### UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

# EFEITO DA LESÃO COM ÁCIDO CAÍNICO SOBRE A FOSFORILAÇÃO E O IMUNOCONTEÚDO DA PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA EM HIPOCAMPO DE RATOS.

## GUIDO LENZ

## Orientadora

## CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

> Porto Alegre 1996

on shind CIENCIAS INS

Aos meus pais Alfredo e Helena por terem me proporcionado a condição de estar aqui

., 1

## Agradecimentos

- À Christianne, pela orientação, pela amizade e principalmente pela excelente convivência;
- Ao Prof. Richard Rodnight pela brilhante condução do grupo FPC;
- Às pessoas que se envolveram diretamente com o trabalho: Simone, Luiz Carlos e Prof<sup>a</sup>. Matilde.
- Àquelas que se envolveram um pouco mais indiretamente mas certamente merecem menção: CA, Carmem, Beti, Tadeu, Ricardo, Fernanda, Paulette, Nice e Prof. Alex.

Às pessoas maravilhosas do FPC e do Departamento de Bioquímica;

À coordenação do Pós-graduação;

Aos meus amigos, aos meus irmãos e todos àqueles com os quais convivo. À CAPES, FINEP, FAPERGS, CNPq e PROPESP.

## Resumo

A resposta do tecido nervoso à lesão ainda é pouco conhecida e o seu estudo tem importância científica muito grande. Este trabalho teve como objetivo central estudar a reação das células glias, mais especificamente os astrócitos, às lesões químicas. baseado na incorporação de <sup>32</sup>P e no imunoconteúdo da proteína de filamento intermediário denominada Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP). Adicionalmente também foi estudada a variação da fosforilação de outras proteínas após a lesão. Tanto a incorporação de <sup>32</sup>P como o imunoconteúdo da GFAP diminuem nos primeiros 7 dias após a lesão, aumentando significativamente após este intervalo e permanecendo elevado em relação ao controle até 84 dias após a lesão. O estado de fosforilação, isto é, a relação entre a incorporação de <sup>32</sup>P e o imunoconteúdo se manteve inalterado após a lesão. Vimentina, outra proteína de citoesqueleto de astrócito, teve a sua incorporação de <sup>32</sup>P aumentada de forma transitória, o mesmo acontecendo com uma proteína provavelmente ainda não descrita, que denominamos pp25 e que foi caracterizada parcialmente. Podemos concluir que o estado de fosforilação da GFAP não é alterado significativamente com a lesão sendo a resposta principal a variação na quantidade desta proteína. O aparecimento transitório de fosfoproteínas gliais como a vimentina e a pp25 parecem representar um bom marcador bioquímico para a gliose.

est l

iv

## Abstract

The response of nervous tissue to lesions is poorly understood as yet, and its study has a great scientific importance. The main objective of this work was to study the reaction of glial cells, more specifically astrocytes after chemical lesioning, using as parameter the incorporation of <sup>32</sup>P into, and the imunocontent of an intermediate filament protein called Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Changes in the incorporation of <sup>32</sup>P into other phosphoproteins after lesion were also studied. Both, the incorporation of <sup>32</sup>P and the immunocontent decreased until day 7 post lesion, increased significantly above control levels after this interval and remained elevated until 84 days post lesion in relation to the control. The state of phosphorylation, that is, the relation between the incorporation of <sup>32</sup>P and the immunocontent remained close to 1 after lesion. Vimentin, another cytoskeletal protein of astocytes presented a transient increase in the incorporation of <sup>32</sup>P, which also occured with a yet unknown protein, called pp25, that was partially characterized. We can conclude that the state of phosphorylation of GFAP is not significantly alterated and that the main response to lesion is the change in the amount of protein. The transient appearence of glial phosphoproteins like vimentin and pp25 could be a good biochemical marker for gliosis.

# Índice

| INTRODUÇÃO                                  | 1  |
|---------------------------------------------|----|
|                                             |    |
| 1. NEURÔNIOS                                | 1  |
| 1.1. EXCITABILIDADE                         | 2  |
| 1.2. TRANSMISSÃO SINÁPTICA                  | 3  |
| 2. CÉLULAS GLIAIS                           | 4  |
| 2.1. CLASSIFICAÇÃO                          | 5  |
| 2.2. FUNÇÕES                                | 6  |
| 2.3. INTERRELAÇÃO GLIA-GLIA E GLIA-NEURÔNIO | 8  |
| 3. TRANSDUÇÃO DE SINAL                      | 9  |
| 3.1. SUPERFÍCIE CELULAR                     | 10 |
| 3.1.1. Receptores Glutamatérgicos           | 11 |
| 3.1.2. Canais lônicos                       | 12 |
| 3.2. SEGUNDOS MENSAGEIROS                   | 13 |
| 3.2.1. Cálcio                               | 13 |
| 3.2.2. Proteína G                           | 13 |
| 3.2.3. cAMP                                 | 13 |
| 3.2.4. IP <sub>3</sub> e Lipídios.          | 13 |
| 3.3. EFETORES                               | 13 |
| 3.3.1. Proteínas Quinases                   | 14 |
| 3.3.2. Fosfatases                           | 15 |
| 3.4. REGULAÇÃO GÊNICA                       | 15 |
| 4. CITOESQUELETO                            | 17 |
| 4.1. MICROTÚBULOS                           | 17 |
| 4.2. ACTINA                                 | 18 |
| 4.3. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS              | 18 |
| 4.3.1. Vimentina                            | 20 |
| 4.3.2. GFAP                                 | 20 |
| <b>5. L</b> ESÕES E GLIOSE                  | 22 |
| 5.1. KA                                     | 23 |
|                                             |    |

vi

| OBJETIVOS                                        | 30 |
|--------------------------------------------------|----|
| 5.4.4. Expressão da GFAP                         | 29 |
|                                                  | 20 |
| 5.4.3 Diferenciação                              | 28 |
| 5.4.2. Hipertrofia ou Hiperplasia dos Astrócitos | 27 |
| 5.4.1. Benefícios e Malefícios da Astrogliose    | 27 |
| 5.4. REAÇÃO GLIAL                                | 27 |
| 5.3.2. Receptores                                | 26 |
| 5.3.1. Mecanismos                                | 25 |
| 5.3. MORTE NEURONAL                              | 25 |
| 5.2. ISQUEMIA                                    | 24 |

| MATERIAL E MÉTODOS                 | 31 |
|------------------------------------|----|
|                                    |    |
| 1. MATERIAIS                       | 31 |
| 2. CIRURGIA                        | 31 |
| 3. HISTOLOGIA                      | 32 |
| 4. MARCAÇÃO                        | 32 |
| 5. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL      | 34 |
| 5.1. PRIMEIRA DIMENSÃO - NEPHGE    | 34 |
| 5.2. SEGUNDA DIMENSÃO - SDS - PAGE | 35 |
| 6. IMUNODETECÇÃO                   | 36 |
| 7. QUANTIFICAÇÃO E ESTATÍSTICA     | 37 |
|                                    | 4  |

### RESULTADOS

| , på                                              |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 1. HISTOLOGIA                                     | 39 |
| 2. ALTERAÇÕES NA GFAP                             | 42 |
| 2.1. Fosforilação                                 | 42 |
| 2.2. IMUNOCONTEÚDO                                | 44 |
| 2.3. RELAÇÃO FOSFORILAÇÃO COM IMUNOCONTEÚDO       | 45 |
| 3. ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM OUTRAS FOSFOPROTEÍNAS | 46 |
|                                                   |    |

vii

<u>39</u>

| 3.1. VIMENTINA E PP25                          | 46 |
|------------------------------------------------|----|
| 3.2. Proteínas de Baixo M <sub>r</sub>         | 48 |
| 3.3. Caracterização do Sistema de Fosforilação | 48 |
| 3.4. DETERMINAÇÃO DO M <sub>R</sub> E DO PI    | 49 |
| 4. ISQUEMIA                                    | 50 |
| DISCUSSÃO                                      | 52 |
| 1. HISTOLOGIA                                  | 52 |
| 1.1. MORTE NEURONAL                            | 52 |
| 1.2. REAÇÃO GLIAL                              | 53 |
| 2. IMUNOCONTEÚDO DA GFAP                       | 53 |
| 2.1. DIMINUIÇÃO INICIAL                        | 55 |
| 2.2. AUMENTO TARDIO                            | 57 |
| 3. ESTADO DE FOSFORILAÇÃO DA GFAP              | 58 |
| 4. PROTEÍNA NEURONAL                           | 58 |

 $\mathcal{A}^{n,i}$ 

| 3                   |  |
|---------------------|--|
| 5. PROTEÍNAS GLIAIS |  |

|             |            | ~       |           |
|-------------|------------|---------|-----------|
| $\sim \sim$ | <b>NIO</b> | <br>inn | <b>FC</b> |
|             | NI.        |         |           |
| $\sim \sim$ | 140        |         |           |

REFERÊNCIAS

<u>63</u>

59

# Lista das Figuras

| Figura 1. Componentes da transmissão sináptica. Segundo Lodge e Collingridge           |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| (1990)                                                                                 | 3    |
| Figura 2. Os principais componentes do CNS e suas interrelações.                       | 5    |
| Figura 3. Mecanismos de transdução de sinal que regulam a expressão gênica.            | _ 16 |
| Figura 4. Polimerização dos filamentos intermediários. Modificado de Alberts et al.    |      |
| (1994c)                                                                                | _ 19 |
| Figura 5. Estrutura do KA, comparada com o Glutamato                                   | _ 23 |
| Figura 6. Hipocampo com as áreas e local de onde foram retirados as amostras           |      |
| (círculos). Esta fatia está a -4,3mm da Bregma. CA1-3 - áreas do "Ammon's              |      |
| horn". PoDG, IBI, OBI - áreas do Giro Denteado (DG). (PAXINOS & WATSON,                |      |
| 1986)                                                                                  | _ 33 |
| Figura 7. Primeira dimensão                                                            | _ 34 |
| Figura 8. Segunda dimensão                                                             | 36   |
| Figura 9. Sistema de anticorpos usados para a imunodetecção                            | 36   |
| Figura 10. Comparação entre fotomicrografias da região das células piramidais do       |      |
| hipocampo (CA1) de: A) tecido normal; Cabeça de seta: neurônio, (1 D.A.I. de           |      |
| salina), B) tecido necrosado; Cabeça de seta: necrose neuronal e Seta: espaço          |      |
| sem conteúdo ( (1 D. A. I. de KA) e C) tecido com gliose; Cabeça de seta: célu-        |      |
| la glial (28 D.A. I. de KA). Barra de calibração (BC) = 10μm                           | 39   |
| Figura 11. Fotomicrografia de hipocampo de rato 1 dia após injeção salina, BC =        |      |
| 100µm. Detalhe superior mostra as células piramidais da área CA1, BC =                 |      |
| 10µт                                                                                   | 39   |
| Figura 12. Fotomicrografia de hipocampo de rato 1 D. A. I. de KA, BC = 100 $\mu$ m. Na |      |
| parte inferior direita podemos visualizar células do DG. Detalhe inferior mostra a     |      |
| área CA1. Seta para cima: neurônios normais; seta inclinada: neurônios em              |      |
| processo de degeneração; e cabeça de seta: células gliais, BC = 10 $\mu$ m             | 40   |
| Figura 13. Fotomicrografia de hipocampo de rato 28 D. A. I. de KA, BC = $100\mu m$ .   |      |
| Detalhe inferior mostra o campo no qual deveriam estar o soma das células pi-          |      |
| ramidais. Seta: neurônios piramidais ainda no processo de degeneração e ca-            |      |
|                                                                                        |      |

ix

| beça de seta: células gliais. BC = 10μm                                                       | _ 41 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 14. Fotomicrografia das áreas CA1, CA2 e CA3 e DG de hipocampo de ra-                  |      |
| tos 1 D. A. I. de KA. Cabeça de seta: neurônio picnótico da área CA3. BC =                    |      |
| 100µm                                                                                         | _ 41 |
| Figura 15. Exemplo de autoradiografia de uma separação bidimensional. SAL - rato              |      |
| injetado com salina (Controle) e KA - rato injetado com KA (Tratado), 7 D. A. I.              |      |
| À esquerda: Mr em quilodaltons baseado em padrões de Mr. G: GFAP; V: Vi-                      |      |
| mentina; X: pp25; S: Sinapsina                                                                | _ 42 |
| Figura 16. Alteração no padrão de fosforilação de 1 a 84 D.A.I. de KA. V: Vimenti-            |      |
| na; Cabeça da seta: GFAP; e seta: pp25                                                        | _ 43 |
| Figura 17. Efeito do tempo pós-injeção de KA sobre a incorporação relativa de <sup>32</sup> P |      |
| na GFAP em relação ao controle. (Intervalo de 1 a 84 dias após a injeção de                   |      |
| KA). *p<0,05 **p<0,01 (teste t)                                                               | _ 43 |
| Figura 18. Comparação entre a exposição do filme (A e D), exposição da NC (B e                |      |
| E) e a imunodetecção (C e F) de lados tratado (KA) e controle (Sal), 1 (A, B, C)              |      |
| e 28 (D, E, F) D.A.I. de KA. Cabeça de seta:GFAP                                              | _ 44 |
| Figura 19. Efeito do tempo pós lesão sobre o imunoconteúdo relativo de GFAP em                |      |
| relação ao controle. (Intervalo de 1 a 84 dias após a injeção de KA). *p<0,05                 |      |
| **p<0,01 (teste t)                                                                            | _44  |
| Figura 20. Efeito do tempo pós-lesão sobre a incorporação relativa de <sup>32</sup> P e o     |      |
| imunoconteúdo relativo de GFAP em relação ao controle. (Intervalo de 1 a 84                   |      |
| D.A.I. de KA)                                                                                 | _46  |
| Figura 21. Comparação do padrão de fosfoproteínas do hipocampo de ratos em                    |      |
| diferentes formas de lesão e em cultura de astrócitos. C -controle: rato injetado             |      |
| com salina, KA - rato 14 D.A.I. de KA , ISC - rato isquêmico, Li - rato tratado de            |      |
| forma crônica com concentrações tóxicas de Li <sup>+</sup> (Rocha et al., dados não publi-    |      |
| cados) e AS - cultura de astrócitos com 18 dias de idade (Gottfried et al., 1995).            |      |
| V: Vimentina; Cabeça da seta: GFAP; e Seta: pp25                                              | 47   |
| Figura 22. Análise das fosfoproteínas de baixo peso molecular num gel de SDS-                 |      |
| PAGE 13%. C - Controle: Rato injetado com solução salina, KA - rato 7 D.A.I.                  |      |
| de KA, AS - cultura de astrócitos de 18 dias (Gottfried et al., 1995). X - pp25. As           |      |
| demais fosfoproteínas foram numeradas de 1 a 8                                                | . 48 |
| Figura 23. Efeito de PDBu e EGTA sobre a incorporação de <sup>32</sup> P em proteínas de      |      |
|                                                                                               | x    |
|                                                                                               |      |

х

baixo peso molecular (7 D.A.I. de KA). EGTA: incubação na ausência de  $Ca^{2+}$  e na presença de 1mM de EGTA, e FOR: incubação com 2,5µM de PDBu. Os lados esquerdos destes filmes são de amostras que foram submetidas à incubação normal. X - pp25. As demais fosfoproteínas foram numeradas de 1 a 8. \_\_\_\_ 49

- Figura 24. "Fergusson Plot" mostrando a migração da pp25 comparada com padrões de M<sub>r</sub>.\_\_\_\_\_ 50
- Figura 25. Padrão de fosfoproteínas de hipocampo de ratos submetidos a isquemia transitória C - rato controle, CA1 - área CA1 de hipocampo e DG - área girus denteado de hipocampo de rato isquemiado durante 20 minutos. A análise das fosfoproteínas foi feita 7 dias após o processo isquêmico. G: GFAP, V: Vimentina, X: pp25. \_\_\_\_\_\_51

ا جزر

xi

# Lista das Tabelas

| Tabela 1: Tipos de Células Gliais                                                            | _ 6  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabela 2. Tipos de filamentos intermediários.                                                | _ 19 |
| Tabela 3. Homologia entre diferentes proteínas formadoras de IFs e entre proteínas           |      |
| formadoras de IFs de espécies diferentes.                                                    | _ 20 |
| Tabela 4: Sítios de fosforilação in vitro da GFAP de rato e as respectivas quinases          |      |
| envolvidas                                                                                   | _ 21 |
| Tabela 5. Meio de incubação                                                                  | 33   |
| Tabela 6. Solução de amostra                                                                 | _ 33 |
| Tabela 7. SDS-PAGE                                                                           | 35   |
| Tabela 8. Eficiência da Transferência do Gel para a NC                                       | 45   |
| Tabela 9. Semiquantificação da incorporação de <sup>32</sup> P em vimentina, pp25 e sinapsi- |      |
| na de hipocampo de ratos injetados com KA em relação ao controle.                            | _47  |
| Tabela 10. Estudos que avaliaram a variação do mRNA e do imunoconteúdo da                    |      |
| GFAP em resposta às lesões                                                                   | 54   |
| Tabela 11. Estudos que avaliaram a variação do imunoconteúdo da vimentina em                 | 1    |
| resposta às lesões                                                                           | 60   |

Abreviaturas

4VO - Método de Oclusão dos 4 vasos - "4 Vessel Oclusion"

AAE - Aminoácido Excitatório

AC - Adenilato Ciclase

AMPA - "DL - α-Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazolepropionic Acid"

BC - Barra de Calibração

bFGF - Fator de Crescimento básico de Fibroblasto "Basic Fibroblast Growth Factor"

C - Controle

CA - Corno de Ammon do Hipocampo

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> - Concentração de Ca<sup>2+</sup> Intracelular

CaMKII - Proteína Quinase Dependente de Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina do Tipo II

cAMP - 3,5-Adenosina Monofosfato Cíclico

cdc Quinase - Quinases do Ciclo de Divisão Celular - "Cell-Division-Cycle Kinases"

CNEN - Conselho Nacional de Energia Nuclear

CNS - Sistema Nervoso Central - "Central Nervous Sistem"

CREB - Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo a cAMP - "cAMP Responsive Element Binding Protein"

D.A.I. - Dias Após a Injeção

DG - Giro Denteado - "Dentate Gyrus"

EGTA - "Ethilene Glycol-bis(β-Aminoethil Ether N, N, N', N', Tetraacetic Acid"

ERK - Quinases Reguladas por Sinal Extracelular "Extracellular Signal-regulated Kinase"

GABA: Ácido γ-Amino Butírico - "γ-Aminobutiric Acid"

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial - "Glial Fibrillary Acidic Protein"

GluR<sub>n</sub> - Receptores de Glutamato (n - os números indicam subtipos)

GNRP - Proteína Liberadora de Nucleotídios da Guanina - "Guanine Nucleotide Releasing Protein"

HE - Hematoxilina e Eosina

IEF - Eletroforese de Focalização Isoelétrica - "Isoeletric Focusing"

IF - Filamento Intermediário - "Intermediate Filament"

IL1 - Interleucina do tipo 1

IP<sub>3</sub> - Inositol-1,4,5-Trifosfato - "Inositol-1,4,5-Triphosphate"

KA - Cainato ou Ácido Caínico - "Kainic Acid"

kDa - Quilodaltons

LTP - Potenciação de Longa Duração - "Long-Term Potentiation"

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitose - "Mitogen-Ativated Protein Kinase"

MARCKS - "Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate"

MEK - Kinase Ativada por Mitose, Ativadora da ERK - "Mitogen Activated, ERK-Activating Kinase" mg - Microglia

mGluR<sub>n</sub> - Receptores de Glutamato do tipo Metabotrópico (n - os números indicam subtipos)

M<sub>r</sub> - Peso Molecular

mRNA - RNA mensageiro

NEPHGE - Eletroforese em Gradiente de pH não Equilibrado - "Non-Equilibrated pH Gradient Electrophoresis"

NMDA - "N-Metil-D-Aspartato"

ol - Oligodendrócito

PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - "Polyacrylamide Gel Electrophoresis"

PDBu - 12,13- Dibutirato de Forbol - "Phorbol-12,14-Dibutyrate"

PI - Ponto Isoelétrico

PKA - Proteína Quinase Dependente de cAMP

PKC - Proteína Quinase Dependente de Ca<sup>2+</sup> e Fosfolipídio

PKG - Proteína Quinase Dependente de cGMP

PLC - Fosfolipase C - "Phospholipase C"

PK - Proteína Quinase - "Protein Kinase"

PP - Proteína Fosfatase - "Protein Phophatase"

PP2A - Proteína Fosfatase do Tipo 2A

RVD - Regulação do Decréscimo de Volume - "Regulation of Volume Decrease"

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio - "Sodium Dodecil Sulfate"

SRF - Fator Responsivo a Soro - "Serum Response Factor"

t<sub>0,5</sub> - Tempo de Meia Vida

T - Tratado

TCA - Ácido Tricloroacético - Trichloroacetic Acid"

TGFβ1 - Fator de Crescimento Transformador β1 - "Transforming Growth Factor β1 "

TNF - Fator de Necrose Tumoral - "Tumor Necrosis Factor"

TEMED - N, N, N', N' - Tetramethyl-Ethylenediamine

VSCC - Canais de Ca<sup>2+</sup> Dependentes de Voltagem - "Voltage Sensitive Calcium Channels"

xiv

## Introdução

O cérebro é um dos grandes desafios da ciência no final deste século e muito provavelmente ainda continuará sendo por um bom tempo. Tratado por muito tempo como uma caixa preta, na qual não adiantaria mexer, ele vem perdendo este "status" de incompreensível desde os estudos histológicos do início deste século, liderados principalmente por Ramón y Cajal, que mostraram um cérebro composto de células, como o restante do organismo, mas que diferem deste pela imensa po-tencialidade de intercomunicação. Os mecanismos usados para esta comunicação começaram a ser esclarecidos com os estudos eletrofisiológicos realizados nas décadas de 50 e 60 no axônio gigante de lula, principalmente por Hodgkin e Huxley (1952), estabelecendo as bases para as Neurociências, que vem evoluindo numa velocidade incrível, talvez pela inerente complexidade ou pela importância humana e filosófica que a compreensão do cérebro representa.

Longas discussões filosóficas sobre a relação mente-cérebro ou como preferem outros matéria-espírito parecem que finalmente podem receber um feixe de luz de fora da filosofia, isto é, das ciências biológicas. Estas já chegaram a uma razoável compreensão dos componentes unitários, isto é, neurônios e células gliais, mas ainda têm uma enorme dificuldade de conceber as propriedades que emergem da complexa interrelação de bilhões destes componentes.

O estudo das lesões pode ser visto tanto como um instrumento de ciência básica, isto é, para estudar a resposta das células à lesão, principalmente a plasticidade neuronal e glial, mas também como ciência aplicada, pois morte neuronal e gliose ocorrem em vários estados patológicos. A compreensão e possível regulação dos mecanismos básicos envolvidos na lesão pode significar importantes passos para a descoberta de tratamentos para estas patôlogias.

#### 1. Neurônios

Os neurônios são as células responsáveis pela transmissão e integração dos sinais elétricos, e o fazem com ajuda de processos, que são divididos em dendritos e axônio(s). Normalmente os dendritos são receptores de sinais, ou seja, preferencialmente pós-sinápticos, enquanto que o axônio, que geralmente é um só, é liberador de sinais, ou seja, pré-sináptico.

#### 1.1. Excitabilidade

Para transmitir sinais, os neurônios possuem uma grande quantidade de receptores, canais iônicos e bombas de íons, (seção 3.1) que fazem deles células excitáveis. Os neurônios mantêm um potencial de membrana, que em condições normais está na faixa de -70mV, e que é conseguido através de gradientes iônicos produzidos e mantidos por bombas de íons às custas do consumo de energia (ALBERTS et al., 1994a).

Quando uma célula é excitada por neurotransmissores, estes se ligam a receptores que abrem canais iônicos permeáveis ao Na<sup>+</sup>,<sup>1</sup> que conseqüentemente entra, impulsionado tanto pelo gradiente de concentração como pelo gradiente iônico. Com a entrada do Na<sup>+</sup>, a célula se despolariza, ou seja, torna o potencial menos negativo. Se a despolarização alcançar um limiar, que fica em torno de -50mV, canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem se abrem em um processo com retroalimentação positiva, permitindo a entrada de mais Na<sup>+</sup> e conseqüentemente disparando o potencial de ação, que pode alcançar valores até +50mV (SCHMIDT et al., 1979).

A membrana plasmática é entre 10 a 25 vezes mais permeável ao potássio  $(K^+)$  do que ao Na<sup>+</sup>. O gradiente de K<sup>+</sup> é devido ao equilíbrio entre duas forças opostas, o gradiente de concentração deste íon, que "empurra" o K<sup>+</sup> para fora e o potencial de membrana, que "puxa" o K<sup>+</sup> para dentro. Quando porém, uma destas forças é alterada, ou seja, sai do equilíbrio, o K<sup>+</sup> aumentará a sua corrente através da membrana, que é o que acontece quando a membrana é despolarizada, e a força que mantinha o K<sup>+</sup> dentro diminui muito, fazendo com que este íon seja liberado e com isso repolarize a membrana até próximo do valor original.

Para que todas as concentrações iônicas retornem ao valor inicial, é imprescindível que os íons que atravessaram a membrana sejam retransportados, o que é feito pela bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> -ATPase, que, como diz o nome, consome energia em forma de ATP para executar tal tarefa (SCHMIDT et al., 1979).

<sup>1</sup> Alguns receptores também permitem a passagem de outros íons, como o Ca<sup>2+</sup> e o Cr. De BIBLICTIONE

#### 1.2. Transmissão Sináptica

A principal via de comunicação entre os neurônios são as sinapses. Uma sinapse química é composta por um terminal pré-sináptico capaz de liberar neurotransmissores e uma membrana pós-sináptica, que pode responder a estes neurotransmissores, através de receptores presentes em sua superfície. A seguir cada um destes itens será rapidamente analisado:



**Figura 1.** Componentes da transmissão sináptica. Segundo Lodge e Collingridge (1990). *Receptores:* Nomes:

"Kainate": Receptor do tipo cainato L-AP4: Receptor do tipo L-AP4 AMPA: Receptor do tipo AMPA NMDA: Receptor do tipo NMDA "Metabotropic" : metabotrópico  $IP_3R$  - Receptor do tipo  $IP_3$ .

Abreviaturas: G: Proteína G PLC: Fosfolipase C DAG: Diacilglicerol PIP<sub>2</sub>: Fosfatidil inositol bisfosfato IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trifosfato Nomes

"Glutamate": glutamato "Glial cell": célula glial

"Phospholipases": fosfolipases

"Ca<sup>2+</sup> store": estoque de Ca<sup>2+</sup>.

"Intracellular free Ca<sup>2+</sup>": Ca<sup>2+</sup> intracelular livre "Glial Cell" - Célula Glial

#### .

Sinais: Flexas: ativação (agonismo)

Flexas com duas barras: inibição (antagonismo)

#### Símbolos:

ΔV<sub>m</sub>: Diferença de Potencial

O terminal sináptico normalmente se encontra repleto de vesículas carregadas de neurotransmissor. Quando o estímulo nervoso chega ao terminal, despolariza-o e conseqüentemente abre canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem, sendo este íon o principal responsável pela sinalização para a liberação do neurotransmissor (Figura 1).

Na região pós-sináptica existe todo um aparato montado no intuito de "interpretar" a mensagem em forma de neurotransmissor liberado pelo terminal sináptico. Os principais componentes são os receptores, proteínas G, adenilato ciclase (AC), PLC, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>, 3,5-adenosina monofosfato cíclico (cAMP), quinases e fosfatases etc. (seção 3, p. 9).

A heterogeneidade das sinapses é grande, dependendo principalmente do neurotransmissor utilizado. Neste trabalho é importante analisar as sinapses excitatórias, que despolarizam a região pós-sináptica principalmente através de um aumento na entrada de Na<sup>+</sup>, sendo o principal neurotransmissor o glutamato, e as sinapses inibitórias, que hiperpolarizam a membrana, através do aumento da entrada de Cl<sup>-</sup>, usando como principal neurotransmissor o ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA).

#### 2. Células Gliais

As células gliais foram observadas pela primeira vez em 1846 por Virchow, como uma substância "macia, medular e de natureza frágil", contrastando com o tecido fibroso dos neurônios, como se aquelas fossem a cola mantenedora destes, donde provém o nome neuroglia ("nerve-glue"). Até a década de 50, a neuroglia era vista como um mero suporte estrutural, quando se observou que as células gliais também forneciam suporte aos neurônios, principalmente atuando sobre o metabolismo dos neurotransmissores glutamato e GABA, sobre íons como o K<sup>+</sup> e sobre o metabolismo energético, regulando a quantidade de glicose cerebral (KIMELBERG & NORENBERG, 1989).

Somente na década de 70 as células gliais começaram a ser vistas não mais apenas como suporte mecânico e metabólico, mas também como um ator no sistema nervoso central (CNS). Crucial para esta mudança de visão foi a descoberta de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos astrócitos, o que mostrou que estas células, apesar de não serem excitáveis, podem responder às mudanças do meio extracelular(KIMELBERG & NORENBERG, 1989).

A Figura 2 mostra a estreita interrelação entre as células do CNS. Prestemos atenção nas diversas funções das células gliais que podem ser observadas nesta

figura, como formação da mielina, participação na barreira hemato-encefálica e suporte estrutural.



**Figura 2.** Os principais componentes do CNS e suas interrelações. Legenda: BV: vasos sanguíneos; V: espaço ventricular; M: superfície da meninge. Segundo Raine (1994)

Mais da metade do volume e do número de células do CNS é composta por células de origem glial. É interessante observar que numa escala filogenética ascendente, existe um aumento na preponderância de células gliais sobre neurônios, alcançando o pico nos humanos, parecendo indicar a grande importância destas células, que se tornam absoluta e relativamente mais abundantes com o aumento da complexidade do CNS (RAISMAN, 1991).

1.10

#### 2.1. Classificação

As células gliais são divididas segundo a sua origem ontogenética e segundo o tamanho do pericário glial. A Tabela 1 mostra os tipos de células gliais.

#### Tabela 1: Tipos de Células Gliais

| Tipo (origem*)   | Subtipo (Ø pericário/μm) | Subsubtipo            |
|------------------|--------------------------|-----------------------|
| Macroglia (ecto) | Astrócito (18-20)        | Protoplasmático       |
|                  |                          | Fibroso               |
|                  | Oligodendrócito (3-5)    | Interfascicular       |
|                  |                          | Satélites Perineurais |
| Microglia (meso) | (2-3)                    |                       |

\* Ecto ou mesodermal. Segundo Bradford (1985).

Os astrócitos são os mais abundantes e os maiores representantes das células gliais. Na substância cinzenta predominam os astrócitos protoplasmáticos, enquanto que os astrócitos fibrosos ocorrem na substância branca, sendo caracterizados pela grande quantidade de processos fibrosos e pela alta concentração de proteínas do filamento intermediário (IF), como a Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP).

Os oligodendrócitos são claramente distinguidos dos astrócitos por seu diâmetro de pericário com preponderância do núcleo em termos de volume celular. Na substância branca, os oligodendrócitos interfasciculares são responsáveis pela formação da mielina no CNS. Na substância cinzenta os oligodendrócitos são geralmente encontrados em associação com o pericário neuronal.

As microglias são as menores células gliais conhecidas, medindo o seu pericário entre 2 e 3 µm, e apresentando uma morfologia muito variável. Estas células são de origem mesodérmica. Quando se expõe a microglia a estímulos capazes de gerar inflamação, ou outros insultos, esta se transforma do estado passivo para uma forma ativa na qual tem capacidade de fagocitose semelhante ao macrófago (BRADFORD, 1985).

#### 2.2. Funções

O astrócito é o tipo de célula glial mais abundante e funcionalmente mais distinto do CNS, sendo conseqüentemente muito estudado. Estas células possuem inúmeras funções, dentre as quais pode-se destacar:

 $\Rightarrow$  tamponar os níveis de ions extracelulares como o K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e lactato;

 $\Rightarrow$  captar neurotransmissores como glutamato e GABA;

 $\Rightarrow$  participar do metabolismo do CO<sub>2</sub> e do íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>),

 $\Rightarrow$  regular o pH extracelular;

⇒ captar e liberar compostos neurotróficos;

⇒ estocar glicogênio, como reserva energética do cérebro;

⇒ guiar os neurônios em sua migração e os axônios no seu crescimento;

- ⇒ participar da resposta imune do cérebro;
- $\Rightarrow$  formar tecido cicatrizante em resposta à perda neuronal;
- ⇒ participar na formação da barreira hemato-encefálica, intermediando o transporte de substâncias entre o sangue e os neurônios.

Dentre estas funções, algumas são mais importantes na resposta astroglial à excitotoxicidade, como o transporte de glutamato. Este neurotransmissor precisa ser mantido em concentrações baixas (1 a 3  $\mu$ M) a fim de amplificar a relação "sinal/ruído" nas transmissões sinápticas e também para evitar a excitotoxicidade. O glutamato captado pelas células gliais é transformado em glutamina, que tanto pode ser liberada para a circulação como pode difundir para os terminais nervosos, onde pode ser retransformada em glutamato fechando o ciclo. Como a síntese de glutamina a partir do glutamato requer amônia, este ciclo é essencial para a homeostase da amônia (BRADFORD, 1985).

O tamponamento do espaço extracelular é de vital importância, pois os neurônios são muito sensíveis à mudanças no pH. Este tamponamento é feito principalmente através da regulação do metabolismo do CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> produzido pelos neurônios difunde até os astrócitos onde é transformado em carbonato pela anidrase carbônica, que pode ser eliminado através da troca por Cl<sup>-</sup> nos vasos sanguíneos (LANDIS, 1994).

Como os astrócitos tamponam os níveis de íons extracelulares, eles não estão livres de alterações osmóticas no seu interior. Em cultura foi observado que o aumento da quantidade de K<sup>+</sup> extracelular induz o inchamento dos astrócitos, o qual pode ser rapidamente revertido. Observou-se que esta reversão está associada a mudanças no transporte de íons, um processo denominado diminuição regulatória de volume (RVD). Acredita-se que o aumento de concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>], ) seja o responsável pelo aumento na condutância do K<sup>+</sup> e do Cl<sup>-</sup>, com conseqüente saída destes íons, levando a um restabelecimento do equilíbrio osmótico. Muito provavelmente este mecanismo envolve canais de K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> dependentes de Ca<sup>2+</sup>, embora o envolvimento de outros segundos mensageiros, como o cAMP não esteja excluído.

As conseqüências fisiológicas do inchamento astroglial ainda são especulativas. Ainda não está claro se o inchamento tão somente é uma conseqüência da grande concentração de íons e/ou glutamato no meio extracelular ou se é uma resposta astroglial fisiologicamente importante. Certos autores acreditam que o inchamento astroglial pode regular a concentração de neurotransmissores e substâncias

neurotróficas, diminuindo o espaço extracelular em áreas restritas do CNS, alterando o perfil de atividade neuronal destas áreas (O'CONNOR & KIMELBERG, 1993).

#### 2.3. Interrelação Glia-glia e Glia-neurônio

Parece óbvio que para desempenhar e orquestrar todas estas funções, os astrócitos devem estar em comunicação constante com os neurônios e com os outros astrócitos. Para tal, os astrócitos expressam em sua superfície uma grande variedade de receptores (GLOWINSKI et al., 1994) e canais iônicos (SONTHEIMER, 1994), conectados a suas devidas respostas por mecanismos de transdução de sinal semelhantes aos que ocorrem em outras células. Estudos em nosso laboratório demonstraram a existência de receptores metabotrópicos em células gliais que podem regular a fosforilação da GFAP (WOFCHUK & RODNIGHT, 1994).

Glutamato é o principal aminoácido excitatório (AAE) do CNS e a resposta celular ao glutamato é mediada por um grande número de receptores (seção 3, pg 9). Destes receptores, somente a localização glial do receptor NMDA permanece controversa (UCHIHORI & PURO, 1993). A despolarização dos astrócitos<sup>2</sup> devido a abertura dos canais de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> é mediada por receptores do tipo AMPA e cainato (KA), enquanto que o aumento de [Ca<sup>2+</sup>], parece ser mediada pelos receptores KA diretamente, sem o envolvimento de canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependente (GIBBONS et al., 1993).

O aumento da concentração de segundos mensageiros (Ca<sup>2+</sup> ou IP<sub>3</sub>) num astrócito pode exercer influência sobre outros astrócitos através da difusão destes componentes pelas junções "gap" <sup>3</sup>. Isto faz com que as alterações de componentes difusíveis em um astrócito sejam compartilhadas com inúmeros outros astrócitos, formando o sincício astroglial, que desta forma pode coordenar suas funções.

Estas junções são principalmente usadas para o tamponamento do K<sup>+</sup> e pelo segundo mensageiro Ca<sup>2+</sup>. O K<sup>+</sup> liberado nos potenciais de ação é captado pelos astrócitos e para evitar um desequilíbrio osmótico localizado este K<sup>+</sup> difunde-se pelas junções "gap" diluindo-se (HANSSON & RÖNNBÄCK, 1995).

A difusão de segundos mensageiros, principalmente o Ca<sup>2+</sup>, é relativamente lenta se comparada com a condução de estímulos nervosos pelos neurônios. Em estudos com cultura observou-se que as ondas de Ca<sup>2+</sup> podem viajar a uma veloci-

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> As células gliais podem se despolarizar, mas não apresentam o potencial de ação, isto é, não são excitáveis.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Gap do inglês significa lacuna, fenda, e usualmente não é traduzida no caso das "gapjunctions".

dade de 7 a 27μm/s, enquanto que as transmissões nervosas se dão a uma velocidade de 1 a 100 m/s. Por este motivo, esta forma de sinalização não deve ter importância fisiológica na transmissão direta de impulsos rápidos, mas pode representar um sistema de processamento de informações extraneurais capaz de regular níveis de excitabilidade e suprimento de energia em regiões localizadas do CNS (HANSSON & RÖNNBÄCK, 1995).

A importância da difusão através da junções "gap" para a transdução de sinal se torna mais evidente quando se analisa a vasta regulação efetuada sobre os mesmos, entre as quais pode-se destacar: Despolarização por K<sup>+</sup>, estimulação por glutamato e aumento do cAMP interno (ativantes), a ativação da proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup> e fosfolipídio (PKC), diminuição no pH intracelular e aumento na concentração de [Ca<sup>2+</sup>], (inibidores) (ENKVIST & MCCARTHY, 1994).

As ondas de Ca<sup>2+</sup> podem ser induzidas por atividade neuronal, como foi observado em um trabalho que usa um estímulo elétrico nos neurônios do Giro Denteado (DG) para ativar ondas de Ca<sup>2+</sup> na área CA3 do hipocampo, distante 1,5 a 3mm um do outro. Esta comunicação entre neurônios e astrócitos é muito provavelmente mediado por glutamato (DANI et al., 1992). Outros neurotransmissores também agem sobre os astrócitos, como por exemplo a norepinefrina, que pode alterar a morfologia glial (SHAO & MCCARTHY, 1994).

Astrócitos podem liberar glutamato por um mecanismo dependente do aumento da [Ca<sup>2+</sup>], podendo com isso exercer influências sobre os receptores de glutamato presentes nos neurônios, interferindo diretamente na neurotransmissão. As maiores evidências para esta intercomunicação entre astrócitos e neurônios provém de estudos em cultura, podendo indicar um papel importante para os astrócitos na comunicação entre os neurônios também *in vivo* (PARPURA et al., 1994).

#### 3. Transdução de Sinal

Organismos multicelulares são os exemplos mais sofisticados do social. São vários bilhões de "indivíduos" coordenados no intento do bem social, ou seja, da máxima eficiência e conseqüente sobrevivência do organismo como um todo. Esta coordenação opera em vários níveis, desde o organismo como um todo até cada indivíduo (célula) em particular. Ao nível do organismo a circulação sangüínea e o sistema nervoso são os principais agentes de coordenação, levando aos indivíduos as mais diversas informações sobre a situação do todo, que precisam ser interpre-

tadas de forma adequada. É desta interpretação celular das informações coordenadoras que trata a transdução de sinal.

Os sociólogos bem sabem o quanto é difícil compreender uma sociedade, e ainda mais coordená-la ou guiá-la. Muito provavelmente a natureza também teve muita dificuldade em coordenar indivíduos para o social. Aparentemente há 3,5 bilhões de anos já existiam organismos parecidos com as bactérias de hoje, mas somente há 1 bilhão de anos pôde-se observar as primeiras evidências de vida multicelular. Ou seja, o tempo necessário para a evolução dos organismos multicelulares (2,5 bilhões) é em muito superior ao do aparecimento da vida unicelular (~1 bilhão) ou da evolução destes primeiros seres multicelulares até o homem (1 bilhão). É verdade que a evolução não é um processo contínuo, mas esta grande diferença parece ser o reflexo da dificuldade de coordenação social (ALBERTS et al., 1994b).

Esta seção está dividida levando-se em conta a mais provável seqüência espacial e temporal da transdução de sinal, qual seja, eventos de superfície celular, produzindo segundos mensageiros, que por sua vez utilizam efetores para gerar os efeitos desejados. É verdade que esta divisão não tem fronteiras bem definidas, existindo em alguns casos terceiros e até quartos mensageiros. Na seção 3.4 será discutido brevemente um assunto muito estudado atualmente, que é a transdução de sinal até o núcleo, regulando a expressão gênica e que usa alguns mecanismos distintos e compartilha outros com a transdução de sinal reguladora dos componentes citosólicos.

A discussão dos mecanismos de transdução de sinal será baseada no sistema nervoso, que apresenta algumas peculiaridades no que tange à superfície celular, mas compartilha a grande maioria dos segundos mensageiros e dos efetores com células de outros tecidos e com outros organismos, o que deixa claro a importância evolucionista destes sistemas de transdução de sinal.

.11

3.1. Superfície Celular

A membrana plasmática tem funções ambíguas, quais sejam, de proteger o interior da célula contra agentes exteriores indesejados e ao mesmo tempo ser "permeável" a moléculas e mensagens que a beneficiam. Esta ambiguidade de funções faz da membrana plasmática uma estrutura muito rica e especializada. A bicamada lipídica junto com algumas estruturas citoesqueléticas são responsáveis pela proteção, ou isolamento físico, enquanto que uma quantidade enorme de receptores, sistemas de transporte e canais controlam a entrada e saída dos mais diversos íons e moléculas (ALBERTS et. al., 1994b).

#### 3.1.1. Receptores Glutamatérgicos

O glutamato é o principal neurotransmissor no sistema nervoso central, podendo ativar vários tipos diferentes de receptores glutamatérgicos, entre os quais está o receptor cainato, importante na análise do presente trabalho.

Receptores ionotrópicos são os que lançam mão de alterações na permeabilidade de certos íons para transmitir o sinal para o interior celular. Estes receptores foram classificados segundo o agonista mais potente em NMDA, AMPA e Cainato. Por outro lado, os receptores metabotrópicos estão ligados ao mecanismo de transdução de sinal através de proteína G e são divididos, baseado na clonagem dos genes, em mGluR1 a mGluR7 (WATSON & GIRDLESTONE, 1995).

#### **3.1.1.1.** NMDA ("N-Metil-D-Aspartato")

O receptor do tipo NMDA, além do sítio para o agonista, possui um sítio regulatório para a glicina e é bloqueado pelo Mg<sup>2+</sup>. Devido a este bloqueio, o receptor NMDA somente é ativado quando a membrana alcança um certo limiar de despolarização, permitindo a entrada dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e, principalmente, Ca<sup>2+</sup>. Este receptor tem um papel fundamental na potenciação de longa duração (LTP).

#### **3.1.1.2.** AMPA ("DL- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazolepropionic Acid")

Este receptor é permeável ao Na<sup>+</sup> e ao K<sup>+</sup>, sendo, juntamente com o receptor KA, o principal responsável pela despolarização do neurônio. Cainato em concentrações na faixa de µM pode ativar o receptor AMPA de forma não desensibilizadora, levando a uma ativação permanente e conseqüentemente podendo ser um ponto de atuação para a excitotoxicidade do cainato (HALL et al., 1994). Estes receptores foram clonados e são denominados GluR1 a GluR4.

#### 3.1.1.3. Cainato

Receptores de cainato são bem distribuídos filogeneticamente, sendo detectados em espécies que vão desde as bactérias até humanos. Portanto também são altamente diferenciados. Até o momento foram clonados 5 genes principais cujas proteínas ligam KA, que são: GluR1, GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2, com uma afinidade ao KA variando de 4 a 95 nM (HENLEY, 1994).

Os mRNAs para KA1 e 2 são bastante concentrados no hipocampo, principalmente na área CA3, que é a mais sensível à excitotoxicidade do KA. GluR6 e KA2 também estão presentes na área CA1 (HENLEY, 1994).

Fosforilação por PKC, proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina do tipo II (CaMKII), PKG, e proteína quinase dependente de cAMP (PKA) podem regu-

lar a atividade destes receptores, sendo que a fosforilação por PKA aumenta a amplitude do sinal produzido por glutamato (WANG et al., 1993).

#### 3.1.1.4. Metabotrópicos

Os receptores metabotrópicos são proteínas com 7 domínios transmembrana, ligados à proteína G. Estes receptores foram classificados baseados na clonagem do gene em mGluR1 a mGluR7, sendo que alguns agonistas ou antagonistas têm atividade diferenciada, possibilitando o estudo das propriedades farmacológicas destes receptores (WATSON & GIRDLESTONE, 1995).

#### 3.1.2. Canais lônicos

Os canais de Na<sup>+</sup> são basicamente de dois tipos, os ativados por neurotransmissor, como visto acima, e os regulados pelo potencial. Ambos têm papéis importantes na excitotoxicidade, pois permitem a entrada de Na<sup>+</sup> despolarizando a célula, tanto em resposta ao neurotransmissor (em nosso trabalho, o agente excitotóxico KA), como potencializando esta resposta com a abertura de mais canais de Na<sup>+</sup> com a despolarização (ALBERTS et al., 1994a).

Os canais de K<sup>+</sup> têm como principal função permitir a saída do K<sup>+</sup> após o potencial de ação para restabelecer o potencial de repouso. É interessante mencionar o tipo de canal de K<sup>+</sup> denominado  $I_{BK(Ca)}$  cuja probabilidade de estar aberto aumenta com o aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  e que funciona como prevenção contra a hiperexcitabilidade e excitotoxicidade. Além dos canais que respondem ao Ca<sup>2+</sup> existem também canais dependentes de voltagem, acoplados a receptores, sensíveis a ATP, a  $(Na^+]_i$ , e até sensível ao volume celular, o que demonstra a importância destes canais na resposta ao desequilíbrio celular. (ALBERTS et al., 1995a).

A condutividade do Cl<sup>-</sup> está relacionado aos neurotransmissores inibitórios como o GABA<sub>A</sub>, que agem ativando canais de <u>Cl</u><sup>-</sup>, produzindo desta forma uma hiperpolarização da célula (WATSON & GIRDLESTONE, 1995).

São conhecidos quatro tipos diferentes de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (VSCC), diferenciados pela dinâmica de resposta, pelo potencial que os ativam, pela condutância e provavelmente pela distribuição morfológica (GHOSH & GREENBERG, 1995). Acredita-se que tanto o canal do receptor NMDA como os VSCC tenham um papel fundamental na morte neuronal mediada por Ca<sup>2+</sup>.

#### 3.2. Segundos Mensageiros

#### 3.2.1. Cálcio

Este íon desempenha diversos papéis de fundamental importância para a célula, estando principalmente envolvido com a transdução de sinal. Além da entrada do Ca<sup>2+</sup> extracelular, a [Ca<sup>2+</sup>], pode ser alterada também através da sua liberação dos estoques intracelulares, principalmente do retículo endoplasmático, por canais que respondem ao inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>).

Os principais efetores do Ca<sup>2+</sup> são proteínas quinases como a CaMKII e a PKC e proteínas fosfatases como a calcineurina. Grande parte da regulação do Ca<sup>2+</sup> é feita com ajuda de uma proteína denominada calmodulina, que, ao ligar-se ao Ca<sup>2+</sup>, pode regular outras proteínas.

#### 3.2.2. Proteína G

As proteínas Gs são proteínas de membrana que transmitem o sinal do receptor a certas enzimas como a AC, a PLC e certos tipos de canais iônicos (ALBERTS et al., 1994b) e (Figura 1). Estas proteínas são triméricas, sendo que a subunidade  $\alpha$  se liga aos efetores para regulá-los, positiva ou negativamente, dependendo do tipo de proteína  $\alpha$  envolvida.

#### 3.2.3. cAMP

O cAMP é produzido pela AC usando como substrato o ATP e degradado pela cAMP-fosfodiesterase. Existem várias isoformas da AC, sendo a mais conhecida regulada por proteínas Gs, como visto acima. Recentemente foi descrito uma AC ativada por Ca<sup>2+</sup>, o que representa um ponto de ligação entre estes dois importantes sistemas de transdução de sinal (COOPER et al., 1995).

أرغريه ا

#### 3.2.4. $IP_3$ e Lipídios

Inositol-1,4,5-trifosfato(IP<sub>3</sub>) é liberado da membrana, onde se encontra ligado ao diacilglicerol, por intermédio da PLC. O IP<sub>3</sub> pode abrir canais de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático, aumentando assim a  $[Ca^{2+}]_i$ . Por sua vez, o diacilglicerol também pode funcionar como segundo mensageiro, tendo como principal efetor a PKC.

#### 3.3. Efetores

Os segundos mensageiros causam os efeitos na célula das mais diversas formas. O íon Ca<sup>2+</sup> pode regular o fluxo iônico pela membrana agindo diretamente

sobre os canais ou regular as adesões intercelulares através das caderinas (ALBERTS et al., 1994d). Contudo, a grande maioria das funções dos segundos mensageiros são realizadas por intermédio do sistema de fosforilação de proteínas, que é composto pelo substrato a ser regulado, pela proteína quinase (PK) e pela proteína fosfatase (PP).

Para que uma dada fosfoproteína seja regulada em resposta aos segundos mensageiros, é necessário que as PKs e as PPs sejam sensíveis a estes mensageiros. Como a atividade de uma determinada fosfoproteína está relacionado com o seu estado de fosforilação, o que importa é o equilíbrio entre a atividade quinásica e a fosfatásica. A seguir serão analisadas rapidamente as principais PKs e PPs.

#### 3.3.1. Proteínas Quinases

Os tipos de quinases mais estudadas são: a PK dependente de cAMP (PKA), a PK dependente de Ca<sup>2+</sup> e calmodulina, especialmente a multifuncional (CaMKII) e a PK dependente de Ca<sup>2+</sup>/fosfolipídeo (fosfatidil serina) ou PK do tipo C (PKC).

A PKA é formada de quatro subunidades, sendo duas regulatórias e duas catalíticas. Com a ligação do cAMP às subunidades regulatórias, estas se soltam das subunidades catalíticas, que desta forma se tornam livres para catalisar a transferência do grupo fosfato aos seus substratos.

A PKC necessita da presença dos dois reguladores para se ativar, isto é, o Ca<sup>2+</sup> e a fosfatidil serina. Esta quinase é conhecida pela potencialidade de produzir tumores em resposta à ativação por ésteres de forbol, provavelmente através da ativação da cascata das MAP quinases e conseqüente ativação da transcrição.

A CaMKII é muito estudada devido a sua cinética de ativação um tanto peculiar e por ser um dos principais componentes da densidade pós-sináptica indicando sua participação na plasticidade neuronal, particularmente na memória (LISMAN, 1994). Como diz o nome, esta quinase é dependente do complexo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina para ser ativada. Mas, em concentrações altas destes ativadores, a CaMKII pode se autofosforilar, tornando-se independente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina.

Além da regulação que o Ca<sup>2+</sup> pode efetuar sobre os níveis de cAMP (seção 3.2.3, p. 13), também existe interrelação entre estes dois sistemas de transdução de sinal a nível das quinases. A PKA pode fosforilar certos canais de Ca<sup>2+</sup>, como por exemplo o receptor de IP<sub>3</sub>, regulando-lhe a atividade. A CaMKII por sua vez pode ter a atividade regulada diretamente através da fosforilação pela PKA. (ALBERTS et al., 1994b)

Outro ponto importante para a interrelação dos diversos mecanismos de transdução de sinal são os substratos fosforiláveis, que normalmente podem ser fosforilados por diversas quinases. A GFAP por exemplo, que pode ser fosforilada por PKA, PKC, CaMKII e cdc quinase. Além de cada fosforilação afetar o substrato de forma diferente, a fosforilação em um sítio pode alterar a fosforilação em um outro sítio (WALLAS & GREENGARD, 1991).

#### 3.3.2. Fosfatases

A dinâmica e portanto o funcionamento do sistema de fosforilação está na sua reversibilidade. Assim sendo, as proteínas responsáveis pela desfosforilação, ou seja, as fosfatases, são tão importantes quanto as quinases.

As proteínas fosfatases foram classificadas segundo a atividade de desfosforilação da fosforilase quinase e sua sensibilidade a inibidores endógenos, em PP1 e PP2.

Existe uma íntima relação entre a atividade das PPs e PKs, sendo estas reguladas por aquelas e vice-versa, ou sendo ambas reguladas pelos mesmos mensageiros, possibilitando a orquestração das atividades destas duas enzimas e levando a uma resposta fisiológica adequada. (MUMBY & WALTER, 1993)

#### 3.4. Regulação Gênica

A concentração intracelular da grande maioria dos componentes celulares pode ser regulada tanto na degradação como na síntese. A regulação da síntese protéica pode se efetuar em vários níveis, desde a transcrição do RNA mensageiro (mRNA) a partir do DNA, até a regulação da atividade ribossomal.

Um dos mecanismos mais estudados envolve receptores de tirosina quinase, uma cascata de proteínas quinases (MAPKs) e a fosforilação de proteínas ligadoras ao DNA, como por exemplo a proteína ligadora ao elemento responsivo a cAMP (CREB), e ao fator responsivo a soro (SRF) (SEGER & KREBS, 1995). Na Figura 3 pode-se ver um resumo dos mecanismos de transdução de sinal reguladores da expressão gênica a nível de transcrição.



**Figura 3.** Mecanismos de transdução de sinal que regulam a expressão gênica. Legenda: VSCC - Canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem; GLU(NMDA): Receptor de glutamato do tipo NMDA, I-AC:Adenilato Cliclase dependente de Ca<sup>2+</sup>; TyrK: Receptores com atividade tirosina quinase; MAPK: Proteína quinase ativada por mitose; PP2A: proteína fosfatase do tipo 2A; Sos: *"son-of-sevenless"*, MP: Membrana Plasmática, MN: Membrana Nuclear, CREB: Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo a cAMP.

PKA, PKC e CaMKII, quinases bem conhecidas pela sua atividade regulatória no citoplasma, também fazem parte dos mecanismos que regulam a expressão, tanto de forma independente, como é o caso da CaMKII e da PKA através de CREB (SRINIVASAN et al., 1994), como em conjunto com a cascata das MAPK, como é o caso da PKC e da PKA, que provavelmente atuam sobre a Raf. Também é interessante mencionar a CaMKIV, presente somente no núcleo e que parece ser importante para a regulação da expressão gênica em resposta ao Ca<sup>2+</sup> (Figura 3) (ENSLEN et al., 1994; GHOST & GREENBERG, 1995).

Os fatores de crescimento são peptídios ou proteínas de baixo peso molecular que induzem a dimerização nos receptores, que possuem atividade autocatalítica para fosforilar resíduos de tirosina, sendo esta catálise intermolecular. Desta forma a dimerização é o passo necessário para a ativação destes receptores. Estes resíduos de tirosina fosforilados são reconhecidos por proteínas que contém o domínio SH2, como por exemplo a Grb2. Esta classe de proteínas, além do domínio SH2, possuem dois domínios SH3, que permitem o reconhecimento e ligação de uma proteína liberadora de nucleotídios de guanina (GNRP), denominada Sos, que por ser uma GNRP ativa Ras (proteína G), que por sua vez ativa a fosforilação da Raf. Esta fosforila MEK, que fosforila MAPK, que por sua vez é translocada para o núcleo para fosforilar e ativar proteínas ligadoras a DNA como por exemplo a ELK. A transdução de sinal em cascata apresenta algumas características importantes como o grande potencial de amplificação e interregulação (SEGER & KREBS, 1995).

A complexidade e a heterogeneidade desta cascata é muito grande. Notemos a quantidade de regulação vindo de fora dela, como por exemplo a PKC, PKA, PP2A e as regulações no nível nuclear por fosfatases como a PP2A (HUNTER, T., 1995). Além disto, em vários níveis já foram descobertos vias paralelas, como é o caso das três MAPK (ERK1, ERK2 e a JNK) (WHITMARSH et al., 1995).

#### 4. Citoesqueleto

A condição social das células num organismo exige delas, ao mesmo tempo, uma forma definida e uma plasticidade para se ajustar às necessidades. As células eucarióticas possuem um sistema complexo de estruturas protéicas dinâmicas responsáveis por diversas propriedades, tais como contração muscular, movimentação em direção ao alimento (observado principalmente em unicelulares), mudanças de conformação e movimentação no desenvolvimento do embrião, além das atribuições intracelulares, como transporte de organelas e segregação dos cromossomos na mitose.

Estas atividades são desenvolvidas por três diferentes tipos de estruturas, a saber: microtúbulos (tubulina), actina (actina) e filamentos intermediários (vimentina, lamina e GFAP). Destacamos que principalmente actina e tubulina são altamente conservadas nos eucariotos, e ausentes nos procariotos, indicando a grande importância destas proteínas no passo evolutivo entre pro e eucariotos (ALBERTS et al., 1994c)

#### 4.1. Microtúbulos

Microtúbulos são estruturas formadas por moléculas de tubulina. A tubulina se polimeriza em forma de um tubo com diâmetro de 25nm, sendo que cada volta deste tubo é formado por 13  $\alpha/\beta$  heterodímeros de tubulina posicionados de tal forma que a estrutura apresente uma polaridade.

Muitas proteínas se ligam aos microtúbulos para as mais diversas funções, entre as quais podemos citar as proteínas associadas ao microtúbulo (MAPs) que estabilizam e são responsáveis por ligar os microtúbulos a outros componentes celu-

lares; a Tau específica de neurônio e essencial para a formação dos axônios; e os "motores" dineína e cinesina, que são particularmente importantes no transporte axonal (ALBERTS et al., 1994c)

#### 4.2. Actina

Actina se polimeriza em um filamento de 8nm de espessura, como dois polímeros enrolados um no outro. Os filamentos de actina são mais finos e flexíveis do que os microtúbulos, ocorrendo geralmente em feixes, pois isoladamente são frágeis.

Os filamentos de actina podem apresentar as mais variadas estruturas, desde uma rede tridimensional até extensões fixas e relativamente permanentes, muitas vezes coexistindo numa mesma célula. Proteínas ligadoras de actina podem alterar a extensão, a estabilidade, bem como o número e a geometria das ligações entre os filamentos de actina e com outros componentes celulares. Filamentos de actina são os principais componentes do córtex celular que fornece às células a força mecânica necessária para várias atividades, tais como movimentos da superfície celular, fagocitose, citocinese e locomoção (ALBERTS et al., 1994c)

#### 4.3. Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários (IFs) compreendem um grupo de filamentos que têm estrutura semelhante e espessura de 8 a 10 nm, sendo o nome devido a espessura estar entre os filamentos de actina e os de miosina nas células de músculos. Na maioria das células, uma extensa rede de IFs envolve o núcleo e se estende até a periferia, aonde se liga à membrana plasmática. IFs são particularmente concentrados em células submetidas a estresse mecânico, como as epiteliais e as musculares (ALBERTS et al., 1994c).

No início da década de 80, várias observações indicavam os microtúbulos e os filamentos de actina como sendo os principais responsáveis pelos diversos movimentos de uma célula, ou seja, pela sua dinâmica, enquanto que os IFs, eram considerados como o componente estático do citoesqueleto.

As proteínas formadoras de IFs são fibrosas, ao contrário da actina e da tubulina, que são proteínas globulares, possuem estruturas muito semelhantes, sendo constituídas por uma *cabeça* N- terminal, uma *cauda* C-terminal e um *bastão* central (Figura 4). Esta parte central contém regiões em  $\alpha$ -hélice com uma região chamada UF SCOMMENTAS "heptad" que se repete várias vezes. Esta região constituída por sete aminoácidos é responsável pela formação de dímeros hélice-sobre-hélice ("coiled coil") entre duas hélices paralelas. A formação dos IFs inicia quando dois monômeros se juntam na forma de hélice-sobre-hélice na região do bastão central, permanecendo a cabeça e a cauda em forma de proteínas globulares, que são responsáveis pela regulação da polimerização. Estes dímeros se juntam dois a dois para formar um microfilamento. Um número indeterminado de microfilamentos se junta para formar um IF (ALBERTS et al., 1994c) (Figura 4).



**Figura 4.** Polimerização dos filamentos intermediários. Modificado de Alberts et al. (1994c). Os IFs são divididos em cinco tipos diferentes (Tabela 2).

| Tunora in Tipoo ao ma |                          |                    |                             |
|-----------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Tipo de IF (Tipo*)    | Polipeptídeo             | M <sub>r</sub> /kD | Localização Celular         |
| Lamina Nuclear (V)    | Lamina A, B e C          | 65-75              | Lâmina nuclear - eucariotos |
| Vimentina (III)       | Vimentina                | 54                 | Cel. de origem mesenquimal  |
| (111)                 | Desmina                  | 53                 | Músculo                     |
| ~ <b>(HI)</b> ~       | GFAP                     | 50                 | Cel. gliais - astrócitos    |
| (111)                 | Periferin                | 66                 | Neurônios                   |
| Queratina (I)         | Tipo I (ácida)           | 40-70              | Cel. epiteliais e derivadas |
| (11)                  | Tipo II (neutral/básica) | 40-70              |                             |
| Neurofilamentos (IV)  | NF-(L, M e H)            | 60-130             | Neurônios                   |

Tabela 2. Tipos de filamentos intermediários.

\* segundo Steiner & Roop (1988).

Devido a grande importância da forma celular nos neurônios, nestes aparece uma família específica de IFs denominados neurofilamentos sendo muito importantes na formação do axônio.

#### 4.3.1. Vimentina

Vimentina está presente em uma grande variedade de células, principalmente nas de origem mesodérmica, como fibroblastos, células endoteliais, glóbulos brancos, além de ser expressa transitoriamente durante o desenvolvimento, como acontece nos astrócitos.

A dinâmica e a regulação da vimentina foram muito bem estudadas, pois ela desempenha um papel importante na mitose. Foi observado que na mitose os filamentos de vimentina se despolimerizam, formando agregados citoplasmáticos de protofilamentos, fato acompanhado pelo aumento da incorporação de fosfato nesta proteína. A quinase que fosforila a vimentina na indução da mitose é a p34<sup>cdc2</sup>, que é uma das quinases do "M-phase promoting factor" responsável pela entrada da célula na mitose e tendo como substrato, além da vimentina, histonas H1, lamínula nuclear e várias proteínas nucleares. Neste caso a vimentina é fosforilada na Ser-55, que faz parte da *cabeça* N-terminal, que parece ser responsável pela dinâmica de polimerização em todos os IFs do tipo III (CHOU et al., 1991).

PKA e PKC fosforilam a vimentina em sítios diferentes dos da p34<sup>cdc2</sup>, mas localizados na parte N-terminal. Esta fosforilação provavelmente não está envolvida na mitose e sim na organização dos IFs durante o crescimento e diferenciação celular (CHOU et al., 1991).

#### 4.3.2. GFAP

A Proteína Fibrilar Glial Ácida (em inglês, "Glial Fibrillary Acidic Protein" -GFAP) é uma proteína típica de IF, possuindo as regiões características deste grupo de proteínas e apresentando uma homologia considerável (Tabela 3).

| Tabela 3. Homolog   | ia entre diferentes | proteínas | formadoras | de IFs | e entre | proteínas | forma- |
|---------------------|---------------------|-----------|------------|--------|---------|-----------|--------|
| doras de IFs de esp | pécies diferentes.  |           |            |        |         |           |        |

| Homologia em %    | N-terminal (Cabeça) | Parte Central (bastão) | C-terminal (cauda) |  |
|-------------------|---------------------|------------------------|--------------------|--|
| h(GFAPxVimentina) | 31                  | 66                     | 56                 |  |
| hGFAPxpGFAP       | 83                  | >90                    | 99                 |  |
|                   |                     |                        |                    |  |

h - de humano, p - de porco Segundo Reeves et al. (1989).

Descrita pela primeira vez como uma proteína ácida presente em filamentos gliais por Eng et al. (1971), a GFAP mostrou-se de difícil caracterização, principal-

mente pela sua insolubilidade em água, sua forte tendência a formação de agregados, e a sua extrema suceptibilidade à proteólise. Uma vez descoberta a localização glial da GFAP, iniciaram os estudos relacionando esta proteína com a resposta do tecido cerebral à injúria, isto é, a gliose.

A seguir veremos os dois principais pontos de regulação da atividade da GFAP, isto é, a sua fosforilação e a sua expressão.

#### 4.3.2.1. Regulação da Polimerização.

Como visto acima, as regiões C e N-terminais são importantes na regulação da polimerização dos IFs, o que geralmente é feito através da fosforilação. A Tabela 4 mostra os sítios de fosforilação *in vitro* com as respectivas quinases responsáveis pela fosforilação.

**Tabela 4:** Sítios de fosforilação *in vitro* da GFAP de rato e as respectivas quinases envolvidas.

| Sítios   |        | Thr-7 | Ser-8 | Ser-13 | Ser-17 | Ser-34 | Ser-389 |
|----------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| Quinases | CaMKII |       |       | X      | X      | X      | х       |
|          | PKC    |       | X     | X      |        | Х      |         |
|          | PKA    | Х     | х     | х      |        | Х      |         |
|          | cdc2K  |       | x     |        |        |        |         |

Segundo Tsujimura et al. (1994b)

Os primeiros cinco sítios estão localizados na *cabeça* N-terminal, enquanto que o sítio Ser-389 está localizado na extremidade C-terminal (TSUJIMURA et al., 1994b). Estudos usando clivagem proteolítica dos resíduos da *cabeça* mostraram que esta parte da molécula é fundamental para a sua polimerização. Fosforilação em um dos sítios (Ser-13 por PKA) já é suficiente para induzir a despolimerização da GFAP (NAKAMURA et al., 1992).

A Tabela 4 mostra os sítios fosforiláveis *in vitro*, isto é, com o substrato e as quinases puras, *in vivo* o processo é menos conhecido, parecendo que a principal quinase que fosforila a GFAP é a CaMKII (LEAL, 1995).

Foi demonstrado que a fosforilação dos IFs tem uma importância muito grande na mitose, sendo que anticorpos específicos para GFAP fosforilada nos resíduos Ser-8 e na Ser-34 marcam somente astrócitos em processo de mitose (MATSUOKA et al., 1992).

A polimerização GFAP pode ser regulada também de outras maneiras, como por exemplo pela S100, uma proteína ligadora de Ca<sup>2+</sup> que inibe a polimerização da GFAP em resposta ao aumento do [Ca<sup>2+</sup>], (BIANCHI et al., 1994).

#### 4.3.2.2. Regulação da Expressão

A regulação da expressão do gene da GFAP tem uma importância fundamental na função dos astrócitos, tanto durante o desenvolvimento, no qual sua expressão está envolvida na diferenciação dos astrócitos, como na resposta à injúria, quando o aumento da GFAP parece estar envolvido na resposta glial do tecido injuriado.

O gene da GFAP possui vários candidatos para a regulação da transcrição, como por exemplo os sítios para AP1 (Fos e Jun) (MASSOD et al., 1993), bem como para outras proteínas reguladoras tais como CREB e TRE. (LAPING et al., 1994). A presença destas seqüências na parte regulatória do gene da GFAP abre a possibilidade de regulação da transcrição mediada pelos principais sistemas de transdução de sinal como a PKA e a PKC (Zagardo et al., 1978; Segevia et al., 1994) (Figura 3, p. 16).

#### 5. Lesões e gliose

A resposta adequada às lesões é um fator importantíssimo para a sobrevivência dos seres vivos. Assim, ao longo da evolução, vingaram mecanismos muito complexos e eficientes visando recompor o tecido ou órgão afetado. No CNS existem agravantes, pois a sua função somente se justifica na complexidade de conexões estabelecidas entre os neurônios, não bastando restabelecer a forma macroscópica, mas principalmente a microscópica, que se estabeleceu através de inúmeras etapas seqüenciais na ontogenia e portanto de difícil recuperação.

O estudo das lesões no CNS possui uma enorme importância clínica, pois em várias doenças existe morte neuronal e conseqüente reação glial, como:

- Doenças degenerativas, como o mal de Alzheimer;
- Doenças neoplásicas e metabólicas que afetam o CNS;
- Desmielinização do cérebro na esclerose múltipla, e
- Certos tipos de epilepsia.

Neste capítulo será dado ênfase à excitotoxicidade produzida pelo KA, e depois veremos a resposta dos neurônios e dos astrócitos a estes danos.
Assim como a grande maioria dos produtos biologicamente ativos, o ácido caínico (KA) também foi isolado seguindo os passos da sabedoria popular. Curandeiros japoneses usam (ou quem sabe usavam) um extrato de alga marinha denominada "Kaininso" (fantasma do mar) como anti-helmítico. A molécula ativa foi isolada em 1953 e a estrutura determinada através de raio-X em 1958 (NITTA et al., 1958).

Podemos observar que o KA é um análogo rígido do glutamato, no qual o Cβ está ligado ao N por um anel de cinco membros (anel pirrolidina) (Figura 5). O grupo isopropanil tem uma função muito importante na ligação do KA ao receptor, pois se este grupo for hidrogenado a isopropenil



(ácido dihidrocaínico), a atividade excitatória será em até 200 vezes menor (JOHNSON et al., 1974). Outra observação interessante é referente à importância da estereoespecificidade do grupo isoproprenil. No KA este grupo está na configuração R, enquanto no ácido alocaínico, que tem muito menos atividade anti-helmítica, o grupo isoprenil se encontra na configuração S.

O KA é muito usado como agente excitotóxico, principalmente pela sua alta afinidade, destruição preferencial de certos tipos de células e também pela destruição específica dos corpos celulares, poupando as fibras que passam pela região afetada (MCGREER et al., 1978). No entanto, estudos mais recentes mostram que as fibras também podem ser destruídas por KA (BEN-ARI, 1985).

Quanto ao mecanismo de ação do KA, ainda existe uma certa controvérsia, principalmente quanto à localização sináptica destes receptores. Está bem demonstrado que o KA aumenta a liberação de glutamato e aspartato tanto *in vivo* quanto *in vitro* (YOUNG et al., 1988) em sinaptossomos através da despolarização e aumento da [Ca<sup>2+</sup>]. Além disto o KA também pode inibir a recaptação de glutamato e aspartato em sinaptossomos, indicando uma localização pré-sináptica (PASTUDZKO et al., 1984).

O mecanismo de neurotoxicidade do KA pode envolver outros receptores, além dos receptores KA. Hall et al. (1994) observaram que o receptor AMPA tem uma afinidade ao cainato na faixa de micromolar, que é muito menor do que a afinidade do KA pelos receptores do tipo KA, que está abaixo de 100nM, mas que pode ser responsável pela ação excitotóxica do KA visto que é necessário uma concentração entre 100 e 500 µM para se conseguir atingir metade da máxima resposta fisiológica nos neurônios hipocampais. Estes dados indicam um possível mecanismo envolvendo receptores AMPA na excitotoxicidade induzida por KA incluindo desta forma também a pós-sinapse.

O KA tem uma certa seletividade sobre os neurônios do hipocampo. Estudos usando violeta de cresil para avaliar a morte neuronal indicaram a seguinte relação de sensibilidade ao KA no hipocampo: células piramidais do CA3 > CA1 > CA2 > girus denteado (NADLER et al., 1978).

## 5.2. Isquemia

Embora este trabalho basicamente tenha usado KA como produtor de lesão, é interessante que seja citado a isquemia também como um modelo de lesão, pois existem muitos pontos em comum nestes dois modelos. A interrupção do fluxo sanguíneo leva a uma diminuição brusca de  $O_2$ , interrompendo a fosforilação oxidativa. Nestas condições, a única fonte de ATP passa a ser a glicólise anaeróbica usando a glicose estocada em forma de glicogênio nas células gliais, que devido ao baixo aproveitamento não consegue suprir o tecido cerebral de forma adequada. Conseqüentemente, a isquemia produz acidose, que tem como principal causa o acúmulo do lactato, o aumento na concentração de  $CO_2$ , a produção de H<sup>+</sup> pela hidrólise de ATP e a diminuição do consumo de H<sup>+</sup> pelas mitocôndrias na fosforilação oxidativa. O pH pode decrescer de 7,4 até em torno de 6,0.<sup>-/-</sup> A acidose pode afetar as funções celulares de várias formas, entre as quais estão a inibição da recaptação de neurotransmissores, o aumento da formação de radicais livres e a degradação ácida do NAD. (FAROOQUI, et al., 1994)

Em aproximadamente 4 minutos, o ATP é depletado, mesmo considerando outras fontes, como fosfocreatina e a adenilato quinase, que podem transformar duas moléculas de ADP em uma de ATP. Com a depletação de ATP, a membrana não consegue mais se repolarizar, pois a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase pára de funcionar, tornando o neurônio hiperativo, o que significa uma grande liberação de glutamato, que não pode ser recaptado pelos neurônios, porque o transporte é dependente do gradiente

de Na<sup>+</sup>. As células gliais também têm a captação de glutamato afetada devido principalmente ao inchamento causado pelo aumento na captação de K<sup>+</sup>. Além destes, a lise celular também pode levar a um aumento extracelular de glutamato, que desta forma produz os efeitos excitotóxicos, e que se vem se somar com os problemas metabólicos que os neurônios já apresentam (FAROOQUI et al., 1994).

Como no caso do KA, a isquemia também tem um certa seletividade hipocampal, sendo que as células piramidais da área CA1 são as mais sensíveis, seguidas pelas células da área CA3 (ORDY et al., 1993).

Embora na lesão induzida por KA não tenha como causa a quebra do metabolismo energético, esta pode ser comparada com a isquemia, pois ambas têm em comum a excitotoxicidade, naquela induzida por KA e glutamato e nesta somente por glutamato.

#### 5.3. Morte Neuronal

O caráter excitável dos neurônios faz com que estas células possuam uma sensibilidade bastante elevada às alterações do meio externo, principalmente quando estas alterações envolvem os íons K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>, ou moléculas capazes de alterar a condutância destes íons, como por exemplo os neurotransmissores.

Estudos que avaliaram a variação da densidade sináptica após a injeção de KA mostraram a grande perda neuronal e a incrível recuperação da densidade sináptica com a sinaptogênese reativa. De 1 a 7 dias após a injeção (D.A.I.) a densidade sináptica diminuiu de 35 (em sinapses por  $100\mu$ m<sup>2</sup>) para apenas 6, sendo que 55 dias após, a densidade já havia retornado ao seu valor inicial (NADLER et al., 1978).

## 5.3.1. Mecanismos

O desequilíbrio osmótico proveniente das alterações na condutância de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> parecia ser uma explicação convincente sobre a morte neuronal. Observações mais detalhadas porém mostraram que a causa da morte é mais complexa e muitas vezes até regulada por programas internos da célula, o que é mais conhecido como apoptose.

Baseado em estudos em cultura, na qual se alterava a concentração iônica do meio, se pôde concluir que a excitotoxicidade é mediada por dois mecanismos distintos: um componente claramente osmótico, isto é dependente de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e

independente de Ca<sup>2+</sup>; outro componente dependente de Ca<sup>2+</sup>, mais retardado e provavelmente envolvendo a morte celular programada (DESSI et al., 1994).

A célula possui mecanismos de morte celular auto-induzida, que são ativados quando esta célula não recebe do meio na qual está inserida os sinais necessários para a sua sobrevivência, principalmente fatores de crescimento. Com o progresso das pesquisas nesta área, está emergindo uma intrincada rede de comunicação responsável pelo controle da apoptose, desde o nível de transdução de sinal até a alteração da expressão gênica (STELLER, 1995).

A apoptose tem uma importância muito grande na ontogenia do CNS, na qual um percentual dos neurônios morre para que os circuitos possam ser restabelecidos. Recentemente no entanto tem surgido fortes evidências para o envolvimento da apoptose nas diferentes formas de excitotoxicidade induzida por glutamato (MITCHELL et al., 1994), KA (POLLARD et al., 1994) ou isquemia (HÉRON et al., 1993).

#### 5.3.2. Receptores

Como visto na seção 3.1.1, existem vários tipos de receptores glutamatérgicos, tendo estes papéis diferentes na morte neuronal.

Os receptores do tipo NMDA, provavelmente pela sua alta condutância ao Ca<sup>2+</sup> parecem ser os principais responsáveis pela morte neuronal (ROTHMAN & OLNEY, 1995), sendo que o bloqueio específico destes receptores previne a entrada de Ca<sup>2+</sup> e conseqüentemente a excitotoxicidade (LEI et al., 1992). Um pouco contraditório a estes estudos é a observação de que o Ca<sup>2+</sup> pode entrar diretamente pelos receptores de cainato, podendo ser este um dos principais responsáveis pela alta excitotoxicidade do KA (GIBBONS et al., 1993).

Por outro lado, agonistas de receptores do tipo metabotrópicos inibem a toxicidade induzida por AAEs (KOH et al., 1991; PIZZI et al., 1993). Ainda não está totalmente claro através de qual sistema de segundo mensageiro é desempenhada esta proteção, mas parece que receptores tipo mGluRs ligados de forma negativa à adenilato ciclase possuem uma função importante (AMBROSINI et al., 1995).

Estes receptores podem sofrer alterações mediante excitotoxicidade. Estudos com cainato mostraram um aumento na resposta dos receptores metabotrópicos ligados ao IP<sub>3</sub>, possivelmente como uma resposta à toxicidade (MAYAT et al., 1994).

#### 5.4. Reação Glial

Talvez devido à complexa interrelação entre os neurônios, já que estas células não mais se dividem uma vez diferenciadas, é que as células gliais desempenham inúmeras atividades no intuito de restabelecer o tecido após a injúria, entre as quais podemos destacar (entre parênteses os tipos de células mais envolvidas: mg microglia, ol - oligodendrócito, as - astrócito) (STREIT & COLTON, 1995; LANDIS, 1994):

- $\Rightarrow$  degradar o tecido morto (mg);
- ⇒ liberar citocinas e fatores de crescimento que regulam a inflamação como IL1 e TNF (mg);
- ⇒ monitorar e controlar o conteúdo molecular e iônico do espaço extracelular (as);
- ⇒ ocupar o local deixado pelos corpos celulares de neurônios mortos (as);
- ⇒ reenvolver axônios e formar novamente as partes da barreira hemato-encefálica destruída (ol).

#### 5.4.1. Benefícios e Malefícios da Astrogliose

Como foi visto acima, a sinaptogênese reativa é de fundamental importância no restabelecimento das conexões ora existentes. O envolvimento da gliose reativa neste processo ainda é bastante discutido. Sabe-se que durante o desenvolvimento, os astrócitos são um excelente substrato para a migração neuronal e a guia axonal (SHAO & MCCARTHY, 1994). Algumas evidências apontam para os astrócitos como sendo os responsáveis pela guia axonal também na sinaptogênese reativa. Por outro lado, foi observado que cicatrizes gliais ("glial scars") não são permissíveis para o crescimento axonal, o que muito provavelmente é devido aos oligodendrócitos e às microglias presentes nestas cicatrizes (HATTEN et al., 1991).

Outros autores acreditam que gliose reativa inibe a sinaptogênese reativa e que conseqüentemente a sua inibição seria benéfica (GIULIAN, 1993). Em resumo, parece que além das funções essenciais na recuperação do tecido cerebral lesionado, a gliose reativa possui conseqüências negativas principalmente no que tange ao restabelecimento dos circuitos neuronais.

#### 5.4.2. Hipertrofia ou Hiperplasia dos Astrócitos

Um número crescente de estudos vem indicando para uma preponderância da hipertrofia sobre a hiperplasia. Norton et al. (1992) refere a existência de proliferação somente em áreas próximas ao trauma enquanto que em locais mais distan-

tes somente há hipertrofia. Da mesma forma, Cunha et al. (1993) observaram somente alterações nos tamanhos dos astrócitos em cérebros humanos com gliose, não encontrando proliferação.

#### 5.4.3. Diferenciação

Para desempenhar as funções que lhes cabe na gliose reativa, os astrócitos se tornam ativados, exibindo várias transformações morfológicas e bioquímicas, a saber : (ENG, 1988; 1985)

- Aumento do diâmetro nuclear;
- · Hipertrofia do corpo celular;
- Aumento do número e hipertrofia dos processos;
- Aumento da atividade das enzimas oxi-redutoras;
- Aumento da síntese de GFAP, vimentina, glutamina sintetase e glicogênio.

No intuito de descobrir o papel da GFAP neste processo de ativação foram feitos vários estudos usando o *antisense* da GFAP para inibir a sua síntese. Em uma linhagem de células astrocítica transfectada com o *antisense* da GFAP, Weinstein et al. (1991) demonstraram que estes astrócitos em cultura são inaptos a formarem processos em resposta à adição de neurônios, ao contrário dos astrócitos normais.

Ghirnikar et al. (1994), usando retrovírus que expressa o *antisense* da GFAP em cultura de astrócitos injuriados mecanicamente demonstrou uma diminuição na hipertrofia dos corpos celulares e dos processos mostrando que a GFAP é importante não somente para a formação dos processos mas também para a sua manutenção.

É importante mencionar que a presença de GFAP é necessária mas não suficiente para a formação de processos pois astrócitos em cultura de baixa densidade, mesmo tendo níveis significantes de GFAP não estendem processos, só o fazendo quando induzidos por algum estímulo, como por exemplo a presença de neurônios. Isto indica que são necessários modificações pós-traducionais para a formação de processos (WEINSTEIN et al., 1991). Levando em conta que a polimerização da GFAP é regulada por fosforilação, além da imensa rede de transdução de sinal que regula este processo, é tentador supor que a fosforilação da GFAP tem alguma importância na formação de processos e conseqüente resposta astrogliótica.

## 5.4.4. Expressão da GFAP

Astrócitos em culturas de baixa densidade se apresentam na forma poligonal, contendo grande quantidade de actina em relação a filamentos intermediários, enquanto que astrócitos em culturas com alta densidade de células, a forma é estelar, com muitos processos citoplasmáticos ("branching cytoplasmic processes"), possuindo desta forma uma concentração maior de filamentos intermediários do que actina. O aumento da quantidade de GFAP foi acompanhada da transformação morfológica de poligonal para estelar.

Fatores que alteram a forma dos astrócitos de poligonal para estelar:

- cAMP ou forscolina (ativador da AC);
- Fatores de crescimento como o fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF).
- Agonistas beta adrenérgicos como o isoproterenol;
- Ativadores de PKC como o éster de forbol.

Fatores de crescimento e hormônios podem regular a expressão de GFAP *in vitro*, como por exemplo hidrocortisona, putrescina, prostaglandina F-2 alfa e fator de crescimento pituitário (LAPING, et al., 1994).

Certas proteínas astrocíticas têm sua expressão aumentada ("upregulation") em resposta à injúria. É o caso da glutamina sintetase, uma proteína exclusivamente glial e que usa o glutamato para produzir a glutamina, e desta forma regula a concentração deste neurotransmissor bem como da amônia (PETITO et al., 1992).

Sítios de transporte de amino ácidos também aumentam em resposta à lesão isquêmica. Foi observado um aumento inicial em questão de alguns minutos, provavelmente devido à regulação destes transportadores através da fosforilação por PKC, e um aumento subseqüente observado depois de dois dias, provavelmente devido à gliose, ou seja um aumento de sítios para transporte nos astrócitos (ANDERSON et al., 1993).

Como foi visto, existem várias tentativas de explicação dos mecanismos de morte neuronal e a conseqüente reação glial. Quanto a esta, vários fatores capazes de alterar a morfologia glial e/ou a expressão de certas proteínas já foram descritos, e portanto, podendo ser um ponto de regulação sobre o qual se possa trabalhar no intuito de controlar a gliose em patologias.

# Objetivos

- ⇒ Estudar as alterações na fosforilação e no imunoconteúdo da proteína marcadora de astrócito, GFAP, após a indução de gliose usando injeção KA em área CA1 de hipocampo de ratos adultos;
- ⇒ Observar a alteração em resposta à gliose de outras fosfoproteínas detectadas pela metodologia utilizada;
- ⇒ Comparar o padrão de fosforilação observado em lesões com KA, com outro modelo de lesão, como a isquemia.
- ⇒ Caracterizar alterações no padrão geral de fosfoproteínas em hipocampo de ratos em resposta à lesão.

100

BIBLUTECA CTORIAL HO

## Material e Métodos

## 1. Materiais

[<sup>32</sup>P]Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> foi comprado da CNEN, São Paulo. Acrilamida, bis-acrilamida, ácido caínico, SDS, β-mercaptoetanol, nonidet P-40, TEMED, EGTA, PDBu, Anti-GFAP policional, foram obtidas da Sigma. "Anti-Rabbit" IGg biotinilada, Peroxidase conjugada com streptavidina e reagentes para a detecção do luminol foram obtidos da Amersham. Demais reagentes utilizados qualidade P.A.

## 2. Cirurgia

Ratos Wistar machos provenientes do biotério da UFRGS, pesando entre 270 e 320 g foram usados. As injeções estereotáxicas foram feitas sob as seguintes coordenadas: LL:  $\pm$  0,30, RC: -0,43cm a partir da *bregma* e DV: -0,26 cm a partir da *dura-matter* determinadas segundo o atlas estereotáxico (PAXINOS & WATSON, 1986) como visto na linha pontilhada na Figura 6. As adequações das coordenadas foram comprovadas com injeção de azul de bromofenol. Os ratos foram anestesia-dos com tiopental sódico via intraperitonial e injetados com 0,2 µl de uma solução de KA 5 mM dissolvido em uma solução de NaCl 0,9%, pH ~ 7 no lado esquerdo (tratado - T) e como controle (C) foi injetado 0,2 µl de uma solução de NaCl 0,9%, pH ~ 7 no lado direito. Este volume foi injetado de forma constante durante 10 minutos.

A quantidade final de KA foi 1nmol. Esta quantidade foi determinada baseado em Nadler et al. (1978) e na injeção de quantidades entre 0,5 a 2 nmoles e conseqüente avaliação histológica da lesão com violeta de cresil (dados não mostrados). A quantidade de 1nmol não destruía o tecido, mas aparentemente destruía boa parte das células, o que era o nosso interesse.

A isquemia foi induzida usando o método de oclusão dos 4 vasos (4VO). Sob anestesia com halotano, as artérias vertebrais dos ratos foram coaguladas e as duas carótidas envoltas por um laço plástico. No dia seguinte estes laços foram fechados por 20 minutos, sendo que os ratos que não perdessem o reflexo em dois minu-

tos eram descartados. Este método reduz o fluxo cerebral a menos de 10% (NETTO et al., 1993).

### 3. Histologia

Para a análise histológica, os ratos foram operados como descrito. Nos mesmos intervalos usados para a análise das fosfoproteínas, eles foram anestesiados com tiopental sódico via intraperitonial, o tórax foi aberto e uma cânula foi introduzida na aorta via o ventrículo esquerdo. A seguir a aorta torácica foi grampeada e o átrio direito aberto. Desta forma o cérebro foi perfundido com salina 0,9% por 10min e depois com uma solução de formaldeído 10% por 10min. O cérebro foi dissecado e guardado em formaldeído 10% até a sua utilização.

Para a fixação do tecido foi usado o seguinte protocolo: Desidratação do cérebro com soluções alcoólicas de 70% e 96% por uma hora respectivamente, deixando a seguir em álcool 96% durante a noite. No dia seguinte os cérebros foram deixados em álcool absoluto por 3 horas, trocando-se a solução de hora em hora. O mesmo foi feito com clorofórmio por duas vezes e com parafina por 3 vezes, após o que o cérebro foi incluído num cubo de parafina.

Os cérebros foram cortados em fatias de 5µm de espessura com micrótomo e montados sobre lâminas. Usamos a técnica de hematoxilina e eosina (HE) (Manual, 1960) para avaliar as mudanças histológicas do tecido cerebral.

Para cada intervalo após o tratamento, se usou um "n" de 2 ratos, sendo que as figuras apresentadas são representativas.

Nas figuras 11,12,13 e 14 foram adicionados um esquema (PAXINOS & WATSON, 1986) que mostra os campos das quais as fotomicrografias foram tiradas.

## 4. Marcação

Os ratos foram mortos por decapitação 1, 4, 7, 14, 28 e 84 dias após a cirurgia. Estes intervalos foram escolhidos baseados em Nadler et al. (1978) e Brock & O'Callaghan (1987) que usaram 55 e 84 dias respectivamente como o máximo por considerarem que até esta data tenham ocorrido os principais fenômenos a serem observados. Os primeiros 3 intervalos foram estabelecidos desta forma no intuito de acompanhar as reações iniciais, teoricamente as mais importantes.

Os hipocampos foram dissecados sobre gelo e cortados em fatias de 0,4 mm de espessura usando um "McIlwain chopper". Foram escolhidas fatias adjacentes à entrada da agulha, quando era possível visualizá-la, caso contrário foram usadas as fatias 9 e 10, onde geralmente se encontrava o local da injeção (determinado previamente em experiências injetando corante azul de bromofenol). Destas fa-



Figura 6. Hipocampo com as áreas e local de onde foram retirados as amostras (círculos). Esta fatia está a -4,3mm da Bregma. CA1-3 - áreas do "Ammon's horn". PoDG, IBI, OBI - áreas do Giro Denteado (DG). (PAXINOS & WATSON, 1986)

tias foram cortadas microfatias redondas com diâmetro de 1mm da área CA1 para os estudos com KA e das áreas CA1 e DG para os estudos com isquemia (Figura 6) que foram então usadas para análise das fosfoproteínas.

Duas microfatias foram pré-incubadas por 60 min. em 100µl do meio de incubação (Tabela 5) Tabela 5. Meio de incubação à temperatura ambiente e gaseificados com O<sub>2</sub>. A seguir o meio de pré-incubação foi retirado e foram adicionados 50µl de meio contendo 60µCi de [32P] ortofosfato, gasificado com O<sub>2</sub> e incubado a 30°C. por 60min.

| Composto          | Conc.   |
|-------------------|---------|
| NaCl              | 124mM   |
| KCI               | 4mM     |
| MgSO4             | 1,2mM . |
| NaHEPES (pH 7.4)  | 25mM    |
| glicose           | 12mM    |
| CaCl <sub>2</sub> | 1mM     |
| O <sub>2</sub>    | 30 min. |

A reação foi interrompida com a adição de ácido tricloroacético (TCA) 10%, e as microfatias foram lavadas duas vezes com TCA 4% para eliminar o excesso de fosfato radioativo não incorporado e uma vez com água destilada para eliminar a acidez.

O tecido foi então solubilizado em 100µl de solução de amostra (Tabela 6). Desta solucão foram retiradas duas alíquotas de 10µl para dosagem de proteínas, e a seguir se adicionou 20µl da mesma solução de amostra . contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 10%, para dar

| Tabela 6. Solução de amostra |         |  |  |  |
|------------------------------|---------|--|--|--|
| Composto                     | Conc.   |  |  |  |
| uréia                        | 9 M,    |  |  |  |
| lisina                       | 12,5 mM |  |  |  |
| SDS                          | 0,2%*   |  |  |  |
| Nonidet P-40                 | 4%      |  |  |  |
| β-Mercaptoetanol             | 0,16%   |  |  |  |
| * % em v/v                   |         |  |  |  |

uma concentração final de 2%. Isto foi necessário pois o método de dosagem de proteínas é sensível ao β-mercaptoetanol.

A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Peterson (PETERSON, 1979). Este método usa a base do método de Lowry et al., com algumas alterações para permitir a presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), melhorando assim a solubilização das proteínas, principalmente as de citoesqueleto, na qual se encontram as proteínas de interesse.

Nas experiências feitas para determinar o sistema de fosforilação que age sobre as fosfoproteínas desconhecidas que aparecem com a lesão, foi usado éter etileno glicol-bis( $\beta$ -aminoetil) (EGTA) e o éster de forbol 12,13 dibutirato. No caso do EGTA, o CaCl<sub>2</sub> do meio de incubação básico foi substituído por 1mM de EGTA, que é um quelante bastante específico para o Ca<sup>2+</sup>. As micro-fatias foram pré-incubadas e incubadas nesta solução. Nas experiências com forbol, as micro-fatias foram pré-incubadas no meio de incubação básico, e incubados no mesmo meio contendo 5µM de 12,13-dibutirato de forbol (PDBu), diluído na hora de usar.

## 5. Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional consiste em separar as proteínas segundo duas propriedades distintas. Neste caso, as proteínas foram separadas na primeira dimensão segundo a sua carga por uma eletroforese com gradiente de pH (Figura 7) e na segunda dimensão pela eletroforese de gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) (Figura 8) separa as proteínas basicamente pelo peso molecular.

#### 5.1. Primeira Dimensão - NEPHGE

Foi uilizado o método de eletroforese em gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE) conforme descrito por O'Farrell et al. (1977). Neste tipo de eletroforese, o gradiente de pH é conseguido através de polímeros com um pKa definido denominados anfolinas. Foi



**Figura 7.** Primeira dimensão. utilizado um gradiente de 2 a 10. Este método é denominado não equilibrado porque as proteínas não atingem o seu ponto isoelétrico. A concentração de acrilamida usada na NEPHGE (e na IEF) foi de 3%.

Foram aplicados 10 ug de proteína em cada tubo e usou-se como marcador de frente de corrida o citocromo C. A corrida demora aproximadamente 2 horas usando as soluções e condições de voltagem, corrente e potência mostrados na Figura 7. Num experimento usual foram corridos 16 géis de NEPHGE. Após a corrida os tubos contendo os géis foram congelados à -20 °C até sua utilização.

## 5.2. Segunda Dimensão - SDS - PAGE

Os géis da SDS-PAGE foram preparados em conjuntos de 8 por vez. Os componentes do gel de separação mostrados na Tabela 7.

Para transferir os géis da primeira para a segunda dimensão, estes foram expulsos do tubo e imersos em uma solução contendo tampão superior, SDS 2% e  $\beta$ -mercaptoetanol 1% por 15 min., para permitir que o SDS se ligue às proteínas. A seguir dois géis de primeira dimensão (sempre Controle e Tratado) foram aplicados num gel de SDS-PAGE, em forma de imagem especular e com a extremidade ácida para o centro. Todas as comparações entre o controle (C) e o tratado (T) foram feitas em um mesmo filme. A corrida eletroforética teve uma duração média de 6 horas, sob as condições indicadas na Figura 8.

Para a determinação do peso molecular (M<sub>r</sub>), foram usados os seguintes padrões (M<sub>r</sub> em quilodaltons (kDa)): Fosfolipase B (97,4), Albumina do soro (66,2), Ovalbumina (45), Anidrase Carbônica (31) Inibidor de Tripsina (21,5) e Lisozima (14,4), (BioRad "low MW markers"). Estes padrões fo-

| Tabel | la 7. | SDS- | PAGE |
|-------|-------|------|------|

| Tabela 7: 000-1 AGE |              |              |  |  |  |
|---------------------|--------------|--------------|--|--|--|
| Compostos           | Separação    | Entrada      |  |  |  |
| Acrilamida/bisacr   | 9%           | 4%           |  |  |  |
| lamida (39;1)       |              |              |  |  |  |
| Tampão tris-HCI     | 373mM pH 8,8 | 123mM pH 6,8 |  |  |  |
| SDS                 | 0,1%         | 0,1%         |  |  |  |
| Glicerol            | 7,46%        | -            |  |  |  |
| TEMED               | 0,06%        | 0,05%        |  |  |  |
| Persulfato          | 0,045%       | 0,098%       |  |  |  |
| Volume              | 402ml        | 91ml         |  |  |  |
|                     |              |              |  |  |  |

% expressa em v/v

ram separados juntamente com as amostras em géis com concentrações de 9, 12, 14 e 16% de acrilamida. O logaritmo do Rf foi plotado contra o peso molecular dos padrões e o valor do logaritmo do Rf da proteína desconhecida foi extrapolado para o  $M_r$ . A média dos valores obtidos nas diferentes concentrações de acrilamida foi usada como o  $M_r$  desta proteína. Os valores dos  $M_r$  indicados na Figura 15 e na Figura 22 foram baseados nos padrões de  $M_r$  separados nos respectivos géis.





Após a corrida, os géis foram colocados em uma solução fixadora (ácido acético 7%, metanol 53% e água 40%), por 18 horas em média, e a seguir imersos por 2 horas numa solução de secagem (metanol 50%, glicerol 1% e água 49%). A seguir os géis foram montados entre dois papéis celofane sobre uma placa de vidro e secos com a ajuda de lâmpadas infra-vermelho. Depois de secos, os géis foram expostos a filme de raio X (X Kodak X-Omat), por tempos variáveis de acordo com a atividade do isótopo, em média por 18 horas no "freezer" - 70°C. Para maiores deta-lhes da marcação e da eletroforese bidimensional consultar Rodnight (1994).

## 6. Imunodetecção

A banda correspondente a GFAP no gel foi identificada usando-se o filme e recortou-se uma área de 2x2 cm. Este pedaço de gel foi hidratado com tampão contendo Tris 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1% por 1 hora durante o qual se retirava o papel celofane. Em seguida o gel foi lavado por 1 minuto com tampão Bjerrum (Tris 48mM, glicina 39mM, metanol 20%) (HEEGAARD & BJERRUM, 1988).



As proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (NC) usando o sistema semi-seco (Trans-blot RD® - Bio Rad). Para tal

foram empilhadas sobre o ânodo: 4 folhas de papel filtro Watman nº 3, a membrana de NC, o gel contendo a(s) proteína(s) a ser analisada, e novamente 4 papéis filtro respectivamente, todos previamente embebidos em tampão Bjerrum tomando-se o cuidado de não deixar bolhas de ar entre os papéis. Tanto os papéis filtro como a NC foram cortados com uma área 20% maior do que o gel seco. Sobre este "sanduíche" foi colocado o cátodo. As condições da transferência foram os seguintes: corrente: 1,2 mA/cm<sup>2</sup>, voltagem: 15V por 60 minutos.

Após a transferência, a NC foi lavada com uma solução fixadora contendo metanol 40% e ácido acético 10%. A NC foi lavada com água, seca e exposta a um filme de raio X para confirmar a transferência das fosfoproteínas e para servir como base no estudo comparativo entre a incorporação de <sup>32</sup>P e o imunoconteúdo.

A NC foi incubada com a solução MTBS, que é constituído de leite em pó desnatado 5% (leite Molico)em TBS (Tris 20mM, NaCl 500mM, pH 7.5) por pelo menos 3 horas. Esta etapa serve para bloquear a NC impedindo a ligação inespecífica dos anticorpos. A seguir foram feitas as incubações com os dois anticorpos e com a enzima peroxidase, todos em seqüência por 1 hora cada incubação, diluídos em MTBS. Entre as incubações com os anticorpos se procedia a lavagem com uma solução contendo TBS mais 0,05% de Tween 20. No nosso sistema foram usados anti-GFAP policional (diluição de 1:500) como primeiro anticorpo, anti-IGg de coelho biotinilada (1:400) como segundo anticorpo e peroxidase conjugada a estreptoavidina (1:3000) (Figura 9).

Foi utilizado o método do luminol para identificação da reação; a peroxidase reage com o reagente de luminol (Amersham International) e emite luz, esta pode ser medida pela impressão do filme de raio-x quantificado posteriormente por densitometria. Este valor fornece a quantidade relativa de GFAP, fosforilada e não fosforilada. Destacamos que amostras de animais C e T sempre foram analisados numa mesma NC, para que seus valores pudessem ser comparados.

## 7. Quantificação e Estatística

Quantificação foi feita usando um densitômetro de varredura "Hoefer Scientific Instruments, San Franscisco". A mancha mais forte de cada filme foi ajustada a 90% da sensibilidade, sendo a outra medida na mesma escala. Para a quantificação dos picos foi utilizado o produto da altura versos a largura.

Para avaliar a relação entre a incorporação relativa de <sup>32</sup>P, com a imunodetecção relativa foi procedido da seguinte forma: o valor da relação C/T na exposição da NC, ou seja a quantidade relativa de <sup>32</sup>P incorporado na GFAP e transferido para a NC foi comparado com a relação C/T da imunodetecção, ou seja da quantidade de GFAP presente nesta amostra o que fornecia um valor aproximado para o estado de fosforilação. A altura e a largura dos picos foram medidos e a sua multiplicação dava um valor aproximado para a área deste pico.

O controle<sup>4</sup> (hipocampo injetado com salina) foi considerado como 100%, sendo o tratado (lado injetado com KA) uma relação do controle. Estes dados foram logaritmizados, no intuito de normalizá-los, pois quando se possui dados percentuais abaixo e acima de 100%, existe uma marcada fuga da linearidade, sendo os dados abaixo de 100% comprimidos e os dados acima estendidos, e o uso do logaritmo torna os dados mais lineares (ZAR, 1984). Para isto todas as relações C/T foram transformadas em logaritmo e estes valores foram usados para o cálculo da média, da dispersão dos dados (erro padrão) e da significância (teste t). A logaritmização não alterou a significância dos dados. O n foi entre 5 e 10.

Com relação as proteínas vimentina, pp25 e sinapsina, as quais geralmente só apareciam no lado lesionado, a densitometria ficou impossibilitada. Para avaliar a variação destas fosfoproteínas foi realizado uma avaliação visual, na qual se atribuia valores de 0 a 4, sendo 0 a ausência de incorporação de <sup>32</sup>P e 4 a incorporação máxima. A relação percentual entre as médias do controle e do tratado fornecia um valor, que indica a tendência de aumento ou diminuição, como está simbolizada na Tabela 9. Esta avaliação foi feita por duas pessoas, o autor e uma pessoa não ligada ao trabalho, e não houve diferenças entre as duas avaliações.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> sempre lembrando que o controle e o tratado provém do mesmo rato, sendo um lado injetado com salina e o outro com KA.

## Resultados

## 1. Histologia

No intuito de demonstrar a morte neuronal e a conseqüente reação glial, usamos a técnica HE. Esta técnica permite visualizar a morte neuronal, bem como as alterações nas células gliais.



**Figura 10.** Comparação entre fotomicrografias da região das células piramidais do hipocampo (CA1) de: A) tecido normal; Cabeça de seta: neurônio, (1 D.A.I. de salina), B) tecido necrosado; Cabeça de seta: necrose neuronal e Seta: espaço sem conteúdo ( (1 D. A. I. de KA) e C) tecido com gliose; Cabeça de seta: célula glial (28 D.A. I. de KA). Barra de calibração (BC) = 10μm.



**Figura 11.** Fotomicrografia de hipocampo de rato 1 dia após injeção salina, BC =  $100\mu m$ . Detalhe superior mostra as células piramidais da área CA1, BC =  $10\mu m$ .

É importante destacar que os neurônios normais apresentam o núcleo claro, porém mais corado do que o citoplasma, que é eosinófilo, e cujo contorno é identificável, enquanto que os neurônios que sofreram ação excitotóxica são fortemente picnóticos. As células gliais apresentam núcleos basófilos.



**Figura 12.** Fotomicrografia de hipocampo de rato 1 D. A. I. de KA, BC =  $100\mu$ m. Na parte inferior direita podemos visualizar células do DG. Detalhe inferior mostra a área CA1. Seta para cima: neurônios normais; seta inclinada: neurônios em processo de degeneração; e cabeça de seta: células gliais, BC =  $10\mu$ m.

Na camada de neurônios piramidais das áreas CA1 e CA3 do hipocampo de rato 1 D.A.I. de KA observou-se um grande número de células picnóticas (Figura 12), fato que não acontece no DG e na área CA2 (Figura 14). Estas células picnóticas podem ser tanto neurônios necrosados (seta inclinada), como células gliais (cabeça de seta) (Figura 14). Também observou-se espaços vazios, provavelmente deixados por neurônios necrosados.

A camada de neurônios piramidais do hipocampo praticamente desaparece 28 D. A. I. de KA (Figura 13). Nos restos das camadas que formam o Corno de Ammon do CA1 ocorreu um aumento de células gliais quando comparado com o controle. Em nenhum dos intervalos estudados foram visualizadas figuras mitóticas das células gliais.



**Figura 13**. Fotomicrografia de hipocampo de rato 28 D. A. I. de KA, BC =  $100\mu$ m. Detalhe inferior mostra o campo no qual deveriam estar o soma das células piramidais. Seta: neurônios piramidais ainda no processo de degeneração e cabeça de seta: células gliais. BC =  $10\mu$ m.



**Figura 14.** Fotomicrografia das áreas CA1, CA2 e CA3 e DG de hipocampo de ratos 1 D. A. I. de KA. Cabeça de seta: neurônio picnótico da área CA3. BC =  $100\mu$ m.

#### 2. Alterações na GFAP

A Figura 15 mostra um exemplo de separação bidimensional, com as fosfoproteínas estudadas neste trabalho e que foram identificadas baseado em estudos prévios realizados em nosso grupo (SALBEGO, 1990). Destacamos a forma de imagem especular, estando as proteínas ácidas voltadas para o centro e as básicas para os extremos.



**Figura 15.** Exemplo de autoradiografia de uma separação bidimensional. SAL - rato injetado com salina (Controle) e KA - rato injetado com KA (Tratado), 7 D. A. I. À esquerda: M<sub>r</sub> em quilodaltons baseado em padrões de M<sub>r</sub>. G: GFAP; V: Vimentina; X: pp25; S: Sinapsina.

#### 2.1. Fosforilação

A Figura 16 mostra uma montagem do padrão de fosfoproteínas nos diversos dias analisados. Pode-se observar o aparecimento da vimentina e da pp25, como também a alteração na incorporação de <sup>32</sup>P da GFAP. Não foi apresentado o controle pois o objetivo desta figura é mostrar as alterações que ocorrem no decorrer dos dias pós injeção de KA.

Na Figura 17 podemos ver a diminuição inicial e o aumento retardado da incorporação de <sup>32</sup>P na GFAP. Destacamos que este gráfico está logaritmizado e a alterações são relativas, isto é, C/T.



**Figura 16.** Alteração no padrão de fosforilação de 1 a 84 D.A.I. de KA. V: Vimentina; Cabeça da seta: GFAP; e seta: pp25.



 $\bigcirc$ 

**Figura 17.** Efeito do tempo pós-injeção de KA sobre a incorporação relativa de <sup>32</sup>P na GFAP em relação ao controle. (Intervalo de 1 a 84 dias após a injeção de KA). \*p<0,05 \*\*p<0,01 (teste t).

## 2.2. Imunoconteúdo

A comparação da fosforilação no filme exposto ao gel, exposto à NC e a imunodetecção em 1 e 28 DAI de KA pode ser visto na Figura 18. Podemos observar a diminuição em 1 DAI e o aumento 28 DAI tanto na fosforilação como no imunoconteúdo relativo, o que pode ser observado mais claramente na Figura 19.



**Figura 18.** Comparação entre a exposição do filme (A e D), exposição da NC (B e E) e a imunodetecção (C e F) de lados tratado (KA) e controle (Sal), 1 (A, B, C) e 28 (D, E, F) D.A.I. de KA. Cabeça de seta: GFAP.



**Figura 19.** Efeito do tempo pós lesão sobre o imunoconteúdo relativo de GFAP em relação ao controle. (Intervalo de 1 a 84 dias após a injeção de KA). \*p<0,05 \*\*p<0,01 (teste t).

Para avaliar a precisão da transferência do gel para a NC, comparamos as relações C/T obtidas do gel e da NC sendo os valores expressos como percentual (Tabela 8).

| D.A.I.                     | 1                | 4                | 7               | 14              | 28              | 84              |
|----------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fosf/NC <sup>(n) 1</sup>   | 129 <sup>7</sup> | 100 <sup>4</sup> | 91 <sup>8</sup> | 95 <sup>4</sup> | 81 <sup>5</sup> | 68 <sup>4</sup> |
| Desvio Padrão <sup>2</sup> | 69               | 55               | 59              | 74              | 19              | 10              |

Tabela 8. Eficiência da Transferência do Gel para a NC.

 A relação C/T do filme exposto ao gel foi dividido pela mesma relação obtida da NC, isto é, após a transferência. Os dados apresentados são a média e
o desvio padrão destes valores. O n é mostrado sobre-escrito.

Embora estes valores estejam em torno de 100%, podemos observar que existe um desvio padrão grande, o que mostra que a comparação da imunodetecção com a fosforilação da NC é mais precisa do que a comparação daquela como a fosforilação do gel, justamente por eliminar a imprecisão da transferência.

## 2.3. Relação Fosforilação com Imunoconteúdo

A relação da incorporação de <sup>32</sup>P com o imunoconteúdo fornece um valor do estado de fosforilação de uma proteína (ver mat. e met. seção 7). Esta relação permaneceu próximo de 100% em todos os intervalos estudados, sendo que nenhum alcançou a significância no teste t. Para este estudo utilizamos a incorporação de <sup>32</sup>P da nitrocelulose, como um meio para evitar os erros que podem estar associados à transferência (Tabela 8). A Figura 20 mostra a incorporação de <sup>32</sup>P proveniente do gel e a imunodetecção no mesmo gráfico, sendo a representação dos erros padrões omitida por motivo de clareza.

أحرب



**Figura 20.** Efeito do tempo pós-lesão sobre a incorporação relativa de <sup>32</sup>P e o imunoconteúdo relativo de GFAP em relação ao controle. (Intervalo de 1 a 84 D.A.I. de KA).

## 3. Alterações Observadas em outras Fosfoproteínas

Como o método usado permite a observação de várias fosfoproteínas, pudemos estudar aquelas cuja incorporação de <sup>32</sup>P também foi afetada pela lesão.

## 3.1. Vimentina e pp25

Dentre as fosfoproteínas que pudemos visualizar no gel 9%, isto é de peso molecular acima de 20 kDa, duas, além da GFAP, variaram marcadamente a incorporação de <sup>32</sup>P após a injeção de KA. São elas a vimentina e uma proteína ainda não descrita de 25 kDa (Figura 16). Estas fosfoproteínas, além de aparecerem nos ratos tratados com KA, também aparecem em outras formas de lesão como isquemia e em ratos submetidos a tratamento crônico com Li<sup>+</sup>, sendo ambas expressas em astrócitos como mostrado na parte "AS" (Figura 21).



**Figura 21.** Comparação do padrão de fosfoproteínas do hipocampo de ratos em diferentes formas de lesão e em cultura de astrócitos. C -controle: rato injetado com salina, KA - rato 14 D.A.I. de KA, ISC - rato isquêmico, Li - rato tratado de forma crônica com concentrações tóxicas de Li<sup>+</sup> (Rocha et al., dados não publicados) e AS - cultura de astrócitos com 18 dias de idade (Gottfried et al., 1995). V: Vimentina; Cabeça da seta: GFAP; e Seta: pp25.

A vimentina e a pp25 são fosforiladas e provavelmente expressas de forma transitória após a lesão (Figura 16 e Tabela 9). A pp25 também é marcada de forma transitória no lado controle, aparecendo 1 D.A.I. e desaparecendo entre 7 e 14 D.A.I. de KA. Além da menor intensidade de marcação da pp25 no controle, a sua curva de aparecimento parece ser adiantada em relação ao tratado.

| lipocampo de ratos injetados col | m KA em re | elaçao ao | controle. |              |            |           |
|----------------------------------|------------|-----------|-----------|--------------|------------|-----------|
| Prot.\Dias após KA               | 1          | 4         | 7         | 14           | 28         | 84        |
| GFAP                             |            | -         | = .       | ++           | ++         | ++        |
| Vimentina                        | 0/8        | ++        | +++       | +++          | 3/7        | 1/5       |
| pp25                             |            | +         | +         | ++           | 4/7        | 0/5       |
| Sinapsina                        |            | 2/7       | 1/8       |              |            |           |
| Legenda: + 110 - 200             | % -        | 75-90     | % = 9     | 0 - 110%     | L          | L         |
| ++ 200 - 500                     | 0%         | 50-75     | % a/r     | n: a = fosfo | proteína c | observada |
| +++ > 500%                       |            | < 50%     | 6 1       | n = total de | experiên   | cias      |

**Tabela 9.** Semiquantificação da incorporação de <sup>32</sup>P em vimentina, pp25 e sinapsina de hipocampo de ratos injetados com KA em relação ao controle.

## 3.2. Proteínas de Baixo M<sub>r</sub>

Como citado acima, no método usado para quantificar a GFAP, aparecem proteínas com M<sub>r</sub> acima de 20 kDa. Para avaliar possíveis alterações em proteínas de baixo peso molecular, isto é, entre 15 e 25 kDa, em resposta a lesão, foi realizado um estudo preliminar usando géis com uma concentração de acrilamida de 13%.



**Figura 22.** Análise das fosfoproteínas de baixo peso molecular num gel de SDS-PAGE 13%. C - Controle: Rato injetado com solução salina, KA - rato 7 D.A.I. de KA, AS - cultura de astrócitos de 18 dias (Gottfried et al., 1995). X - pp25. As demais fosfoproteínas foram numeradas de 1 a 8.

A Figura 22 mostra as fosfoproteínas com M<sub>r</sub> entre 15 e 25 kDa. Destaca-se nesta figura, além da proteína x (pp25), a proteína de número 4, que aparece em cultura de astrócitos e tem uma incorporação de <sup>32</sup>P aumentada 7 DAI de KA.

## 3.3. Caracterização do Sistema de Fosforilação

No intuito de caracterizar o sistema de fosforilação que age sobre as fosfoproteínas ainda não descritas e que possuem a incorporação de <sup>32</sup>P alterada em resposta a lesão, usamos PDBu (ativador de PKC) e EGTA (quelante de Ca<sup>2+</sup>). Desta forma estudamos a importância da PKC e das PKs dependentes de Ca<sup>2+</sup> na fosforilação destas proteínas. Estes estudos forám realizados em hipocampo de ratos 7 D.A.I. de KA, sendo o controle uma amostra do mesmo hipocampo submetido à marcação normal.

O forbol aumenta a incorporação da <sup>32</sup>P na proteína MARCKS e na proteína neuronal sinapsina, não influenciando a incorporação da <sup>32</sup>P na GFAP e da vimentina, confirmando dados da literatura (SALBEGO, 1990). Tanto a fosforilação da GFAP em animal adulto como a fosforilação da vimentina em animal jovem são dependentes de Ca<sup>2+</sup> no meio de incubação (LEAL, 1995).



**Figura 23.** Efeito de PDBu e EGTA sobre a incorporação de <sup>32</sup>P em proteínas de baixo peso molecular (7 D.A.I. de KA). EGTA: incubação na ausência de Ca<sup>2+</sup> e na presença de 1mM de EGTA, e FOR: incubação com 2,5µM de PDBu. Os lados esquerdos destes filmes são de amostras que foram submetidas à incubação normal. X - pp25. As demais fosfoproteínas foram numeradas de 1 a 8.

É importante chamar a atenção para a dependência de Ca<sup>2+</sup>, ao menos parcial, da fosforilação da pp25 (x). As proteínas numeradas de 1 a 8 parecem ter a fosforilação dependente de Ca<sup>2+</sup> com exceção da proteína de número 4 (Figura 23).

A PKC parece não estar envolvida na fosforilação da pp25 (x), pois o forbol aparentemente não altera a incorporação de <sup>32</sup>P neste proteína. No entanto, forbol parece ativar a incorporação de <sup>32</sup>P nas proteínas 7 e 8. É importante mencionar que as proteínas 1 e 2 estão praticamente ausentes no lado controle do forbol devido a um artifício.

## 3.4. Determinação do M<sub>r</sub> e do Pl

Usamos géis com concentrações de acrilamida de 9, 12,14 e 16%, conforme descrito em materiais e métodos. A proteína x (Figura 15) apresentou um  $M_r$  de 25  $\pm$  1,7kDa, sendo por isso denominada de pp25 ("Phosphoprotein 25kDa").

Para avaliar a migração desta proteína no SDS-PAGE foi feito um gráfico "Ferguson" (FERGUSSON, 1964) comparativo entre os padrões de M<sub>r</sub> e a pp25.





Como podemos observar na Figura 24, a pp25 apresenta uma migração levemente anômala, quando comparada com os padrões de M<sub>r</sub>, isto é, tanto a inclinação quanto a interceptação no eixo das ordenadas é levemente diferente dos padrões.

Na eletroforese de focalização isoelétrica (IEF), realizada para determinar o ponto isoelétrico (PI), a pp25 migrou até um pH entre a GFAP (PI = 6,0) e a vimentina (PI = 5,7), permanecendo um pouco mais próxima desta. Usando também o valor da PI da MARCKS (PI = 4,6) como padrão, podemos sugerir que o valor da PI para a pp25 está em torno de 5,8 (dados não mostrados).

## 4. Isquemia

Foi realizado um estudo piloto para avaliar se o padrão de fosfoproteínas de hipocampo de ratos que sofreram isquemia é comparável com o produzido por lesão com KA. Na isquemia, como também no caso do KA, existe uma variabilidade entre as áreas do hipocampo, sendo a área CA1 mais sensível do que o DG (seção 5.2, p. 24).

NALIOTECA SETORIAL DO RETITUTO DE MOCIÊNCIA



**Figura 25.** Padrão de fosfoproteínas de hipocampo de ratos submetidos a isquemia transitória C - rato controle, CA<sub>1</sub> - área CA1 de hipocampo e DG - área girus denteado de hipocampo de rato isquemiado durante 20 minutos. A análise das fosfoproteínas foi feita 7 dias após o processo isquêmico. G: GFAP, V: Vimentina, X: pp25.

Na isquemia, a incorporação de <sup>32</sup>P na vimentina foi detectada somente na área CA1, enquanto que a incorporação na pp25 foi detectada na área CA1 e na DG.

est.

Discussão

## 1. Histologia

## 1.1. Morte Neuronal

As células neuronais apresentam o núcleo claro, porém mais corado do que o citoplasma. A morte neuronal é caracterizada pela retração do corpo celular e pela hipercromasia do núcleo. Desta forma pode-se ter uma idéia qualitativa da morte neuronal. Não foi possível avaliar a morte neuronal de forma quantitativa, mas a comparação do hipocampo controle com o tratado com KA 1 D.A.I. (Figura 11), mostra claramente a elevada quantidade de morte neuronal da áreas CA1 do hipocampo. Outra evidência da morte neuronal pode ser vista em hipocampo 28 D. A. I. com KA. Observou-se uma diminuição acentuada do número de células piramidais na área CA1 do hipocampo, bem como uma total desorganização, quando comparados com o hipocampo injetado com salina, na qual pode-se identificar claramente a camada de células piramidais.

Ainda em 28 D.A.I. (Figura 14) de KA observou-se neurônios (setas) com algumas características patológicas como descrito por Escourolle & Poirier, (1973), isto é, com um núcleo intensamente heterocromático, excêntrico e um citoplasma acidófilo, e com a superfície basófila. Também é interessante chamar a atenção do grande número de células gliais, que ocupam o espaço deixado pelos neurônios, caracterizando a gliose reativa.

Os neurônios do hipocampo têm sensibilidade diferenciada ao KA (CA3 > CA1 > CA2 > DG - seção 5.1 da introdução p. 23). Prestemos atenção principalmente na área CA2 e DG (Figura 14), que apresentam pouquíssima morte neuronal, ao contrário do que acontece nas áreas CA1 e CA3. Isto pode ser visto também em hipocampo tratado 1 e 28 D. A. I. de KA, nas quais o DG aparece (Figuras 12 e 13).

#### 1.2. Reação Glial

A importância relativa da hipertrofia e da hiperplasia ainda são controversos (seção 5.4.2 da introdução, p. 27),. Ambos parecem ocorrer, sendo que a hiperplasia ocorre preferencialmente em regiões próximas à lesão, principalmente quando é usada lesão com agulha, que pode romper a barreira hemato-encefálica, fazendo com que fatores mitogênicos encontrados no sangue estimulem a proliferação glial. A hipertrofia glial predomina em regiões mais distantes da lesão (O'CALLAGHAN, 1993).

Um D.A.I. de KA tornou-se evidente o aumento da visualização de células gliais, o que pode estar de acordo com o estudo de Nadler et al. (1978) que demonstraram proliferação de células gliais 3 D.A.I. de KA, em áreas onde houve perda neuronal.

A origem destas células gliais permanece controverso, pois não se observou figuras mitóticas, o que exclui a proliferação. Existe a possibilidade de haver um aumento da visualização das células gliais devido ao desaparecimento neuronal ou a um aumento na marcação destas células na camada de células piramidais do hipocampo.

Vinte e oito D.A.I. de KA a gliose reativa se torna clara, com uma preponderância de células gliais em relação aos neurônios em todas as áreas do hipocampo, ao contrário do que era observado no hipocampo injetado com salina.

## 2. Imunoconteúdo da GFAP

A variação na expressão da GFAP em resposta à injúria é um fato bem descrito na literatura como visto de forma resumida na Tabela 10.

| Tipo de lesão            | Animal*<br>(área**) | Variação                   | Referência                    |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Encefalomielite alérgica | r (ce)              | û p (10, 18)               | Smith et al. (1983)           |
| Eletrolítico             | r (cen)             | û p (1, +10)               | Steward et al. (1993)         |
| Eletrolítico             | r (cen)             | û m (0,5, 12)              | Steward et al. (1993)         |
| Eletrolítico             | r (hp)              | 압 m (1, ?)                 | Bonthius et al. (1994)        |
| Eletrolítico             | m (hp)              | ûm (1, ?)                  | Kelley & Steward, (1993)      |
| Axotomia                 | h (tc)              | û m (2, +14)               | Oblinger & Singh, (1993)      |
| 6-hidroxidopamina        | r (sn)              | û m (10, 120)              | Rataboul et al. (1989)        |
| Isquemia (30 min)        | r (hp CA1)          | ֆp(1, 2), ûp (7,42)        | Petito & Halaby, (1993)       |
| Lesão mecânica           | ?                   | 0р (? inicial)             | Hozimi et al. (1991)          |
| Hipóxia-isquemia         | rn (c, hp)          | û p (1, +14)               | Burtrum & Silverstein, (1994) |
| Hipóxia-isquemia         | rn (c)              | 압 m (1, +14)               | Burtrum & Silverstein, (1994) |
| Trimetilchumbo           | r (hp)              | 압 p (7, +84)               | Brock & O'Callaghan, (1987)   |
| Trimetilchumbo           | r (cf)              | û p (7, 84)                | Brock & O'Callaghan, (1987)   |
| NMDA                     | rn (c)              | û m (1, +14)               | Burtrum & Silverstein, (1993) |
| NMDA                     | rn (hp)             | û m (? <sup>1</sup> , +14) | Burtrum & Silverstein, (1993) |
| KA (Ip)                  | r (cp)              | û p (7, +180)              | Gramsbergen & Berg, (1994)    |
| não indicada             | m (hp)              | û m (0,5, ?)               | Landry et al. (1992)          |

Tabela 10. Estudos que avaliaram a variação do mRNA e do imunoconteúdo da GFAP em resposta às lesões.

\* r - rato, h - hamster, rn - rato neonatal

\*\* ce - corda espinhal, hp - hipocampo, c - córtex, cf - cortex frontal, cen - córtex entorinal, sn - substância negra, tc - tronco cerebral, es - estriato, cp - córtex piriforme

🔺 🕆 aumento, 🕀 diminuição, p - proteína, m - mRNA

# (x, y) x - dias após a lesão em que o aumento ou a diminuição iniciam, y - intervalo na qual a quantidade volta ao nível do controle (+ y = quantidade permaneceu elevada até o dia indicado).

? - dado não apresentado;

1. Em 1 dia foi observado somente um aumento inconsistente e bem menor do que o aumento observado no córtex.

Destacamos a grande heterogeneidade destes estudos, tanto no tipo de lesão bem como no que tange à área do CNS e ao animal usado. Apesar disto, com exceção de dois que mostraram uma diminuição inicial, todos os outros estudos mostraram um aumento na concentração, em intervalos variando de 0,5 até 10 dias após a lesão, nos estudos com o mRNA, e de 1 até 10, nos estudos que medem o imunoconteúdo da GFAP.

#### 2.1. Diminuição Inicial

Observamos inicialmente uma diminuição do imunoconteúdo da GFAP (Figura 20). KA é um dos agentes excitotóxicos mais potentes que se tem conhecimento. Quando foi descrita sua ação excitotóxica (NADLER et al., 1978), ela foi muito alardeada, pois parecia apresentar uma especificidade muito grande sobre o corpo celular dos neurônios, não afetando os axônios nem as células gliais. Quando se voltou a atenção às células gliais observou-se que estas possuem praticamente todos os tipos de receptores dos neurônios, e entre eles, os receptores cainato (seção 2.3 da introdução, p. 11).

Dentre os processos que levam a morte celular, o aumento no [Ca<sup>2+</sup>], parece ser um passo importante, principalmente no caso de morte neuronal. Gramsberger & Berg (1994), usando a aplicação de KA intraperitonial e Mitani et al. (1993), usando condições isquêmicas em fatias observaram um grande aumento na [Ca<sup>2+</sup>], que correlacionaram com a morte neuronal.

Nos astrócitos também pode ocorrer um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  em resposta a KA. Isto foi demonstrado por Gibbons et al. (1993) com aplicação de  $300\mu$ M de KA em cultura de astroglia cortical e por Porter & McCarthy (1995), que mostraram um aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  e inchamento em resposta a  $100\mu$ M de KA em astrócitos de fatias hipocampais. Além do aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  também foi observado despolarização e efluxo de K<sup>+</sup> em cultura de astrócitos após a aplicação de 0,5mM KA (MACVICAR et al., 1988).

Devido a importância fisiológica do  $Ca^{2+}$ , é muito provável que alterações na sua concentração desencadeie uma série de processos degenerativos para a célula, entre os quais podemos destacar a ativação de enzimas proteolíticas. Gibbons et al. (1993) sugere uma associação entre a enzima calpaína e a neurodegeneração mediada pelo receptor NMDA, ou seja através de  $Ca^{2+}$ . A calpaína na presença de concentrações de  $Ca^{2+}$  na faixa de mM pode se converter, por um processo autoproteolítico, da forma mM para a forma  $\mu$ M, produzindo um aumento na sua atividade, através da translocação da enzima para a membrana. Foi observado que em cérebro de animais lesionados tanto a atividade como a translocação para a membrana estão aumentados, indicando o envolvimento da calpaína no mecanismo de degradação de certos componentes intracelulares em resposta ao aumento de [ $Ca^{2+}$ ]. A calpaína apresenta uma certa especificidade na degradação de componentes do citoesqueleto, incluindo neurofilamentos, proteínas associadas à microtúbulos entre outros, o que pode estar envolvido com a diminuição inicial observada da GFAP após injeção de KA (ARRIGONI & COHADON, 1991).

Assim como o aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, o desbalanço iônico também pode afetar a síntese protéica. Petito & Halaby (1993) encontraram um decréscimo no imunoconteúdo da GFAP, 1 e 2 dias após 30 minutos de isquemia e discutiram este decréscimo como um efeito do inchamento astrocítico e da desagregação polirribossômica.

Além de afetar a concentração de certas proteínas, como a GFAP, as mudanças nos astrócitos discutidos acima também pode levar a degeneração, podendo a diminuição inicial estar também relacionada a este processo.

No presente estudo, o imunoconteúdo da GFAP permanece inferior ao controle até 4 D.A.I. e alcança um aumento significativo somente após 28 dias<sup>5</sup>. Embora o KA injetado no hipocampo (concentração de 5mM) deva se difundir rapidamente, é muito provável que sua concentração próximo ao local de injeção alcance os níveis usados nos estudos *in vitro* (PORTER & MCCARTHY, 1995), e portanto possa afetar também os astrócitos.

Em cultura de astrócitos, o "turnover" da GFAP se divide em dois "pools": um rápido, com um tempo de meia vida ( $t_{0,5}$ ) de 18 horas, e outro lento, com  $t_{0,5}$  de 6 dias. O primeiro representa 47% e o último 53% do total de GFAP (CHIU & GOLDMAN, 1984). Neste estudo observamos uma diminuição de 48% no imunoconteúdo da GFAP em relação ao controle 1 dias após a lesão, o que pode representar alteração no "turnover" do "pool" rápido, embora seja complicado extrapolar dados de "turnover" de proteínas do citoesqueleto de cultura para estudos *in vivo* (DEARMOND et al., 1986).

Algumas citocinas parecem ter um papel importante na resposta à lesão no CNS (ISACKSON, 1995). Lesões elevam os níveis de várias citocinas, entre as quais pode-se destacar: IL- $\beta$ 1 (ESTRADA et al., 1992), fator de necrose tumoral (TNF) (CHENG et al., 1994), bFGF (Gall et al., 1994) e o fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (LINDHOLM et al., 1992). Algumas destas citocinas afetam a expressão da GFAP, como por exemplo a IL-1 $\beta$ , que em cultura de astrócitos diminui a concentração do mRNA da GFAP (LIU et al., 1994), o que também foi descrito para a TNF (SELMAJ et al., 1991). Outras inibem a proliferação de astrócitos, como a TGF- $\beta$ 1 (LINDHOLM et al., 1992).

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Após 14 dias a imunoreatividade já mostra uma tendência de aumento, mas ainda não alcança a significância

Embora o estudo de citocinas e o seu envolvimento na resposta do tecido cerebral após lesão ainda esteja no seu início, acreditamos que a sua ação sobre os astrócitos e especialmente sobre a GFAP possa ser uma das explicações para a variação da concentração da GFAP, inclusive sua diminuição inicial.

Aqui é importante fazermos um comentário metodológico. Quando se trabalha com fosfoproteínas, existe a possibilidade de o anticorpo reconhecer de forma diferenciada a proteína dependendo do seu estado de fosforilação. Neste estudo, porém, este problema é reduzido pelo uso de um anticorpo policional.

#### 2.2. Aumento Tardio

O aumento da quantidade de GFAP pode estar tanto relacionado com a diferenciação e um conseqüente aumento da relação síntese/degradação, bem como com a proliferação.

Ainda não existe consenso na literatura sobre os mecanismos envolvidos no aumento da quantidade da GFAP com a diferenciação após a lesão. Petito & Halaby, (1993) sugerem a perda da fatores inibitórios neuronais e estímulos liberados pelos monócitos (que podem entrar e proliferar no CNS após certos tipos de lesão). Estes fatores podem ser tanto solúveis, isto é citocinas, como insolúveis, estando presentes na superfície destas células (moléculas de adesão).

Quanto ao mecanismo intracelular também não existe consenso. Novamente o Ca<sup>2+</sup> parece ser um bom candidato, pois Gramsbergen & Berg, (1994) mostraram uma correlação positiva entre o aumento da GFAP com o acúmulo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> após injeção de KA intraperitonial. Na seção 4.3.2.2 e na Figura 3 da Introdução foram mencionadas algumas possibilidades de regulação do gene da GFAP, existindo a possibilidade de que esta regulação seja mediada pelo Ca<sup>2+</sup>.

Outra possibilidade envolve o cAMP, que é bem conhecido como ativador da síntese da GFAP (MESSEN et al., 1992). Dash et al. (1995) encontraram um aumento na fosforilação da CREB em hipocampo após isquemia, fato que possibilita a ativação da transcrição mediada pela CREB nos genes que possuem a seqüência CRE, como é o caso do gene da GFAP. Lembremos que a CREB pode ser fosforilada pela PKA, como também pela CaMKII, o que possibilita a regulação mediada pelo cAMP e pelo Ca<sup>2+</sup> (seção 3.4 da introdução, p. 15).

## 3. Estado de Fosforilação da GFAP

É importante discutirmos rapidamente o método usado para avaliar o estado de fosforilação. Na Tabela 8, mostramos a relação entre a fosforilação relativa (C/T) do gel e da NC, no intuito de tentar avaliar a precisão da transferência da proteína do gel para a NC. Podemos ver que as médias apresentam um desvio padrão muito elevado. É complicado explicar este fato, já que ambos os lados, isto é, C e T, são submetidos às mesmas condições durante a transferência. Um ponto de imprecisão pode ser a densitometria, realizada em um densitômetro de varredura, inadequado para este tipo de manchas, o que foi resolvido em parte por leituras múltiplas. Para minimizar o erro técnico quanto ao estado de fosforilação, foi usado a intensidade da fosforilação medida na NC comparada com a imunodetecção.

A hipótese de trabalho inicial sugeria uma mudança no estado de fosforilação da GFAP com a ativação dos astrócitos, isto é, após lesão, já que a presença de GFAP é necessária mas não suficiente para a formação de processos, apontando para uma regulação na sua atividade, possivelmente através da fosforilação (Weinstein et al., 1991).

Não existe diferença significativa entre a incorporação de <sup>32</sup>P medida no gel e o imunoconteúdo da GFAP, fato confirmado pela comparação da incorporação medida na NC com o imunoconteúdo (Figura 20). Isto pode significar que o principal responsável pela plasticidade astrocítica após a lesão é a regulação da expressão de GFAP, ficando a regulação da polimerização, ou seja, a fosforilação, para segundo plano.

É importante mencionar que, devido à baixa sensibilidade do método usado, provavelmente não pudemos detectar pequenas modificações no estado de fosforilação, talvez importantes para a regulação da polimerização.

#### 4. Proteína Neuronal

A sinapsina é uma fosfoproteína exclusivamente neuronal, sendo indentificável pelo método usado neste trabalho. Brock e O'Callaghan (1987), usando trimetil chumbo como agente tóxico, mostraram um decréscimo da sinapsina I em torno de 25% do valor inicial em 35 dias, voltando a um valor próximo ao controle em 84 dias, sendo que o número de células piramidais diminuiu quatro vezes aos 21 dias, per-
manecendo neste patamar até 84 dias pós-tratamento. Como era de se esperar, observamos uma diminuição na incorporação de <sup>32</sup>P na sinapsina em relação ao controle em todos os dias avaliados, chamando a atenção para 4 e 7 dias após, no qual ela está praticamente ausente. A incorporação de <sup>32</sup>P retorna ao valor observado 1 dia após a injeção, provavelmente mostrando a sinaptogênese reativa. Este valor permanece inferior em relação ao controle, talvez indicando uma recuperação parcial (Tabela 9).

Neste trabalho, exceto para a GFAP, avaliamos apenas a incorporação de <sup>32</sup>P nas proteínas, dessa forma não havendo condições de saber se a variação observada se deve a variação na quantidade de proteína ou apenas se deve a alteração do sistema de fosforilação (Tabela 9).

## 5. Proteínas Gliais

Durante a ontogenia, os filamentos intermediários dos astrócitos passam de uma composição exclusiva de vimentina para uma constituída de GFAP. No rato, esta transição ocorre durante a mielinização, isto é, entre a segunda e a terceira semana pós-natal. Durante esta transição os IFs destes astrócitos podem ser compostos por ambas as proteínas (DAHL, 1981; CALVO et al., 1991).

A expressão da vimentina nos astrócitos está relacionada com a fase imatura destas células, enquanto que a expressão da GFAP está relacionada com a fase madura e menos dinâmica dos astrócitos. Um modelo seqüencial similar tem sido proposto para as mudanças características da astrogliose reativa (SCHIFFER et al., 1988), na qual também se observa uma expressão inicial da vimentina e em alguns casos, uma diminuição da GFAP, talvez como parte do mecanismo de tornar os astrócitos mais parecidos com os imaturos e podendo desta forma desempenhar melhor as funções características os astrócitos imaturos, isto é, dar suporte para a sinaptogênese.

Na Tabela 11 podemos ver alguns estudos mostrando o aparecimento da vimentina após lesões.

| Tipo de lesão            | Animal*    | Variação 🔺   | Referência               |
|--------------------------|------------|--------------|--------------------------|
|                          | (área**)   | (Intervalo#) |                          |
| Isquemia (30 min)        | r (hp CA1) | û p (2, +42) | Petito & Halaby, (1993)  |
| Axotomia                 | h (tc)     | ûр(2, +14)   | Oblinger & Singh, (1993) |
| Encefalomielite alérgica | r (ce)     | ûp(?)        | Smith et al. (1983) e    |
|                          |            |              | Goldmuntz et al. (1986)  |
| Isquemia (30 min)        | r (hp CA1) | 압 p (2, +42) | Petito & Halaby, (1993)  |
| Lesão mecânica           | r (c)      | ûр(2, 12)    | Janeczko, (1993)         |
| Lesão mecânica           | r (c)      | û p(?)       | Calvo & Boya, (1991)     |

**Tabela 11.** Estudos que avaliaram a variação do imunoconteúdo da vimentina em resposta às lesões.

\* r - rato, h - hamster;
 \*\* ce - corda espinhal, hp - hipocampo, c - córtex, tc - tronco cerebral,
 ☆ aumento, ⊕ diminuição, p - proteína

# (x, y) x - dias após a lesão em que o aumento ou a diminuição iniciam, y - intervalo na qual a quantidade volta ao nível do controle (+ y = quantidade permaneceu elevada até o dia indicado).

? - dado não apresentado.

Os estudos mostrados na Tabela 11 sugerem o segundo dia após a lesão como o início da imunodetecção da vimentina. Existe alguma variação quanto ao desaparecimento da imunodetecção, sendo que Oblinger et al. (1993) ainda observaram vimentina 42 dias após a lesão.

No presente trabalho observamos um aumento na incorporação de <sup>32</sup>P na vimentina em relação ao controle entre o segundo e o décimo quarto D. A. I., parecendo indicar que a curva temporal da incorporação está de acordo com a da expressão desta proteína, como acontece no caso da GFAP.

A proteína de 25 k (pp25) tem um perfil de incorporação de <sup>32</sup>P semelhante ao da vimentina, isto é, um aumento transitório que inicia 4 D.A.I. de KA, e permanece até o décimo quarto dia. O aumento na incorporação é uma forte indicação para a presença desta proteína nos astrócitos, o que foi confirmado pelos estudos de Gottfried et al. (1995) usando cultura de astrócitos. Não podemos, no entanto, afirmar que esta proteína seja exclusiva de astrócitos. Em fatias de cérebro de ratos não lesionados, esta proteína não incorpora <sup>32</sup>P, contudo não podemos afirmar se ela está presente ou não.

Quanto aos sistemas de fosforilação que atuam sobre as proteínas analisadas podemos afirmar que o forbol ativa a fosforilação da MARCKS e da sinapsina, não influenciando significativamente na fosforilação da GFAP e da vimentina, como

bem descrito por Salbego, (1990), embora estas proteínas tenham sítios para a PKC (TSUJIMURA et al., 1994 a, b).

A proteína de número 8 da Figura 22 e da Figura 23 possui várias semelhanças com uma proteína descrita por Araujo et al. (1993) e denominada PEA-15. Além de aparecer em cultura de astrócitos (Gottfried et al., 1995), a proteína número 8 aparenta migrar em torno de 15 kDa em géis de SDS-PAGE, possui PI um pouco mais ácido do que a vimentina<sup>6</sup> em NEPHGE e aparece como um "dublete", tendo o componente mais ácido sua fosforilação ativada por forbol.

Embora a PEA-15 seja expressa em astrócitos, sua fosforilação parece não ser alterada com a lesão, ao contrário de outras proteínas astrocíticas, como a pp25, (número 4 da Figura 22), a GFAP e a vimentina (Figura 15).

A fosforilação da pp25 é dependente de Ca<sup>2+</sup> e não afetado pela adição de forbol ao meio de incubação, o que indica que ela não é substrato da PKC. É interessante observar que a pp25 aparece ora como "dublete" (em tecido lesionado na presença de EGTA e em cultura de astrócitos) e ora como "triplete" (em tecido lesionado), sugerindo a existência de isoformas de fosforilação.

A fosforilação da pp25, e talvez a expressão da proteína, parecem ser um bom marcador de gliose, assim como a expressão da vimentina e o aumento da GFAP. Isto porque a pp25 também aparece em outras formas de gliose, como o tratamento crônico com Li<sup>+</sup> (Rocha et al., dados não publicados) e a isquemia, aparecendo esta proteína somente na área onde a sensibilidade à isquemia é mais elevada, isto é, na área CA1 do hipocampo, não aparecendo no DG, que é bem descrito como resistente a lesões (NADLER et al., 1978; SCHREIBER & BAUDRY, 1995). Outro fato interessante é a sensibilidade da marcação de pp25 em resposta a formas brandas de lesão, como é o caso da injeção de solução salina. Neste caso não observamos a marcação da vimentina, e também não pudemos detectar nenhum aumento da GFAP, mas visualizamos claramente a marcação da pp25 1 D. A. I..

Quanto as proteínas de baixo M<sub>r</sub> pode-se observar na Figura 21, que tanto as proteínas número 3 e 4 como a pp25(x) tiveram a incorporação de <sup>32</sup>P aumentada com a lesão, sendo estas proteínas, com exceção da número 3, também marcadas com <sup>32</sup>P em cultura de astrócitos, podendo ser bons candidatos para marcadores de gliose.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> a vimentina não aparece na figura 23 e 24, mas se pode usar a proteína x (pp25) como referência, pois esta possui um PI muito parecido com aquela (5,7 e 5,8 respectivamente).

## Conclusões

1. Observamos uma diminuição inicial no imunoconteúdo da GFAP, fato pouco descrito na literatura. Estas observações podem estar ligadas à diminuição da síntese protéica ou à ativação de proteases.

2. O estado de fosforilação da GFAP não é alterado significativamente após a injeção de 1nmol de KA no hipocampo de ratos em relação ao controle, indicando uma maior importância da regulação da expressão/degradação do que para a regulação da fosforilação da GFAP na gliose reativa;

3. Uma fosfoproteína presente em astrócitos e que aparece após a lesão foi parcialmente caracterizada. Esta proteína tem um  $M_r$  de 25kDa e um PI em torno de 5,8, sendo sua fosforilação dependente de Ca<sup>2+</sup>. Este fosfoproteína foi denominada de pp25.

4. Proteínas presentes em astrócitos, como a vimentina e a pp25 tiveram sua incorporação de <sup>32</sup>P aumentada. O aumento na quantidade de vimentina já é bem descrito, mas a pp25 parece ser uma proteína ainda desconhecida, que pelo menos no que diz respeito à incorporação de <sup>32</sup>P, se comporta de forma semelhante à vimentina.

5. A incorporação de <sup>32</sup>P na pp25 parece ser uma boa marcadora de gliose, pois ela apareceu em vários tipos de lesão, parecendo ser mais sensível do que outros marcadores, como a vimentina ou o aumento da GFAP.

6. A precisão do método utilizado provavelmente não é suficiente para indicar pequenas alterações no estado de fosforilação, podendo estes somente ser usados para alterações muito grandes no estado de fosforilação.

7. Não foi possível avaliar a importância relativa da hiperplasia e da hipertrofia glial, sendo necessários para isto estudos com imunohistoquímica de moléculas específicas de células gliais, como a GFAP e a vimentina.

Referências

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J. D., (1994a), Membrane Transport of Small Molecules and the Ionic Basis of Membrane Excitability. In: *Molecular Biology of the Cell,* 3rd ed. Garlard Publishing, New York, NY.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J. D., (1994b), Cell Signaling. In: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. Garlard Publishing, New York, NY.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J. D., (1994c), The Cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell,* 3rd ed. Garlard Publishing, New York, NY.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J. D., (1994d), Cell Junctions, Cell Adesion, and the Extracellular-Matrix. In: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. Garlard Publishing, New York, NY.
- AMBROSINI, A., BRESCIANI, L., FRACCHIA, S., BRUNELLO, N. AND RACAGNI,
   G., (1995), Metabotropoc Glutamate Receptors Negatively Coupled to
   Adenylate Cyclase Inhibit NMDA Receptor Activity and Prevents Neurotoxicity in
   Mesencephalic Neurons *In Vitro. Mol. Pharmacol.* 47, 1057-1064.
- ANDERSON, K. J., NELLGARD, B. AND WIELOCH, T., (1993), Ischemia-induced Upregulation of Excitatory Amino Acids Transport Sites. *Brain Res.* **622**, 93-98.
- ARAUJO, H., DANZIGER, N., CORDIER, J., GLOWINSKI, J. AND CHNEIWEISS,
  H., (1993), Characterization of PEA-15, a Major Substrate for PKC in Astrocytes.
  J. Biol. Chem., 268, 5911-5920.
- ARRIGONI, E. AND COHADON, F., (1991), Calcium-Activated Neutral Protease Activities in Brain Trauma. *Neurochem.Res.* **16**:483-487.
- BEN-ARI, Y., (1994), Kainate-Induced Apoptotic Cell Death in Hippocampal Neurons. *Neurosc.* **63**, 7-18.
- BIANCHI, R., GARBUGLIA, M., VERZINI, M., GIAMBANCO, I., DONATO, R., (1994),
   Mechanism of S100 Protein-Dependent Inhibition of GFAP Polymerization. *BBA*,
   1223, 354-360.

- BONTHIUS, D. J., STRINGER, J. L., LOTHMAN, E. W. AND STEWARD, O., (1994), Spreding Depression and Reverbatory Seizures Induced the Upregulation of mRNA for GFAP. *Brain Res.***645**, 215-224.
- BRADFORD, H. F., (1985), Glial Cells: Mechanical and Functional Supporting Cells of the Nervous System. Cap. 2, p. 62-110, In: *Chem Neurobiol.* W. H. Freeman and Company, NY, USA.
- BROCK, T. O. AND O'CALLAGHAN, J. P., (1987), Quantitative Changes in the Synaptic Vesicle Protein Synapsin I and p38 and the Astrocyte-Specific GFAP are Associated with Chemical Induced-Injury to the Rat Central Nervous System. J. Neurosc. 7(4), 931-942.
- BURTRUM, D. AND SILVERSTEIN, F. S., (1993), Excitotoxic Injury Stimulates GFAP mRNA Expression in Perinatal Rat Brain, *Exper. Neurobiol.* **121**, 127-132.
- BURTRUM, D. AND SILVERSTEIN, F. S., (1994), Hypoxic-Ischemic Brain Injury Stimulates GFAP mRNA and Protein Expression in Neonatal Rats. *Exper. Neurol.* **126,** 112-118.
- CALVO, J. L. AND BOYA, J., (1991), Co-expression of GFAP and Vimentin in Reactive Astrocytes Following Brain Injury in Rats. *Brain Res.* **566**, 333-336.
- CHENG, B., CHRISTAKOS, S. AND MATTSON, M. P., (1994), Tumor Necrosis Factor Protects Neurons against Metabolic-Exctitotoxic Insults and Promote Maintenance of Calcium Homeostasis. *Neuron*, **12**, 139-153.
- CHIU, F. C. AND GOLDMAN, J. E., (1984), Synthesis and Turnover of Cytoskeletal Proteins in Cultured Astrocytes. *J. Neurochem.*, **42**, 166-174.
- CHOU, H. Y., NGAI, K. L. AND GOLDMAN, R., (1991), The Regulation of Intermediate Filament Reorganization in Mitosis. *J. Biol. Chem.*, **266(12)**, 7325-7328.
- COOPER, D. M. F., MONS, N. AND KARPEN, J. W., (1995), Adenylyl Cyclases and the Interaction Between Calcium and cAMP Signaling. *Nature*, **374**, 421-424.
- CUNHA, A., JEFFERSON, J. J., TYOR, W. R., GLASS, J. D., JANNOTTA, F. S. AND VITKOVIC, L., (1993), Glioses in Human Brain: Relationship to Size but not Other Properties of Astrocytes. *Brain Res.*, **600**, 161-165.
- DAHL, D., (1981), The Vimentin-GFAP Transition in Rat Neuroglia Cytoskeleton Occurs at the Time of Myelination. *J. Neurosc. Res.* **6**, 741-748.

- DANI, J,. CHERNJAVSKY, A. AND SMITH, S. J., (1992), Neuronal Activity Triggers Calcium Waves in Hippocampal Astrocytes Networks. *Neuron*, **8**, 429-440.
- DASH, P. K., MOORE, A. N. AND DIXON, C. E., (1995), Spatial Memory Deficits, Increased Phosphorylation of the Transcription Factor CREB, and Induction of the AP-1 Complex Following Experimental Brain Injury. *J. Neurosc.* **15**, 2030-2036.
- DEARMONDM S. J., LEE, Y. L., KRETZSCHMAR, H. A. AND ENG, L. F., Turnover of Glial Filaments in Spinal Cord. *J. Neurochem.*, **47**, 1749-1753, (1986).
- DESSI, F., MARLANGUE, C. C. AND BEN-ARI, Y., (1994), Glutamate-Induced Neuronal Death in Cerebellar Culture is Mediated by Two Distinct Components: a Sodium-Chloride Component and a Calcium Component. *Brain Res.*, **650**, 49-55.
- ENG, L. F., (1985), GFAP: The Major Protein of Glial Intermediate Filaments in Differentiated Astrocytes. *J. Neuroimmun.*, **8**, 203-214.
- ENG. L. F., (1988), Regulation of Glial Intermediate Filaments in Astrogliosis. *The Biochemical Pathology of Astrocytes*, 79-90.
- ENG, L. F., VANDERHAEGHEN, J. J., BIGNAMI, A. AND GERSTL, B., (1971), An Acidic Protein Isolated from Fibrous Astrocytes. *Brain Res.* 28, 351-354.
- ENKVIST, M. O. AND McCARTHY, K. D., (1994), Astroglial Gap Junction Communication is Increased by Treatment with Either Glutamate or Hight K<sup>+</sup> Concentration. J. Neurochem. **62(2)**, 489-495.
- ENSLEN, H., SUN, P., BRICKEY, D., SONDERLING, S., KLAMO, E. AND SONDERLING, T. R., (1994), Characterization of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV. J. Biol. Chem., **269**, 15520-15527.
- ESCOUROLLE, R. AND POIRIER, J., (1973), Basic Pathology of the Central Nervous System. Cap. 1, p. 19-34, In: *Mariual of Basic Neropathology*, W. A. Saunders Company, NY.
- ESTRADA, J. G., SEGURA, L. M. G. AND ALEMA, I.T., (1992), Expression of Insulin-like Growth Factor I by Astrocytes in Response to Injury. *Brain Res.* **592**, 343-347.
- FAROOQUI, A. A., HAUN, S. E. AND HORROCKS, L. A., (1994), Ischemia and Hypoxia, Basic Neurochemistry: Molec. Cell. and Med. Aspects, 5th Ed., Raven Press Ltd. New York, 1994.

- FERGUSSON, K. A., (1964), Starch-Gel Electrophoresis Application to the Classification of `Pituitary Proteins and Polypeptides. *Metabolism*, **13**, 985-1002.
- GALL, C. M., BERSCHAUER, R. AND ISAKSON, P. J., (1994), Seizures Increases Basic Fibroblast Growth Factor mRNA in Adult Rat Forebrain Neurons and Glia. *Mol. Brain Res.* 21, 190-205,
- GHIRNIKAR, R. S., YU, A. C. H. AND ENG., L. F., (1994), Astrogliosis in Culture: III. Effect of Recombinant Retrovirus Expressing Antisense GFAP RNA, *J. Neurosc. Res.* 38, 376-385.
- GHOSH, A. AND GREENBERG, M. E., (1995), Calcium Signaling in Neurons: Molecular Mechanisms and Cellular Consequences. *Science*, **268**, 239-247.
- GIBBONS, S.J., BRORSON, J. R., BLEAKMAN, D., CHARD, P. S. AND MILLER, R. J., (1993), Calcium influx and neurodegeneration. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **679**:22-33.
- GIULIAN, D., (1993), Reactive Glia as Rivals in Regulating Neuronal Survival. *Glia*, **7**, 102-110.
- GLOWINSKI, J., MARIN, P., TENCE, M., STELLA, N., GIAUME, C. AND PREMONT, J., (1994), Glial Receptors and Their Intervention in Astrocyto-Astocytic and Astrocyto-Neuronal Interactions. *Glia*, **11**, 201-208.
- GOLDMUNTZ, E. A., BROSNAN, C. F., CHIU, F. C. AND NORTON, W. T., (1986), Astrocytic Reactivity and Intermediate Filament Metabolism in Experimental Autoimmune Encephalomyilitis: The Effect of Supression with Prazosin. *Brain Res.* **397**, 16-26.
- GOTTFRIED, C., KARL, J., RIGON, P., GONÇALVES, C. A., RODNIGHT, R. AND WOFCHUK, S., (1995), Protein Phosphorylation in Primary Cultures of Astrocytes: Inhibition of <sup>32</sup>P-Incorporation by Ca<sup>2+</sup>. In: Symposium: The Membrane Transport of Calcium and Function of Glutamate Receptors. Porto Alegre, RS
- GRAMSBERGEN, J. B. P. AND BERG, K. J., (1994), Regional and Temporal Profiles of Calcium Accumulation and GFAP Levels in Rat Brain After Systemic Injection of Kainic Acid. *Brain Res.* **667**, 216-228.
- HALL, R. A., KESSLER, M. AND LYNCH, G., (1994), Kainate Binding to the AMPA Receptor in Rat Brain. *Neurochem. Res.* **19(6)**, 777-782.

- HANSSON, E. AND RÖNNBÄCK, L., (1995), Astrocytes in Glutamate Neurotransmission. *FASEB J.*, **9**, 343-350.
- HATTEN, M. E., LIEM, R. K. H., SHELANSKI, M. L. AND MASON, C. A., (1991), Astroglia in CNS Injury. *Glia*, **4**, 233-243.
- HEEGAARD, N. H. AND BJERRUM, O. J., (1988), Immunoblotting General Principles and Procedures. In *Handbook of Immunoblotting of Proteins*. Bjerrum, O. J., Heegard, N. H., **1**, 1-15, CRC, Boca Raton, Florida.
- HENLEY, J., M., (1994), Kainate Binding Proteins: Phylogeny, Structure and Possible Functions. *TIBS*, **15**, 182-190.
- HÉRON, A., POLLARD, H., DESSI, F., MOREAU, J., LASBENNES, F., BEN-ARI, Y.
  AND CHARRIAUT-MARLANGE, C., (1993), Regional Variability in DNA
  Fragmentation After Global Eschemia Evidenced by Combined Histologial and
  Gel Electrophoresis Observations in the Rat Hippocampus. *J. Neurochem.*, 61, 1973-1976.
- HODGKIN, A. L. AND HUXLEY, A. F., (1952), A Quantitative Description of Membrane Currents and its Application to Conduction and Excitation in Nerve. J. *Physiol.* **117**, 500-544.
- HOZIMI, I., CHIN, F. G. AND NORTON, W. T., (1991), Biochemical and Immunocytochemical Changes in GFAP after Stab Wound. *Brain Res.*, **524**, 64-71.
- HUNTER, T., (1995), Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell*, **80**, 225-236, (1995).
- ISACKSON, P. J., (1995), Trophic Factor Response to Neuronal Stimul or Injuty. *Cur. Op. Neurobiol.* **5**, 350-357.
- JANECZKO, K., (1993), Co-expression of GFAP and Vimentin in Astrocytes Proliferating in Response to Injury in the Mouse Cerebral Hemisphere. A Combined Auto-radiographic and Double Immunocytochemical Study. Int. J. Devl. Neurosc. 11, 139-147.
- JOHNSON, G. A. R., CURTIS, D. R., DAVIES, J. AND MCCULLOCH, R. M., (1974), Spinal Interneurone Excitation by Conformationally Restricted Analogues of L-Glutamic Acid. *Nature*, **248**, 804-805.

- KELLEY, M. S. AND STEWARD, O., (1993), The Role of Neuronal Activity in Upregulating GFAP mRNA Levels after Electrolytic Lesions of the Enthorinal Cortex. *Int. J. Devl. Neurosc.* **11**, 105-115.
- KIMELBERG, H. K. AND NORENBERG, M. D., (1989), Astrocytes, Scientific Am. April, 66-76.
- KOH, J. Y., PALMER, E. AND COTMAN, C. W., (1991), Activation of the Metabotropic Glutamate Receptor Attenuates NMDA Neurotoxicity in Cortical Cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9431-9435.
- LANDIS, S. M. D., (1994), The Early Reactions of Non-Neuronal Cells to Brain Injury, Ann. Rev. Neurosc. **17**, 133-151.
- LANDRY, C. F., IVY, G. O. AND BROWN, I. R., (1992), Effect of a Discrete Dorsal Forebrain Lesion in the Rat on the Expression of Neuronal and Glias-Specific Genes: Induction of Calmodulin, NF-L, SC1, and GFAP mRNA. J. Neurosc. Res. 32,.
- LAPING, N. J., TETER, B., NICHOLS, N. R., ROZOVSKY, I. AND FINCH, C. E., (1994), GFAP: Regulation by Hormones, Cytokines, and Growth Factors. *Brain Pathology*, **1**, 259-274.
- LEAL, R. B., Estudo do Sistema Fosforilante da ppH-47/GFAP em Cérebro de Ratos: Distribuição Regional, Identificação da Quinases Envolvidas na Fosforilação e Mapeamento Fosfopeptídico. *Tese de Doutorado,* Curso de Pós Graduação em Bioquímica, UFPR, Curitiba, p. 110.
- LEI, S. Z., ZHANG, D., ABELE, A. E. AND LIPTON, S.A. (1992), Blockade of NMDA Receptor-mediated mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> prevents neurotoxicity. *Brain Res.* 598, 196-202.
- LINDHOLM, D., CASTRÉN, E., KIEFER, R., ZAFRA, F. AND THOENE, H., (1992), TGF-b1 in the Rat Brain: Increase after Injury and Inhibition of Astocyte Proliferation. *J. Cell Biol.* **117**, 395-400.
- LISMAN, J., (1994). The CaM kinase II hypothesis for the Storage of Synaptic Memory. *TINS*; **17**, 406 412.
- LIU, W., ZAGARDO, B. S., AQUINO, D. A., ZHAO, M. L., DICKSON, D. W., BROSNAN, C. F. AND LEE, S. C., (1994), Cytoskeletal Alterations in Human Fetal Astrocytes Induced by Interleukin-1β. *J. Neurochem.* **63**, 1625-1634.

- LODGE, D. AND COLLINGRIDGE, G., (1990), Pharmacology of Excitatory Amino Acids, *TIPS*, **12**.
- MACVICAR, B. A., BAKER, K. AND CRICHTON, S. A., (1988), Kainic Acid Evokes a Potassium Efflux from Astrocytes, *Neurosc.* **25(2)**, 721-725.
- MANUAL of Histologic and Special Staining Technics, (1960), 2 ed., New York, McGraw-Hill, 25-32.
- MASOOD, K., BESNARD, F., SU, Y. AND BRENNER, M., (1993), Analysis of a Segment of the Human GFAP Gene that Directs Astrocyte-Specific Transcription. *J. Neurochem.*, **61**, 160-166, (1993).
- MATSUOKA, Y., NISHIZAWA, K., YANO, T., SHIBATA, M. ANDO, S., TAKAHASHI,
  T. AND INAGAKI, M., (1992), Two Different Protein Kinases Act on a Different
  Time Schedule as Glial Filament Kinases During Mitosis. *EMBO Jornal*, **11(8)**, 2895-2902.
- MAYAT, E., NATOLI, M. L., RONDOUIN, G., LEBRUN, F., SASSETI, I. AND RÉCASENS, M., (1994), Kainate-induced Status Epilepticus Leads to a Delayed Increase in Variuos Specific Glutamate Metabotropic Receptors Responses in the Hippocampus. *Brain Res.* **645**, 186-200.
- McGREER, P.L., McGREER, E. G. AND HATTORI, T., (1978), Kainic Acid: A Tool in Neurobiology, *Kainic Acid as a Tool of Neurobiology*, ed. E.G.McGeer et al. Raven Press, 219-237. 123-128.
- MESSENS, J., AND SLEGERS, H., (1992), Synthesis of GFAP in Rat C<sub>6</sub> Glioma in Chemically Defined medium: cAMP Dependent Transcriptional and Translational Regulation. *J. Neurochem.*, **58**, 2071-2080.
- MITANI, A., YANASE, H., SAKAI, K., WAKE, Y. AND KATAOKA, K., Origin of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Elevation Induced by in vitro Ischemia-like Condition in Hippocampal Slices. *Brain Res.* **601**, 103-110, (1993).
- MITCHELL, I. J., LAWSON, S., MOSER, B., LAIDLAW, S. M., COOPER, A. J., WALKINSHAW, G. AND WATERS, C. M., (1994), Glutamate-Induced Apoptosis Results in a Loss of Striatal Neurons in the Parkinsonian Rat. *Neurosc.* **63**, 1-5.
- MUMBY, M. C. AND WALTER, G., (1993), Protein Serine/Threonine Phosphatases: Structure, Regulation, and Function in Cell Growth, *Phys. Rev.* **73**, 673-699.

- NADLER, J.V., PERRY, B.W. AND COTMAN, C.W. (1978). Preferential vulnerability of hippocampus to intraventricular kainic acid. In: "*Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*" ed. E.G.McGeer et al. Raven Press, 219-237.
- NAKAMURA, Y., TAKEDA, M., AIMOTO, S., HOJO, H., TAKAO, T., SHIMONISHI, Y., HARIGUCHI, S. AND NISHIMURA, T., (1992), Assembly Regulatory Domain of GFAP, J. Biol. Chem. 237, 23269 - 23274.
- NETTO, C. A., HODGES, H., SINDEN, J. D., PEILLET, E., KERSHAW, T., SOWINSKI, P., MELDRUM, B. S. AND GRAY, J. A., (1993), Effects od Fetal Hippocampal Field Grafts on Ischemic-Induced Deficits in Spatial Navigation in the Water Maze. *Neurosci.*, **54**, 69-92.
- NITTA, I., WATASE, H. AND TOMIIE, Y., (1958), Structure of Kainic Acid and its Isomer Allokainic Acid. *Nature*, **181**, 761-762.
- NORTON, W. T., AQUINO, D. A., HOZUMI, I., CHIU, F. C. AND BROSNAN, C. F., (1992), Quantitative Aspect of Reactive Gliosis: A Review. *Neurochem. Res.* **17**, 877-885.
- OBLINGER, M. M. AND SINGH, L. D., (1993), Reactive Astrocytes in Neonate Brain Upregulate Intermediate Filaments in Response to Axonal Injury. *Int. J. Devl. Neurosc.* **11**, 149-156.
- O'CALLAGHAN, J. P., (1993), Quantitative Features of Reactive Gliosis following Toxicant-induced Damang of CNS. *Ann. NY Acad. Sci.* **679**, 195-210.
- O'CALLAGHAN, J. P., BRITON, R. E. AND MCEWEN, B. S., (1989), Glucocorticoids Regulate the Concentration of GFAP Throughout the Brain. *Brain Res.* **494**, 159-161
- O'CONNOR E, R. AND KIMELBERG, H. K., (1993), Role of Calcium in Astrocyte Volume Regulation and in the Release of Ions and Amino Acids. *J. Neurosc.* **13**, 2638-2650.
- O'FARRELL, P. Z., GOODMAN, H. M. AND O'FARRELL, P. H., (1977), Hight Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Basic as well as Acidic Proteins. *Cell*, **12**, 1133-1142.
- ORDY, J. M., WENGENACK, T. M., BIALOBOK, P., COLEMAN, P. D., RODIER, P., BAGGS, R. B., DUNLAP, W. P. AND KATEST, B., (1993), Selective Vulnerability and Early Progression of Hippocampal CA1 Pyramidal Cell Degeneration and

GFAP-positive Astrocytes Reactivity in the Rat Four-vessel Occlusion Model of Transient Ischemia. *Exp. Neurol.* **119**, 128-139.

- PARPURA, V., BASARSKY, T. A., LIU, F., JEFTINIJA, K., JEFTINIJA, S. AND HAYDON, P. G., Glutamate-Mediated Astrocyte-Neuron Signalling. *Nature*, **369**, 744-747, (1994).
- PASTUSZKO, A., WILSON, D. F. AND ERECINSKA, M., (1984), Effects of Kainic Acid in Rat Brain Synaptossomes: The Involvement of Calcium. J. Neurochem. 43(3), 747-754.
- PAXINOS, G. AND WATSON, C., (1986), The Rat Brain in Stereotaxic Coordenates. Second Ed. Academic Press, North Ryde, Australia
- PETERSON, G. L., (1979), Review of the Folin Phenol Protein Quantification Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* **100**, 201-220.
- PETITO, C. K., CHUNG, M. C., VERKHOVSKY, L. M. AND COOPER, A. J. L., (1992), Brain Glutamine Synthetase Increases Following Cerebral Ischemia in the Rat. *Brain Res.* 569, 275-280.
- PETITO, C. K. AND HALABY, I. A., (1993), Relationship Between Ischemia and Ischemic Neuronal Necrosis to Astrocytes Expression of GFAP. Int. J. Devl., Neurosc. 11, 239-247.
- PIZZI, M., FALLACARA, C., ARRIGHI, V., MEMO, M. AND SPANO, P. F., (1993), Attenuation of Excitatory Amino Acid Toxicity by Metabotropic Glutamate Receptor Agonists and Aniracetam in Primary Cultures of Cerebelar Granule Cells. J. Neurochem., 61(2) 683-689.
- POLLARD, H., MARLANGUE, C. C. CANTAGREL, S., REPRESA, A., ROBAIN, O., MOREAU, MITANI, A., YANASE, H., SAKAI, K., WAKE, Y. AND KATAOKA, K., (1993), Origin of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Elevation Induced by in Vitro Ischemia-Like Condition in Hippocampal Slices. *Brain Res.* **601**, 103-110.
- PORTER, J. T. AND MCCARTHY, K. D., (1995), GFAP-Positive Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamergic Neuroligands with Increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Glia*, **13**, 101-112.
- RAINE, C. S., (1994), Neurocellular Anatomy. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Alberts, R. W., Molinoff, P. B., Basic Neurochemistry, p. 6.

- RAISMAN, G., (1991), Glia, Neurons and Plasticity, Annals of the NY Acad. Sci, Glial-Neuronal Interraction. 633, 209-213.
- RATABOUL, P., VERNIER, P., BIGUET, N. F. AND MALLET, J., (1989), Modulation of GFAP mRNA Levels Following Toxic Lesions in the Basal Ganglia of the Rat. *Brain Res. Bull.* **22**, 155-161.
- REEVES, S. A., HELMAN, L. J., ALLISON, A. AND ISRAEL, M. A., (1989), Molecular Cloning and Primary Structure of Human GFAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5178-5182.
- RODNIGHT, R. B., (1994), Quantitative Two-Dimensional Analysis of Protein Phosphorylation in Mini-Slices of Brain Tissue. Personal Communication
- ROTHMAN, S. M. AND OLNEY, J. W., (1995), Excitotoxicity and the NMDA Receptor - Still Lethal after Eight Years, *TINS*, **18**, 57-58.
- SALBEGO, C. G., (1990), Estudo Ontogenético de Fosfoproteínas Cerebrais em Micro-fatias de Córtex Cerebral e Hipocampo de Ratos Normais e Desnutridos.
   *Tese de Doutorado,* Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFPR, Curitiba, p. 83.
- SCHIFFER, D., GIORDANA, M. T., MIGHELI, A., GIACCONE, G., PEZZOTTA, S. AND MAURO, A., (1988), GFAP and Vimentin in the Experimental Glial Reaction of the Rat Brain. *Brain Res.* **374**, 110-118.
- SCHMIDT, R. F., DUDEL, J., JÄNIG, W., ZIMMERMANN, M., (1979), Neurofisiologia, São Paulo: EPU: Editora da Universidade de São Paulo.
- SCHREIBER, S. S. AND BRAUDRY, M., (1995), Selective Neuronal Vulnerability in the Hippocampus a Role for Gene Expression? *TINS*, **18**, 446-451.
- SEGER, R. AND KREBS, E.G., (1995), The MAPK Signaling Cascade. Faseb j. 9, 726-735.
- SEGEVIA, J., LAWLESS, G. M., TILLAKARATNE, N. J. K., BRENNER, M. AND TOBIN, A. J., (1994), cAMP Decreases the Expression of a Neuronal Marker (GAD<sub>67</sub>) and Increases the Expression of an Astroglial Marker (GFAP) in C6 Cells. *J. Neurochem.*, **63**, 1218-1225.
- SELMAJ, K., ZAGARDO, B. S., AQUINO, D. A., FAROOQ, M., RAINE, C. S., NORTON, W. T. AND BROSNAN, C. F., (1991), TNF-Induced Proliferation of

Astrocytes from Mature Brain Is Associated with Down-Regulation of GFAP mRNA. J. Neurochem., **57**, 823-830.

SHAO, Y. AND MCCARTHY, K. D, (1994), Plasticity of Astrocytes. Glia, 11, 147-155.

- SMITH, M. E., SOMERA, F. P. AND ENG, L. F., (1983), Immunocytochemical Staining for GFAP and the Metabolism of Cytoskeletal Proteins in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Brain Res.* 264, 241-253.
- SONTHEIMER, H., (1994), Voltage-Dependent Ion Channels in Glial Cells. Glia, **11**, 156-172.
- SRINIVASAN, M., EDMAN, C, F. AND SCHULMAN, H., (1994), Alternative Splicing Introduces a Nuclear Localization Signal That Targets Multifuncional CaM Kinase to the Nucleus. J. Cell Biol. 126, 839-852.
- STEINER, P. M. AND ROOP, D. R., (1988), Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments, *Ann. Rev. Biochem*, **57**, 593-625.
- STELLER, H., (1995), Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. Science, 267, 1445-1449.
- STEWARD, O., KELLEY, M. AND TORRE, E. R., (1993), The Process of Reinnervation in the Dentate Gyrus of Adult Rats: Temporal Relationship between Changes in the Levels of GFAP and GFAP mRNA in Reactive Astrocytes. *Exp. Neurolog.* **124**, 167-183.
- STREIT, W. J. AND COLTON, C. A. K., (1995), The Brain's Immune System, Sci. Am., Nov. 38-43.
- TSUJIMUA, K., OGAWARA, M., TAKEUCHI, Y., IHMI, S. I., HA, M. H. AND INAGAKI, M., (1994a), Visualization and Function of Vimentina Phosphorylation by cdc2 Kinase During Mitosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 31097-31106.
- TSUJIMUA, K., TANAKA, J. ANDO, S., MATSUOKA, Y., KUSUBATA, M., SUGIURA, H., YAMAUCHI, T. AND INAGAKI, M., (1994b), Identification of Phosphorylation Sites on GFAP for cdc2 Kinase and CaMK II. *J. Biochem.* **116**, 426-434.
- UCHIHORI, Y. AND PURO, D. G., (1993), Glutamate as a Neuron-to-Glial Signal for Mitogenesis: Role of Glial NMDA Receptors. *Brain Res.* **613**, 212-220.
- WALAAS, S. I. AND GREENGARD, P., (1991), Protein Phosphorylation and Neuronal Function. *Pharmacological Reviews*, **43(3)**, 299-349.

- WANG, L. Y., TAVERNA, F. A., HUANG, X. P., MACDONALD, J. F. AND HAMPSON, D. R., (1993), Phosphorylation and Modulation of a Kainate Receptor (GluR6) by cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA). *Science*, 259, 1173-1175.
- WATSON, S. AND GIRDLESTONE, D., (1995), Receptor & Ion Channel Nomenclature (Suplement) *TIPS*. 6th Ed.
- WEINSTEIN, D. E., SHELANSKI, M. L. AND LIEN, R. K. H., (1991), Supression by Antisense mRNA Demonstrates a Requirement for GFAP in the Formation of Stable Astrocytic Processes in Response to Neurons. J. Cell Biol. 112(6), 1205-1213.
- WHITMARSH, A. J., SHORE, P., SHARROCKS, A. D. AND DAVIS, R. J., (1995), Integration of MAP Kinase Signal Transduction Pathways at the Serum Response Element. *Science*, **269**, 403 - 407.
- WOFCHUK, S. T. AND RODNIGHT, R., (1994), Glutamate Stimulates the Phosphorylation of GFAP in Slices of Immature Rat Hippocampus via a Metabotropic Receptor. *Neurochem. Int.* **24**, 517-523.

YOUNG, A. M. J., CROWDER, J. M. AND BRADFORD, H. F., (1988), Potentiation by Kainate of Excitatory Amino Acid Release in Striatum: Complementary in Vivo and in Vitro Experiments. J. Neurochem., 50, 337-345.

ZAGARDO, B. S., IWAKIM A. K, AND GOLDMAN, J. E., (1988), Astrocytes Regulate GFAP mRNA Levels by Cyclic AMP and Protein Kinase C-Dependent Mechanism. *Glia*, **1**, 346-354.

ZAR, H. H., (1984), Biostatistical Analysis. **Second Ed.** Prentice-Hall, New Jersey, USA.

. . . . .