., Hosli, L. e Johnston, G.A. (1967). Inhibition of spinal neurons by glycine. *Nature.* 215:1502–1503.
- Curtis, D.R., Hosli, L., Johnston, G.A. e Johnston, I.H. (1968). The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Exp. Brain Res.* 5:235–258.
- Dalby, N.O. e Mody, I. (2001). The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Curr Opin Neurol* 14:187–192.
- Danglot, L., Rostaing, P., Triller, A. e Bessis, A. (2004). Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 27:394-403.
- Delpire, E. (2000). Cation–chloride cotransporters in neuronal communication. *News Physiol. Sci.* 15:309–312.
- Dumoulin, A., Rostaing, P., Bedet, C., Levi, S., Isambert, M.F., Henry, J.P., Triller, A. e Gasnier, B. (1999). Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J. Cell Sci.* 112(6):811-823.
- Flint, A.C., Liu, X. e Kriegstein, A.R. (1998). Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron.* 20:43–53.
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T. e Poo, M. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell.* 105:521–532.

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

- Gomez, J., Ohno, K., Hulsmann, S., Arnsen, W., Eulenburg, V., Richter, D.W., Laube, B. e Betz, H. (2003). Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron*. 40:797–806.
- Graham, D., Pfeiffer, F. e Betz, H. (1983). Photoaffinitylabelling of the glycine receptor of rat spinal cord. *Eur. J. Biochem.* 131:519–525.
- Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H. e Laube, B. (2005). The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*. 45:727–739.
- Guastella, J., Brecha, N., Weigmann, C., Lester, H. A., e Davidson, N. (1992) Cloning, expression, and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:7189–7193.
- Harlow, E. e Lane, D., (1999), *Using Antibodies – A Laboratory Manual*, 1ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A.
- Harvey, R.J., Depner, U.B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T.G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O.M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D.P., Betz, H., Zeilhofer, H.U. e Muller, U. (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 304:884–887.
- Heck, S., Enz, R., Richter-Landsberg, C. e Blohm, D. H. (1996). Expression and mRNA splicing of glycine receptor subunits and gephyrin during neuronal differentiation of P19 cells in vitro, studied by RT-PCR and immunocytochemistry. *Dev. Brain Res.* 98:211-220.
- Hopkin, J.M. e Neal, M.J. (1970). The release of ¹⁴C-glycine from electrically stimulated rat spinal cord slices. *Br. J. Pharmacol.* 40:136P-138P.
- Ito, S. e Cherubini, E. (1991). Strychnine-sensitive glycine responses of neonatal rat hippocampal neurons. *J Physiol (Lond)*. 440:67–83.
- Jensen, M.L., Schousboe, A. e Ahring, P. K. (2005). Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J. Neurochem.* 92:217–225.
- Johnson, J.W. e Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. 325:529-531.
- Kirsch, J. (2006). Glycinergic transmission. *Cell Tissue Res.* 326:535-540.

8. Anexos

- Kirsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U. Z., Schmitt, B. e Betz, H. (1991). The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J. Biol. Chem.* 266:22242-22245.
- Kirschner, A., Breustedt, J., Rosche, B., Heinemann, U.F. e Schmieden, V. (2003). Effects of taurine and glycine on epileptiform activity induced by removal of Mg²⁺ in combined rat entorhinal cortexhippocampal slices. *Epilepsia.* 44(9):1145-1152.
- Kuhse, J., Laube, B., Magalei, D. e Betz, H. (1993). Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron.* 11:1049–1056.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Langosch, D., Thomas, L. e Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:7394–7398.
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:760–793.
- Lewis, T.M., Schofield, P.R. e McClellan, A. M. L. (2003). Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor. *J Physiol.* 549(2):361–374.
- Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H. e Nelson, N. (1993) Cloning and Expression of a Spinal Cord-and Brain-specific Glycine Transporter with Novel Structural Features. *J. Biol. Chem.* 268:22802–22808.
- Logan, W.J. e Snyder, S. H. (1971). Unique High Affinity Uptake Systems for Glycine, Glutamic and Aspartic Acids in Central Nervous Tissue of the Rat. *Nature, Lond.* 234:297-299.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lynch, J.W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.* 84:1051–1095.
- Malosio, M.L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J., e Betz, H. (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit m RNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J.* 10:2401-2409.
- Meier, J., Meunier-Durmort, C., Forest, C., Triller, A. e Vannier, C. (2000). Formation of glycine receptor clusters and their accumulation at synapses. *J. Cell Sci.* 113:2783-2795.

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H. e Langosch, D. (1995). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor β subunit. *Neuron*. 15:563-572.
- Muller, E., Le-Corronc, H. e Legendre, P. (2008). Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Front. Mol. Neurosci.* 1:3.
- Nelson, D.L. e Cox, M.M., (2000), *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3ª Ed., Worth Publishers, E.U.A.
- Owens, D. F. e Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Rev. Neurosci.* 3:715-727.
- Palkovits, M. e Brownstein, M.J., (1983), *Microdissection of brain areas by the punch technique in: Brain Microdissection Techniques*, 1ª Ed., Cuello A. C. MeElsevier, E.U.A.
- Palkovits, M. e Brownstein, M.J., (1988), *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*, 1ª Ed., Elsevier Science Publishing, E.U.A.
- Parent, J.M. e Lowenstein, D.H. (2002). Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res.* 135:121–131.
- Paxinos, G. e Watson, C., (1998), *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4ª Ed., Academic Press. E.U.A.
- Peterson, G.L., (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100:201-220.
- Pfeiffer, F., Graham, D. e Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J. Biol. Chem.* 257:9389–9393.
- Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G. e Betz, H. (1984). Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:7224–7227.
- Plotkin, M.D., Snyder, E.Y., Hebert, S.C. e Delpire, E. (1997). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol.* 33: 781–795.
- Polak, J.M. e Van Noorden, S., (1997), *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª Ed., Bios Scientific Publishers, E.U.A.

8. Anexos

- Poyatos, I., Ponce, J., Aragón, C., Giménez, C. e Zafra, F. (1997). The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 49:63–70.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J. e Betz, H. (1992). The atypical M2 segment of the β subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J.* 11:4305–4311.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O. e White, L.E. (Editores), (2008), *Neuroscience*. 4ª Ed., Sinauer Associates, Inc., E.U.A.
- Rajendra, S. e Schofield, P.R. (1995). Molecular mechanisms of inherited startle syndromes. *Trends Neurosci.* 18:80–82.
- Rees, M.I., Lewis, T.M., Kwok, J.B., Mortier, G.R., Govaert, P., Snell, R.G., Schofield, P.R. e Owen, M.J. (2002). Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum. Mol. Genet.* 11:853–860.
- Roux, M. J. e Supplisson S. (2000). Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron.* 25:373–383.
- Ruiz-Gomez, A., Morato, E., Garcia-Calvo, M., Valdivieso, F. e Major, F. Jr. (1990) Localization of the strychnine binding site on the 48-kilodalton subunit of the glycine receptor. *Biochemistry.* 29:7033–7040.
- Sagné, C., Mestikawy, S.E., Isambert, M.F., Hamon, M., Henry, J.P., Giros, B. e Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* 417:177-183.
- Sambrook, J. e Russell, D., (2001), *Molecular Cloning – a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.U.A.
- Sato, K., Yoshida, S., Fujiwara, K., Tada, K. e Tohyama, M. (1991) Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Res.* 567:64 –70.
- Schmitt, B., Knaus, P., Becker, C. M. e Betz, H. (1987). The Mr 93,000 polypeptide of the glycine receptor is a peripheral membrane protein. *Biochemistry.* 26:805-811.
- Seiler, N. e Sarhan, S. (1984). Synergistic anticonvulsant effects of a GABA agonist and glycine. *Gen Pharmacol* 15:367–9.

Caracterização espaço-temporal do receptor da glicina no hipocampo de rato

- Shahar, A., Vellis, J., Vernadakis, A. e Haber, B. (Editores), (1989), *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*. 1ª Ed., Alan R. Liss, Inc. E.U.A.
- Shank, R.P. e Aprison, M.H. (1970). The metabolism in vivo of glycine and serine in eight areas of the rat central nervous system. *J. Neurochem.* 17:1461–1475.
- Siegel, R., Agranoff, B., Albers, R.W. e Molinoff, P. (Editores), (1989), *Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 4ª Ed., Raven Press, E.U.A.
- Smith, K.E., Borden, L.A., Harting, P.R., Branchek, T. e Weinshank, R.L. (1992). Cloning and expression of a glycine transporter reveal co-localization with NMDA receptors. *Neuron.* 8:927-935.
- Sola, M., Bavro, V.N., Timmins, J., Franz, T., Ricard-Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok, R.W., Paarmann, I., Saiyed, T., O’Sullivan, G.A., Schmitt, B., Betz, H. e Weissenhorn, W. (2004). Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J.* 23:2510–2519.
- Strachan, T. e Read, A.P., (2004), *Human Molecular Genetics 3*, 3ª Ed., Garland Science Publishing, E.U.A.
- Takahashi, T., Momiyama, A., Hirai, K., Hishinuma, F. e Akagi, H. (1992). Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron.* 9:1155–1161.
- Thio, L.L., Shanmugam, A., Isenberg, K. e Yamada, K. (2003). Benzodiazepines block α 2-containing inhibitory glycine receptors in embryonic mouse hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 90:89–99.
- Vanderberg R.J., Shaddick K. e Ju P. (2007) Molecular Basis for Substrate Discrimination by Glycine Transporters. *J. Biol. Chem.* 282(19):14447–14453.
- Wegerhoff, R., Weidlich, O. e Kässens, M., *Basics of Light Microscopy and Imaging*, Olympus Life and Material Science Europa GmbH -GIT VERLAG GmbH & Co. KG, Alemanha.
- Werman, R. (1966). Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* 18:745–766.
- Wilson, K. e Walker, J. (Editores), (2005), *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 6ª Ed., Cambridge University Press, E.U.A.
- Young, A.B. e Snyder, S.H. (1973). Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2832–2836.

8. Anexos

Young-Pearse, T.L., Ivic, L., Kriegstein, A.R. e Cepko, C.L. (2006). Characterization of Mice with Targeted Deletion of Glycine Receptor Alpha 2. *Mol. Cell. Biol.* 26(15):5728-5734.

Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C. e Storm-Mathisen, J. (1995). Glycine Transporters Are Differentially Expressed among CNS Cells. *J. Neurosci.* 15(5):3952–3969.

Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L. e Squire L.R. (Editores), (1999), *Fundamental Neuroscience*, 1ª Ed., Academic Press, E.U.A.

- www.biophysics.org.au/About/index.html;

- www.bristol.ac.uk/synaptic/info/pathway/hippocampal.htm;

- www.neuroscienceassociates.com/perf-protocol.htm;

- www.pubmed.org.

8. Anexos:

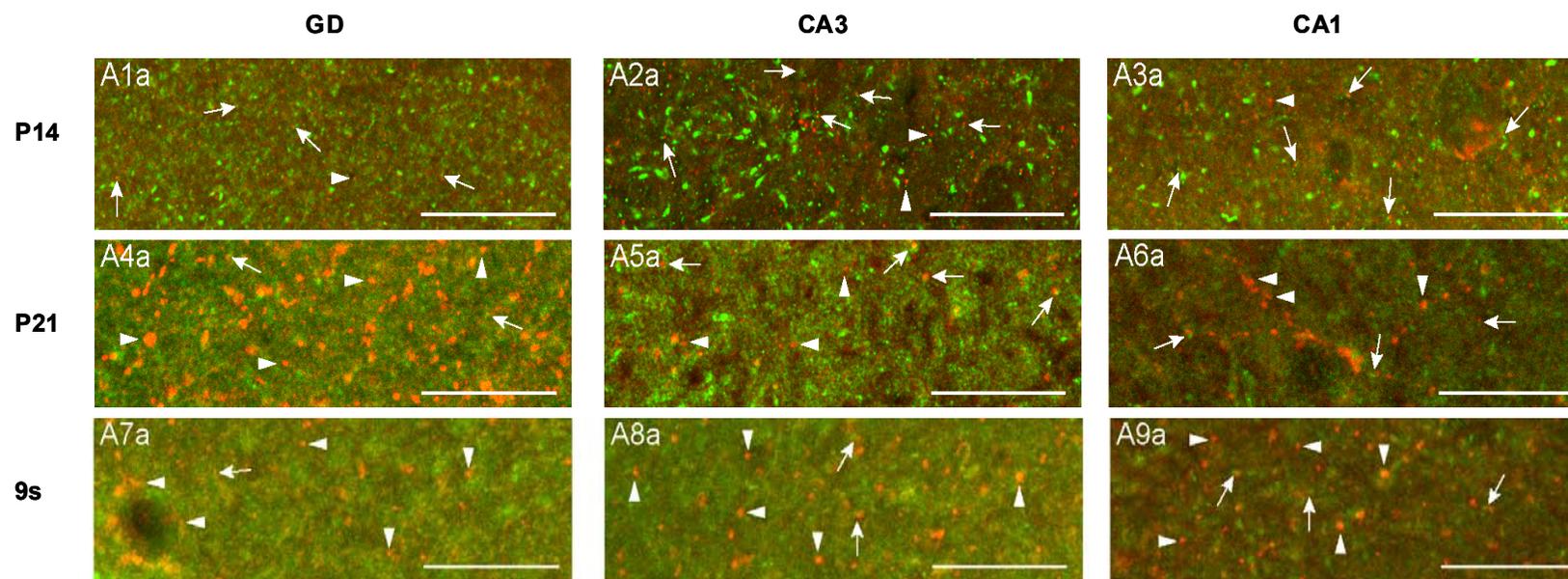


Figura 26 – Dupla detecção do receptor da glicina e do VIAAT nas zonas dendríticas do hipocampo de rato para os estádios pós-natais compreendidos entre P14 e 9 semanas. Foram utilizadas fatias de cérebro (5 μ m) de ratos extraídos com catorze (P14) e vinte e um (P21) dias após o nascimento e com 9 semanas de idade (9s). Os anticorpos primários usados foram: anticorpo monoclonal de ratinho para o receptor da glicina (1:500) e anticorpo policlonal de coelho para o VIAAT (1:200). Os anticorpos secundários utilizados foram: anticorpos de cabra anti-IgG de ratinho Alexa Fluor 568 e anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (1:400). Em todos os casos, o receptor da glicina está marcado a vermelho e o VIAAT a verde. As imagens foram obtidas com uma objectiva de imersão em óleo 63x. A barra da escala corresponde a 20 μ m. As setas indicam a proximidade entre o receptor da glicina e o VIAAT. Os triângulos indicam a presença de aglomerados extrasinápticos de receptor da glicina. GD (*gyrus dentatus*); CA1-3 (*cornu ammonis 1-3*).