



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**Estudo do Transporte Sinaptossomal de Glutamato e da  
Nocicepção em Camundongos que Não Expressam a Proteína  
Prion Celular**

**Cristiane Lima Carqueja**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Carla I. Tasca  
Departamento de Bioquímica, CCB**

**Co-orientador: Dr. Adair R. S. Santos  
Departamento de Ciências Fisiológicas , CCB**

**Florianópolis, Maio de 2006.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**Estudo do Transporte Sinaptossomal de Glutamato e da  
Nocicepção em Camundongos que Não Expressam a Proteína  
Prion Celular**

**Cristiane Lima Carqueja**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Carla I. Tasca  
Departamento de Bioquímica, CCB**

**Co-orientador: Dr. Adair R. S. Santos  
Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de  
grau de Mestre.**

**Florianópolis, Maio de 2006.**

## AGRADECIMENTOS

Cada momento da nossa vida pode nos levar a caminhos diferentes e, às vezes, durante a caminhada, esquecemos de agradecer àquelas pessoas que estão ao nosso lado, de perto ou de longe, mas torcendo por nós. Este é meu espaço para agradecer a todas essas pessoas que fazem parte da minha vida e que, de algum modo, contribuíram para a realização desta etapa. Infelizmente, não conseguirei nomear todas as pessoas que fizeram parte dessa história...

Antes de tudo, agradeço a Deus, e por tê-Lo encontrado, ou por O estar buscando, nestes últimos dois anos. Sua força é imprescindível para me manter firme nos meus propósitos, mesmo quando tudo parece demasiadamente escuro ou perdido. Continuarei orando para que Ele esteja sempre ao meu lado, em todos os momentos da minha vida.

Um agradecimento especial aos meus pais, Maria Helena e Moacir, por terem me incentivado nos estudos, desde sempre. E confiarem na minha capacidade, acreditando nos meus sonhos junto comigo, mesmo se parecessem loucura... Amo vocês!!! Aos meus irmãos, Helena e Guilherme, por serem criaturas maravilhosas, que eu adoro. À Leisa, que entrou na família, e também me deu apoio em várias ocasiões.

Aos avós, Lourdes e José Heleno, e a toda família, que não entendem muito o que eu faço, mas acham o máximo... E sempre têm palavras de conforto.

À Carla, por ser uma grande orientadora e por ter acreditado numa médica que tinha vontade de fazer mestrado, e acabou vindo pra pesquisa básica... Imagino que deva ter sido uma preocupação, mas espero que eu tenha respondido às expectativas.

Ao Prof. Roger Walz, por ter boas idéias e estar sempre disposto a realizar novos projetos. Pelo incentivo para que eu fizesse o mestrado. E por fazer ótimas colaborações!

À Prof<sup>a</sup>. Vilma Martins, do Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer de São Paulo, pela fundamental colaboração neste trabalho e pelo fornecimento dos animais utilizados.

Aos meus colegas de laboratório, Helena, Tharine, Simone, Carina, Scheyla, Samuel, Bruno, Wagner, Marina, especialmente Ronan (espero que você esteja bem aí no Japão!) e Ellen. Também aos colegas que não estão mais no laboratório, mas me ajudaram muito no início, Tiago, Maria Emília, Ronny e Dani W.

Aos professores e colegas dos laboratórios “vizinhos”, Nelson e Rodrigo, por auxiliarem em vários momentos.

Ao Prof Adair, pela co-orientação e por ter me acolhido naqueles meses em que fiquei aprendendo como provocar dor em camundongos...

Aos colegas Flávia e Vinícius, pela ajuda fundamental para os experimentos de nocicepção, e pelos ensinamentos. À Flávia também pela ajuda com as análises estatísticas.

À minha amiga Fran, por escutar minhas lamentações há tantos anos... Às amigas Irina e Luciana que, mesmo de longe, sempre deram apoio.

Ao secretário da pós-graduação, Nivaldo, por resolver alguns problemas de vez em quando.

Aos professores e colegas da pós-graduação, pela troca de experiências.

Por fim, mas de modo algum menos importante (pelo contrário!), ao meu amor, André. Obrigada por ter entrado na minha vida e colocado poesia nos meus dias.

“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor.” 1Co 13.13

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	01
PROTEÍNA PRÍON CELULAR .....	01
NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA .....	10
NOCICEPÇÃO .....	13
OBJETIVO GERAL .....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
2. METODOLOGIA .....	20
2.1. MATERIAIS .....	20
2.1.1. REAGENTES .....	20
2.1.2. EQUIPAMENTOS .....	20
2.2. ANIMAIS .....	22
2.3. ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA .....	22
2.3.1. PREPARAÇÕES DE FRAÇÕES SINAPTOSSOMAIS .....	22
2.3.2. ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE L-[ <sup>3</sup> H]GLUTAMATO .....	23
2.3.3. ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE L-[ <sup>3</sup> H]GLUTAMATO .....	23
2.3.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA .....	24
2.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
2.4. ESTUDOS DE NOCICEPÇÃO .....	25
2.4.1. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO GLUTAMATO .....	25

2.4.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO .....	25
2.4.3 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA .....	26
2.4.4 ESTÍMULO VISCERAL CONDICIONANTE .....	27
2.4.5 INFLAMAÇÃO (EDEMA) E ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA PELO CFA .....	27
2.4.6 TESTE DA PLACA QUENTE (HOT-PLATE) .....	28
2.4.7 TESTE DE RETIRADA DA CAUDA (TAIL-FLICK) .....	28
2.4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
3. RESULTADOS .....	30
3.1. ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA .....	30
3.2. ESTUDOS DE NOCICEPÇÃO .....	37
4. DISCUSSÃO .....	52
5. CONCLUSÕES .....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato em preparações de sinaptossomas obtidas a partir de hipocampo, cerebelo, córtex cerebral, córtex entorrinal e bulbo olfatório de camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	31
Figura 2. Avaliação da liberação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato em preparações de sinaptossomas obtidas a partir de hipocampo, cerebelo, córtex cerebral, córtex entorrinal e bulbo olfatório de camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	34
Figura 3. Avaliação temporal da nocicepção induzida por Glutamato em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	38
Figura 4. Nocicepção induzida por Glutamato em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	39
Figura 5. Avaliação temporal da nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	40
Figura 6. Nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.....	41
Figura 7. Avaliação temporal da nocicepção induzida pela formalina em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	43
Figura 8. Primeira e segunda fases da nocicepção induzida pela formalina em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	44

Figura 9. Nocicepção induzida pela formalina após estímulo visceral condicionante em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	45
Figura 10. Avaliação temporal da alodinia induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.....	47
Figura 11. Avaliação temporal do edema induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.....	48
Figura 12. Teste da placa quente (hot-plate) em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	50
Figura 13. Teste de retirada da cauda (tail-flick) em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5-HT** - Serotonina

**ADP** - Adenosina-5'-difosfato

**AMP** - Adenosina-5'-monofosfato

**ATP** - Adenosina-5'-trifosfato

**AMPA** - Alfa-amino-3-hidróxi-metilsoxazole-propianato

**Ca<sup>++</sup>** - Íon cálcio

**CFA** - Adjuvante completo de Freund

**DNA** - Ácido desoxi-ribonucleico

**EAAT** - Transportador de aminoácido excitatório

**GABA** - Ácido gama-aminobutírico

**GLAST** - Transportador astrocitário de glutamato e aspartato

**GLT-1** - Transportador astrocitário de glutamato-1

**Glu** - Glutamato

**GPI** - Glicosilfosfatidilinositol

**HEPES** - Ácido hidróxi-etil-piperazina-etanosulfônico

**IL** - Interleucina

**K<sup>+</sup>** - Íon potássio

**KA** - Kainato

**LTP** - Potenciação de longa duração

**MK-801** - Dizolcipina

**Na<sup>+</sup>** - Íon sódio

**NMDA** - N-metil-D-aspartato

**PKA** - Proteína quinase A

**Prnp** - Gene da Proteína prion celular

**PrPc** - Proteína prion celular

**PrPsc** - Proteína prion “scrapie”

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RNAm** - RNA mensageiro

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SNP** - Sistema Nervoso Periférico

**SOD** - Superóxido dismutase

**TNF** - Fator de necrose tumoral

## RESUMO

A proteína príon celular (PrPc) é uma glicoproteína de membrana, ancorada à superfície celular por glicosilfosfatidilinositóis. É expressa em diversos tipos celulares, sendo abundante em neurônios. Vários estudos vêm sendo conduzidos no intuito de investigar as possíveis funções fisiológicas desta proteína. Animais que tiveram o gene da PrPc (*Prnp*) deletado constitutivamente apresentam maior sensibilidade a convulsões, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A PrPc também está envolvida na proteção contra o estresse oxidativo, modulação da apoptose neuronal, adesão celular e neuritogênese. Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central, mediando diversas funções fisiológicas. Excesso de glutamato na fenda sináptica leva a um fenômeno conhecido por excitotoxicidade. Assim, sua retirada da fenda sináptica é fundamental para o funcionamento adequado do SNC. Essa função é exercida por transportadores astrocitários de alta afinidade. A captação astrocitária de glutamato está reduzida em culturas gliais derivadas de camundongos que não expressam PrPc. Estes animais também apresentam alterações de memória idade-dependentes. Recentemente foi demonstrado que a PrPc regula a fagocitose e resposta inflamatória *in vitro* e *in vivo*. Pacientes com encefalopatia espongiiforme podem perceber alterações de sensibilidade em estágios iniciais da doença. Neste estudo investigamos o transporte sinaptossomal de glutamato em camundongos que não expressam PrPc de 9 meses de idade, e avaliamos a resposta nociceptiva de camundongos que não expressam PrPc em modelos de nocicepção química e térmica. Não foram observadas alterações na captação de glutamato total, dependente ou independente de íons sódio, assim como não houve alteração na liberação de glutamato, basal ou despolarizada, em hipocampo, córtex cerebral, córtex entorrinal, cerebelo e

bulbo olfatório, entre camundongos que expressam e não expressam PrPc. Camundongos que não expressam PrPc mostraram-se mais resistentes aos estímulos térmicos nos testes da placa quente (hot plate) e de retirada da cauda (tail flick), mas somente para estímulos moderados (55° C). No teste de nocicepção induzida por ácido acético os animais que não expressam PrPc tiveram maior resposta nociceptiva em comparação aos animais que expressam a proteína. Não houve diferença entre os camundongos que expressam e não expressam PrPc na nocicepção induzida por formalina ou glutamato, assim como na alodinia mecânica induzida por CFA. No entanto, CFA induziu menos edema de pata em camundongos que não expressam PrPc. O estímulo visceral condicionante, produzido por injeção de ácido acético 20 dias antes do teste, reduziu de modo significativo a nocicepção induzida por formalina, nas primeira e segunda fases, nos camundongos que expressam PrPc. Já os camundongos que não expressam PrPc não tiveram esta resposta alterada pelo pré-tratamento com ácido acético. Nossos resultados demonstram que o transporte sinaptossomal de glutamato em animais de idade avançada não é alterado pela ausência da PrPc, e que esta proteína possui um papel importante na nocicepção térmica, na dor inflamatória induzida por macrófagos, no edema inflamatório e no sistema de controle descendente da dor. A nocicepção envolvendo fibras sensitivas não mielinizadas não parece ser afetada pela deleção do gene da PrPc.

## **ABSTRACT**

Cellular prion protein (PrPc) is a glycosyl-phosphatidylinositol anchored cell surface glycoprotein mainly expressed in neurons and, to a lesser extent, in other types of cells, which has been highly conserved during evolution. Recent studies have been done to investigate the function of PrPc. Animals in which the PrPc gene (*Prnp*) was constitutively ablated presented an enhanced neuronal excitability *in vitro* and a higher sensitivity to seizures induction *in vivo*. PrPc is also implicated with protection against oxidative stress, modulation of neuronal apoptosis, cellular adhesion, neurite outgrowth and maintenance. Glutamate plays a central role in the fast excitatory synaptic transmission and glutamate levels on synaptic cleft are related to excitability and neuronal damage. The clearance of glutamate from synaptic cleft is carried out mainly by astrocytic glutamate transporters. The astrocytic glutamate uptake is decreased in glial cultures obtained from PrPc null mice, and these animals show altered memory functions, age related. Recently it was demonstrated that PrPc modulates phagocytosis and inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. In addition, human patients with spongiform encephalopathy present altered pain sensitivity in early stages of disease. In this study we have investigated the influence of the prion protein expression on synaptosomal glutamate transport in 9 month old animals, and investigated the PrPc function on the nociceptive response, submitting PrPc null mice to thermal and chemical models of nociception. There were no differences on total, Na<sup>+</sup>-dependent or Na<sup>+</sup>-independent glutamate uptake and also no differences were observed on basal or depolarized glutamate release, in cerebral cortex, entorhinal cortex, hippocampus, cerebellum and olfactory bulb, between wild type and PrPc knockout mice. PrPc null

mice were more resistant to thermal tail flick and hot plate tests than wild-type mice. However this hypoalgesia was observed only at 55.0°C (intermediate heat stimulus) and there was no difference at mildly (50.5°C) and harshly (58.0°C) painful heat stimuli. In the acetic acid-induced visceral pain, mice lacking PrPc showed enhanced response when compared to wild-type mice. There was no difference between knockout and wild-type mice on glutamate- or formalin- induced licking behavior and CFA- induced mechanical allodynia. PrPc null mice developed significantly lower paw edema than wild-type mice. The visceral conditioning stimuli, produced by previous injection of acetic acid (20 days before testing), significantly reduced early and late phases of formalin- induced nociception in wild-type mice. On the other hand, the same pre-treatment did not alter the formalin response in PrPc null mice. Our findings show that neuronal glutamate transport is not altered by the absence of the cellular prion protein and that PrPc plays a role on the thermal nociceptive transmission, macrophage-dependent acute inflammatory pain, inflammatory edema and descending control of pain. Nociceptive transmission involving unmyelinated sensitive fibers seems not to be related to PrPc function.

## 1. INTRODUÇÃO

### **Proteína Príon Celular**

A proteína príon celular (PrPc) é uma glicoproteína ancorada à superfície externa da membrana celular, amplamente expressa nos diversos tecidos, e abundante no Sistema Nervoso Central (SNC). O interesse pelo estudo das funções fisiológicas desta proteína iniciou a partir da década de 1980, quando foi identificada uma isoforma desta proteína como o agente causador das encefalopatias espongiformes, chamada príon scrapie (PrPsc). O pesquisador Stanley Prusiner recebeu um Prêmio Nobel após a confirmação de sua teoria, em que este agente infeccioso era uma proteína (PrPsc), uma proposta inovadora, pois, até então, todos os patógenos infecciosos possuíam material genético (DNA ou RNA) (revisado por PRUSINER, 1998).

Entre as encefalopatias espongiformes transmissíveis estão: Scrapie (afeta cabras e ovelhas), Encefalopatia espongiforme bovina, e Doença de Creutzfeldt-Jacob em humanos. Todas causadas por príons e levam a condições neurodegenerativas fatais (PRUSINER, 1991).

A doença pode ocorrer tanto por mutações no gene da PrPc (*Prnp*), levando a alterações neurológicas (como a Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker) (SASSOON et al, 2004) ou psiquiátricas (há relatos de esquizofrenia familiar ligada a mutações na PrPc) (SAMAIA et al, 1997); ou pela infecção com a PrPsc (PRUSINER, 1998).

A Doença de Creutzfeldt-Jacob, que ocorre em humanos, pode existir de 4 formas. Casos esporádicos, com causa desconhecida; casos familiares, associados a mutações genéticas; casos iatrogênicos, por transmissão acidental via equipamentos

cirúrgicos contaminados, por exemplo; e uma variante da doença, ligada à exposição através de alimentos à PrPsc bovina. A variante da Doença de Creutzfeldt-Jacob afeta pacientes mais jovens (média de 29 anos, em contraste com 65 anos da doença clássica) (World Health Organization, 2002). No início do quadro patológico, os pacientes geralmente apresentam sintomas psiquiátricos, comumente depressão, evoluindo invariavelmente até a demência. Sintomas neurológicos, incluindo dificuldade à deambulação e movimentos involuntários, desenvolvem-se no decorrer da doença. Sintomas sensitivos, como sensação de endurecimento da pele, são experimentados por metade dos pacientes como primeiras manifestações. Um estudo epidemiológico, realizado na Suécia, também evidenciou outros sintomas sensitivos, como parestesias, prurido e dor, principalmente em pacientes jovens (LUNDBERG, 1998).

A proteína infecciosa, PrPsc, caracteriza-se por ser insolúvel, parcialmente resistente à proteinase K, e sua estrutura terciária contém menor quantidade de  $\alpha$ -hélices e maior de  $\beta$ -lâminas em relação à proteína normal, PrPc. Devido a suas características, a PrPsc acumula-se na célula, causando sua destruição. No cérebro, a destruição de um grande número de neurônios leva a um aspecto de esponja ao microscópio, daí o nome de Encefalopatias Espongiformes (PRUSINER, 1998).

Na infecção pela PrPsc, a PrPc presente em diversas células, e abundante em neurônios, é convertida à forma terciária da PrPsc pela própria proteína infectante, num processo ainda pouco conhecido. Esta conversão pode envolver mecanismos de transporte celular da própria PrPc, que parecem ser um mecanismo bastante complexo. Este processo de transformação da PrPc em PrPsc pode envolver três compartimentos distintos na célula: organelas da via secretória, membrana plasmática, e organelas da via endocitótica (LEE et al, 2003). Importante ressaltar que a expressão da Prpc é absolutamente necessária para que ocorra a infecção. A demonstração definitiva de que

a PrPc participa deste processo se deu com a produção de animais geneticamente modificados que não expressam a proteína PrPc. Estes animais são totalmente resistentes à infecção pela PrPsc (PRUSINER, 1998).

Assim, as doenças causadas por príons são vistas como doenças por ganho de função devido ao acúmulo da forma infecciosa, PrPsc, pois existem poucas evidências de que a perda da PrPc após a mudança conformacional tenha papel na patogênese destas doenças. No entanto, a possibilidade de que as doenças causadas por príons tenham, também, um componente de perda de função, pela perda da expressão da PrPc, continua em aberto, e só pode ser afastada após o conhecimento das funções fisiológicas desta proteína (CHIARINI et al, 2002).

A proteína príon celular, PrPc, é uma glicoproteína de membrana, cuja estrutura terciária é composta por  $\alpha$ -hélices, é solúvel e sensível à proteólise. A PrPc está ancorada à membrana celular por glicosilfosfatidilinositóis (GPI) (PRUSINER, 1998). Ela é expressa na superfície de diversos tipos celulares. Assim, a hipótese de função neuronal exclusiva é pouco provável. No entanto, o fato de esta proteína ter altos níveis de expressão em neurônios sugere que ela tenha uma função importante nestas células. A PrPc concentra-se em regiões sinápticas, tanto pré quanto pós-sinapticamente, podendo ser facilmente isolada em microdomínios de membrana ricos em colesterol, denominados “lipid rafts” (revisado por BROWN, 2001).

Provavelmente a PrPc é expressa por todos os vertebrados, vários mamíferos e aves já tiveram genes da PrPc seqüenciados. Uma região da proteína, chamada “octameric repeats”, composta por quatro repetições de uma seqüência de oito aminoácidos (octâmeros), é altamente conservada entre as espécies (WOPFNER et al, 1999). Esta característica de conservação pode indicar que esta região representa um domínio funcional essencial para a atividade desta proteína.

A produção de animais geneticamente modificados que não expressam a PrPc, chamados animais “knockout”, foi um passo importante no sentido de identificar as possíveis funções fisiológicas da PrPc.

As primeiras observações desses animais em que o gene *Prnp* foi suprimido, indicaram que seu desenvolvimento e comportamento não apresentavam qualquer alteração (BUELLER et al, 1992), o que fez com que alguns pesquisadores chegassem a acreditar que a PrPc teria uma função redundante ou até nenhuma função na célula. Pouco tempo depois foram publicados estudos mostrando alterações eletrofisiológicas (COLLINGE et al, 1994) e comportamentais, relacionadas ao ritmo circadiano (TOBLER et al, 1996). Atualmente existem um grande número de evidências comprovando que a PrPc possui, realmente, funções fisiológicas.

A PrPc desempenha uma função de proteína ligante de cobre na sua região N-terminal, que contém um domínio funcional de 32 aminoácidos, formado pela repetição de quatro octâmeros. A ligação de, pelo menos, dois átomos de cobre à PrPc confere a esta uma atividade semelhante àquela da enzima Superóxido dismutase (SOD) (BROWN et al, 1999). A PrPc parece contribuir diretamente para a atividade SOD celular. Imuno-depleção de PrPc em extratos cerebrais murinos reduz a atividade SOD total destes extratos. Isto implica que PrPc pode agir na detoxificação do ânion superóxido, prevenindo o estresse oxidativo. A presença de uma proteína que se liga ao cobre, possuindo atividade SOD, na sinapse pode ter uma função de proteção dessa região contra os efeitos de ânions superóxido e de espécies reativas de oxigênio (revisado por BROWN, 2001).

Os efeitos antioxidantes da PrPc também foram observados em modelos de cultura de células. Neurônios e astrócitos cerebelares de camundongos que não expressam a PrPc são mais sensíveis à toxicidade por ânions superóxido, enquanto

células com maior expressão desta proteína são mais resistentes ao estresse oxidativo (BROWN et al, 1997). Mais recentemente, existem evidências de que a PrPc tem sua expressão aumentada em eventos onde a lesão por estresse oxidativo é um fator importante na fisiopatologia da doença, como na isquemia (WEISE et al, 2004).

A ligação da PrPc ao cobre pode ter, ainda, outras funções na célula. O papel exato do cobre na sinapse ainda não é completamente compreendido. Sabe-se que distúrbios nos níveis sinápticos de cobre leva a alterações na atividade de receptores, como inibição de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), ou redução na potenciação de longa duração (LTP). Estudos eletrofisiológicos mostraram que em fatias hipocámpais de camundongos que não expressam a PrPc, parâmetros como as correntes inibitórias rápidas mediadas por receptores GABA-A e LTP estão alterados (COLLINGE et al, 1994). Sinaptossomas purificados de cérebros de camundongos que não expressam a PrPc apresentam menor conteúdo de cobre, quando comparados aos de animais selvagem. Culturas de células cerebelares, provenientes destes animais, captam menor quantidade de cobre do que células onde há expressão da PrPc. A exposição de células que expressam PrPc a concentrações crescentes de cobre aumenta o turnover desta proteína, o que pode sugerir um papel desta proteína na resistência à toxicidade por cobre (revisado por BROWN, 2001).

Estresse oxidativo e toxicidade por cobre estão diretamente ligados, o que pode ser explicado através da reação de Fenton: o cobre pode catalisar a conversão de espécies reativas de oxigênio ou gerar radical hidroxila diretamente da água. Assim, o sequestro de cobre tem efeitos protetores imediatos em células sensíveis ao estresse oxidativo (BROWN, 2001).

Camundongos que não expressam a proteína PrPc possuem maior suscetibilidade a crises convulsivas agudas e “kindling” por diversas drogas (WALZ et

al, 1999). Levando-se em consideração o fato de que o estresse oxidativo tem papel importante na fisiopatologia das crises convulsivas, a perda da proteção conferida pela PrPc pode facilitar a redução deste limiar de crise observado nestes animais.

Além de alterações no SNC, também foi demonstrado um aumento na oxidação de lipídeos e proteínas de células de músculo esquelético, coração e fígado de camundongos que não expressam PrPc (revisado por MARTINS & BRENTANI, 2002).

A PrPc também foi caracterizada como um receptor de laminina, uma proteína da matriz extracelular, ligando-se especificamente a um decapeptídeo carboxi-terminal, presente na cadeia  $\gamma$ -1 da mesma. Esta ligação é importante para adesão neuronal e neuritogênese em células PC12 e neurônios hipocâmpais em cultura. Células que não expressam a PrPc quando plaqueadas sobre laminina ou sobre o decapeptídeo  $\gamma$ -1 purificado tiveram sua neuritogênese fortemente ou totalmente inibida, respectivamente (GRANER et al, 2000). Estes dados indicam que a PrPc pode ter função na mediação de sobrevivência e diferenciação neuronal.

Em modelo de apoptose em retina, a PrPc está envolvida na indução de sinais neuroprotetores através da interação com um peptídeo que se liga aos resíduos 113-128 da PrPc. Nestes experimentos este peptídeo ligou-se de forma específica e com alta afinidade à PrPc, promovendo uma resposta neuroprotetora, reduzindo apoptose. Esta resposta foi ausente nas células que não expressavam PrPc ou em células previamente tratadas com anticorpo anti-PrPc. A ligação da PrPc com o peptídeo, causando neuroproteção, está envolvida com a via do AMP cíclico e proteína quinase A (PKA), pois inibindo esta via houve perda da proteção. Estas evidências sugerem que a PrPc está envolvida na modulação da apoptose (CHIARINI et al, 2002).

Testes comportamentais realizados em camundongos que não expressam a PrPc e em ratos submetidos a injeções intra-hipocâmpais de anticorpo anti-PrPc,

evidenciaram que a PrPc também está envolvida na aquisição e retenção de memória, mas de forma dependente da idade (COITINHO et al, 2003).

Estudos relacionados à neurotransmissão glutamatérgica também foram realizados em animais que não expressam a PrPc. Em culturas de células gliais, astrócitos tipo 1 de camundongos que não expressam PrPc apresentam redução na captação de glutamato dependente de íons sódio, quando comparados aos astrócitos que expressam a PrPc. Neste mesmo modelo, a captação de glutamato dependente de  $\text{Na}^+$  foi inibida pelo tratamento das culturas com peróxido de hidrogênio e cobre, sendo esta alteração observada apenas nas culturas gliais que não expressam PrPc. A captação de glutamato independente de  $\text{Na}^+$  não foi alterada, nem pela ausência da PrPc nas células, nem pelos tratamentos citados (BROWN & MOHN, 1999).

Animais que não expressam a PrPc apresentam redução na resposta locomotora induzida pela injeção intra-peritoneal de MK-801, um antagonista de receptores glutamatérgicos do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Este modelo é usado como modelo animal de esquizofrenia, onde a administração de MK-801 induz uma resposta de hiperlocomoção. Enquanto foram observadas alterações em relação ao sistema glutamatérgico, o mesmo não foi verdade para os sistemas dopaminérgico e adenosinérgico, também testados neste mesmo estudo, pela administração de anfetamina e cafeína (COITINHO et al, 2002).

Existem outras evidências indicando uma possível participação do sistema glutamatérgico na infecção pela PrPsc. Estudos de ligação de MK-801 em hipocampo de camundongos inoculados com PrPsc mostram uma redução de sítios de ligação para este antagonista não-competitivo de receptores NMDA. Esta redução foi observada a partir de 110 dias da inoculação da proteína infectante, e ocorreu, principalmente, na região CA3 do hipocampo. No entanto, após apenas 10 dias da infecção, foi observado

um aumento nos sítios de ligação de MK-801 em todas as camadas do hipocampo, exceto em CA1, de maneira nem sempre significativa. Esse último achado sugere que os mecanismos de transmissão glutamatérgica estão alterados logo no início da inoculação, assim, a neurotransmissão via receptores NMDA pode estar aumentada nos estágios iniciais da infecção. Já a perda dos sítios de ligação observada nos estágios tardios, pode indicar sinais de um processo neurodegenerativo, e ocorre antes do aparecimento de sintomas (DIEZ et al, 2001). Em co-culturas de neurônios cerebelares e astrócitos, o tratamento das mesmas com o peptídeo PrP106-126, um peptídeo sintético que corresponde ao núcleo da PrPsc, estimula mudanças na composição dos receptores NMDA, causando morte celular através do aumento da toxicidade glutamatérgica. Além disso, o peptídeo PrP106-126 causou uma liberação de cobre e glutamato pelos astrócitos, o que pode contribuir para este aumento de toxicidade (SASSOON et al, 2004). Gliose é uma característica principal nas doenças causadas por príons (PRUSINER, 1998). Astrócitos que expressam PrPc, quando cultivados com neurônios cerebelares que não expressam PrPc, e tratados com o peptídeo PrP106-126 induzem toxicidade mediada por glutamato. Normalmente, astrócitos normais em co-cultura com neurônios cerebelares que não expressam PrPc têm papel protetor em relação a estes últimos contra toxicidade glutamatérgica. Esta proteção é abolida ao tratar estas culturas com o peptídeo PrP106-126 (BROWN, 1999).

Análises post-mortem de pacientes com Doença de Creutzfeldt-Jacob mostraram redução na expressão dos receptores de glutamato do subtipo AMPA (sensíveis ao ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) GluR2/3 em córtex frontal, córtex entorrinal e células de Purkinje; e redução dos receptores tipo NMDA em córtex frontal, córtex entorrinal e camadas granular e molecular do cerebelo. Estes dois tipos de receptores também tiveram expressão reduzida na camada molecular do giro denteado

no hipocampo. Essa redução correlacionou-se com deposição da proteína do Prion, perda neuronal e degeneração espongiiforme em todos os casos estudados. Em contraste, a expressão dos receptores ionotrópicos de GABA, subtipo GABA<sub>A</sub> R $\alpha$ 1, manteve-se normal, ou até moderadamente aumentada nas regiões do córtex frontal, córtex entorrinal e camada molecular do cerebelo. Estes resultados mostram uma alteração importante e seletiva na expressão de receptores de neurotransmissores cruciais no SNC, apontando para uma vulnerabilidade maior dos receptores glutamatérgicos na Doença de Creutzfeldt-Jacob (FERRER & PUIG, 2003).

O transporte sinaptossomal de glutamato em camundongos que não expressam PrPc foi avaliado anteriormente. Este estudo não evidenciou diferenças significativas entre os animais que expressam ou não a PrPc, tanto na captação quanto na liberação de glutamato. Porém, foram avaliados apenas animais jovens, com 3 meses de idade (THAIS, 2005).

Além destas alterações referentes ao sistema glutamatérgico, estudos mostram associação da PrPc com o sistema serotoninérgico. Em modelo utilizando uma linhagem celular chamada 1C11<sup>5-HT</sup>, que expressa receptores serotoninérgicos tipo 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>1B/D</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, todos pertencentes à família de receptores acoplados a proteínas G, a ligação da PrPc com anticorpo específico concomitante à estimulação dos receptores 5-HT por agonistas, modula a resposta destes receptores. A ligação da PrPc inibe a estimulação da fosfolipase C pelo receptor 5-HT<sub>2A</sub>, reduz a inibição da adenilato ciclase mediada pelos receptores 5-HT<sub>1B/D</sub>, e potencializa a ligação do receptor 5-HT<sub>2B</sub> à fosfolipase A2. Ou seja, a PrPc age como moduladora dos acoplamentos e regulação entre receptores 5-HT em células serotoninérgicas 1C11<sup>5-HT</sup>, e indica que esta proteína contribui para a homeostase de funções relacionadas à serotonina. Como consequência, este envolvimento da PrPc na regulação fina das funções serotoninérgicas pode contribuir

para as alterações no metabolismo da serotonina já observadas em roedores infectados pela scrapie (MOUILLET-RICHARD et al, 2004).

Além de sua expressão abundante no SNC, a PrPc também é expressa por diversos tipos celulares, como já citado anteriormente. Assim, discute-se que sua função não deve ser exclusiva em neurônios. Evidências recentes indicam um papel da PrPc na modulação da fagocitose *in vivo* e *in vitro*. Fagócitos derivados de camundongos que não expressam a PrPc são mais ativos que aqueles que expressam PrPc. Esta observação foi verdadeira tanto para macrófagos peritoneais, quanto para células de origem neuroectodérmica, como as retinianas. Alterações na fagocitose, redução ou aumento, podem trazer conseqüências indesejadas. A fagocitose está associada à produção de espécies reativas de oxigênio e enzimas lisossomais, ambas com potencial de destruição. No SNC também existem células com características de macrófago, conhecidas como microglia. A microglia é quiescente, sendo ativada pela presença de patógenos, produzindo uma resposta inflamatória. Uma regulação negativa da fagocitose promovida pela presença abundante da PrPc neste tecido pode ser interessante, pois uma atividade inflamatória exacerbada traria destruição celular. Além disso, na inflamação induzida, camundongos que não expressam PrPc recrutam mais monócitos e menos neutrófilos que camundongos selvagem. Ou seja, o perfil inflamatório é diferente nos animais que expressam ou não a PrPc. A perda de função da PrPc na regulação da fagocitose pode ser mais um mecanismo contribuinte na fisiopatologia das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (de ALMEIDA et al, 2004).

### **Neurotransmissão Glutamatérgica**

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, participando como um importante mediador de processos de comunicação

intercelular, plasticidade, crescimento e diferenciação (NEDERGAARD *et al*, 2002; AARTS & TYMIANSKI, 2003). O glutamato está envolvido em diversas funções cerebrais, como aprendizado e memória, emoção e motivação, e atividades motoras. Também parece estar presente na patogenia de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer (GREENE & GREENEMYRE, 1996; SEGOVIA *et al*, 2001).

As ações do glutamato são mediadas por dois tipos de receptores: ionotrópicos, que formam canais iônicos, e metabotrópicos, ligados às proteínas G. Os receptores ionotrópicos possuem propriedades farmacológicas e fisiológicas que os subdividem em três populações distintas: os ativados por N-metil-D-aspartato (NMDA), os que respondem ao ácido caínico (KA), e os sensíveis ao ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) (MICHAELIS, 1998). Aos receptores AMPA e KA é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida, e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). Os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias, e são altamente permeáveis aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ). Devido a essas propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória. Os receptores metabotrópicos agem através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (OBRENOVITCH & URENJAK, 1997).

Não existem evidências de efetiva metabolização extracelular de glutamato, ou seja, a sinalização estimulada por glutamato é finalizada quando este neurotransmissor é retirado da fenda sináptica por recaptação para o terminal pré-sináptico ou para as células gliais (ROBINSON, 1999). Quando captado por astrócitos, o glutamato pode ser metabolizado por diversas vias, na qual a formação de glutamina e a entrada no ciclo dos

ácidos tricarbóxicos são quantitativamente mais importantes. A formação de glutamina é catalisada, de maneira dependente de ATP, pela glutamina sintetase, enzima presente em astrócitos, com pouca expressão em oligodendrócitos e ausente em neurônios. A glutamina pode ser liberada pelo astrócito e captada pelo neurônio, o qual a converterá novamente a glutamato pela enzima glutaminase, localizada na mitocôndria. O glutamato formado pode ser então novamente armazenado em vesículas e liberado (ANDERSON & SWANSON, 2000).

Uma vez liberado, o glutamato atinge altas concentrações na fenda sináptica, o que permite sua ação sobre seus receptores. Transportadores de alta afinidade presentes nos astrócitos são os responsáveis pela retirada do glutamato do espaço extracelular, encerrando sua ação sináptica, pois sua degradação na fenda sináptica não é eficiente, como ocorre para outros neurotransmissores (TAKAHASHI *et al*, 1997). Astrócitos e neurônios expressam um total de cinco isoformas de transportadores de aminoácidos excitatórios dependentes de  $\text{Na}^+$ . Dois transportadores astrocitários já foram clonados e denominados de GLAST (glutamate-aspartate transporter) e GLT-1 (glutamate transporter). Em humanos eles são designados como EAAT1 e EAAT2 (excitatory aminoacid transporter). GLT-1 e GLAST são amplamente distribuídos no cérebro. O transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o EAAC1 (homólogo humano, EAAT3). Ele é encontrado em regiões não-sinápticas. Outros subtipos clonados incluem EAAT4, localizado em células de Purkinje e EAAT5, localizado em neurônios retinianos (ANDERSON *et al.*, 2001). A captação celular de glutamato é acoplada ao transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , sendo que o transporte de uma molécula de glutamato para dentro da célula é vinculado à entrada de três íons  $\text{Na}^+$  e um próton e à saída de um íon  $\text{K}^+$  (NEDERGAARD *et al*, 2002). A função dos transportadores de glutamato é inibida pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio,

peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, sendo a regulação do estado redox da célula uma variável importante na manutenção dos níveis de glutamato na fenda sináptica (KANAI, 1997).

O excesso de glutamato na fenda sináptica causa o fenômeno conhecido como excitotoxicidade, que é um fator comum a vários distúrbios neurológicos, incluindo acidente vascular cerebral, epilepsia, traumatismo crânio encefálico e doenças neurodegenerativas (OBRENOVITCH & URENJAK, 1997). Glutamato pode ser neurotóxico agindo em receptores NMDA, AMPA e, também em seus receptores metabotrópicos (MELDRUM, 2000). A lesão excitotóxica resulta do excesso de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  na célula através dos canais iônicos e pela ação suplementar da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos reservatórios intracelulares, levando a um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (CHOI, 1987). Este  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ativa uma série de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintases ou endonucleases que contribuem para a morte celular (MELDRUM, 2000).

### **Nocicepção**

O organismo possui diversos sistemas responsáveis pelo controle da homeostasia, dentre eles a dor tem papel de destaque, pois atua como um mecanismo de alerta do corpo (WALL, 1999). A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER e MELZACK, 1999). Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos (JULIUS e BASBAUM, 2001). A dor é influenciada por fatores tanto fisiológicos quanto psicológicos, por isso, em animais é avaliada de forma indireta. O

componente fisiológico da dor é denominado de nocicepção, assim, modelos animais de analgesia são, de fato, modelos de nocicepção (TJØLSEN e HOLE, 1997).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser agudo ou crônico. Na dor aguda, ocorre ativação dos nociceptores em resposta a alguma lesão tecidual. Persistindo por mais de 6 meses, então passa a ser considerada como dor crônica. Da mesma forma que a dor aguda, a dor crônica também é causada por lesão ou patologia, podendo permanecer mesmo depois da reparação do tecido (LOESER & MELZACK, 1999).

Existem quatro tipos principais de dor: nociceptiva, por estimulação dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos; neurogênica, por dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (“dor central”); neuropática, devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos; e psicogênica, que não é oriunda de uma fonte somática identificável (MILLAN, 1999). Quando ocorre um dano tecidual significativo, a dor é geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação, podendo levar a um quadro de hipersensibilidade, causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos (DRAY, 1997). Em quadros de hipersensibilidade, pode-se observar a hiperalgesia (resposta aumentada para estímulos nocivos) e a alodínia (resposta aumentada para estímulos não nocivos) (MILLAN, 1999). Apesar dos neurônios espinhais possuírem uma relação estímulo-resposta estável para estímulos intermitentes, breves e não nocivos, eles estão sujeitos à plasticidade sináptica. Com isso, entradas nociceptivas repetitivas de baixa frequência ou lesão tecidual periférica levam a mudanças funcionais na medula espinhal, tais como aumento da resposta a estímulos supralimiais, redução do limiar nociceptivo, expansão do tamanho do campo receptivo (hiperalgesia secundária) e descargas neuronais prolongadas, gerando assim um quadro de hipersensibilidade (MA e WOOLF, 1996).

A recepção do estímulo nociceptivo na periferia ocorre em estruturas específicas situadas nas terminações nervosas distais dos neurônios aferentes sensitivos, denominadas nociceptores, amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. Os nociceptores são receptores sensíveis a diferentes estímulos, que podem ser térmicos, mecânicos ou químicos (BESSON e CHAOUCH, 1987; DRAY, 1997; BESSON, 1999; MILLAN, 1999).

Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários estão localizados nos gânglios da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos à medula espinhal e outro para inervar os tecidos corporais. Os aferentes primários são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. Os neurônios mais mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam a maior velocidade de condução são as fibras A $\beta$ . Essas fibras respondem de forma máxima ao leve toque ou movimento e, normalmente, não contribuem para a dor. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem as fibras C não mielinizadas e as fibras pouco mielinizadas A $\delta$ , respectivamente. Estas fibras são as responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo, que ocorre de forma mais lenta do que aquela observada para as fibras A $\beta$ . Existem ainda duas classes principais de fibras A $\delta$ , sendo diferenciadas por suas diferenças de resposta à estimulação térmica ou lesão tecidual. As fibras A $\delta$  do tipo I respondem a temperaturas inferiores a 53°C, enquanto as fibras A $\delta$  do tipo II respondem a temperaturas menores que 43°C (PLEUVRY, 1996; SHELLEY, 1994; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

A ativação dos nociceptores pode ocorrer em decorrência de estímulos térmicos que podem ser frio ou calor, estímulos mecânicos com intensidade suficiente para ativar

as fibras nociceptivas ou por uma série de irritantes químicos. No entanto, a atividade e o metabolismo dessas fibras também são amplamente regulados por mecanismos endógenos, como produtos da lesão tecidual e mediadores inflamatórios. Muitas substâncias causam ativação direta dos nociceptores (por exemplo, bradicinina, ATP, capsaicina) causando assim uma dor de característica aguda. Já mediadores inflamatórios (por exemplo, prostaglandinas) produzem dor por sensibilizar os nociceptores. Isto acontece pela ativação de proteínas quinases intracelulares e alteração da excitabilidade da membrana, ou indiretamente via síntese e liberação de outros reguladores celulares (por exemplo, citocinas). Além disso, uma excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão neuronal, pode decorrer do aparecimento de novos canais iônicos e receptores (DRAY et al., 1994; GUIRIMAND e LE BARS, 1996; BESSON, 1997; COGGESHALL e CARLTON, 1997; DRAY, 1997; BESSON, 1999; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999).

Os impulsos nociceptivos chegam através dos aferentes primários na medula espinhal, mais precisamente no corno dorsal, área primária de recebimento da maioria das informações somatossensoriais (COGGESHALL e CARLTON, 1997). O corno dorsal da medula é uma estrutura dividida em lâminas com base em sua citoarquitetura. As fibras aferentes primárias C e A $\delta$  têm suas terminações principalmente nas lâminas mais superficiais [lâminas I (zona marginal) e II (substância gelatinosa)] (BESSON e CHAOUCH, 1987). A partir daí a informação nociceptiva se projeta para o tálamo através de neurônios de segunda ordem, ou neurônios sensoriais secundários, formando as vias ascendentes. Os neurônios sensoriais secundários são ativados pela liberação de glutamato e SP dos aferentes primários (HILL, 2001). As vias ascendentes mais importantes são: o trato espinotalâmico, o trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico. O organismo também possui mecanismos intrínsecos para o

controle da dor. Após a estimulação de diferentes núcleos do tálamo pelas vias ascendentes, ocorre ativação de diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo, amígdala e cerebelo, onde a informação de presente contexto é integrada com experiências do passado e processada para produzir a percepção da dor e promover a resposta adequada que é enviada para a medula espinhal através dos neurônios descendentes (GUYTON, 1992; BESSON, 1999; CRAIG e DOSTROVSKY, 1999; MILLAN 1999). A modulação descendente da informação nociceptiva envolve uma série de estruturas cerebrais e sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico, além de canabinóides endógenos entre outras substâncias (revisado por MILLAN, 2002).

Observando a ampla expressão da PrPc e evidências crescentes de sua importância, não só no SNC, mas também em outros sistemas, como o imunológico, consideramos relevante a busca por novas funções dessa proteína.

A relação entre PrPc e o sistema glutamatérgico vem sendo investigada, já tendo sido demonstrado que a ausência da PrPc em células gliais altera a captação de glutamato dependente de íons sódio. Nosso grupo investigou a captação sinaptossomal de glutamato em animais de 3 meses de idade que não expressam a PrPc, e não observamos qualquer alteração. No entanto, como citado anteriormente, estes animais têm alteração de memória dependente de idade, sendo observada apenas nos animais com 9 meses. Considerando a importante participação do sistema glutamatérgico nas funções relacionadas à memória, é justificável procurar alterações neste sistema em animais de idade avançada.

Não só o sistema glutamatérgico, mas também o serotoninérgico é alterado pela ausência da PrPc. Lembrando que este último é fundamental para a modulação

endógena da dor e que a PrPc também tem relação com sistema de fagocitose, o qual também está relacionado à nocicepção por participar da cascata inflamatória, consideramos a hipótese de que a ausência da PrPc pode modificar a resposta nociceptiva. Ressaltamos, ainda, o fato de não existirem estudos em relação à resposta nociceptiva em animais que não expressam a PrPc, e nosso estudo pode contribuir na compreensão dos papéis fisiológicos desta proteína.

## **OBJETIVO GERAL**

Estudar o transporte e liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por seus transportadores neuronais em preparações de sinaptossomas obtidas a partir do hipocampo, córtex cerebral, córtex entorrinal, cerebelo e bulbo olfatório de camundongos que não expressam a proteína príon celular e camundongos selvagens, com idade de 9 meses.

Estudar o perfil de resposta nociceptiva em camundongos que não expressam a proteína príon celular e camundongos selvagens.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato total, dependente de sódio e independente de sódio em sinaptossomas obtidos das regiões cerebrais acima citadas, de camundongos que não expressam a proteína príon celular e camundongos selvagens, com idade de 9 meses.

Avaliar a liberação basal de L-[<sup>3</sup>H]glutamato e a liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em condições despolarizantes em sinaptossomas obtidos das regiões cerebrais acima citadas, de camundongos que não expressam a proteína príon celular e camundongos selvagens, com idade de 9 meses.

Verificar a resposta nociceptiva de camundongos que não expressam a proteína príon celular e camundongos selvagens, em modelos de nocicepção térmica, química e inflamatória.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 MATERIAIS**

#### **2.1.1 REAGENTES:**

Ácido morfolino propanosulfônico (MOPS), albumina sérica bovina (BSA), cloreto de colina, Folin-Ciocalteu, L-glutamato, ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), Adjuvante Completo de Freund e cloreto de sódio da Sigma®.

L-[<sup>3</sup>H]Glutamato e Percoll da Amersham®.

Ditiotreitol (DTT) da Pharmacia Biotech®.

TRIS-(hidroximetil)-aminometano e HEPES da USB®.

Ácido acético e formaldeído da Merck®.

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade analítica e obtidos de fornecedores comerciais padrão. Para os estudos de nocicepção, as drogas foram diluídas em solução de cloreto de sódio 0,9%.

#### **2.1.2 EQUIPAMENTOS**

- Agitador de tubos, Phoenix®.

- Analgesiômetro térmico, Ugo Basile®.

- Banho-maria, Biomatic®.
- Centrífuga Refrigerada, Himac CR20B2 – Hitachi®
- Centrífuga, 5804R – Eppendorf®.
- Cintilador Tri-Carb 1600 TR – Packard®.
- Hot plate - modelo-DS 37, Ugo Basile®.
- Potenciômetro – DM 20, Digimed®.
- Pletismômetro - Ugo Basile®.

## 2.2 ANIMAIS

Camundongos machos adultos (idade de 3 meses para estudos de nocicepção, 9 meses para estudos de transmissão glutamatérgica) Prnp<sup>0/0</sup> descendentes de animais Zrch I foram utilizados (BUELLER et al., 1992). Os controles selvagens foram criados pelo cruzamento de descendentes F1 do acasalamento de 129/Sv X C57BL/6J. Para confirmar o genótipo dos animais foram realizadas reações em cadeia da polimerase com DNA extraído de suas caudas. As reações foram realizadas em temperatura de anelamento à 60°C e 35 ciclos usando “primers” (5’ATCAGTCATCATGGCGAAC3’) e (5’AGAGAATTCTCAGCTGGAT CTTCTCCCGTC3’). Foi obtida uma banda de 693 pb correspondente à seqüência do gene Prnp nos animais selvagens enquanto uma banda de 1.635 pb, que representa o cassete de kanamicina que substituiu o gene Prnp e identifica os animais Prnp<sup>0/0</sup>. Os animais foram mantidos em grupos de 10 por gaiola

com acesso livre a comida e água, e mantidos em ciclo de claro e escuro de 12h (luz às 7:00) em temperatura de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ . O guia NIH para cuidados e uso de animais de laboratório (NIH Publications No. 80-23, revisado em 1978) foi seguido em todos os experimentos.

## **2.3 ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA**

### **2.3.1 PREPARAÇÃO DE FRAÇÕES SINAPTOSSOMAS**

A preparação de sinaptossomas foi adaptada de DUNKLEY e colaboradores (1988). Os camundongos foram mortos por decapitação, o cérebro rapidamente removido e as estruturas cerebrais, hipocampo, córtex, córtex entorrinal, bulbo olfatório e cerebelo, dissecadas em uma placa de Petri a  $4^\circ \text{C}$ , e pesadas. As estruturas cerebrais provenientes de 4 animais foram utilizadas para cada preparação de sinaptossomas. Estas estruturas foram individualmente homogeneizadas em Potter de vidro (10 % peso/volume) a  $4^\circ \text{C}$ , em um tampão composto por sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM, ditiotreitol 0,25 mM, pH 7,4. As demais porções do cérebro foram descartadas. O homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 1.000 g. O sobrenadante foi coletado com pipeta Pasteur e 2 ml foram aplicados aos tubos preparados com o gradiente descontínuo de Percoll (23, 15, 7 e 3 %). Os gradientes com a amostra foram então centrifugados por 13 min a 30.000 g. As frações 3 (15% Percoll) e 4 (23% Percoll) de cada tubo foram coletadas, unidas e recentrifugadas por 18 min a 30.000 g. O precipitado foi novamente ressuspensão e centrifugado por 18 min. a 30.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado final ressuspensão em tampão HBSS (solução salina tamponada por HEPES), o qual consiste de: HEPES 27 mM; KCl 2,4

mM; NaCl 133 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,0 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM; glicose 12 mM. As preparações de sinaptossomas foram então utilizadas para os ensaios de captação e liberação de glutamato.

### **2.3.2 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE L-[<sup>3</sup>H]GLUTAMATO**

A captação de glutamato foi realizada conforme previamente descrito (FONNUM ET AL., 1980; TASCAL ET AL., 2004). A reação foi iniciada pela adição de 35 µl (100 µg de proteína) da preparação de sinaptossomas ao meio contendo L-[<sup>3</sup>H]glutamato 100 nM (composto de glutamato não radioativo e L-[<sup>3</sup>H]glutamato 49 Ci/mmol) em HBSS com NaCl 200 mM. A incubação foi finalizada após 1 minuto por filtração do meio de ensaio através de filtros de fibra de vidro (Millipore 0,45 µm). Os filtros foram rapidamente lavados (3 vezes) com 4 ml de Mops-Tris 10 mM, pH 7,4, à temperatura ambiente. A captação específica e de alta afinidade de L-[<sup>3</sup>H]glutamato (dependente de sódio) foi calculada como a diferença entre a captação obtida com o meio de incubação descrito acima (captação total) e a captação obtida em ensaios realizados na ausência de íons sódio, utilizando cloreto de colina em substituição ao cloreto de sódio (captação independente de sódio). A radioatividade presente nos filtros foi avaliada em um contador de cintilação líquida.

### **2.3.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE L-[<sup>3</sup>H]GLUTAMATO**

O ensaio de efluxo de glutamato foi adaptado de TAVARES et al. (2002). Foi realizada a captação conforme descrito acima, por 15 minutos a 35° C na presença de L-[<sup>3</sup>H]glutamato (concentração final, 500 nM) e alíquotas de 1,4 mg de proteína de sinaptossomas. A captação foi interrompida por centrifugação a 13.000 g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão HBSS sem

glutamato e novamente centrifugado. O procedimento anterior foi repetido por mais três vezes com o intuito de retirar todo o neurotransmissor que não tenha sido captado. Por fim, os sinaptossomas foram incubados a 35° C por 1 min, em condições basais ou despolarizantes (na presença de KCl 40 mM com redução equimolar de NaCl). O efluxo foi imediatamente finalizado por centrifugação por 1 min. a 16.000 g. Os sobrenadantes e precipitados obtidos foram separadamente avaliados para a radioatividade por cintilação líquida. A quantidade de L-[<sup>3</sup>H]glutamato liberada (no sobrenadante) foi calculada como uma porcentagem da quantidade total de radioatividade (radioatividade no sobrenadante adicionada à radioatividade no precipitado).

#### **2.3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951), usando-se albumina bovina sérica como padrão.

#### **2.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram avaliados com o teste-T de Student, utilizando o programa SPSS versão 10.0 e foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

## **2.4 ESTUDOS DE NOCICEPÇÃO**

Todos os testes comportamentais foram realizados com camundongos que não expressam a PrPc, com idade de 3 meses, usando camundongos que expressam normalmente a PrPc (selvagens), de mesma base genética, como grupo controle.

### **2.4.1 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO GLUTAMATO**

Este modelo foi proposto recentemente por BEIRITH et al. (2002) e analisa o envolvimento do sistema glutamatérgico, principalmente os receptores NMDA e não-NMDA na transmissão nociceptiva. A injeção de glutamato induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa.

Os animais foram colocados individualmente dentro de um funil de vidro transparente, por um período de adaptação de, no mínimo, 20 minutos e que posteriormente, foi utilizado para observar a reação à dor induzida pelo glutamato, cronometrando-se a cada 5 min (período máximo de 60 min) o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata. Cada animal recebeu 20 µl de solução de glutamato (10 µmol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita. O tempo que o animal levou para lamber ou morder a pata injetada com glutamato foi considerado como indicativo de dor (BEIRITH et al., 1998).

### **2.4.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO**

Embora este seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, é considerado um modelo de dor inflamatória visceral. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina

(0,9%). Basicamente, as contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (SANTOS et al., 1999b). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram observados em funis de vidro individuais e o número de contorções abdominais foi quantificado a cada 5 min em um período máximo de 60 minutos.

#### **2.4.3 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA**

Esse modelo permite avaliar dois tipos distintos de dor: a dor de origem neurogênica (estimulação direta dos nociceptores) e a de origem inflamatória (caracterizada pela sensibilização dos nociceptores causada por liberação de mediadores envolvidos na inflamação). O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (SANTOS et al., 1999). Os animais receberam 20 µl de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita. Após a injeção de formalina os animais foram colocados, individualmente, em um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, no intervalo de 5 minutos, durante 1 hora, para avaliar a evolução do processo nociceptivo.

Esse modelo permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção da formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda, que ocorre entre 15 a 30 min após a formalina, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores químicos da inflamação (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

#### **2.4.4 ESTÍMULO VISCERAL CONDICIONANTE**

Os animais foram tratados com ácido acético 0,6%, 0,45 ml, via i.p. com objetivo de induzir um estímulo visceral condicionante (KURIHARA et al, 2003). Três semanas após a injeção de ácido acético ou solução salina (grupo controle), foi examinado estímulo nocivo através da administração de 20 µl de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita. Após a injeção de formalina os animais foram colocados, individualmente, em um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado durante 0-5 min (fase aguda) e 15-30 min (fase tônica) após a injeção, para avaliar a evolução do processo nociceptivo (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

#### **2.4.5 INFLAMAÇÃO (EDEMA) E ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA PELO CFA**

Este modelo permite avaliar a evolução da nocicepção de origem inflamatória crônica induzida pela injeção de adjuvante completo de Freund (CFA). Os camundongos foram anestesiados com éter e receberam uma injeção intraplantar de 20 µL de CFA (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* em 85% parafina e 15% manida monoleato) na pata posterior direita. A dose de CFA utilizada produz significativo aumento do volume da pata e desenvolvimento de alodinia (FERREIRA et al., 2001).

A avaliação do edema foi realizada através de pletismômetro (Ugo Basile) em vários tempos (basal, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 e 192 h) e foi expresso (µL) como a diferença entre o volume da pata antes (basal) e posteriormente à injeção do CFA (De CAMPOS et al., 1996; FERREIRA et al., 2001). O aumento do volume da pata foi utilizado como indicativo do grau de inflamação.

A alodinia mecânica foi medida conforme descrito anteriormente (CHAPLAN et al., 1994). Esta consiste da aplicação de uma força mecânica (em gramas) através do uso de filamento de Von Frey (VFH, Stoelting, Chicago, USA). A utilização desse filamento permite aplicação de diferentes forças na pata, e a retirada da pata frente ao estímulo é considerada como resposta nociceptiva. O gráfico obtido representa 50% do limiar de resposta (retirada da pata) frente a 6 aplicações do filamento de Von Frey. A frequência de retirada foi determinada anteriormente à aplicação de CFA (basal). A alodinia mecânica foi observada 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 e 192 h após a injeção de CFA.

#### **2.4.6 TESTE DA PLACA QUENTE (HOT-PLATE)**

O teste da placa quente é um modelo que avalia a latência de resposta frente ao estímulo térmico, ou seja, é um modelo de nocicepção térmica descrito por WOOLFE & MACDONALD (1944). Nesses experimentos, o aparelho de placa quente (Ugo Basile, modelo-DS 37) foi mantido a 50,5°, 55° ou 58°C. Os animais foram colocados num cilindro de vidro de 24 cm de diâmetro sobre a superfície aquecida, e o tempo entre a colocação do animal e a resposta nociceptiva (caracterizada pela lambida, mordida e batidas das patas) foi considerado como latência de resposta. Para prevenir lesão tecidual foi utilizado um tempo de corte de 30s.

#### **2.4.7 TESTE DE RETIRADA DA CAUDA (TAIL-FLICK)**

Um analgesiômetro térmico (Ugo Basile) foi utilizado para medir a latência de resposta dos animais de acordo com o método descrito por D'AMOUR & SMITH (1941). Para isto, um estímulo luminoso (90 W) foi aplicado na cauda do animal, sendo que o tempo em segundos que o mesmo levou para remover a cauda, expondo a fotocélula no aparelho foi cronometrado. Para prevenir lesão tecidual foi utilizado um

tempo de corte automático de 30s e foram realizadas três medidas sendo que a média das mesmas foi calculada para quantificar a latência de resposta.

#### **2.4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram avaliados com análise de variância de uma via (ANOVA), com exceção dos dados obtidos dos estudos de alodinia e edema induzidos por CFA e do estímulo condicionante visceral, que foram analisados com teste de duas vias (ANOVA), seguidos pelo teste Student-Newman-Keuls ou teste-T de Student (na análise de uma via), utilizando o programa Graph Pad Instat versão 2.05. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM e foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

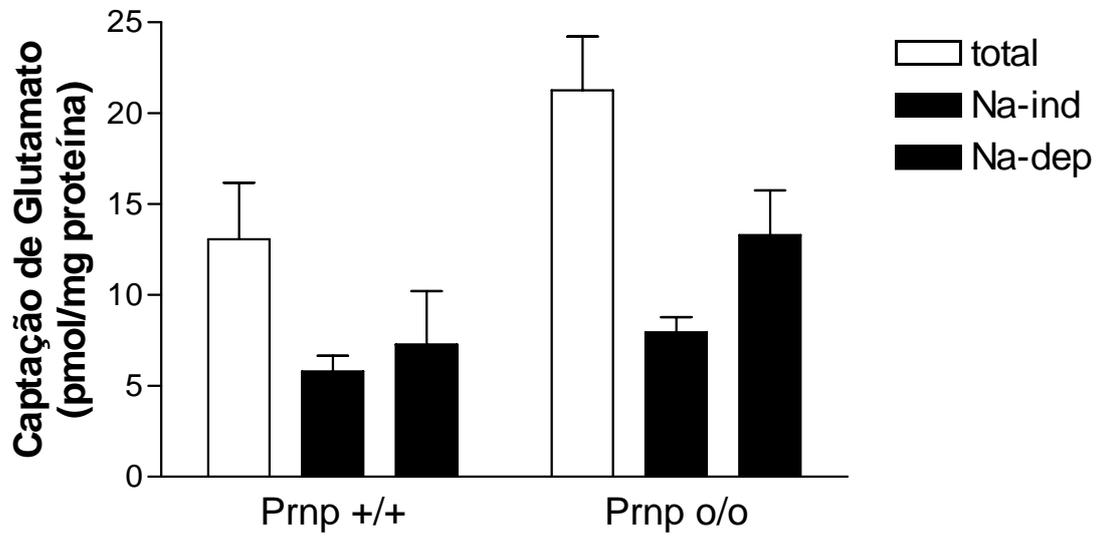
#### **3.1 ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA**

A captação e liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato foram avaliadas em preparações de sinaptossomas obtidas a partir do hipocampo, córtex cerebral, córtex entorrinal, cerebelo e bulbo olfatório de camundongos selvagens e camundongos que não expressam a proteína príon celular, com idade avançada (9 meses).

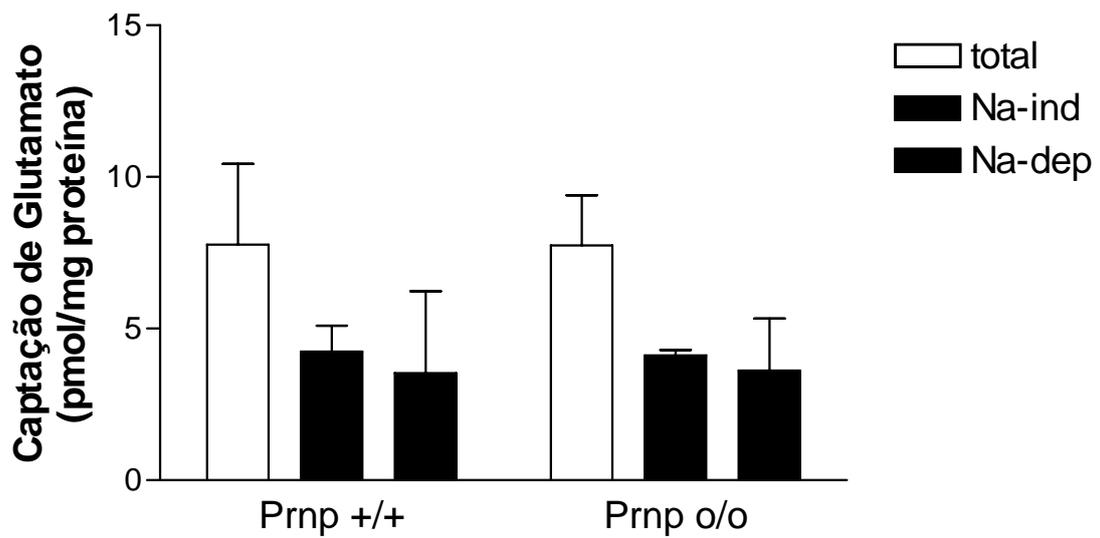
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os camundongos selvagens e os que não expressam a proteína príon celular, na captação sinaptossomal total de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em hipocampo (p = 0,120), cerebelo (p= 0,991), córtex (p= 0,778), córtex entorrinal (p= 0,783) e bulbo olfatório (p= 0,572); na captação dependente de Na<sup>+</sup> em hipocampo (p = 0,193), cerebelo (p= 0,972), córtex (p= 0,733), córtex entorrinal (p= 0,811) e bulbo olfatório (p= 0,596); ou na captação independente de Na<sup>+</sup> em hipocampo (p = 0,147), cerebelo (p= 0,884), córtex (p= 0,831), córtex entorrinal (p= 0,748) e bulbo olfatório (p= 0,883) (Figura 1).

Também não foram observadas diferenças significativas na liberação basal de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em sinaptossomas obtidos de hipocampo (p = 0,263), cerebelo (p= 0,742), córtex (p= 0,867), córtex entorrinal (p= 0,807) e bulbo olfatório (p= 0,850); e na liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato estimulada por despolarização (aumentando a concentração de K<sup>+</sup>) em hipocampo (p = 0,228), cerebelo (p= 0,880), córtex (p= 0,960), córtex entorrinal (p= 0,685) e bulbo olfatório (p= 0,669), entre os camundongos selvagens e os que não expressam a proteína príon celular (Figura 2).

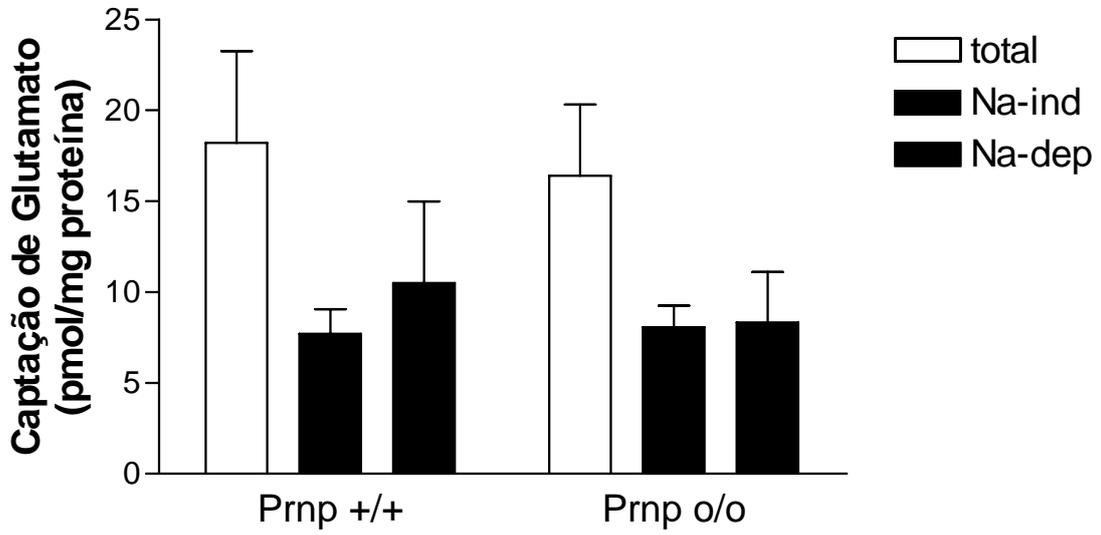
### A- Hipocampo



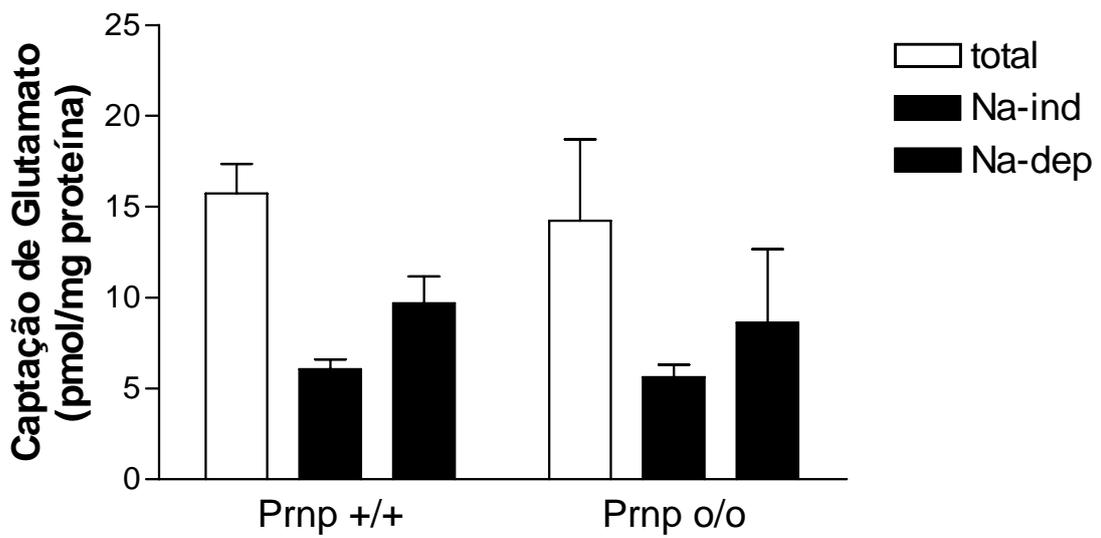
### B - Cerebelo



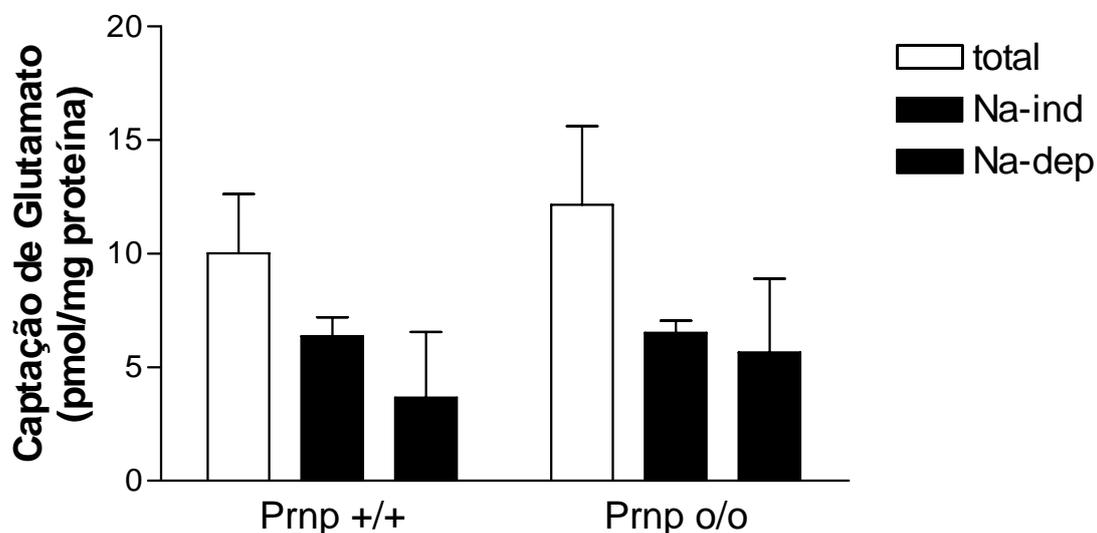
### C - Córtex Cerebral



### D - Córtex Entorrinal

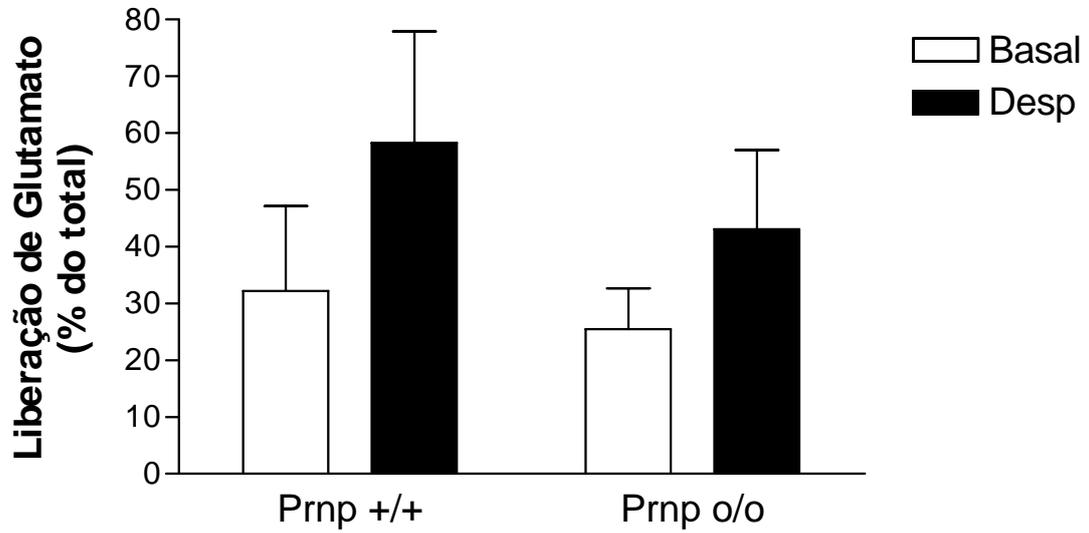


## E - Bulbo Olfatório

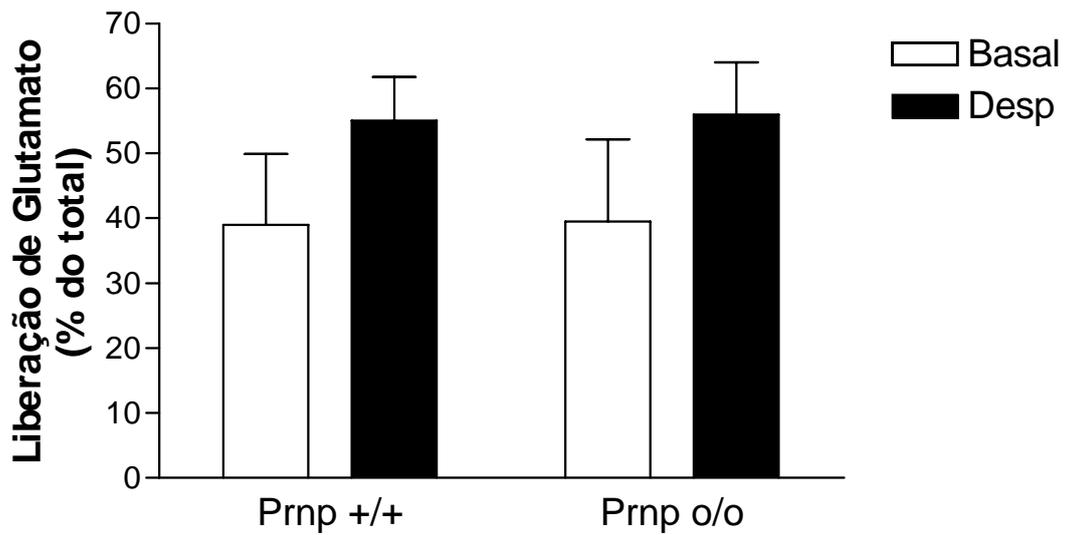


**Figura 1. Avaliação da captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em preparações de sinaptossomas obtidas a partir de hipocampo, cerebelo, córtex cerebral, córtex entorrinal e bulbo olfatório de camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** A captação total de glutamato, independente de Na<sup>+</sup> (Na-ind) e dependente de Na<sup>+</sup> (Na-dep) foi avaliada em sinaptossomas obtidos a partir do hipocampo (A), cerebelo (B), córtex cerebral (C), córtex entorrinal (D) e bulbo olfatório (E) de camundongos selvagens (Prnp +/+) e que não expressam a PrPc (Prnp o/o), com idade de 9 meses. A captação de glutamato está expressa em pmol/mg proteína/min. Os dados representam média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicatas. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos de Prnp +/+ e Prnp o/o.

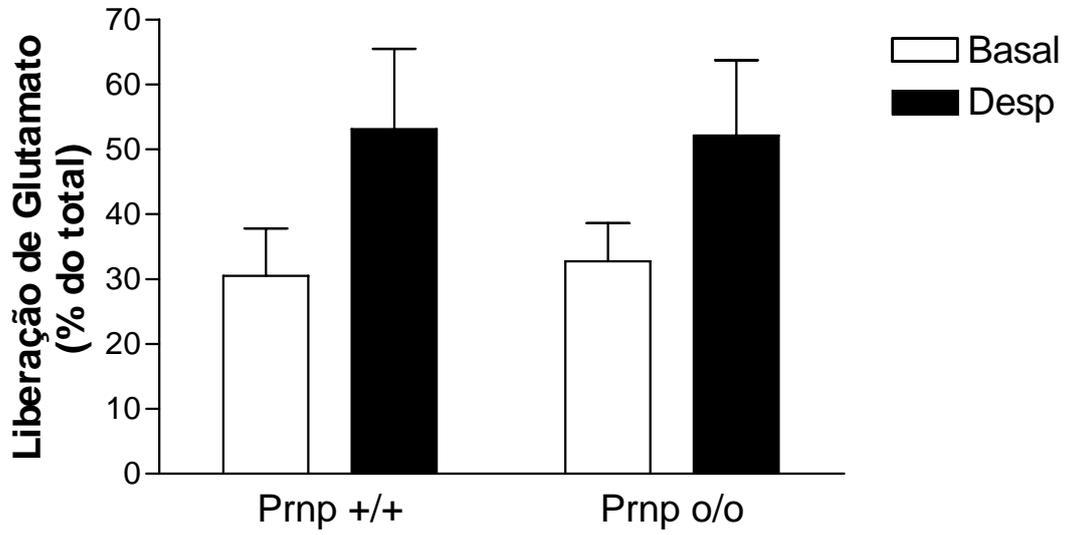
### A - Hipocampo



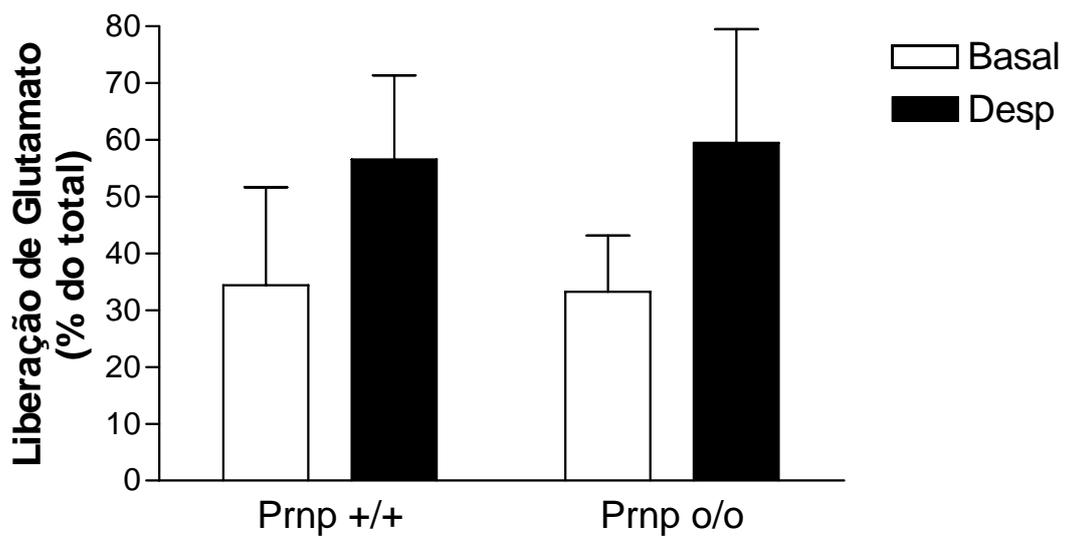
### B - Cerebelo



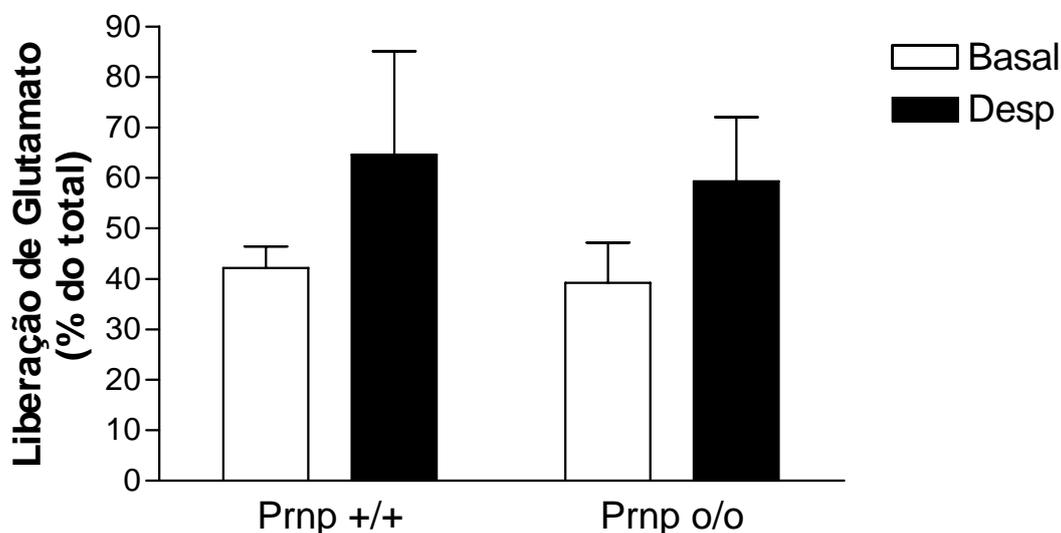
### C - Córtex Cerebral



### D - Córtex Entorrinal



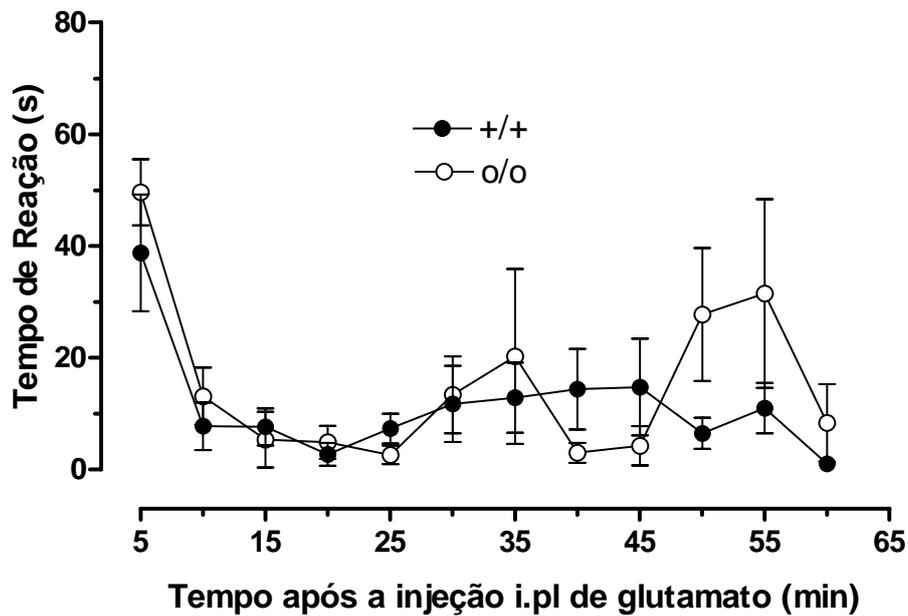
## E - Bulbo Olfatório



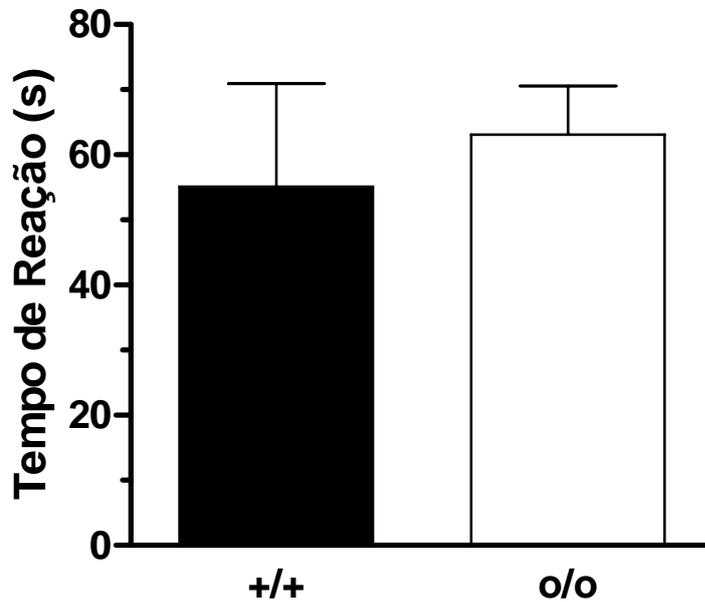
**Figura 2. Avaliação da liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em preparações de sinaptossomas obtidas a partir de hipocampo, cerebelo, córtex cerebral, córtex entorrinal e bulbo olfatório de camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** A liberação basal de glutamato foi realizada em concentrações fisiológicas de KCl (basal) e a liberação estimulada por despolarização foi realizada na presença de 40 mM KCl no meio de incubação (desp) em sinaptossomas obtidos a partir do hipocampo (A), cerebelo (B), córtex cerebral (C), córtex entorrinal (D) e bulbo olfatório (E) de camundongos selvagens (Prnp +/+) e que não expressam a PrPc (Prnp o/o), com idade de 9 meses. Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[<sup>3</sup>H] glutamato captado. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos realizados em triplicatas. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos de Prnp +/+ e Prnp o/o.

### **3.2 ESTUDOS DE NOCICEPÇÃO**

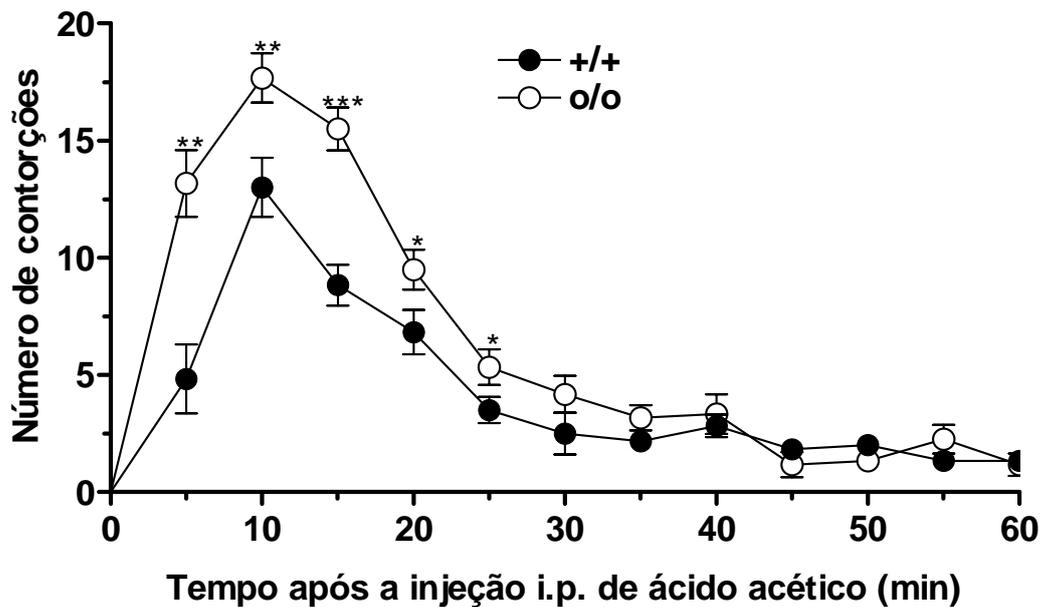
Os dados apresentados nas Figuras 3 e 4 indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de camundongos selvagens e camundongos que não expressam a proteína príon celular na nocicepção induzida pelo glutamato. No estudo da nocicepção inflamatória visceral induzida pelo ácido acético observou-se que animais que não expressam a proteína príon celular foram mais responsivos que animais selvagens (Figuras 5 e 6). Desta forma, esses resultados podem indicar que a ausência da expressão da proteína príon celular parece ser relevante para a evolução da inflamação induzida pelo ácido acético.



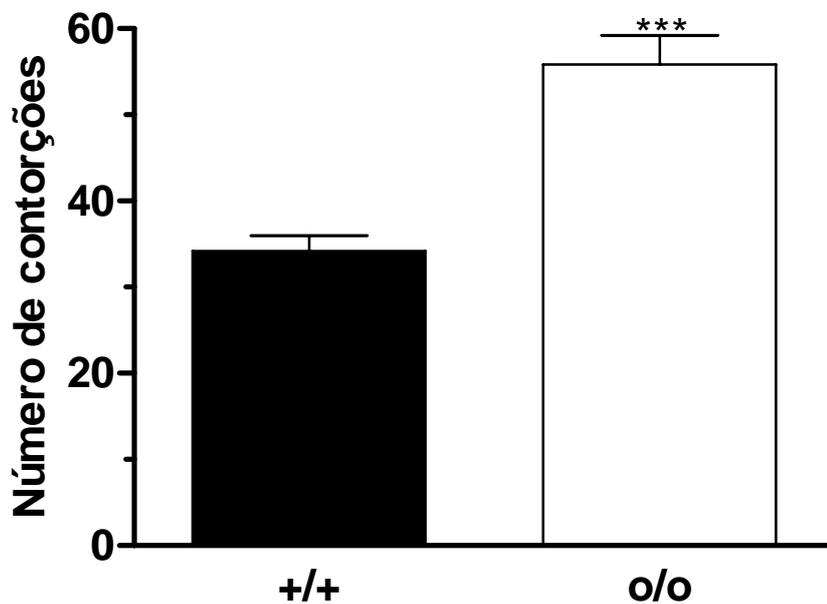
**Figura 3. Avaliação temporal da nociceção induzida por Glutamato em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Avaliação temporal da nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato ( $10 \mu\text{mol/pata}$ ) em animais selvagens (círculo fechado) e que não expressam a proteína prion celular (círculo aberto). Os resultados representam média  $\pm$  EPM de oito animais e a análise estatística entre os grupos foram realizadas através de ANOVA uma via.



**Figura 4. Nociceção induzida por Glutamato em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10  $\mu$ mol/pata) durante 15 minutos, em animais selvagens (barra escura) e que não expressam a proteína prion celular (barra clara). As colunas indicam média  $\pm$  EPM de oito animais e as análises estatísticas entre os grupos foram realizadas através de ANOVA uma via.

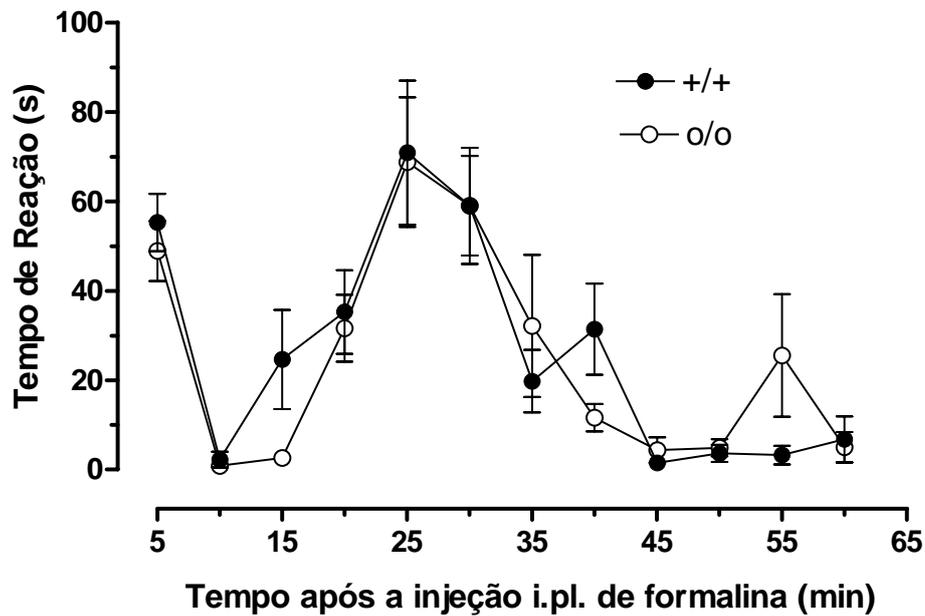


**Figura 5. Avaliação temporal da nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos que não expressam a proteína príon celular e selvagens.** Avaliação temporal do número de contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. de ácido acético em animais selvagens (círculo fechado) e que não expressam a proteína príon celular (círculo aberto). Os resultados representam média  $\pm$  EPM de seis animais. Os símbolos denotam diferença significativa entre os grupos selvagem e que não expressam a proteína príon celular \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  (ANOVA uma via, seguida de teste t de Student).

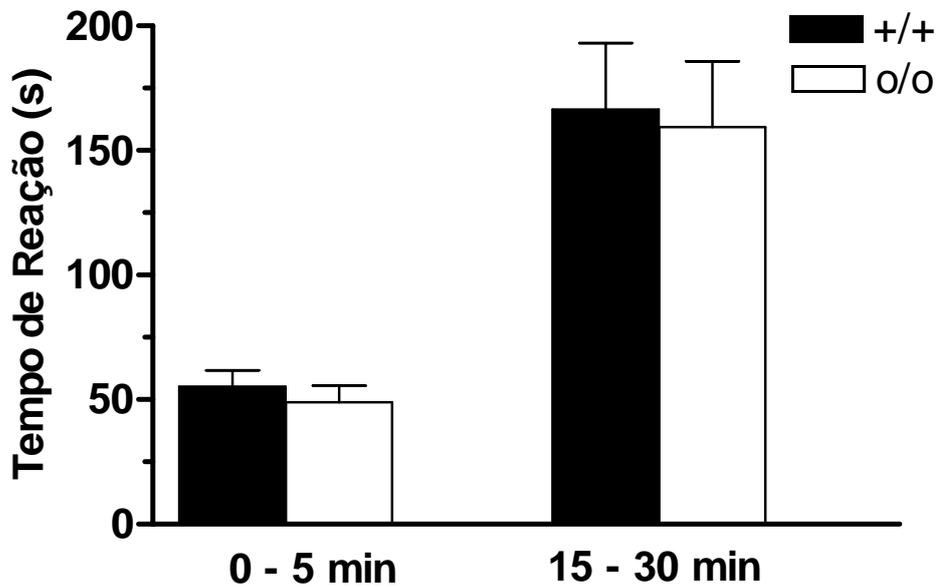


**Figura 6. Nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Resposta nociceptiva (contorções abdominais) induzida pela injeção i.p. de ácido acético durante 20 minutos, em animais selvagens (barra escura) e que não expressam a proteína prion celular (barra clara). As colunas indicam média  $\pm$  EPM de seis animais. Os símbolos denotam a diferença significativa entre os grupos selvagem e que não expressam a proteína prion celular \*\*\* $p \leq 0.001$  (ANOVA uma via, seguida de teste t de Student).

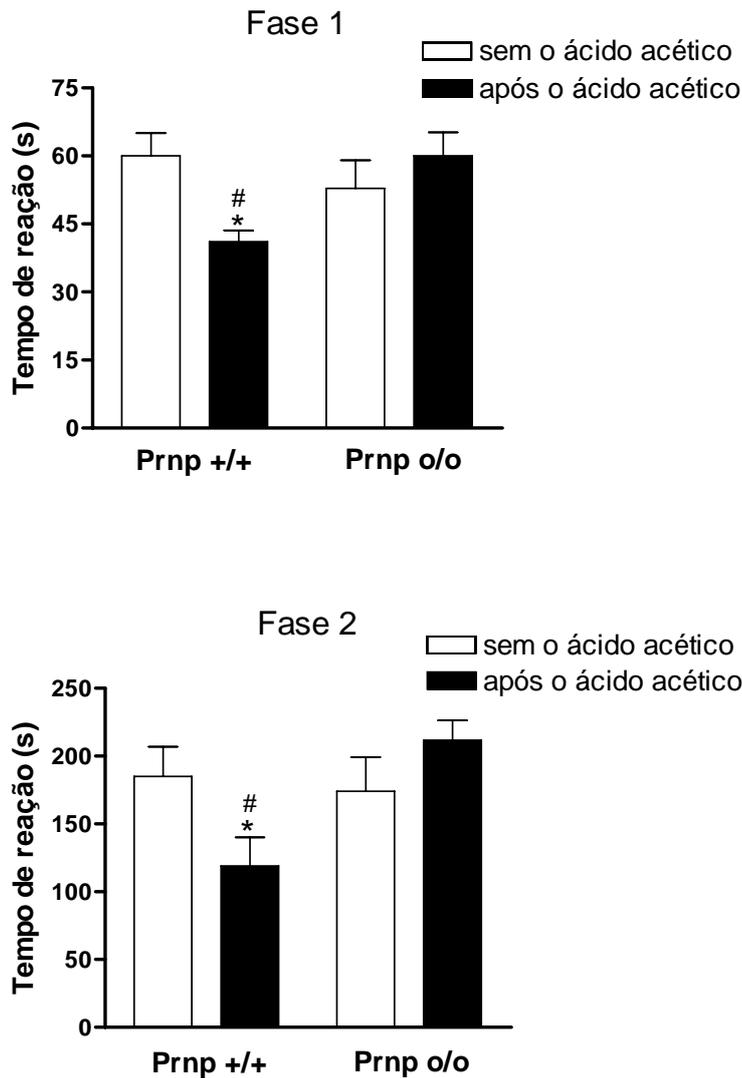
Os resultados apresentados nas Figuras 7 e 8 mostram que também não houve diferença entre os grupos de camundongos selvagens e camundongos que não expressam a proteína príon celular na nocicepção induzida pela formalina, tanto na nocicepção neurogênica (primeiros 5 minutos) quanto na inflamatória (15 a 30 minutos). Quando avaliados os resultados do estímulo visceral condicionante, observa-se uma diferença significativa entre os grupos submetidos previamente, ou não, ao estudo de nocicepção induzida pelo ácido acético, somente nos camundongos selvagens. O grupo selvagem que foi submetido ao teste com ácido acético apresenta um menor número de manifestações dolorosas no teste com a formalina, tanto na fase de nocicepção neurogênica (fase 1) quanto na fase inflamatória (fase 2), em comparação ao grupo selvagem que recebeu apenas o teste com a formalina. Entre os grupos de camundongos que não expressam a proteína do príon celular não houve diferença significativa (Figura 9).



**Figura 7. Avaliação temporal da nocicepção induzida pela formalina em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Avaliação temporal da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) em animais selvagens (círculo fechado) e que não expressam a proteína prion celular (círculo aberto). Os resultados representam média  $\pm$  EPM de oito animais e as análises estatísticas entre os grupos foram realizadas através de ANOVA uma via.

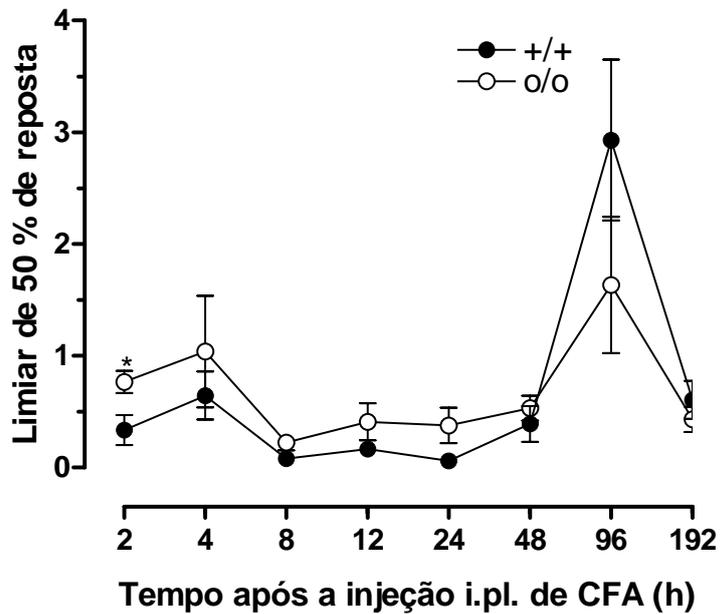


**Figura 8. Primeira e segunda fases da nocicepção induzida pela formalina em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Primeira fase (0-5 min) e segunda fase (15-30 min) da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) em animais selvagens (barra escura) e que não expressam a proteína prion celular (barra clara). As colunas indicam média  $\pm$  EPM de oito animais e as análises estatísticas entre os grupos foram realizadas através de ANOVA uma via.

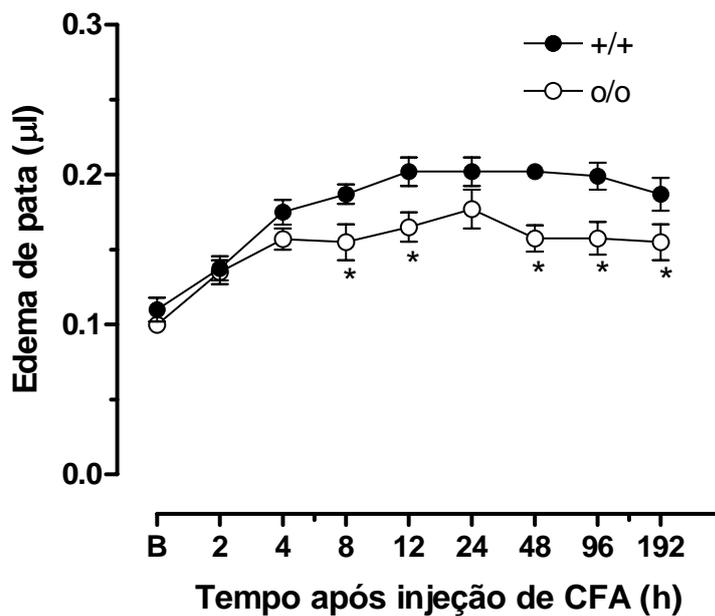


**Figura 9. Nociceção induzida pela formalina após estímulo visceral condicionante em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Primeira fase (0-5 min) (A) e segunda fase (15- 30 min) (B) da nociceção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) em animais selvagens e que não expressam a proteína prion celular, submetidos a um estímulo visceral condicionante, por administração i.p. de ácido acético 3 semanas antes. As colunas indicam média  $\pm$  EPM de oito animais pré-tratados com salina i.p. (barra clara) ou ácido acético (barra escura). Os símbolos denotam a diferença significativa \* $p < 0,05$  entre os grupos que receberam, ou não, o estímulo condicionante; e # $p < 0,05$  entre grupos selvagem e que não expressam a proteína prion celular. Dados analisados com teste de duas vias (ANOVA), seguidos pelo teste Student-Newman-Keuls.

A injeção intraplantar de CFA produziu uma alodinia duradoura nos animais testados, porém não observamos diferença significativa entre camundongos selvagem e que não expressam a proteína príon celular (Figura 10). Avaliando a inflamação (edema) induzida pelo CFA, demonstrou-se que, após 2 horas da injeção de CFA, todos os animais tiveram aumento de volume da pata, em relação ao volume basal. No entanto os camundongos que não expressam a proteína príon celular desenvolveram menor edema, quando comparados aos animais selvagens, a partir de 8 horas após a injeção (Figura11).

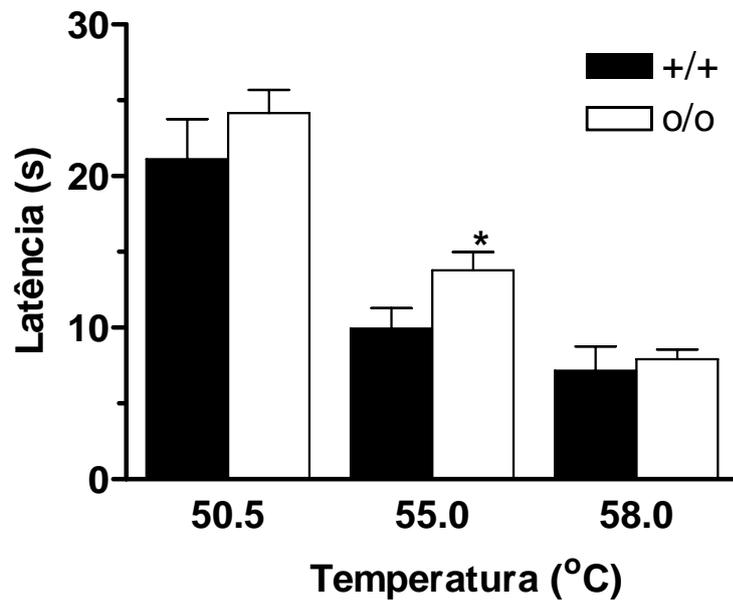


**Figura 10. Avaliação temporal da alodinia induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos que não expressam a proteína príon celular selvagens.** Avaliação temporal da resposta ao estímulo mecânico (alodinia) através do filamento de Von Frey frente à inflamação induzida pela injeção i.pl. de CFA em animais selvagens (círculo fechado) e que não expressam a proteína príon celular (círculo aberto). Os resultados representam média  $\pm$  EPM de oito animais. O símbolo denota diferença significativa entre grupo selvagem e knockout  $*p \leq 0.05$ . Dados analisados com teste de duas vias (ANOVA), seguidos pelo teste Student-Newman-Keuls.

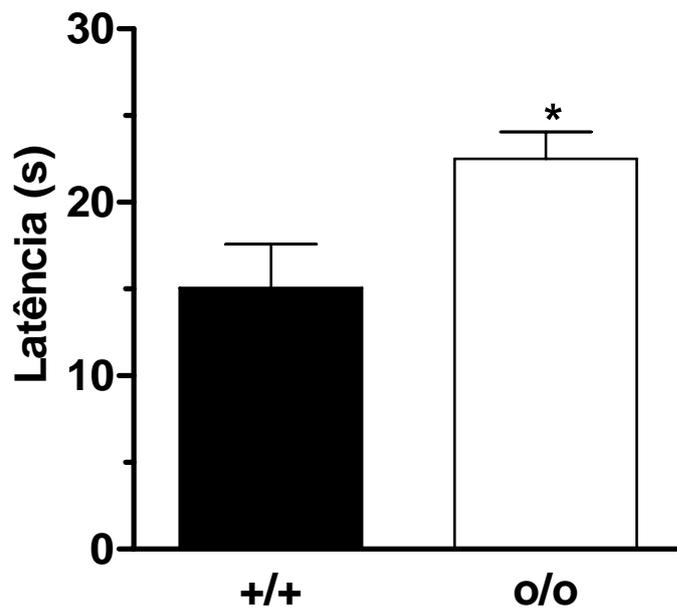


**Figura 11. Avaliação temporal do edema induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Avaliação temporal para o desenvolvimento do edema de pata frente à inflamação induzida pela injeção i.pl. de CFA em animais selvagens (círculo fechado) e que não expressam a proteína prion celular (círculo aberto). Os resultados representam média  $\pm$  EPM de oito animais. O símbolo denota diferença significativa entre grupos selvagem e que não expressam a proteína prion celular  $*p \leq 0.05$ . Dados analisados com teste de duas vias (ANOVA), seguidos pelo teste Student-Newman-Keuls

Pode-se observar que no teste da placa quente ocorreu diferença significativa entre os grupos de animais selvagens e que não expressam a proteína príon celular na temperatura de 55°C, onde os camundongos que não expressam a proteína príon celular apresentaram maior latência de resposta, o que indica maior resistência ao estímulo térmico aplicado (Figura 12). Resultado semelhante foi obtido no teste de retirada da cauda, onde novamente o grupo de animais que não expressam a proteína príon celular teve maior latência de resposta ao estímulo aplicado (Figura 13).



**Figura 12. Teste da placa quente (hot-plate) em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Avaliação da resposta nociceptiva frente a estímulo térmico induzido pela placa quente (hot-plate) em animais selvagens (barra escura) e que não expressam a proteína prion celular (barra clara). As colunas representam média  $\pm$  EPM de sete animais. O símbolo denota diferença significativa entre os grupos selvagem e que não expressam a proteína prion celular  $*p \leq 0.05$  (ANOVA uma via, seguida do teste t de Student).



**Figura 13. Teste de retirada da cauda (tail-flick) em camundongos que não expressam a proteína prion celular e selvagens.** Avaliação da resposta nociceptiva frente a estímulo térmico induzido pela radiação luminosa (90 W) na cauda (tail-flick), em animais selvagens (barra escura) e que não expressam a proteína prion celular (barra clara). As colunas representam média  $\pm$  EPM de sete animais. O símbolo denota diferença significativa entre os grupos selvagem e que não expressam a proteína prion celular  $*p \leq 0.05$  (ANOVA uma via, seguida do teste t de Student).

#### **4. DISCUSSÃO**

A proteína príon celular, PrPc, é uma glicoproteína de membrana, expressa em diversos tipos celulares, cujas funções fisiológicas têm sido amplamente investigadas nos últimos anos. Sua importância no desenvolvimento de doenças causadas pela proteína infecciosa, scrapie (PrPsc), chamadas encefalopatias espongiformes transmissíveis, vem sendo elucidada. Sabe-se que a infecção somente ocorre quando a célula expressa a PrPc, pois a PrPsc usa sua estrutura e transforma a proteína normal em uma proteína infectante, processo com mecanismo ainda pouco conhecido (PRUSINER, 1998). Entre as características das doenças causadas por príons está uma marcada neurodegeneração. Existem autores que propõem que esta neurodegeneração pode estar acontecendo devido à perda de função da PrPc, facilitando ocorrência de lesões por estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica (BROWN et al, 1999; BROWN 2001). A PrPc parece contribuir também na homeostase do sistema serotoninérgico, agindo como moduladora do acoplamento e regulação entre receptores 5-HT em células serotoninérgicas (MOUILLET-RICHARD et al, 2004).

Além de sua expressão abundante no SNC, a PrPc também é expressa por diversos tipos celulares, como já citado anteriormente. Assim, discute-se que sua função não deve ser exclusiva de neurônios. Evidências recentes indicam um papel da PrPc na modulação da fagocitose *in vivo* e *in vitro* (de ALMEIDA et al, 2005).

A produção de animais que não expressam a PrPc foi uma ferramenta fundamental para o estudo de possíveis funções fisiológicas desta proteína. Neste estudo foram utilizados camundongos que não expressam a PrPc, da linhagem Zrch1, e camundongos com mesma base genética, que expressam a proteína, como grupo controle. Foram realizados estudos de transporte sinaptossomal de glutamato em

camundongos com idade de 9 meses, e estudos de nocicepção em animais de 3 meses de idade, com objetivo de contribuir na identificação dos papéis fisiológicos da PrPc tanto no SNC, quanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP).

### **Neurotransmissão glutamatérgica**

Neste estudo, investigamos a atividade dos transportadores neuronais de glutamato, e se esta poderia ser alterada pela ausência da PrPc. Nenhuma alteração foi observada na captação e liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por sinaptossomas obtidos do hipocampo, cerebelo, córtex cerebral, córtex entorrinal e bulbo olfatório de camundongos que não expressam a PrPc, com idade de 9 meses (Figs. 1 e 2).

O envolvimento do sistema glutamatérgico nas doenças causadas por Príons vem sendo demonstrado ao longo dos anos. Estudos de união de MK-801 em hipocampo de camundongos inoculados com PrPsc mostram uma redução nos sítios de união para este antagonista não-competitivo de receptores NMDA, o que ocorre antes do aparecimento de sintomas, podendo indicar sinais de um processo neurodegenerativo (DIEZ et al, 2001). Em coculturas de neurônios cerebelares e astrócitos, o tratamento das mesmas com o peptídeo PrP106-126, um peptídeo sintético que corresponde ao núcleo da PrPsc, estimula mudanças na composição dos receptores NMDA, causando morte celular através do aumento da toxicidade glutamatérgica (SASSOON et al, 2004). Estudos de imunohistoquímica em cérebros de pacientes com Doença de Creutzfeldt-Jacob mostram uma alteração importante e seletiva na expressão de receptores de neurotransmissores cruciais no SNC, apontando para uma vulnerabilidade maior dos receptores glutamatérgicos nesta patologia (FERRER & PUIG, 2003).

Alterações no sistema glutamatérgico também foram observadas em animais que não expressam a PrPc. Em culturas de células gliais, astrócitos tipo 1 destes

camundongos apresentam redução na captação de glutamato dependente de  $\text{Na}^+$ , sem alterar a captação independente de íons  $\text{Na}^+$  (BROWN & MOHN, 1999). O transporte de glutamato é dependente de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). A captação independente de íons sódio ocorre, principalmente, pelo transportador EAAT4, que é dependente de íons cloreto. Estudos demonstraram que a expressão deste transportador não é alterada nos camundongos que não expressam a PrPc (YUKITAKE et al, 2003), o que pode explicar os resultados obtidos anteriormente em relação à captação de glutamato independente de  $\text{Na}^+$ . Animais que não expressam a PrPc apresentam redução na resposta locomotora induzida pela injeção intra-peritoneal de MK-801 (COITINHO et al, 2002).

A ausência de alteração significativa na captação e liberação de glutamato em sinaptossomas observada neste estudo, poderia sugerir que o acúmulo de glutamato na fenda sináptica não estaria relacionado à excitabilidade neuronal aumentada em camundongos que não expressam a PrPc. No entanto, já foi demonstrado que a ausência da PrPc promove uma redução na captação de glutamato em culturas de astrócitos. Além disso, neurônios cerebelares em culturas obtidas destes animais, são mais sensíveis à toxicidade de glutamato, o que poderia sugerir que ausência da PrPc, contribui para o aumento da excitabilidade neuronal (BROWN & MOHN, 1999).

Os transportadores neuronais de glutamato foram clonados e são designados EAAT3, amplamente expresso em neurônios, EAAT4, encontrados em neurônios de Purkinje no cerebelo, e EAAT5 encontrados na glia e em neurônios da retina (SIMS & ROBINSON, 1999). No entanto, foi demonstrado que o transportador de glutamato EAAT2 (ou GLT-1), presente em astrócitos, pode também contribuir para a captação de alta afinidade por glutamato em preparações sinaptossomais de roedores (SUCHAK et al., 2003). Em certas condições fisiopatológicas, como isquemia aguda e crises

epilépticas, a neurotoxicidade do glutamato pode ser potencializada devido à falha ou alteração na atividade dos transportadores de glutamato (DANBOLT, 2001).

Considerando que a inibição da síntese do transportador de glutamato neuronal, EAAT3, pela administração crônica de oligonucleotídeos “antisense” produziu uma discreta neurotoxicidade e convulsões (ROTHSTEIN et al., 1996), é razoável supor que os transportadores sinaptossomais de glutamato poderiam apresentar alterações na sua atividade, ou eventualmente na sua expressão, em camundongos que não expressam a PrPc, e que são mais propensos à indução de crises epilépticas (WALZ et al., 1999). Um estudo anterior realizado em nosso laboratório já havia demonstrado que não existem alterações no transporte sinaptossomal de glutamato em camundongos que não expressam PrPc com idade de 3 meses (THAIS, 2005; THAIS et al., 2006). Testes comportamentais, especificamente tarefas de esQUIVA inibitória, realizados em camundongos que não expressam a PrPc e em ratos submetidos a injeções intra-hipocâmpais de anticorpo anti-PrPc, evidenciaram que a PrPc também está envolvida na aquisição e retenção de memória, mas de forma dependente da idade. Estes animais foram testados nas idades de 3 e 9 meses, e o que se observou é que, aqueles animais de 9 meses de idade, tiveram alterações em tarefas de avaliação da memória de curto e longo prazo. Já os animais na idade de 3 meses não apresentaram qualquer prejuízo na aquisição de memória (COITINHO et al, 2003). Levando em conta estes dados, testamos a hipótese de uma possível alteração no transporte sinaptossomal de glutamato de maneira dependente da idade dos animais. Nossas observações novamente não demonstraram qualquer alteração no transporte sinaptossomal de glutamato em camundongos que não expressam PrPc aos 9 meses de idade.

No entanto, comparando com os resultados prévios de nosso grupo (THAIS et al, 2006), observamos que houve um aumento na captação total e na captação

dependente de sódio em animais de 9 meses em relação aos de 3 meses de idade, assim como houve aumento na liberação de glutamato em condições basais e despolarizantes. Estas alterações foram evidenciadas tanto em animais que expressam, quanto nos que não expressam a PrPc, sendo que as diferenças no transporte de glutamato foram exclusivas da idade (THAIS et al, 2006). Em relação às diferenças na captação de glutamato em animais de idade avançada, os resultados são discordantes na literatura. Enquanto alguns autores mostraram redução nos níveis de captação de glutamato em animais mais velhos (VATASSERY et al., 1998), a maioria dos estudos não encontram alterações no transporte de glutamato relacionados à idade (PALMER et al., 1994; SANCHEZ-PRIETO et al., 1994). A liberação de glutamato também é controversa em relação às diferenças de idade. Enquanto alguns autores não observaram alterações (PALMER et al., 1994; SANCHEZ-PRIETO et al., 1994), outros encontraram um aumento na liberação de glutamato, basal e estimulada por  $K^+$ , em ratos de 12 meses de idade (LHULLIER et al., 2004). No entanto, nenhum destes estudos foi conduzido com animais de 9 meses de idade, nem avaliaram estruturas cerebrais independentemente, aspectos que devem ser considerados ao comparar resultados. Assim, podemos concluir que a PrPc não está criticamente envolvida no transporte neuronal de glutamato.

Em concordância com nossos achados, YUKITAKE e colaboradores (2003), usando uma linhagem diferente de camundongos com deleção para o gene *Prnp* (*Ngsk*), também observaram que não houve alteração nos níveis de RNAm dos transportadores EAAT4 de neurônios cerebelares em animais que não expressam a PrPc. No entanto, considerando que a captação de glutamato dependente de  $Na^+$  em astrócitos que não expressam PrPc é diminuída (BROWN & MOHN, 1999), e que a expressão dos transportadores de aminoácidos excitatórios é diferente entre células gliais e neuronais (também entre culturas celulares e frações subcelulares), sugerimos a possibilidade de

que a captação astrocitária de glutamato está alterada na ausência da PrPc, enquanto o transporte neuronal de glutamato (captação e liberação sinaptossomais) não é alterado com a deleção do gene Prnp.

Recentemente, foi também demonstrado um aumento nos níveis de RNAm de subunidades do receptor NMDA no giro denteado de camundongos que não expressam a PrPc quando comparados ao tipo selvagem (MAGLIO et al., 2004). Outras anormalidades previamente reportadas nestes animais poderiam contribuir para a hiperexcitabilidade incluindo: a) perda da condutância de correntes de  $K^+$  ativadas por  $Ca^{+2}$ , com redução na amplitude de hiperpolarização, levando à alteração de propriedades celulares intrínsecas de células piramidais no hipocampo (COLLING et al., 1996); b) inibição anormal do receptor GABA-A no hipocampo, que poderia contribuir para um estado hiperexcitável (COLLINGE et al., 1994); c) reorganização das fibras musgosas no hipocampo, semelhante ao observado na epilepsia do lobo temporal relacionada com a esclerose hipocampal (COLLING et al., 1997); d) mudanças na atividade de ectonucleotidases no hipocampo e neocórtex, resultando em níveis mais baixos de hidrólise de ADP, possivelmente levando a níveis mais baixos do anticonvulsivante endógeno adenosina, na fenda sináptica (PEREIRA et al., 2001, BONAN et al., 2000a;b).

Apesar da possível correlação teórica entre transportadores neuronais de glutamato, excitabilidade neuronal e excitotoxicidade neural, o transporte neuronal de glutamato parece estar funcionalmente normal após a deleção do gene Prnp. Assim, podemos concluir que a PrPc não é crucial para o transporte neuronal de glutamato, ou sua ausência foi compensada de maneira eficaz nesses animais estudados. Mesmo sendo resultados negativos, acreditamos que estes dados podem contribuir para a compreensão

dos papéis fisiológicos da PrPc, pois mostram claramente que esta proteína não está envolvida de modo crítico em uma função neuroquímica fisiologicamente importante.

### **Estudos de Nocicepção**

A transmissão nociceptiva compreende uma rede neuronal complexa, distribuída em sistemas periférico, espinal e supra-espinal, e ocorre pela ação de neurotransmissores, neuromoduladores e mensageiros intracelulares (JULIUS & BASBAUM, 2001; JI & STRICHARTZ, 2004). Considerando que a PrPc vem sendo reconhecida como uma proteína importante para a função e homeostasia de sistemas de neurotransmissores, e ainda sua ampla expressão em neurônios, bem como em outras células, é surpreendente o fato de ainda não existirem dados referentes à sua função no sistema nociceptivo. Neste estudo demonstramos que a PrPc é necessária para produção de respostas comportamentais normais em relação à dor.

Animais que não expressam a PrPc apresentaram menor sensibilidade ao estímulo térmico no teste de retirada da cauda em relação aos animais controle (Fig. 13). No teste da placa quente esta hipoalgesia foi observada apenas na temperatura de 55° C, o mesmo não ocorrendo para estímulos térmicos leve (50,5° C) e intenso (58° C) (Fig. 12). As respostas produzidas por estes estímulos térmicos parecem ser geradas por vias diferentes de integração. Aquelas produzidas pelo estímulo da placa quente dependem de integração supra-espinal (CHAPMAN et al, 1985; LE BARS et al, 2001), enquanto as observadas no teste de retirada da cauda correspondem a uma reação reflexa espinal (SINCLAIR et al, 1988; LE BARS et al, 2001). A razão para o efeito analgésico observado na ausência da expressão da PrPc não é clara. Tem sido sugerido na literatura que, em média, 45 % das fibras de pequeno (fibras C) e médio (fibras Aδ tipo II) diâmetro que se projetam para o corno dorsal da medula exibem correntes evocadas por

temperaturas mais baixas (~45° C), enquanto 5 a 10 % dos neurônios (fibras A $\delta$  tipo I) respondem a temperaturas a partir de 52° C, e não são sensíveis à capsaicina (JULIUS & BASBAUM, 2001). Assim, a ausência da PrPc pode estar afetando apenas um tipo específico de fibras, principalmente aquelas com maior mielinização.

Neste contexto, a PrPc não parece estar envolvida na modulação de resposta referente às fibras C, sensíveis à capsaicina. Em camundongos que não expressam a PrPc não houve qualquer alteração na resposta produzida pela injeção intraplantar de formalina, tanto na fase aguda quanto na fase tardia (Figs. 7 e 8). As respostas observadas neste teste são reguladas, pelo menos parcialmente, pelas fibras C sensíveis à capsaicina (McCALL et al, 1996; SANTOS & CALIXTO, 1997). Também não foram observadas alterações nas respostas comportamentais de camundongos knockout para PrPc no teste de nocicepção induzida pelo glutamato (Figs. 3 e 4). Estudos prévios demonstram que a nocicepção induzida pelo glutamato é mediada por fibras C sensíveis à capsaicina (BEIRITH et al, 2003).

É importante lembrar que a condução dos estímulos nociceptivos ao corno dorsal da medula se dá através dos neurônios aferentes primários, classificados de acordo com o diâmetro e mielinização de suas fibras. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem as fibras C não mielinizadas e as fibras pouco mielinizadas A $\delta$ , respectivamente (MILLAN, 1999). A mielinização no SNP ocorre através das células de Schwann, as quais emitem prolongamentos citoplasmáticos que envolvem os axônios individualmente, cobrindo-os com mielina. Existem evidências mostrando que as células de Schwann requerem a formação de uma lâmina basal para envolver e mielinizar os axônios adequadamente. Lamininas são os principais componentes da matriz extra-celular e parecem ser especialmente importantes neste processo de mielinização no SNP. Estudos *in vitro* demonstraram que é necessária

deposição de laminina para mielinização axonal em modelo de cocultura de neurônios e células de Schwann (YU et al, 2005).

A deleção do gene que codifica um receptor de laminina, presente na célula de Schwann, chamado distroglicano, altera a organização da mielina em nervos periféricos, reduzindo a velocidade de condução nestes nervos e alterando respostas a estímulos dolorosos nestes animais. Isto indica que uma adequada interação entre célula de Schwann e laminina pode ser fundamental para o funcionamento adequado do SNP (SAITO et al, 2003). Também a deleção da própria laminina, especificamente da cadeia  $\gamma$ -1, leva a alterações importantes na mielinização do SNP (YU et al, 2005). A PrPc também foi caracterizada como receptor de laminina, ligando-se especificamente a um decapeptídeo carboxi-terminal, presente na cadeia  $\gamma$ -1 da mesma. Esta interação PrPc-laminina promove sinais neuroprotetores, facilitando a sobrevivência e diferenciação neuronal (GRANER et al, 2000). Nossas observações apontam para um papel importante da PrPc no funcionamento normal de fibras mielinizadas, as quais tiveram alteração nos seus limiares de resposta nos camundongos que não expressam a PrPc, o que não foi evidenciado nas respostas de fibras não mielinizadas.

Diferentemente do observado para estímulos térmicos, camundongos que não expressam PrPc apresentam maior sensibilidade à dor induzida pelo ácido acético, um modelo de dor visceral inflamatória (Figs. 5 e 6). A administração de ácido acético intraperitoneal ativa macrófagos e mastócitos residentes na cavidade abdominal, causando liberação de mediadores inflamatórios endógenos, como bradicinina, substância P, prostanoídes e citocinas (fator de necrose tumoral- TNF- $\alpha$ , interleucinas- IL-1 $\beta$ , IL-8) (COLLIER et al, 1968; RIBEIRO et al, 2000). Assim, a nocicepção induzida por ácido acético é bastante dependente da presença e atividade de macrófagos e mastócitos. Estudos demonstraram que animais que não expressam a PrPc apresentam

um aumento da fagocitose dependente de macrófagos, e a administração intraperitoneal de substâncias químicas pró-inflamatórias causa um maior recrutamento de macrófagos, quando comparados a animais que expressam a PrPc. Ou seja, a PrPc regula negativamente a fagocitose (de ALMEIDA et al, 2005). Estes dados são consistentes com nossa observação de que estes animais que não expressam a PrPc mostraram sensibilidade aumentada à nocicepção induzida pelo ácido acético (maior número de contorções abdominais), o que pode ser explicado, ao menos em parte, por maior recrutamento e atividade de macrófagos peritoneais, aumentando a liberação de substâncias pró-inflamatórias, resultando em maior ativação de nociceptores viscerais.

Ao contrário do que ocorre no modelo de dor visceral induzida por ácido acético, onde o recrutamento de macrófagos é fundamental, no modelo de edema e inflamação induzidos por CFA, as respostas são determinadas, principalmente, pela infiltração de células polimorfonucleares (F.C. MEOTTI, comunicação pessoal). Neste estudo observamos uma atividade pró-inflamatória da PrPc relativa a estas células específicas do sistema imune, pois animais que não expressam esta proteína desenvolveram menos edema, em comparação aos animais selvagem (Fig. 11). Esta resposta está de acordo com dados de literatura, que mostram que, nos camundongos onde o gene *Prnp* foi deletado, há um menor recrutamento de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) (de ALMEIDA et al, 2005). Assim, a PrPc parece ter atividades distintas em relação ao recrutamento e função das células do sistema imune, regulando negativamente os macrófagos e a fagocitose, e positivamente as células polimorfonucleares, o que se reflete na sensibilidade diferenciada à dor em animais que não expressam esta proteína em modelos de dor inflamatória.

Outra evidência importante de nosso estudo, indicando que a PrPc é necessária para respostas adequadas aos estímulos nociceptivos, está no modelo de

condicionamento visceral induzido por ácido acético. Utilizando este modelo, estudos prévios demonstraram que a injeção intraperitoneal de ácido acético induz uma inibição da dor somática inflamatória de longa duração (2 a 3 semanas) em camundongos C57BL/6J. Esta antinocicepção é provocada, principalmente, pela ativação do sistema serotoninérgico na medula espinal. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a administração de ácido acético por esta via ocasiona um aumento na expressão de RNA mensageiro dos receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> na medula espinal (KURIHARA et al, 2003). Ativação de receptores 5-HT<sub>2</sub> da medula produz antinocicepção através da despolarização de interneurônios inibitórios, como neurônios GABAérgicos e/ou glicinérgicos. Além disso, a serotonina despolariza os terminais centrais de neurônios aferentes primários, inibindo a transmissão sináptica entre estes aferentes nociceptivos primários e neurônios de segunda ordem do corno dorsal da medula espinal (SUGIYAMA & HUANG, 1995; MILLAN, 1997; KHASABOV et al, 1999). Assim, a serotonina tem papel fundamental na antinocicepção que ocorre no modelo de condicionamento visceral induzido por ácido acético. Nossos resultados evidenciam que a administração de ácido acético intraperitoneal, vinte dias antes da indução de nocicepção pela administração intra-plantar de formalina, levou a uma redução da resposta nociceptiva observada neste último teste, tanto na primeira quanto na segunda fase, em camundongos que expressam normalmente a PrPc (Fig. 9).

Por outro lado, os animais que não expressam a PrPc não tiveram este efeito antinociceptivo, evidenciando um papel da PrPc na plasticidade sináptica no controle da dor. Estudos mostram associação da PrPc com o sistema serotoninérgico. A ligação da PrPc cancela a estimulação da fosfolipase C pelo receptor 5-HT<sub>2A</sub>, reduz a inibição da adenilato ciclase mediada pelos receptores 5-HT<sub>1B/D</sub>, e potencializa a ligação do receptor 5-HT<sub>2B</sub> à fosfolipase A2. Ou seja, a PrPc age como moduladora dos

acoplamentos e regulação entre receptores 5-HT indicando que esta proteína contribui para a homeostase de funções relacionadas à serotonina (MOUILLET-RICHARD et al, 2004). Considerando estes dados, podemos extrapolar nossas observações no sentido de que, a deleção do gene Prnp leva a alterações no sistema serotoninérgico, o qual é extremamente importante nos processos de regulação central da dor, e, conseqüentemente, impede que ocorra a inibição da neurotransmissão nos neurônios aferentes primários.

Nossos resultados demonstram, pela primeira vez na literatura, que a PrPc tem papel importante nos mecanismos de transmissão nociceptiva. Observamos que a PrPc apresenta interação com o sistema serotoninérgico de controle central da dor, sua presença parece ser fundamental na condução de estímulos pelas fibras aferentes mielinizadas, e mecanismos de nocicepção inflamatória têm íntima relação com sua função regulatória sobre as células do sistema imune.

## **6. CONCLUSÕES**

Não foram detectadas diferenças significativas na captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato total, dependente de Na<sup>+</sup> ou independente de Na<sup>+</sup>, em preparações sinaptossomais obtidas do hipocampo, cerebelo, bulbo olfatório, córtex cerebral e córtex entorrinal de camundongos selvagens e que não expressam a proteína príon celular, com idade de 9 meses.

Não foram detectadas diferenças significativas na liberação basal de L-[<sup>3</sup>H]glutamato e na liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato induzida por despolarização, em preparações sinaptossomais obtidas do hipocampo, cerebelo, bulbo olfatório, córtex cerebral e córtex entorrinal de camundongos selvagens e que não expressam a proteína príon celular, com idade de 9 meses.

Não houve diferença entre camundongos selvagens e que não expressam a proteína príon celular na nocicepção induzida por glutamato.

Na nocicepção inflamatória visceral induzida pelo ácido acético observou-se que animais que não expressam a proteína príon celular foram mais responsivos que animais selvagens, indicando que a PrPc tem papel regulador da função inflamatória dependente de macrófagos.

Não houve diferença entre os grupos de camundongos selvagens e camundongos que não expressam a proteína príon celular na nocicepção induzida pela formalina, tanto na nocicepção neurogênica (primeiros 5 minutos) quanto na inflamatória (15 a 30 minutos).

Camundongos que expressam a proteína príon celular apresentam redução da nocicepção induzida pela formalina, nas duas fases do teste, quando submetidos ao estímulo visceral condicionante. Camundongos que não expressam a proteína príon

celular não demonstraram este efeito, evidenciando que a PrPc é importante para a regulação do controle descendente da dor.

Na inflamação induzida por CFA, camundongos que não expressam a proteína príon celular apresentaram menor edema que animais selvagem, indicando um possível papel regulador de inflamação da PrPc.

Nos modelos de nocicepção térmica (placa quente e retirada da cauda), camundongos que não expressam a proteína príon celular tiveram maior limiar de resposta, em comparação com animais que expressam a proteína. No teste da placa quente esta diferença foi observada apenas na temperatura de 50,5° C. Isto demonstra a participação da PrPc na transmissão nociceptiva de fibras sensitivas mielinizadas.

## **7. REFERÊNCIAS**

- AARTS M.M. & TYMIANSKI M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochem. Pharmacol.* 66:877-886, 2003.
- ANDERSON C.M. & SWANSON R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14, 2000.
- ANDERSON C.M.; BRIDGES R.J.; CHAMBERLIN A.R.; SHIMAMOTO K.; YASUDA-KAMATAMI Y.; SWANSON R.A. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J. Neurochem.* 79: 1207-1216, 2001.
- BEIRITH A.; SANTOS A.R.; RODRIGUES A.L.; CRECZYNSKI-PASA T.B.; CALIXTO J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol.*, 345(3):233-45, 1998.
- BEIRITH A.; SANTOS A.R.; CALIXTO J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Res.*, 969(1-2):110-6, 2003.
- BESSON J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. *Drugs.* 53: 1-9, 1997.

- BESSON J.M. The neurobiology of pain. *Lancet*. 353: 1610-1615, 1999.
- BESSON J.M. & CHAOUCH A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.* 67: 67-186, 1987.
- BONAN C.D.; AMARAL O.B.; ROCKENBACH I.C.; WALZ R.; BATTASTINI A.M.; IZQUIERDO I.; SARKIS J.J. Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes, *Neurochem. Res.* 25:775–779, 2000a.
- BONAN C.D.; WALZ R.; PEREIRA G.S.; WORM P.V.; BATTASTINI A.M.; CAVALHEIRO E.A.; IZQUIERDO I.; SARKIS J.J. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Res.* 39:229–238, 2000b.
- BROWN D.R. Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J Neurochem.*, 73(3):1105-13, 1999.
- BROWN D.R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci.*, 24(2):85-90, 2001.
- BROWN D.R. & MOHN C.M. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia*, 25: 282-292, 1999.
- BROWN D.R.; QIN K.; HERMS J. W.; MADLUNG A.; MANSON J.; STROME R.; FRASER P. E.; KRUCK T. von BOHLEN A.; SCHULZ-SCHAEFFER W. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687, 1997.

BROWN D.R.; WONG B.S.; HAFIZ F.; CLIVE C.; HASWELL S.J.; JONES I.M.

Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J.* 1999; 344 1:1-5.

BÜELLER H.; FISCHER M.; LANG Y.; BLUETHMANN H.; LIPP H.-P.;

DEARMOND S.J.; PRUSINER S.B.; AGUET M.; WEISSMANN C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356: 577-582, 1992.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M.; YAKSH, T.L.

Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosc. Meth.* 53: 55-63, 1994.

CHAPMAN C.R.; CASEY K.L.; DUBNER R.; FOLEY K.M.; GRACELEY R.H.;

READING A.E. Pain measurement: an overview. *Pain* 22: 1-31, 1985.

CHIARINI L.B.; FREITAS A.R.O.; ZANATA S. M.; BRENTANI R.R.; MARTINS

V.R.; LINDEN R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J*, 13: 3317-3328, 2002.

CHOI D.W. Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7(2): 369-379,

1987.

COGGESHALL R.E. & CARLTON S.M. Receptor localization in the mammalian

dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res. Rev.* 24: 28-66, 1997.

COITINHO A.S.; DIETRICH M.O.; HOFFMANN A.; DALL'IGNA O.P.; SOUZA

D.O.; MARTINS V.R.; BRENTANI R.R.; IZQUIERDO I.; LARA D.R. Decreased

hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP(C)). *Brain Res Mol Brain Res.*, 107(2):190-4, 2002.

COITINHO A.S.; ROESLER R.; MARTINS V.R.; BRENTANI R.R.; IZQUIERDO I. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport.*, 14(10):1375-9, 2003.

COLLIER H.O.J.; DINNEEN J.C.; JOHNSON C.A.; SCHNEIDER C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 32: 295-310, 1968.

COLLING S.B.; COLLINGE J.; JEFFERYS J.G. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca (+2)-activated K<sup>+</sup> currents. *Neuroscience*; 209:49-52; 1996.

COLLING S.B.; KHANA M.; COLLINGE J.; JEFFERYS J.G. Mossy fiber reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res*, 755:28-35, 1997.

COLLINGE J.; WHITTINGTON M.A.; SIDLE K.C.L.; CORINE J.S.; PALMER M.S.; CLARKE A.R.; JEFFERYS J.G.R. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*; 370:295-29; 1994.

CRAIG A.D. & DOSTROVSKY J.O. Medulla to thalamus. In: WALL P.D.; MELZACK R. *Textbook of pain*. Churchill Livingstone: Londres. 1-8, 1999.

- D'AMOUR F.E. & SMITH D.L. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72: 74-79, 1941.
- DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1-105, 2001.
- DE ALMEIDA C.J.; CHIARINI L.B.; DA SILVA J.P.; E SILVA P.M.; MARTINS M.A.; LINDEN R. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol.*, 77(2):238-46, 2005.
- DE CAMPOS R.O.; ALVES R.V.; KYLE D.J.; CHAKRAVARTY S.; MAVUNKEL B.J.; CALIXTO J.B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.*, 316(2-3):277-86, 1996.
- DIEZ M.; DeARMOND S.J.; GROTH D.; PRUSINER S.B.; HÖKFELT T. Decreased MK-801 binding in discrete hippocampal regions of prion-infected mice. *Neurobiol. Disease*, 8: 692-699, 2001.
- DRAY A. Peripheral Mediators of Pain. In: DICKENSON A.; BESSON J.-M., editors. *The Pharmacology of Pain. Vol.130/I.*, Springer: Verlag, Berlin. 21-41, 1997.
- DRAY A.; URBAN I.; DICKENSON A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 190-197, 1994.
- DUNKLEY P.R.; HEATH J.W.; HARRISON S.M.; JARVIE P.E.; GLENFIELD P.J.; ROSTAS J.A.P. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.* 441: 59-71, 1988.

- FERREIRA J.; CAMPOS M.M.; PESQUERO J.B.; ARAUJO R.C.; BADER M.; CALIXTO J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology.*, 41(8):1006-12, 2001.
- FERRER I. & PUIG B. GluR2/3, NMDA $\epsilon$ 1 and GABA<sub>A</sub> receptors in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol*; 106:311-318, 2003.
- FONNUM F.; LUND-KARLSEN R.; MALTHER-SORENSEN D.; STERRI S.; WALAAS I. High affinity transport systems and their role in transmitter action. In: *The Cell Surface and Neuronal Function.* (COTMAN C. W.; POSTE G.; NICHOLSON G. L. eds.) 455-504. Elsevier, Amsterdam, 1980.
- GRANER E.; MERCADANTE A.F.; ZANATA S.N.; FORLENZA O.F.; CABRAL A.L.B.; VEIGA S.S.; JULIANO M.A.; ROESLER R.; WALZ R.; MINETTI A.; ISQUIERDO I.; MARTINS V.; BRENTANI R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol. Brain Res.*, 76: 85-92, 2000.
- GREENE J.G. & GREENAMYRE J.T. Bioenergetics and Glutamate Toxicity. *Progr. Neurobiol.* 48: 613-634, 1996.
- GUIRIMAND F. & LE BARS D. Physiologie de la nociception. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* 15: 1048-1079, 1996
- GUYTON A.C. Sensações somáticas: II. Dor, cefaléia e sensações térmicas. In: *GUYTON A.C. Tratado de fisiologia médica.* Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 458-467, 1992.

- HILL R.G. Molecular basis for the perception of pain. *Neuroscientist*. 7: 282-292, 2001.
- HUNSKAAR S. & HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.*, 30(1):103-14, 1987.
- JI R.R. & STRICHARSTZ G. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. *Science* 252: 1-19, 2004.
- JULIUS D. & BASBAUM A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413: 203-210, 2001.
- KANAI Y. Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr. Op. Cell Biol*. 9: 565-572, 1997.
- KHASABOV S.G.; LOPEZ-GARCIA J.A.; ASGHAR A.U.R.; KING A.E. Modulation of afferent-evoked neurotransmission by 5-HT<sub>3</sub> receptors in young rat dorsal horn neurons in vitro: a putative mechanism of 5-HT<sub>3</sub> induced antinociception. *Br J Pharmacol.*, 127: 843-852, 1999.
- KURIHARA T.; NONAKA T.; TANABE T. Acetic acid conditioning stimulus induces long-lasting antinociception of somatic inflammatory pain. *Pharmacol, Biochem Behav* 74: 841-849, 2003.
- LE BARS D.; GOZARIU M.; CADDEN S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53: 597-652, 2001.
- LEE K.S.; LINDEN R.; PRADO M.A.; BRENTANI R.R.; MARTINS V.R. Towards cellular receptors for prions. *Rev Med Virol.*,13(6):399-408,2003.

- LHULLIER F.L.; RIERA N.G.; NICOLAIDIS R.; JUNQUEIRA D.; DAHAM K.C.; CIPRIANI F.; BRUSQUE A.M.; SOUZA D.O. Effect of DHEA on glutamate release from synaptosomes of rats at different ages, *Neurochem. Res.* 29:335-339, 2004.
- LOESER J.D.; MELZACK R. Pain: an overview. *Lancet.* 353: 1607-1609, 1999.
- LOWRY O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A.L.; RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- LUNDBERG P.O. Creutzfeldt-Jakob disease in Sweden. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 65(6):836-41, 1998.
- MA Q.P. & WOOLF C.J. Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. *Pain.* 67: 97-106, 1996.
- MAGLIO L.E.; PEREZ M.F.; MARTINS V.R.; BRENTANI R.R.; RAMIREZ O.A. Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Molec. Brain Res.* 131:58-64, 2004.
- MARTINS V.R. & BRENTANI R.R. The biology of the cellular prion protein. *Neurochem Int.*, 41(5):353-5, 2002.
- MCCALL W.D.; TANNER K.D.; LEVINE J.D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett.*, 208(1):45-8, 1996.
- MELDRUM B.S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* 130: 1007S-1015S, 2000.

- MICHAELIS E.K. Molecular Biology of Glutamate Receptors in the Central Nervous System and their Role in Excitotoxicity, Oxidative Stress and Aging. *Progr. Neurobiol.* 54: 369-415, 1998.
- MILLAN M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson a, Besson JM, editors. *The pharmacology of pain. Hand-book of experimental pharmacology*, vol. 130. Heidelberg: Springer-Verlag p. 387-446, 1997.
- MILLAN M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57: 1-164, 1999.
- MILLAN M.J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66: 355-474, 2002.
- MOUILLET-RICHARD S.; PIETRI M.; SCHNEIDER B.; VIDAL C.; MUTEL V.; LAUNAY J.M.; KELLERMANN O. Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. *J Biol Chem* 280: 4592-4601, 2004.
- NEDERGAARD M.; TAKANO T.; HANSEN A.J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Rev. Neurosci.*3: 748-755, 2002.
- OBRENOVITCH, T.P. & URENJAK, J. Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessive Synaptic Efficacy. *Progr. Neurobiol.* 51: 39-87, 1997.
- PALMER A.M.; ROBICHAUD P.J.; REITER C.T. The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol. Aging* 15:103-111, 1994.

PEREIRA G.S.; WALZ R.; BONAN C.D.; BATTASTINI A.M.O.; IZQUIERDO I.; MARTINS V.R.; BRENTANI R.R.; SARKIS J.J.F. Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. *Neurosc Lett.* 301: 72-74, 2001.

PLEUVRY B.J. & LAURETTI G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol. Ther.* 71: 313-324, 1996.

PRUSINER S.B. Molecular biology of prion diseases. *Science*, v. 252, 1515-1522, 1991.

PRUSINER S.B. PRIONS. *Proc Natl Acad Sci ,USA*, 95, 13363-13383,1998.

RAJA S.N.; MEYER R.A.; RINGKAMP M.; CAMPBELL J. N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL P. D.; MELZACK R. *Textbook of pain.* Churchill Livingstone: Londres. 1-8, 1999.

RIBEIRO R.A.; VALE M.L.; THOMAZZI S.M.; PASCHOALATO A.B.P.; POOLE S.; FERREIRA S.H.; CUNHA F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol* 387: 111-118, 2000.

ROBINSON M.B. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem. Intl.* 33: 479-491, 1999.

ROTHSTEIN J.D.; DYKES-HOBERG M.; PARDO C.A.; BRISTOL L. A.; JIN L.; KUNCL R.W.; KANAI Y.; HEDIGER M.A.; WANG Y.; SCHIELKE J.P.;

- WELTY D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate, *Neuron*. 16:675-686, 1996.
- SAITO F.; MOORE S.A.; BARRESI R.; HENRY M.D.; MESSING A.; ROSS-BARTA S.E.; COHN R.D.; WILLIAMSON R.A.; SLUKA K.A.; SHERMAN D.L.; BROPHY P.J.; SCHMELZER J.D.; LOW P.A.; WRABETZ L.; FELTRI M.L.; CAMPBELL K.P. Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* 38:747–758, 2003.
- SAMAIA H.B.; MARI J.J.; VALLADA H.P.; MOURA R.P.; SIMPSON A.J.; BRENTANI RR. A prion-linked psychiatric disorder. *Nature*. 20;390(6657):241, 1997.
- SANCHEZ-PRIETO J.; HERRERO I.; MIRAS-PORTUGAL M.T.; MORA F. Unchanged exocytotic release of glutamic acid in cortex and neostriatum of the rat during aging, *Brain Res. Bull.* 33:357-359, 1994.
- SANTOS A.R.S. & CALIXTO J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosc lett*, 235:73-76, 1997.
- SANTOS A.R.; MIGUEL O.G.; YUNES R.A.; CALIXTO J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.*, 289(1):417-26, 1999.

- SASSOON J.; DANIELS M.; BROWN D.R. Astrocytic regulation of NMDA receptor subunit composition modulates the toxicity of prion peptide Pr106-126. *Mol. Cell. Neurologic*, 25: 181-191, 2004.
- SEGOVIA G.; PORRAS A.; DEL ARCO A.; MORA F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Develop.* 122: 1-29, 2001.
- SHELLEY A. & CROSS M.D. Pathophysiology of pain. *Mayo Clin. Proc.* 69: 375-383, 1994.
- SIMS K.D. & ROBINSON M.B. Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Critical Reviews in Neurobiol.*, 13(2): 169-197, 1999.
- SINCLAIR J.G.; MAIN C.D.; LO G.F. Spinal vs supraspinal actions of morphine on rat tail-flick reflex. *Pain* 33: 357-362, 1988.
- SUCHAK S.K.; BALOYIANNI N.V.; PERKINTON M.S.; WILLIAMS R.J., MELDRUM B.S.; RATTRAY M. The 'glial' glutamate transporter, EAAT2 (Glt-1) accounts for high affinity glutamate uptake into adult rodent nerve endings. *Neurochem.*, 84,522-532, 2003.
- SUGIYAMA B.H. & HUANG L.Y.M. Activation of 5-HT<sub>2</sub> receptors potentiates the spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSPs) in trigeminal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 21: 1415, 1995.

- TAKAHASHI M.; BILLUPS B.; ROSSI D.; SARANTIS M.; HAMANN M.; ATTWELL D. The Role of Glutamate Transporters in Glutamate Homeostasis in the Brain. *J. Exper. Biol.* 200: 401-409, 1997.
- TASCA C.I.; SANTOS T.G.; TAVARES R.G.; BATTASTINI A.M.O.; ROCHA J.B.T.; SOUZA D.O. Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochem. Int.* 44:423-431, 2004.
- TAVARES R.G.; TASCA C.I.; SANTOS C.E., ALVES L.B.; PORCIUNCULA L.O.; EMANUELLI T.; SOUZA D.O. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem. Int.*, 40 (7): 621-7, 2002.
- THAIS M.E. Transporte Sinaptossomal de Glutamato em Camundongos que Não Expressam a Proteína Prion Celular. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- THAIS M.E.; CARQUEJA C.L.; SANTOS T.G.; SILVA R.V.; STROEH E.; MACHADO R.S.; WAHLHEIM D.O.; BIANCHIN M.M.; SAKAMOTO A.C.; BRENTANI R.R.; MARTINS V.R.; WALZ R.; TASCA C.I. Synaptosomal glutamate release and uptake in mice lacking the cellular prion protein. *Brain Res.*, 1075(1):13-9, 2006.
- TJØLSEN A.; BERGE O.G.; HUNSKAAR S.; ROSLAND J.H.; HOLE K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17, 1992.

- TJØLSEN A & HOLE K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., - M., editors. The Pharmacology of Pain. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1-20, 1997.
- TOBLER I.; GAUS S.E.; DEBOER T.; ACHERMANN P.; FISCHER M.; RULICKE T.; MOSER M.; OESCH B.; MCBRIDE P.A.; MANSON J.C. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature.*, 380(6575):639-42, 1996.
- VATASSERY G.T.; LAI J.C.; SMITH W.E.; QUACH H. T. Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamin E to oxidative stress, *Neurochem. Res.* 23:121-125, 1998.
- WALL P.D. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. Textbook of pain. Churchill Livingstone: Londres. 1-8, 1999.
- WALZ R.; AMARAL O.B.; ROCKENBACH I.C.; ROESLER R.; IZQUIERDO I.; CAVALHEIRO E.A.; MARTINS V.R.; BRENTANI R.R. Increased sensitivity to seizure in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia*, 40(12):1679-1682, 1999.
- WEISE J.; CROME O.; SANDAU R.; SCHULZ-SCHAEFFER W.; BAHR M.; ZERR I. Upregulation of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett.*, 372(1-2):146-50, 2004.
- WOOLFE G. & MACDONALD A.L. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80: 300-307, 1944

WOPFNER F.; WEIDENHOFER G.; SCHNEIDER R.; VON BRUNN A.; GILCH S.;  
SCHWARZ T.F.; WERNER T.; SCHATZL H.M. Analysis of 27 mammalian and 9  
avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol  
Biol.*, 289(5):1163-78, 1999.

World Health Organization. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. Fact sheet N°180, 2002.  
[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/en/)

YU W.M.; FELTRI M.L.; WRABETZ L.; STRICKLAND S.; CHEN Z.L. Schwann  
cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents  
proliferation. *J Neurosci.*, 25(18):4463-72, 2005.

YUKITAKE M.; STAOH J.I.; KATAMINE S.; KURODA Y. EAAT4 mRNA  
expression is preserved in the cerebellum of prion protein-deficient mice.  
*Neuroscience Lett.*, 352: 171-174, 2003.