

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PERFIL ONTOGENÉTICO DA TRANSCRIÇÃO DE  
SUBUNIDADES DO RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO  
(NMDA) EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS

Hugo Bock

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Porto Alegre, novembro de 2009.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Identificação Genética do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o apoio do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética Médica também do HCPA e do Laboratório 26 do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA (FIPE-HCPA).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à pessoa que orientou este mestrado, professora Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira. Responsável direta por minha trajetória acadêmica e profissional há alguns anos; entre conversas, discussões e cumplicidade, me mostrou a importância de fazer esta pós-graduação. Agradeço muito, por tudo.

Agradeço aos professores, colegas, Comissão de Pós-Graduação e secretários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS por ter me proporcionado tanto aprendizado e experiência.

Agradeço aos professores membros da comissão de acompanhamento Dr. Giancarlo Pasquali e Dr. Rogério Margis pelas sugestões e pela compreensão.

Agradeço ao pessoal do Laboratório 26 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, especialmente aos professores Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza e Dr. Luiz Valmor Cruz Portela, pelo apoio e pelas conversas esclarecedoras; e à Msc. Júlia Dubois Moreira, pela disposição em ajudar na coleta das amostras.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Identificação Genética, especialmente à Fernanda, Marina, Mariana, Vanessa, Tailise, Gabizinha e Gabriel Furtado pelo companheirismo, incentivo, convivência e amizade, e ao Hemilliano de Lemos que teve um papel fundamental na coleta das amostras do mestrado do “tiozão”.

Agradeço a todos do Serviço de Genética Médica do HCPA, secretárias, colegas do LBM, professores e amigos, principalmente ao Dr. Júlio César Loguercio Leite, exemplo de profissional e de pessoa, e à Thais Stanoski Santa Rita pelo convívio e pelas conversas descontraídas regadas a café. Aos colegas do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Ingrid e Lili, obrigado pela amizade e pelas risadas.

Agradeço à minha família, pelo apoio e compreensão recebidos durante todos os anos de minha vida e, principalmente, no período de realização deste mestrado.

Agradeço à Cristiane Bohnen, uma companheira especial que sempre acreditou em mim e me incentivou durante o mestrado, que suportou meu nervosismo e irritação, e ouviu meus desabafos. Meu amor a ela.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	05
RESUMO .....	07
ABSTRACT .....	08
1. INTRODUÇÃO .....	09
1.1 Glutamato e sistema glutamatérgico .....	09
1.2 Receptores glutamatérgicos .....	10
1.3 Receptor glutamatérgico ionotrópico tipo NMDA .....	12
1.4 Subunidades do receptor glutamatérgico ionotrópico tipo NMDA .....	14
1.4.1 Subunidade 1 [Grin1 – Subunidade 1 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato ( <i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 1</i> )] .....	14
1.4.2 Subunidade 2 [Grin2 – Subunidade 2 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato ( <i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2</i> )] .....	15
1.4.3 Subunidade 3 [Grin3 – Subunidade 3 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato ( <i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 3</i> )] .....	17
1.5 Aspectos moleculares .....	17
2 OBJETIVOS .....	20
2.1 Objetivo geral .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
3 ARTIGO CIENTÍFICO .....	21
4 CONCLUSÃO .....	60
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
ANEXO I – MINI CURRÍCULO .....	66

## ABREVIATURAS

AMPA – ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

AMPARs – receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

ATP – adenosina tri-fosfato

BDNF – fator neurotrófico derivado de cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*)

CDK5 – cinase dependente de ciclina 5 (*cyclin-dependent kinase 5*)

CREB – proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP-cíclico (*cAMP response element-binding protein*)

Gapdh – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Gln – glutamina

Glu – glutamato

GluRs – receptores de glutamato ou receptores glutamatérgicos

Grin1 – Subunidade 1 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 1*)

Grin2A – Subunidade 2A do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2A*)

Grin2B – Subunidade 2B do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2B*)

Grin2C – Subunidade 2C do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2C*)

Grin2D – Subunidade 2D do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2D*)

Grin3A – Subunidade 3A do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 3A*)

Grin3B – Subunidade 3B do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 3B*)

iGluRs – receptores glutamatérgicos ionotrópicos

KA – cainato

KARs – receptores cainato

LTD – depressão de longa duração (*long-term depression*)

LTP – potenciação de longa duração (*long-term potentiation*)

mGluRs – receptores glutamatérgicos metabotrópicos

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMDARs – receptores N-metil-D-aspartato

NMDARs-Grin1 – receptores N-metil-D-aspartato com a subunidade Grin1

NMDARs-Grin2A – receptores N-metil-D-aspartato com a subunidade Grin2A

NMDARs-Grin2B – receptores N-metil-D-aspartato com a subunidade Grin2B

NMDARs-Grin2C – receptores N-metil-D-aspartato com a subunidade Grin2C

NMDARs-Grin3A – receptores N-metil-D-aspartato com a subunidade Grin3A

NMDARs-Grin3B – receptores N-metil-D-aspartato com a subunidade Grin3B

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

SNC – sistema nervoso central

## RESUMO

O glutamato (Glu) é o neurotransmissor excitatório mais abundante do sistema nervoso central e está envolvido em funções cerebrais como aprendizado/memória, desenvolvimento e envelhecimento cerebral. Mudanças na vulnerabilidade neuronal durante o desenvolvimento pós-natal podem ser parcialmente explicadas por mudanças na expressão das subunidades de receptores de Glu (GluRs). O objetivo desse trabalho foi determinar o padrão de expressão das subunidades de GluRs do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) em quatro estruturas cerebrais (cerebelo, córtex, estriato e hipocampo) em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal de ratos por quantificação relativa por PCR em tempo real. Mudanças significativas na expressão de Grin1 foram observadas em quase todas as estruturas em relação aos níveis pós-natais de expressão. Níveis de expressão de Grin2A foram menores no cerebelo com um padrão de aumento gradual e níveis elevados na vida adulta no córtex e no hipocampo. A expressão do Grin2B demonstrou um padrão decrescente no cerebelo assim como no hipocampo. Por outro lado, o padrão de expressão de Grin2C mostrou uma tendência a aumentar nas quatro estruturas, a qual foi mais evidente no cerebelo com um aumento significativo nos níveis de expressão. O padrão de expressão do Grin2D foi também caracterizado por uma tendência para uma diminuição nos níveis de expressão pela vida adulta. Essa tendência foi mais evidente no cerebelo e no hipocampo. Expressões de Grin3A e Grin3B não demonstraram uma tendência específica. No caso de Grin3B, níveis semelhantes de expressão foram observados com a exceção de um pico de expressão no cerebelo de ratos de 10 dias. Os dados obtidos nesse estudo permitiram-nos introduzir novos aspectos na área de expressão de GluRs e poderão contribuir para desvendar potenciais alvos para o desenvolvimento de terapias mais efetivas para muitas doenças.

## ABSTRACT

Glutamate (Glu) is the most abundant excitatory neurotransmitter of the central nervous system and is involved in cerebral functions such as learning/memory, development, and cerebral aging. The changes in vulnerability of neurons during postnatal development can be partially explained by changes in expression of glutamate receptors subunits (GluRs). In this work, we aimed to determine expression profile of ionotropic N-methyl-D-aspartate (NMDA) GluR subunits in four brain structures (cortex, cerebellum, striatum and hippocampus) in different stages of postnatal rat development by relative quantification real-time PCR using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) as endogenous control. Significant changes in Grin1 expression were demonstrated in almost each age from all structures in relation to the initial postnatal expression level. Levels of expression of Grin2A were lower in cerebellum with a gradual raising pattern and high levels in adulthood in cortex and hippocampus. Grin2B expression levels were found to show a decreasing pattern in cerebellum as well as in hippocampus. Conversely, Grin2C expression pattern was found to show an increasing tendency in all four brain structures being more evident in cerebellum with significantly high expression levels. Expression profile of Grin2D was also characterized by a tendency to a drop in expression levels throughout adulthood. This tendency was well defined mainly in cerebellum and in hippocampus. Grin3A and Grin3B expression were found to show a non specific tendency. In the case of Grin3B, even levels of expression were seen with a marked exception of a peak in expression in cerebellum of 10-days old rats. Data generated in this study brings new insight in the field of GluRs expression and might contribute to unmask potential targets for the development of more effective therapies for many disorders.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Glutamato e o sistema glutamatérgico

O glutamato (Glu) é o neurotransmissor excitatório mais abundante do sistema nervoso central (SNC) e está envolvido em várias funções cerebrais, como aprendizado/memória, desenvolvimento e envelhecimento cerebral (Ozawa et al, 1998; Danbolt, 2001; Segovia et al, 2001). O Glu não atravessa a barreira hemato-encefálica, ele é sintetizado e armazenado em neurônios e células gliais. O Glu pode ser sintetizado de duas formas: (1) a partir da glicose do Ciclo de Krebs, por transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato, e (2) diretamente a partir de glutamina (Gln) (Dingledine & McBain, 1999). A Gln produzida na glia é transportada para os terminais nervosos, sendo então convertida em Glu pela enzima glutaminase. Dentro dos terminais nervosos, o Glu é transportado para o interior das vesículas sinápticas através de um processo dependente de  $Mg^{2+}$  e ATP e sua concentração pode chegar a 100 mM (Greene & Greenamyre, 1999; Meldrum, 2000).

O Glu participa da transmissão sináptica normal, bem como da potenciação de longa duração (*long-term potentiation* - LTP) e da depressão de longa duração (*long-term depression* - LTD) (Debane et al., 2003). A transmissão glutamatérgica também está envolvida com a maturação e com o desenvolvimento do SNC dos mamíferos, participando do aparecimento de novas sinapses, da modulação da intensidade de sinapses existentes e do desaparecimento de sinapses, tendo, assim, um papel importantíssimo na plasticidade sináptica responsável pelo aprendizado, memória, comportamento e cognição (Genoux & Montgomery, 2007).

A liberação excessiva de Glu pode causar uma excitotoxicidade nos neurônios, levando até a morte celular. Essa liberação excessiva é causada por um desbalanço energético do metabolismo resultando em uma diminuição do suprimento de oxigênio, que leva a uma depleção nos suprimentos de ATP. Dessa maneira, as células não conseguem restabelecer seu potencial de membrana, ocorrendo uma liberação exagerada de Glu na fenda sináptica que ativa os receptores glutamatérgicos (GluRs), aumenta o influxo de íons cálcio para o citoplasma e causa a liberação de radicais livres de oxigênio aumentando o dano celular, podendo levar à morte (Dingledine et al., 1999).

Deficiências no sistema glutamatérgico, por ativação excessiva ou deficiente dos receptores, podem ser causadas por várias desordens cerebrais, tanto agudas (como hipóxia, isquemia, convulsão e trauma) quanto crônicas (como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose amiotrófica lateral e epilepsia) (Choi, 1988; Ozawa et al., 1998; Danbolt, 2001; Maragakis & Rothdtein, 2004; Sheldon & Robinson, 2007).

## **1.2 Receptores glutamatérgicos**

Os GluRs são os receptores de neurotransmissores excitatórios mais predominantes no SNC de mamíferos, sendo ativados por uma variedade enorme de processos neurofisiológicos normais. O Glu, após ser liberado das vesículas dos terminais pré-sinápticos, chega aos GluRs dos astrócitos e dos neurônios pós-sinápticos e pode gerar respostas rápidas, lentas ou persistentes na transmissão do sinal (Simeone et al., 2004). Os GluRs são divididos em duas classes: os metabotrópicos (mGluRs) e os ionotrópicos (iGluRs).

Os mGluRs são aqueles que, quando ativados, geram uma resposta mediada por proteínas G e sistemas de segundos mensageiros, ou seja, uma resposta lenta (Conn & Pin, 1997).

Os iGluRs são assim denominados, pois, quando ativados, abrem um canal iônico na membrana permitindo um influxo de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , despolarizando neurônios e astrócitos e, conseqüentemente, gerando uma resposta rápida. Eles são classificados com base na sua ativação por diferentes agonistas farmacológicos. Eles são denominados receptores tipo NMDA quando o agonista é o N-metil-D-aspartato. Os receptores tipo não-NMDA, incluem os receptores AMPA (AMPA), cujo agonista é o ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico, e os receptores KA (KARs), cujo agonista é o cainato (Bressan & Pilowski, 2003).

Apesar dos NMDARs terem uma afinidade por Glu cerca de 500 vezes maior do que os AMPARs e KARs, eles contribuem pouco para a transmissão sináptica basal, pois o  $\text{Mg}^{2+}$  exerce um bloqueio dependente de voltagem no canal iônico. Entretanto, após uma despolarização mais intensa da membrana, quando os AMPARs e KARs já foram sensibilizados, os NMDARs contribuem significativamente para a transmissão sináptica (Nowak et al., 1984). No hipocampo, por exemplo, os AMPARs e NMDARs podem interagir com a enzima  $\alpha$ -cinase dependente de cálcio e calmodulina tipo II ( $\alpha$ -CaMKII) atuando na modulação da memória e na LTP, considerado um modelo das bases celulares e moleculares da memória (Lisman et al., 2002).

Todos os subtipos de GluRs têm um papel importante na excitotoxicidade e a vulnerabilidade dos neurônios muda durante o desenvolvimento pós-natal o que pode ser devido a alterações na expressão das subunidades desses receptores (McDonald et al., 1988; McDonald et al., 1992). Alguns estudos demonstraram que a distribuição cerebral

dos GluRs varia conforme a estrutura cerebral e a idade dos animais. No córtex cerebral e no hipocampo há mais NMDARs desde o início do período pós-natal, com desenvolvimento subsequente dos receptores do tipo não-NMDA (Insel et al., 1990; Brennan et al., 1997; Petralia et al., 1999). Entretanto, o estriato mostra uma tendência oposta em que as respostas sinápticas provocadas pelo Glu no período pós-natal são mediadas por receptores do tipo não-NMDA e a maturação dos NMDARs ocorre mais tarde (Colwell et al., 1998; Nansen et al., 2000; Villares & Stavale, 2001; Lilliu et al., 2001).

### **1.3 Receptor glutamatérgico ionotrópico tipo NMDA**

Os GluRs tipo NMDA estão distribuídos por todo o SNC, sendo que a maioria está localizada em dendritos pós-sinápticos. Entretanto, eles são também encontrados em astrócitos corticais e botões pré-sinápticos como auto-receptores ou hetero-receptores (Conti, 1997). Os NMDARs sinápticos e extra-sinápticos tem efeitos opostos na função da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP-cíclico (*cAMP response element-binding protein* – CREB), na regulação gênica e na sobrevivência neuronal. A entrada de cálcio pelos receptores NMDA sinápticos induz a ativação de CREB e aumenta a expressão do fator neurotrófico derivado de cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF). Por outro lado, quando o cálcio entra pelos NMDARs extra-sinápticos, a via da CREB é desligada, bloqueando a expressão de BDNF. A estimulação dos NMDARs sinápticos contribuem para uma atividade anti-apoptótica, enquanto que a estimulação de NMDARs extra-sinápticos causa a perda do potencial de membrana de mitocôndrias e morte celular (Hardingham et al., 2002).

Os NMDARs estão associados a várias funções e mecanismos de desenvolvimento do SNC pré e pós-natal, incluindo diferenciação celular, crescimento, migração e proliferação de axônios e degeneração de neurônios que não são mais usados (Ikonomidou et al., 1999; Ikonomidou et al., 2001). Os NMDARs têm um papel importante na plasticidade sináptica referente ao aprendizado e memória e são alvos de fármacos usados em terapias relacionadas ao manejo da dor e de doenças neurológicas (Lalonde & Joyal, 1993).

A ativação deficiente ou excessiva desses receptores está relacionada com alterações do desenvolvimento normal do SNC (Lalonde & Joyal, 1993). A morte neuronal devido à excitotoxicidade observada após traumatismo craniano, eventos isquêmicos, hipóxia e hipoglicemia está relacionada a uma ativação excessiva dos NMDARs (Choi, 1988).

Os NMDARs são canais iônicos com grande permeabilidade a íons  $\text{Ca}^{2+}$ . No potencial de repouso, os NMDARs permanecem bloqueados de forma dependente de voltagem por íons  $\text{Mg}^{2+}$  e, para que os receptores sejam ativados, é necessário que haja uma despolarização de membrana com a remoção do  $\text{Mg}^{2+}$  e ligação do agonista endógeno Glu e do co-agonista glicina, ou D-serina, a sítios específicos (Johnson & Ascher, 1987; Gasic & Hollmann, 1992; Seeburg et al., 1994; Sucher et al., 1996; Mothet et al., 2000). A estimulação do sítio da glicina nos NMDARs inicia a sinalização do complexo NMDA e parece ser responsável pela modulação da comunicação célula-célula através da transdução do sinal transmembrana (Nong et al., 2003).

Um NMDARs funcional é um complexo heteromultimérico composto por uma combinação de subunidades que são codificados por uma família gênica: Grin1, Grin2A,

Grin2B, Grin2C, Grin2D, Grin3A e Grin3B, sendo que, a subunidade Grin1 está sempre presente (Monyer et al., 1992; Lynch et al., 1994; Pérez-Otaño et al., 2001).

#### **1.4 Subunidades do receptor glutamatérgico ionotrópico tipo NMDA**

##### 1.4.1 Subunidade 1 [Grin1 – Subunidade 1 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 1*)]

A subunidade 1 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (Grin1) apresenta o sítio de ligação específico do co-agonista glicina do NMDAR. Camundongos que expressam somente 5% dos níveis normais de Grin1 sobrevivem até a idade adulta, mas apresentam comportamento anormal, incluindo aumento da atividade motora e diminuição de interação social e sexual. Esse comportamento anormal é semelhante ao observado em modelos animais de esquizofrenia, que melhoram quando tratados com haloperidol ou clozapina (Mohn et al., 1999).

A expressão transgênica aumentada de Grin1 por um período de 5 meses em ratos foi associada com uma forte atividade anti-epiléptica e neuroprotetora, sugerindo um potencial terapêutico para doenças neurológicas (During et al., 2000).

Por meio da aplicação de técnica nocaute, a função do NMDAR foi induzida e revertida na região CA1 do hipocampo durante o período de consolidação da memória. Dessa forma, foi demonstrado que a consolidação da memória depende da reativação de NMDARs e que a região CA1 do hipocampo é essencial para converter memórias novas em memórias de longo prazo, um processo que continua por semanas depois da aquisição da memória (Shimizu et al., 2000).

Camundongos em que a função do NMDAR-Grin1 pode ser induzida ou cessada por nocaute especificamente no córtex frontal perderam a capacidade de reter a memória nessa região, sugerindo que a presença de Grin1 também é importante no processo de retenção da memória (Cui et al., 2004). Camundongos nocaute para Grin1 mostraram interrupção da LTP na parte dorsal do estriato e da LTD na parte ventral do estriato, sugerindo que o estriato está envolvido em um sub-sistema de aprendizado motor (Deng et al., 2006).

#### 1.4.2 Subunidade 2 [Subunidade 2 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2*)]

Este grupo é composto por quatro subunidades: Grin2A, Grin2B, Grin2C e Grin2D. Estas subunidades apresentam o sítio de ligação específico para o agonista Glu do NMDAR. Grin2A, Grin2B, Grin2C e Grin2D têm distribuição, regulação e propriedades funcionais diferentes, o que provavelmente explica a heterogeneidade funcional dos NMDARs.

A inibição preferencial de NMDARs com Grin2A (NMDARs-Grin2A) no hipocampo impediu a LTP, mas não a LTD. Por outro lado, inibindo seletivamente os NMDARs-Grin2B, a LTD foi inibida e a LTP não foi afetada, demonstrando, assim, que as diferentes subunidades têm um papel crítico na polaridade da plasticidade sináptica (Liu *et al.*, 2004).

O aumento da atividade do NMDAR foi obtido pela fosforilação do resíduo ser1232 nos NMDARs-Grin2A pela ativação da cinase dependente de ciclina 5 (*cyclin-dependent kinase 5* – CDK5). Quando CDK5 é inibida ou sua interação com NMDARs-

Grin2A cessa, ocorre uma proteção das células piramidais na região CA1 do hipocampo em um evento isquêmico (Wang et al., 2003).

Modelos animais nocaute para Grin2A são viáveis, mas apresentam plasticidade hipocampal prejudicada (Sakimura et al., 1995). Modelos animais que expressam NMDARs-Grin2A sem o domínio C-terminal intracelular também são viáveis, mas apresentam memória contextual e plasticidade sináptica prejudicada (Sprengel et al., 1998).

Mudanças no nível da expressão relativa de NMDAR-Grin2A e NMDAR-Grin2B podem regular a amplitude do pico do potencial pós-sináptico excitatório modulando, assim, a eficiência da plasticidade sináptica. A probabilidade de abertura de canal em células renais embrionárias que expressam NMDARs-Grin2A é quatro vezes maior do que em células renais embrionárias que expressam NMDARs-Grin2B (Chen et al., 1999). O aumento da expressão de Grin2B é importante na manutenção da LTP em hipocampo de ratos (Thomas et al., 1999).

Modelos animais nocaute para Grin2B e modelos animais que expressam NMDARs-Grin2B sem o domínio C-terminal intracelular morrem no período perinatal (Kutsuwada et al., 1996; Sprengel et al., 1998).

Camundongos transgênicos para o gene Grin2B mostraram um aumento significativo da sua expressão no córtex e no hipocampo e pouca expressão no tálamo, tronco e cerebelo. Em testes de comportamento, como o de reconhecimento de novos objetos, de medo condicionado e de memória espacial, esses camundongos transgênicos tiveram um melhor desempenho sugerindo uma possível melhora genética dos atributos mentais e cognitivos (Tang et al., 1999).



Modelos animais nocaute para Grin2C não mostraram nenhuma deficiência aparente e modelos animais que expressam NMDARs-Grin2C sem o domínio C-terminal intracelular são viáveis, mas apresentavam deficiência na coordenação motora (Kadotani et al., 1996; Sprengel et al., 1998).

Modelos animais nocaute para Grin2D não mostraram nenhuma deficiência aparente nos testes de ansiedade e de atividade motora, mas mostraram uma atividade espontânea reduzida no teste de campo aberto (Ikeda et al., 1995).

#### 1.4.3 Subunidade 3 [Subunidade 3 do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato (*Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 3*)]

Este grupo é composto por duas subunidades: Grin3A e Grin3B. Estas subunidades apresentam o sítio de ligação específico do co-agonista glicina do NMDAR.

NMDARs-Grin3A encontram-se distribuídos por todo o SNC, mas os NMDARs-Grin3B são expressos predominantemente em neurônios motores. Os NMDARs que são compostos exclusivamente por Grin1 (essencial para a funcionalidade do receptor) e por Grin3A ou Grin3B formam NMDARs diferentes dos convencionais. Esses receptores têm como agonista a glicina e não são ativados por Glu nem por NMDA, já que estas subunidades são sítios específicos para glicina. Os NMDARs-Grin3A e NMDARs-Grin3B são praticamente impermeáveis ao cálcio e suas funções, apesar de contraditórias, são as mesmas de um receptor excitatório de glicina (Chatterton et al., 2002).

### 1.5 Aspectos moleculares

O gene que codifica a subunidade Grin1 em ratos (NM\_017010), a qual apresenta o sítio de ligação específico para o co-agonista glicina do NMDAR, está

localizado no cromossomo 3 na região p13. A proteína é composta por 938 aminoácidos e apresenta 99% de identidade com humanos (Karp et al., 1993). O gene está organizado em 21 exons distribuído por aproximadamente 26 kilobases (kb). Três exons (4, 20 e 21) sofrem *splicing* alternativo e produzem 8 isoformas diferentes em ratos e estas sequências estão presentes em humanos (Zimmer et al., 1995).

O grupo da subunidade 2 é composto por quatro genes: Grin2A, Grin2B, Grin2C e Grin2D. Estas subunidades apresentam o sítio de ligação específico do agonista Glu do NMDARs. O gene que codifica a subunidade Grin2A (NM\_012573) está localizado no cromossomo 10 na região q11. A proteína é composta por 1464 aminoácidos e apresenta uma maior taxa de evolução em primatas do que em roedores (Hess et al., 1996; Dorus et al., 2004). O gene que codifica a subunidade Grin2B (NM\_012574) está localizado no cromossomo 4 na região q43. A proteína é composta por 1482 aminoácidos e apresenta 98% de identidade com humanos (Hess et al., 1996). O gene que codifica a subunidade Grin2C (NM\_012575) está localizado no cromossomo 10 na região q32.2. A proteína é composta por 1250 aminoácidos e apresenta 88% de identidade com humanos (Lin et al., 1996). O gene que codifica a subunidade Grin2D (NM\_022797) está localizado no cromossomo 1 na região q22. A proteína é composta por 1323 aminoácidos e apresenta 95% de identidade com humanos (Hess et al., 1998).

O grupo da subunidade 3 é composto por dois genes: Grin3A e Grin3B. O gene que codifica a subunidade Grin3A (AF073379) está localizado no cromossomo 5, região q22. A proteína é composta por 1115 aminoácidos e apresenta 92,7% de identidade com humanos (Andersson et al., 2001). O gene que codifica a subunidade Grin3B (NM\_133308) está localizado no cromossomo 7, região q11, e a proteína é composta por 1002 aminoácidos.

A partir do isolamento dos genes responsáveis pela síntese de proteínas formadoras dos NMDARs, vários estudos foram realizados em modelos animais de estados patológicos mostrando a importância dos NMDARs no SNC. Esses receptores estão envolvidos em várias funções do SNC, desde a vida embrionária até a morte neuronal. Esta diversidade de funções pode ser parcialmente explicada pela composição das subunidades presentes no receptor funcional. Alguns dados apontam para disfunções neurológicas e doenças psiquiátricas quando uma ou mais subunidades estão ausentes ou super-expressas. Um dos desafios da neurociência é a melhor compreensão da organização dos NMDARs durante o desenvolvimento normal do ser humano e como eles podem estar alterados em estados patológicos. Portanto, parece importante o estabelecimento do perfil de transcricional desses genes em animais de diversas idades.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Determinar o perfil de expressão das subunidades do NMDAR em diferentes estruturas cerebrais de ratos de diferentes idades do desenvolvimento.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Avaliar a expressão dos genes Grin1, Grin2A, Grin2B, Grin2C, Grin2D, Grin3A e Grin3B no cerebelo, no córtex, no estriato e no hipocampo de ratos de diferentes idades por quantificação relativa;

- Determinar o perfil de expressão desses genes nos diferentes períodos de desenvolvimento nas diferentes estruturas cerebrais e comparar os resultados obtidos com os dados encontrados na literatura.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à revista *Neuroscience*.

## **Gene Expression Ontogeny of N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptor Subunits in Rat Brain Structures**

Hugo Bock<sup>1,2</sup>, Hemilliano de Lemos<sup>1,3</sup>, Júlia Dubois Moreira<sup>3</sup>, Diogo Onofre Gomes de Souza<sup>3</sup>, Luiz Valmor Cruz Portela<sup>3</sup>, Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>1,2,3,\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Identificação Genética - Centro de Pesquisas e Serviço de Genética Médica - HCPA;

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia – UFRGS;

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica – UFRGS.

\*Corresponding author: Maria Luiza Saraiva-Pereira - mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, Brazil.

Section Editor: **Molecular Neuroscience**: L. Kaczmarek, Dept. of Molecular and Cellular Neurobiology, Nencki Institute of Experimental Biology, ul. Pasteura 3, 02-093 Warsaw, Poland.

## **List of abbreviations**

Glu – glutamate

LTP – long-term potentiation

GluRs – glutamate receptors

NMDA – N-methyl-D-aspartate

Grin – glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate

RT – reverse transcriptase

qPCR – quantitative real-time PCR

EPSCs – excitatory postsynaptic currents

## **Abstract**

Glutamate (Glu) is the most abundant excitatory neurotransmitter of the central nervous system and is involved in cerebral functions such as learning/memory, development, and cerebral aging. The changes in vulnerability of neurons during postnatal development can be partially explained by changes in expression of glutamate receptors subunits (GluRs). In this work, we aimed to determine expression profile of ionotropic NMDA GluR subunits in four brain structures (cortex, cerebellum, striatum and hippocampus) in different stages of postnatal rat development by relative quantification real-time PCR using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) as endogenous control. Significant changes in Grin1 expression were demonstrated in almost each age from all structures in relation to the initial postnatal expression level. Grin2A levels of expression were lower in cerebellum with a gradual raising pattern and high levels in adulthood in cortex and hippocampus. Grin2B expression levels were found to show a decreasing pattern in cerebellum as well as in hippocampus. Conversely, Grin2C expression pattern was found to show an increasing tendency in all four brain structures being more evident in cerebellum with significantly high expression levels. Expression profile of Grin2D was also characterized by a tendency to a drop in expression levels throughout adulthood. This tendency was well defined mainly in cerebellum and in hippocampus. Grin3A and Grin3B expression were found to show a non specific tendency. In the case of Grin3B, even levels of expression were seen with a marked exception of a peak in expression in cerebellum of 10-days old rats. Data generated in this study brings new insight in the field of GluRs expression and might contribute to unmask potential targets for the development of more effective therapies for many disorders.

Key words: quantitative real-time PCR; NMDA glutamate receptor; mRNA expression; rat brain.



Glutamate (Glu) is the most abundant excitatory neurotransmitter of the central nervous system (CNS) and is involved in cerebral functions such as learning/memory, development and cerebral aging (Ozawa et al., 1998; Danbolt, 2001; Segovia et al., 2001). Glu participates of the normal synaptic transmission as well as of long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Debane et al., 2003). The glutamatergic transmission is involved with maturation and development of mammals CNS (Genoux and Montgomery, 2007) and may also be a potent neurotoxin, being able to produce neuronal death (Dingledine et al., 1999). Deficiencies in glutamatergic system can be caused by some cerebral clutters like hypoxia, ischemic stroke, convulsion and trauma, and by some diseases like Parkinson, Alzheimer, Huntington, lateral amyotrophic sclerosis and epilepsy (Choi, 1988; Ozawa et al., 1998; Danbolt, 2001; Maragakis and Rothdtein, 2004; Sheldon and Robinson, 2007).

Glutamate receptors (GluRs) can generate fast, slow or persistent answers when activated (Simeone et al., 2004). GluRs are divided into two classes: the metabotropic GluRs and the ionotropic GluRs (Conn and Pin, 1997). Three classes of ionotropic GluRs have been identified in the CNS: the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, the kainic acid (KA) receptor, and the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionate (AMPA) receptor (Dingledine et al., 1999; Meldrum, 2000).

NMDA GluRs are ionic channels with great permeability of  $\text{Ca}^{2+}$ . They require membrane depolarization to remove  $\text{Mg}^{2+}$ , linking the endogenous agonist Glu and co-agonist glicine or D-serine to specific small sites to activate the receptor (Johnson and Ascher, 1987; Gasic and Hollmann, 1992; Seeburg et al., 1994; Sucher et al., 1996; Mothet et al., 2000).

A functional NMDA GluRs is a heterodimeric complex for a combination of subunits that are codified by a glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate (Grin) gene family, composed by 7 subunits: Grin1, Grin2A, Grin2B, Grin2C, Grin2D, Grin3A, and Grin3B, being that the subunit Grin1 is an mandatory component (Monyer et al., 1992; Lynch et al., 1994; Pérez-Otaño et al., 2001).

All GluRs subtypes play an important role in excitotoxicity and change in vulnerability of neurons during the postnatal development can be partially explained by alterations in expression of these receptors subunits (McDonald et al., 1988, 1992). Studies demonstrate that GluRs cerebral distribution varies in different cerebral structures and ages of animals. More NMDA GluRs are found in cortex and hippocampus since the beginning of postnatal period with later development of non-NMDA GluRs types (Insel et al., 1990; Brennan et al., 1997; Petralia et al., 1999). However, an opposing pattern can be found in striatum where synaptic answers in postnatal period are mediated by non-NMDA GluRs and maturation of NMDA GluRs occurs at a late stage (Colwell et al., 1998; Nansen et al., 2000; Villares and Stavale, 2001; Lilliu et al., 2001).

The NMDA GluR plays an important role in CNS in different ways. Therefore, in order to contribute with additional knowledge on NMDA GluR, we have evaluated gene expression of subunits in four brain structures: cortex, cerebellum, hippocampus, and striatum in different stages of rat development.

## Experimental procedures

### Animals and structures

Four brain structures (cortex, cerebellum, hippocampus, and striatum) were isolated from 7 groups (10 animals per group) of male Wistar rats at different ages (2, 5, 10, 15, 30, 60, and 100 days). Due to the reduced size of striatum, this structure was not dissected from 2- and 5-days old rats. Animals were housed in an air-conditioned room (21-22°C) with 12 h dark-light cycle and food and water were offered *ad libitum*. Animals were decapitated and brains were rapidly removed and structures dissected. To stabilize and protect RNA, samples were submerged in RNAlater<sup>®</sup> (Ambion) and stored at 4°C overnight to allow the solution to thoroughly penetrate the tissue, then moved to -20°C for long term storage. All experiments were in agreement with the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, UFRGS, Brazil.

### RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using TRIreagent<sup>®</sup> solution (Ambion) according to manufacturer's protocol. RNA concentrations were evaluated using the fluorimetric method Quant-iT<sup>®</sup> RNA Assay (Invitrogen) in the Qubit<sup>™</sup> (Invitrogen) equipment. cDNA was synthesized by reverse transcription (RT) reaction using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The amount of isolated RNA used for RT reactions was 2 µg in a total reaction volume of 20 µl containing 2 µl of 10x RT buffer, 0.8 µl of dNTP 25x (100 mM), 2 µl of 10x RT Random Primers, and 1 µl of MultiScribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase (50 units/ml). Reactions were performed for 10 min at 25°C, 2 h at 37°C and terminated with 5 s at 85°C. Subsequently, cDNA was kept at - 20°C until used

for PCR amplification. A 1:5 dilution of cDNA solution was prepared in water before qPCR.

#### Quantitative real-time PCR (qPCR)

Messenger RNA expression was measured by qPCR using gene-specific TaqMan FAM/MGB inventoried assays (Applied Biosystems) (table 1). Expression values of the target gene was normalized by the expression of endogenous control glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) using TaqMan VIC/MGB endogenous control inventoried assay Rn9999916\_s1 (Applied Biosystems) (table 1). Reaction was carried out in an ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems)

Table 1 – Number of assay used in this study for relative quantification of each NMDAR subunit (Applied Biosystems).

<b>Gene</b>	<b>Assay number</b>
Grin1	Rn01436038_m1
Grin2A	Rn00561341_m1
Grin2B	Rn00561352_m1
Grin2C	Rn00561364_m1
Grin2D	Rn00575638_m1
Grin3A	Rn01448553_m1
Grin3B	Rn00591133_m1

Reaction was carried out in a total volume of 8  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of cDNA solution, 0.4  $\mu$ l of gene specific TaqMan assay, 0.4  $\mu$ l of endogenous control TaqMan assay and 4  $\mu$ l of 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems), that contains ROX, Amplitaq

Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, and MgCl<sub>2</sub>. Cycling program was 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Reactions were performed in triplicate.

Target transcripts relative expression levels were determined by the ddCt method according to Livak and Schmittgen (2001).

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed by SPSS 13.0 package for Windows (SPSS, Inc.) using ANOVA with *post hoc* by Bonferroni and correlational analysis with Bonferroni correction to control for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant for  $p < 0.05$ .

## Results

Transcriptional profile of each NMDA GluR subunit was determined in four cerebral structures. The relative expression was calculated by the method  $\Delta\Delta C_t$  with Gapdh as endogenous control. We have determined as calibrator the structure with lower expression level in 2-days old rats for cortex, cerebellum, and hippocampus.

Grin1 subunit mRNA expression in each structure at different ages

Results of Grin1 mRNA expression in each structure are shown in figure 1. Comparing all four structures we observed that cerebellum showed the lowest mRNA expression levels in general. High expression levels were observed in cortex in 15-days old rats and in striatum in 15- and 30-days old rats.

We have observed a statistically significant decrease in expression of this subunit from 2-days old rats to 5-days old rats in cerebellum. We have also shown that mean values of relative expression from all groups of rats when compared to 2-days old rats were statistically different ( $p < 0.005$ ), although two lower values were observed in 30- and 100-days old rats.

In cortex, Grin1 subunit mRNA expression was shown to be more variable. Expression levels of 5-days old rats were statistically lower than levels of 2-days old rats ( $p < 0.005$ ). On the other hand, a peak of expression was seen in 15-days old rats ( $p < 0.005$ ). High levels of expression were also observed in 30- and 100-days old rats.

Expression levels in striatum were much higher than levels in cerebellum and peaks of expression were demonstrated in 30- and 60-days old rats when compared to 10-days old rats ( $p < 0.005$ ).

In hippocampus, mRNA expression started at similar levels than those found in cerebellum, but statistically significant increase was observed from 10- to 15-days old rats ( $p < 0.005$ ). These levels were kept at similar values up to 100-days old rats.

#### Grin2A subunit mRNA expression in each structure at different ages

Results of Grin2A mRNA expression in each structure are shown in figure 2. Expression levels in cerebellum were several folds less than levels established in other studied structures.

Although Grin2A expression levels were shown to be variable in cerebellum, we can observe a pattern of a steady growth with age. Statistically significant differences were found in all groups of rats when compared to 2-days old rats. A decrease in expression was found from 2- to 5-days old rats ( $p < 0.005$ ) and increases were observed in all other ages.

In cortex, significant increase of Grin2A expression was observed in all ages ( $p < 0.005$ ), being gradual until the 10-days and a 5 times fold increase from 10- to 15-days old rats. Following that, a small reduction was seen up to 60-days with levels returning to similar values of 15-days at 100-days old rats.

A significant increase in Grin2A expression was also observed in striatum of rats of 10 to 60 days. A small fall in expression levels were seen from 60- to 100-days old rats. However, in all evaluated stages expression levels were statistically different from levels established for 10-days old rats.

Levels of expression of Grin2A in 2-, 5- and 10-days old rats were very similar in hippocampus. In this structure, expression levels from this subunit started to raise at 15 days with all levels being statistically higher than the expression level found at 2-days old rats ( $p < 0.005$ ).

Grin2B subunit mRNA expression in each structure at different ages

The overall results of Grin2B expression can be found in figure 3. We have also observed that expression levels in cerebellum were lower than expression levels observed of this subunit in other brain structures.

The expression profile of Grin2B in cerebellum suffer a statistically significant reduction in 5-days old rats when compared to 2-days old rats ( $p < 0.005$ ). From that, expression levels showed slight variations until 15 days. Following that, a drastic fall in Grin2B expression levels was observed from 15- to 30-days old rats, in order of 8 times. After that, small variations were shown with no significant differences.

In cortex, Grin2B expression started at a higher level in 2-days old rats when comparing to levels of this gene in cerebellum. We have then observed a statistically significant increase in Grin2B levels in 5-days old rats and these values remains very similar in 10-days old rats ( $p < 0.05$ ). These levels have suffered a significant increase in 15-days old rats ( $p < 0.005$ ). In the following ages studied (30- and 60-days old rats), a decrease in these levels were seen and a return to levels similar to those detected in 10 and 15 days were observed in 100-days old rats.

High levels of Grin2B expression was seen in 10-days old rats and these levels drastically reduced in the other ages included in this study. Although variations were detected all these levels were statistically different from that determined in 2-days old rats.

In hippocampus, expression was observed to be high in 2-days old rats and a statistically significant reduction was already seen in 5-days old rats ( $p < 0.005$ ). After that, a great reduction was also seen in 10-days old rats and levels were kept at similar values until 100-days old rats.



## Grin2C subunit mRNA expression in each structure at different ages

Results of Grin2C expression can be found in figure 4. We have seen a different expression profile of this gene in cerebellum as described below. Another diverse feature of this gene expression profile was the enormous variation in magnitude order of expression when data was normalized to Gapdh levels.

Low Grin2C expression levels were observed in 2- and 5-days old rats in cerebellum when compared to extremely high levels of expression in 100-days old rats. Grin2C expression levels at this age were by far the highest established in this study having Gapdh as endogenous control to normalize the raw data.

In cortex, Grin2C expression levels also rose drastically in 10-days old rats ( $p < 0.005$ ) and an even higher increase was seen in 15-days old rats ( $p < 0.005$ ). From that stage, drop in expression levels was detected in 30-days old rats and similar levels were observed from that age until 100-days old rats.

Grin2C expression levels in striatum demonstrated statistically significant increase from 10- to 15-days old rats ( $p < 0.005$ ). Another increase in expression levels was observed in 30-days old rats and similar levels were seen in 60- and 100-days old rats.

Grin2C expression levels in hippocampus demonstrated statistically significant increase from 2- to 5-days old rats ( $p < 0.005$ ). An even higher increase was observed in 10-days old rats and in 15-days old rats with similar magnitude order. After that, fluctuations in expression levels were detected but all statistically different from Grin2C expression levels in 2-days old rats.

## Grin2D subunit mRNA expression in each structure at different ages

Results of Grin2B expression can be found in figure 5. Considering this gene expression, we have detected high expression levels in cerebellum at early ages when compared to other brain structures included in this study.

Expression of Grin2D had initiated at high levels in 2- and 5-days old rats in cerebellum and a statistically significant reduction was noted in 10-days old rats ( $p < 0.005$ ). Expression levels continued to fall in the following ages up to 100-days old rats, where we have detected expression levels 25 times less than in 2-days old rats.

In cortex, slight changes in Grin2D expression levels increase were seen from 2-days old rats until 15-days old rats. Then a statistically significant fall in expression levels was detected in 30-days old rats ( $p < 0.005$ ) and these levels remain very similar until the last group included in this study (100-days old rats).

Grin2D expression levels in striatum were similar from 10- to 60-days old rats when a drop in expression levels was observed in 100-days old rats ( $p < 0.005$ ).

Profile of expression in hippocampus were demonstrated to be similar in 2- and 5-days old rats and a statistically significantly drop in these levels was detected in 10-days old rats ( $p < 0.005$ ). Following that, levels remain low and different from those at 2-days old rats.

#### Grin3A subunit mRNA expression in each structure at different ages

Grin3A expression profile is shown in figure 6. In general, expression of this gene was variable in brain structures analyzed with higher levels observed mainly in hippocampus.

In cerebellum, expression of Grin3A was found to be similar at 2-, 5- and 10-days old rats. Then a significant fall in levels of expression became evident and these levels were found to be alike until group of 100-days old rats ( $p < 0.005$ ).

Grin3A expression in cortex was found to rise abruptly from 2-days old rats to 5-days old rats ( $p < 0.005$ ). Then, expression levels showed a slight drop in 10-days old rats and a more clear decrease was seen in 15-days old rats, where levels were back to the initial rates. Subsequently, Grin3A expression levels drop even further and remain similar until 100-days old rats.

Expression of Grin3A was shown to be similar in the groups of 10- and 15-days old rats in striatum. Then levels of expression reduced in 30-days old rats ( $p < 0.005$ ) and went back up in 60-days rats. However, another reduction was detected in animals that were 100-days old ( $p < 0.005$ ).

In hippocampus, levels of expression were high in rats of 2 days and an important reduction was observed from 5-days old rats to 10-days old rats ( $p < 0.05$ ). After that, an even higher drop in expression levels was seen in 15-day old rats that remain steady until 100-days old rats.

#### Grin3B subunit mRNA expression in each structure at different ages

Finally, Grin 3B levels of expression profile are shown in figure 7. This gene showed low levels of expression in general, with few peaks of expression in cerebellum and striatum as outlined below.

In cerebellum, expression of Grin3B was seen to be similar in 2- and 5-days old rats and a significant increase was observed in 10-days old rats ( $p < 0.005$ ). These levels

drop again in 15-days old rats and drop even further in 30- and 60-days old rats ( $p < 0.005$ ). In 100-days old rats Grin3B levels of expression went back up as can be seen in the figure.

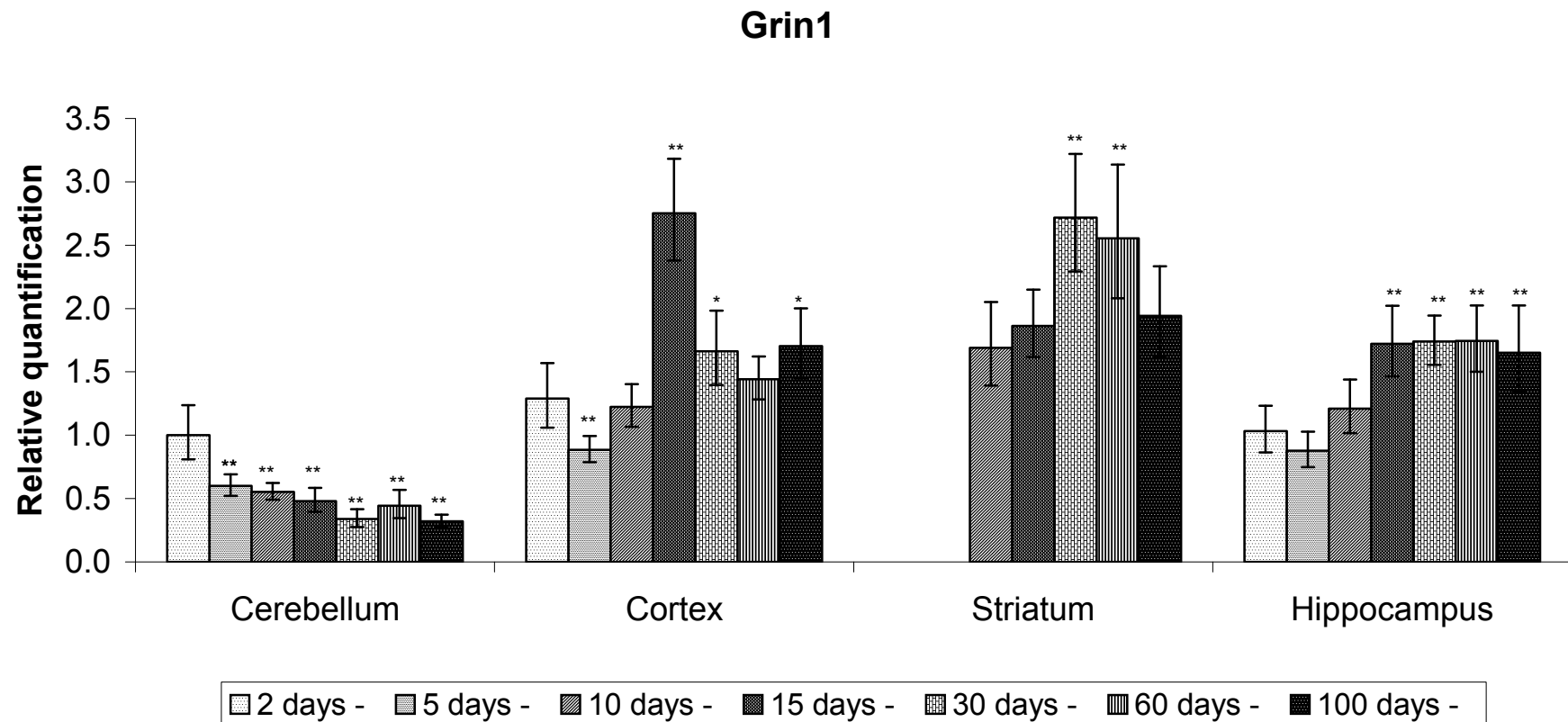
Grin3B expression was determined to be low in all ages tested in cortex, with small variations among animal of different ages (not statistically significant).

A quite significant raise in Grin3B expression was shown from 10- to 15-days old rats ( $p < 0.005$ ) and an extremely significant decrease in this gene expression was observed in 30-days old rats ( $p < 0.005$ ) in striatum. Levels of expression were high again in 60- and 100-days old rats ( $p < 0.005$ ).

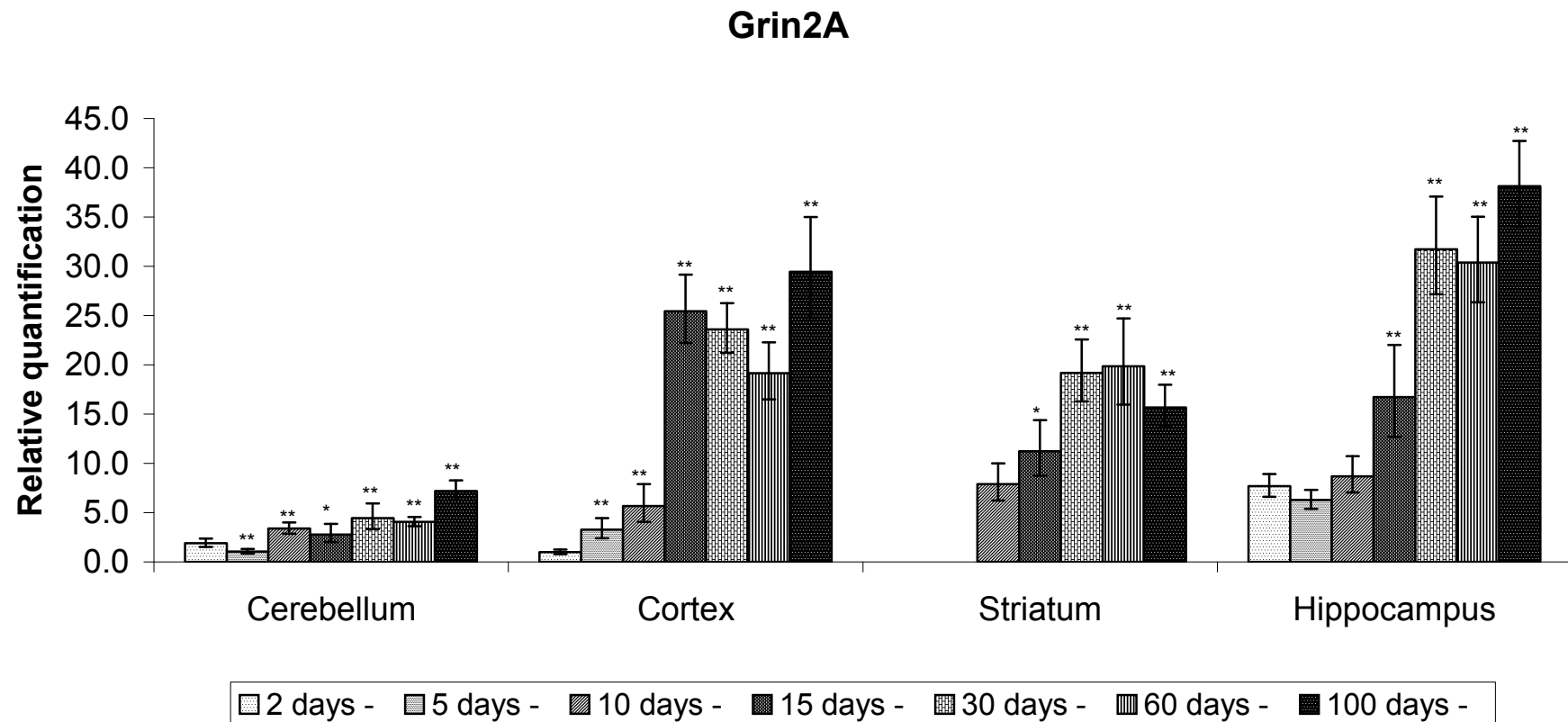
Like results observed in cortex, Grin3B expression in hippocampus remained practically unchangeable along different ages tested.

#### Profile of NMDA subunits' genes at different ages in each brain structure

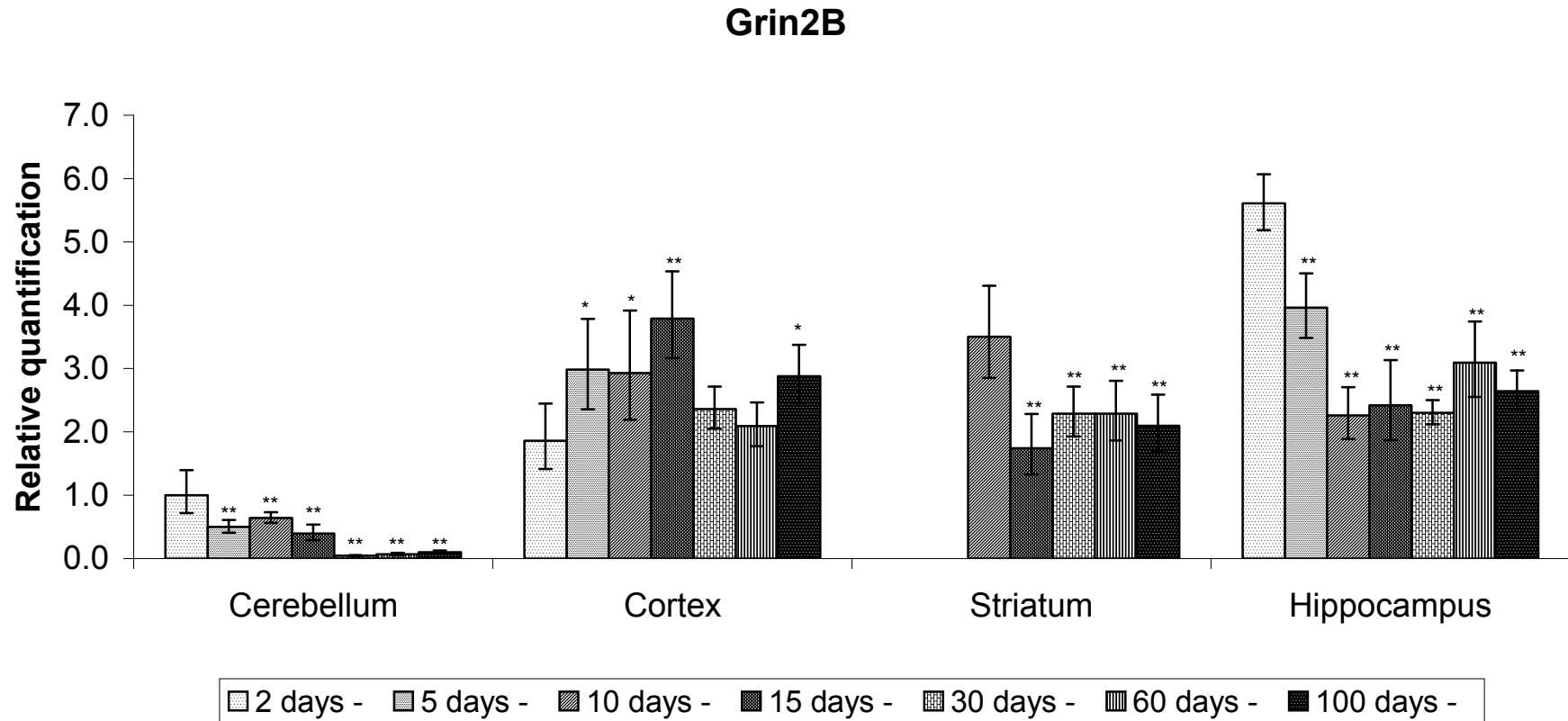
Figures 8 to 11 show levels of expression of each gene in relation to expression levels of Grin1. As expected, all genes have shown lower levels than Grin1 expression levels in all brain structures studied and at almost all ages. A similar or slight higher level was detected in Grin2C in cerebellum of 100-days old rats (figure 8). We have also demonstrated higher levels of Grin2B in hippocampus of 2- and 5-days old rats (figure 11).



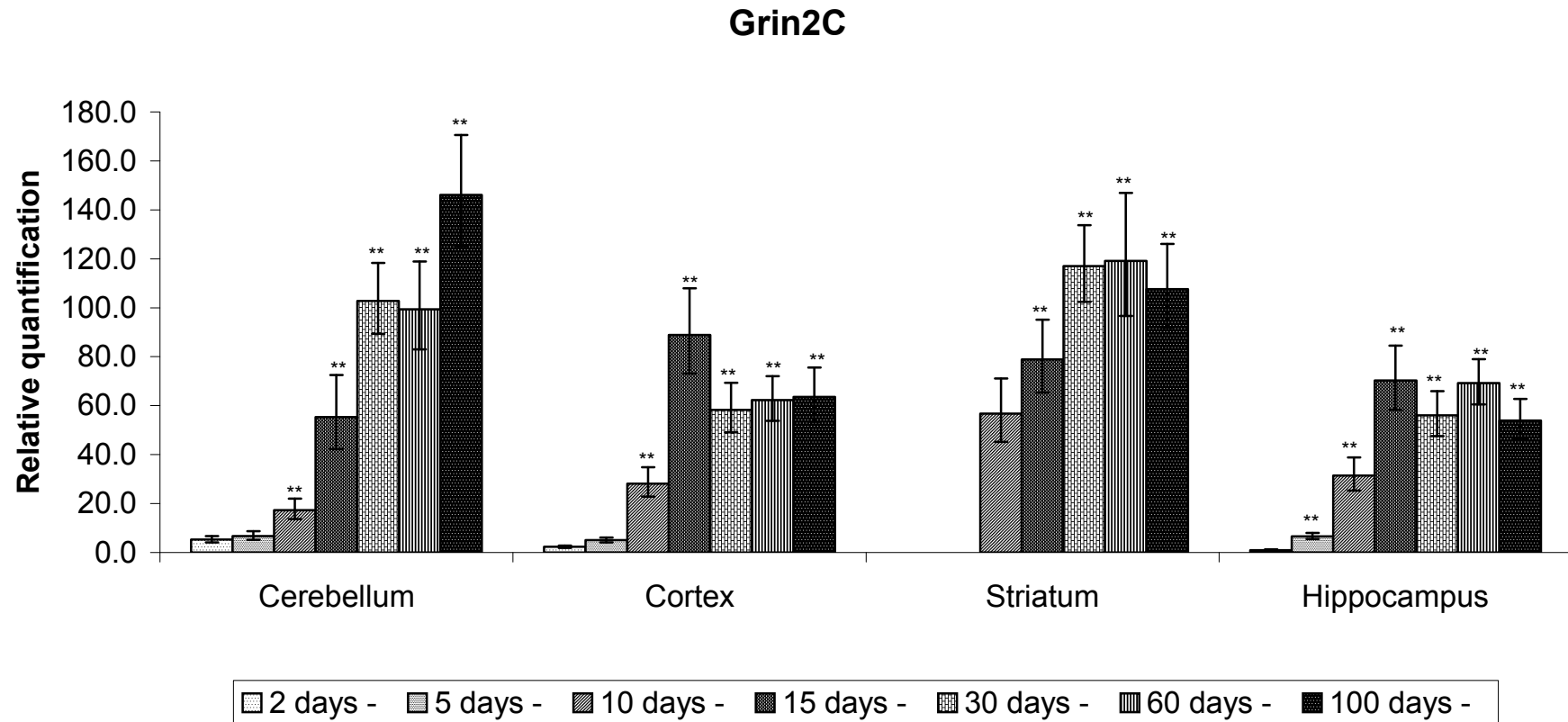
**Figure 1 – Relative expression of Grin1 gene in different brain structures.** Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10). Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and results of cerebellum from 2-day old rats were used as calibrator. Results were compared with ANOVA and \* was used for  $p < 0.05$  and \*\* were used for  $p < 0.005$ .



**Figure 2 – Relative expression of Grin2A gene in different brain structures.** Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10). Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and results of cortex from 2-days old rats were used as calibrator. Results were compared with ANOVA and \* was used for  $p < 0.05$  and \*\* were used for  $p < 0.005$ .



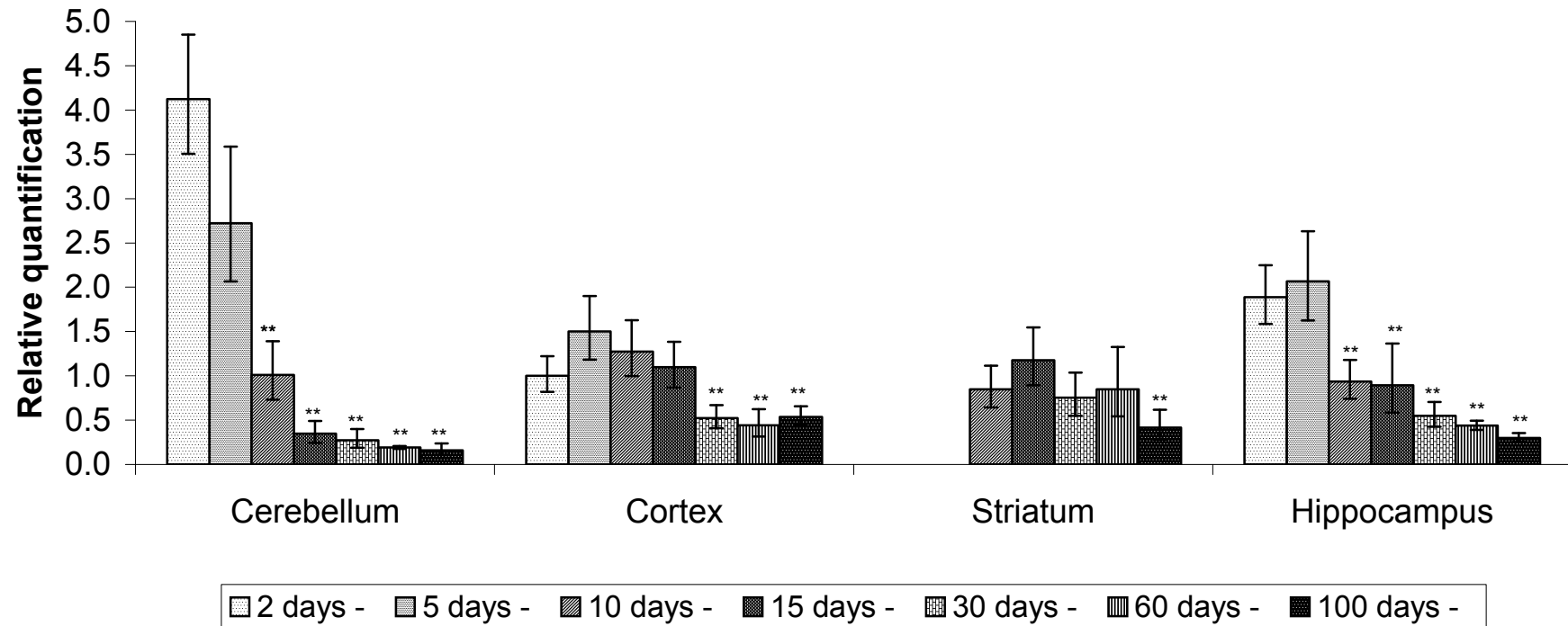
**Figure 3 – Relative expression of Grin2B gene in different brain structures.** Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10). Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and results of cerebellum from 2-days old rats were used as calibrator. Results were compared with ANOVA and \* was used for  $p < 0.05$  and \*\* were used for  $p < 0.005$ .



**Figure 4 – Relative expression of Grin2C gene in different brain structures.** Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10). Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and results of hippocampus from 2-days old rats were used as calibrator. Results were compared with ANOVA and \* was used for  $p < 0.05$  and \*\* were used for  $p < 0.005$ .

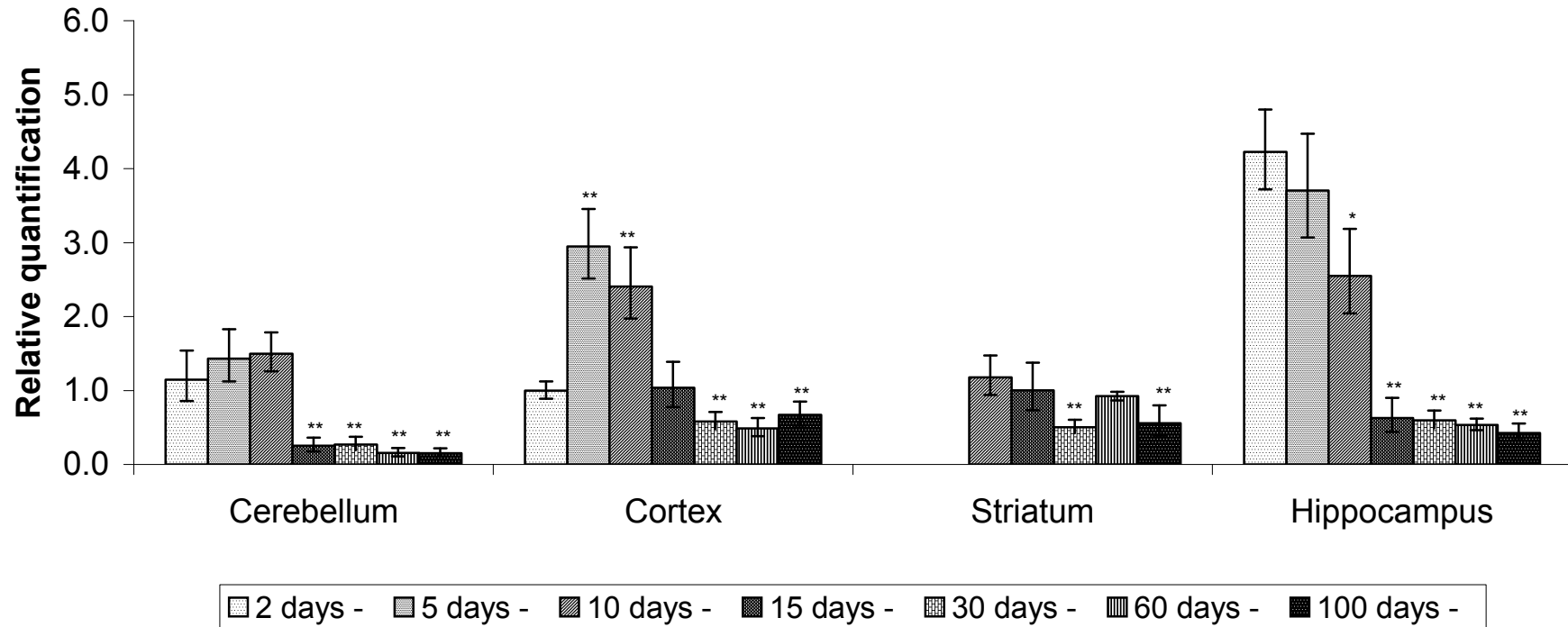


## Grin2D



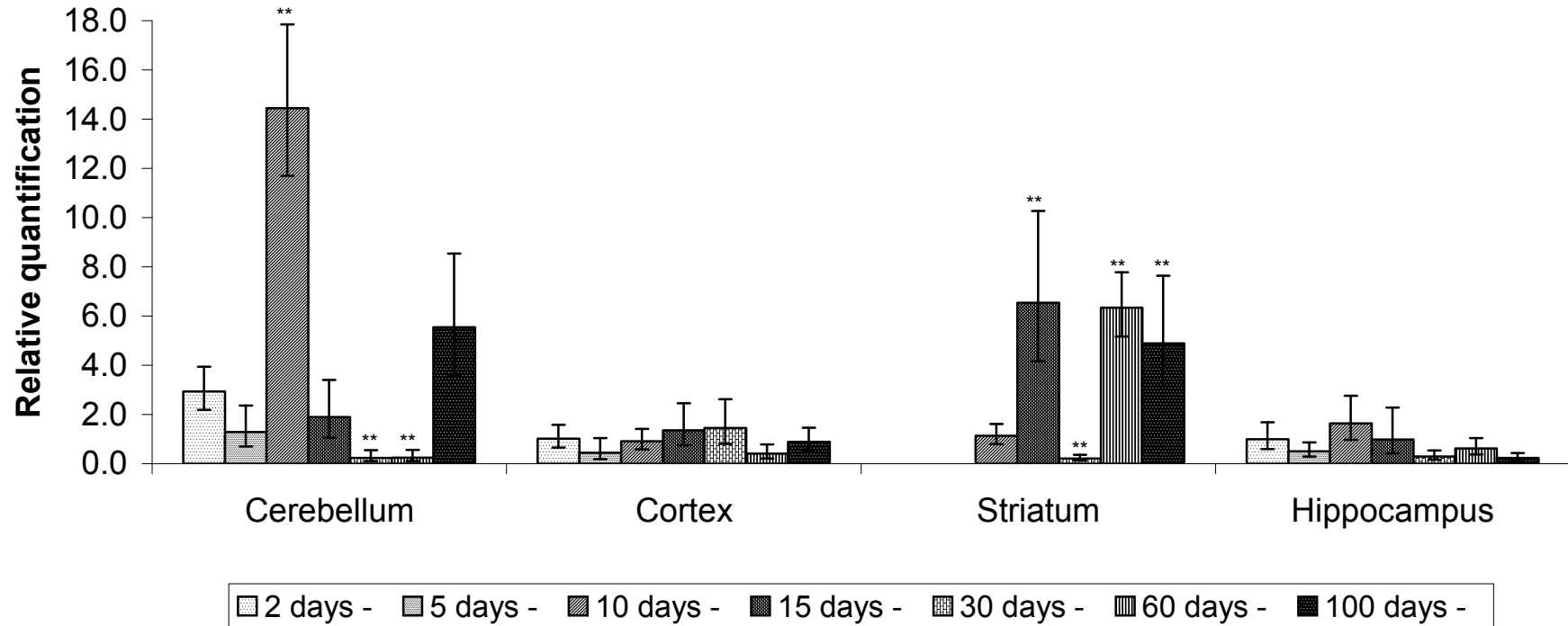
**Figure 5 – Relative expression of Grin2D gene in different brain structures.** Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10). Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and results of cortex from 2-days old rats were used as calibrator. Results were compared with ANOVA and \* was used for  $p < 0.05$  and \*\* were used for  $p < 0.005$ .

## Grin3A

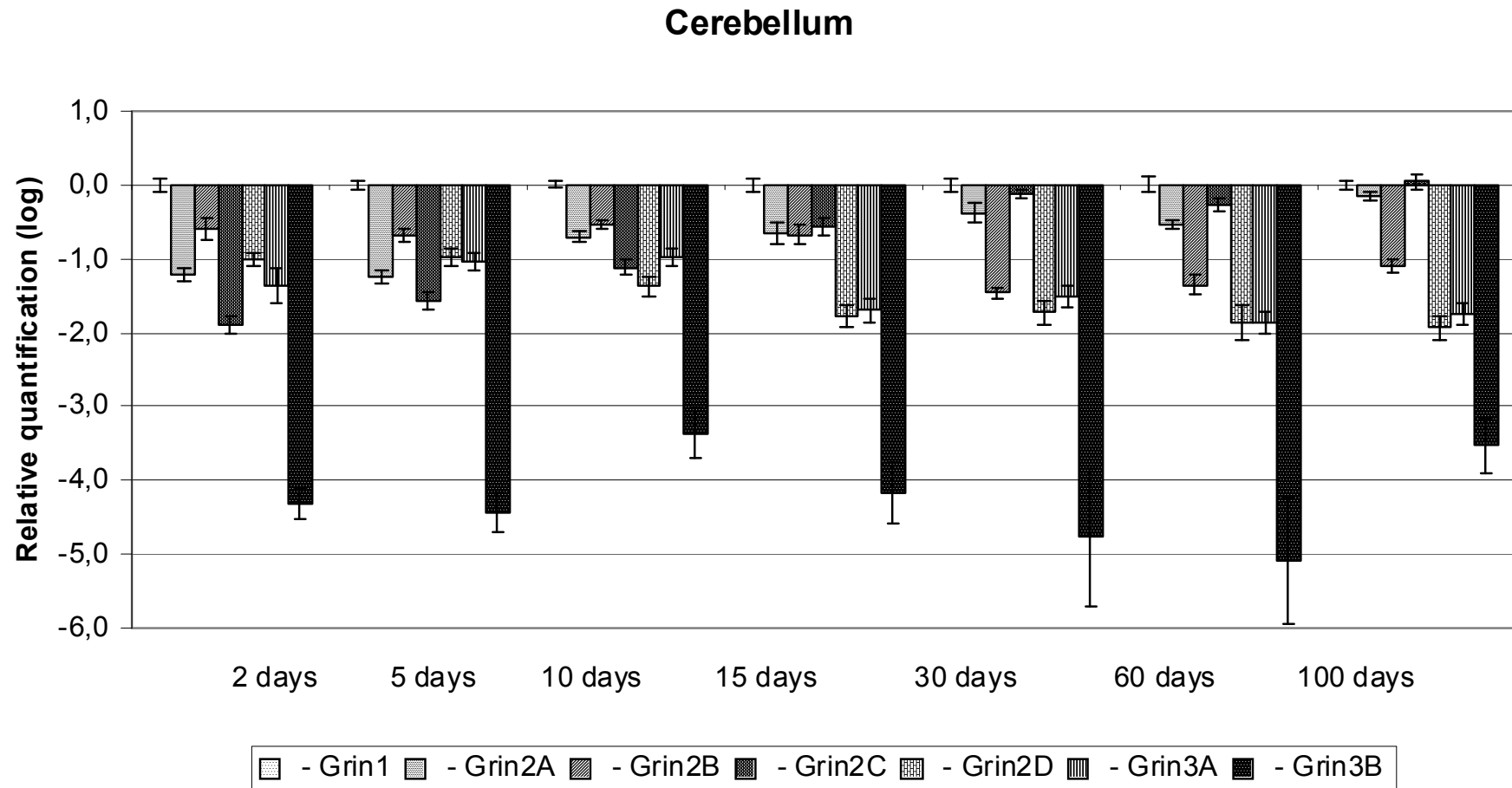


**Figure 6 – Relative expression of Grin3A gene in different brain structures.** Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10). Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and results of cortex from 2-days old rats were used as calibrator. Results were compared with ANOVA and \* was used for  $p < 0.05$  and \*\* were used for  $p < 0.005$ .

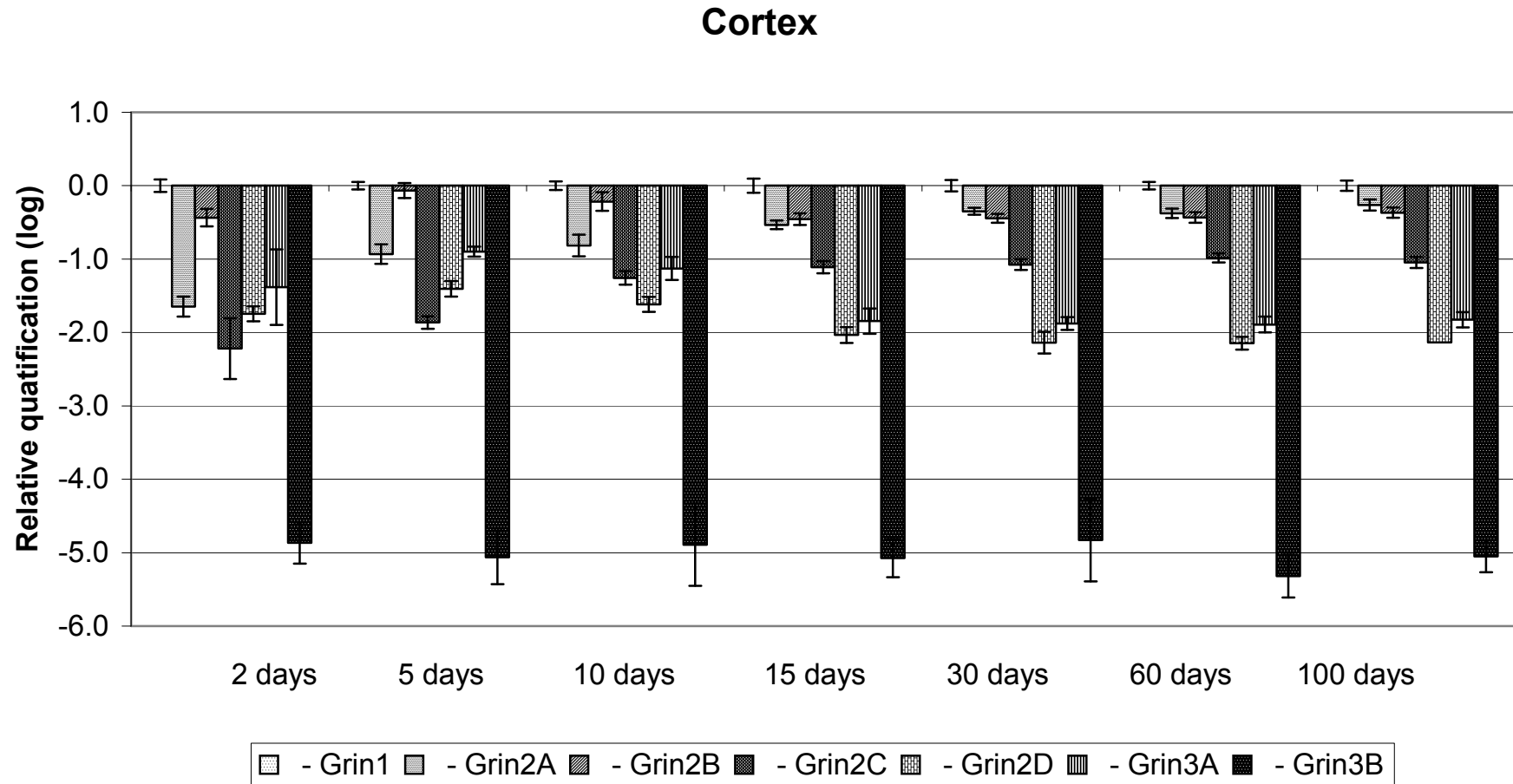
## Grin3B



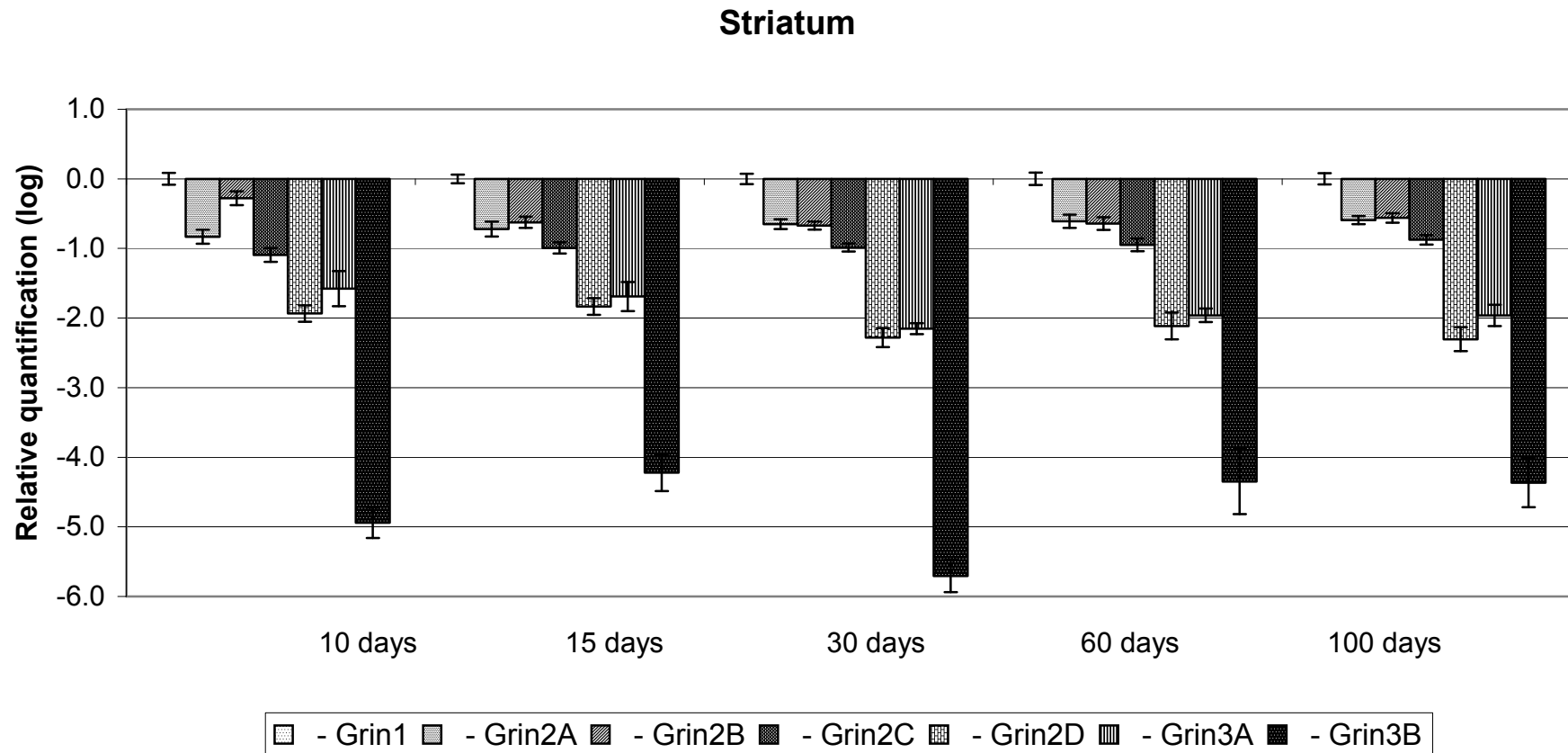
**Figure 7 – Relative expression of Grin3B gene in different brain structures.** Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10). Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and results of cortex from 2-days old rats were used as calibrator. Results were compared with ANOVA and \* was used for  $p < 0.05$  and \*\* were used for  $p < 0.005$ .



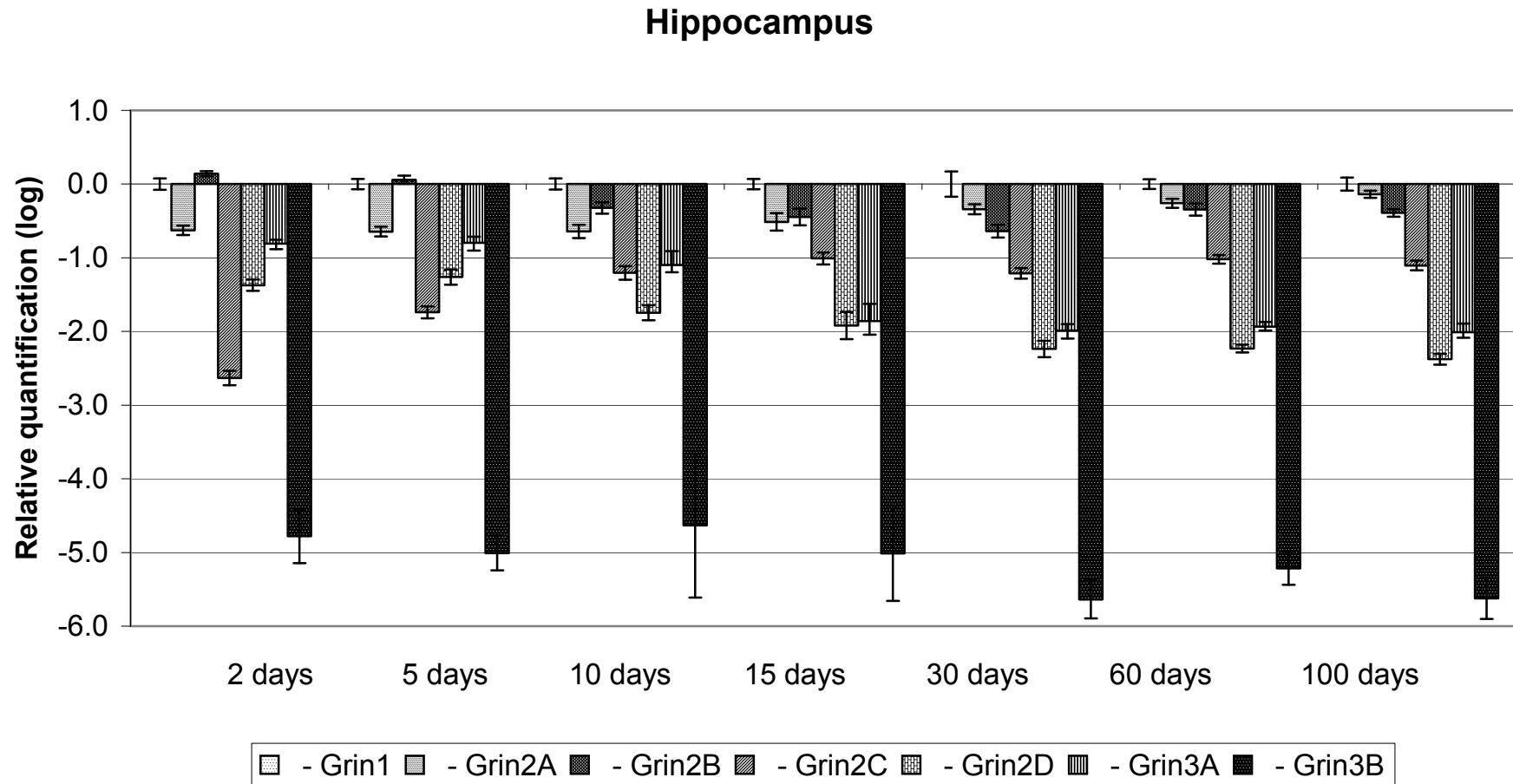
**Figure 8 – Expression profile of NMDARs subunits in cerebellum.** Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) in logarithmic scale. Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and Grin1 expression was used as calibrator.



**Figure 9 – Expression profile of NMDARs subunits in cortex.** Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) in logarithmic scale. Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and Grin1 expression was used as calibrator.



**Figure 10 – Expression profile of NMDARs subunits in striatum.** Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) in logarithmic scale. Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and Grin1 expression was used as calibrator.



**Figure 11 – Expression profile of NMDARs subunits in hippocampus.** Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) in logarithmic scale. Relative ratios of mRNA levels were calculated using the ddCT method normalized by Gapdh as endogenous control and Grin1 expression was used as calibrator.

## Discussion

In the present study we describe the gene expression profile of NMDA GluR subunits in cerebellum, cortex, hippocampus, and striatum of rats throughout postnatal development to adulthood. During postnatal development, excitatory synaptic transmission plays a key role in acquisition of mature morphology as well as neuronal properties (Simon et al., 1992; Fox et al., 1996; Lai et al., 2004; Zhang et al., 2005). Activity-dependent synaptic plasticity that occurs in critical or sensitive periods during early postnatal life is also important for maturation of neural circuits (Katz and Shatz, 1996; Petralia et al., 1999; Quinlan et al., 1999; Chen et al., 2006).

Studies with NMDA antagonists in immature rat brain suggest that disturbances of GluR function during development could lead to severe impairment of neuronal circuitry and reorganization of GluR expression (Hofer and Constantine-Paton, 1994).

The cerebral cortex plays a central role in many complex brain functions including memory, attention, perceptual awareness, thought, language, and consciousness (Vizi, 2000). In our study, a gradual increase in *Grin1* expression levels was clearly demonstrated up to 15 days in cortex and hippocampus. This data corroborate previous studies with diseases and brain injuries that showed abnormal low expression of NMDA GluR. Low expression of NMDA GluR is involved in the development of diabetic neuropathy (Tomiyama et al., 2005). Decrease in expression of NMDA GluR genes in hippocampus have been also widely described in studies with ischemia (Dos-Anjos et al., 2009). Another study demonstrated that adult animals previously submitted to an immune challenge, either as neonates or adults, displayed altered levels of NMDA GluR mRNA in hippocampus. This finding suggests that memory impairments in these animals could have been primarily reference memory dysfunctions and the most likely change associated with such effect is the observed *Grin1* reduction in hippocampus that was seen in postnatal LPS-treated rats at 5 and 30 days (Harré et al., 2008).



In cerebral cortex, transient forebrain ischemia followed by reperfusion 48 h later elicits a general down regulation of NMDA GluR gene expression in different brain structures. The decreased gene expression could be explained in terms of a compensatory mechanism aimed at protecting neuronal cells against the excitotoxicity induced by Glu through the down-regulation of NMDA GluR, which would make cells less responsive to the activation by Glu (Wong et al., 2001).

Various motor learning tasks, such as chaining of motor sequences, visuomotor skill acquisition, and instrumental lever-pushing and serial reaction time tests involve the striatum (Cromwell and Berridge, 1996; Dong et al., 2000; Reynolds et al., 2001). Our data show high Grin1 mRNA expression in this structure in all stages of development, mainly in 30- and 60-days old rats. Grin1 deletion from striatum, which effectively eliminated NMDA GluR function, abolished striatal LTP and impaired motor learning (Dang et al., 2006). These findings have important implications for the underlying mechanisms of motor learning impairments seen in Parkinson's, dystonia, and Huntington's diseases that involve the corticostriatal circuitry.

We have observed high levels of Grin1 expression at around day 15 in cortex, striatum and hippocampus. This suggests that high levels of development, synaptogenesis and synaptic plasticity in neurons from these structures are at around this age. Similar features were not observed in cerebellum where a decrease in Grin1 mRNA expression during development was demonstrated as that observed previously (Akazawa et al., 1994).

In our study, Grin2A expression levels were also found to be high in cortex, striatum and hippocampus and levels were maintained at reasonable levels throughout adulthood. Levels of expression are several folds higher than levels in cerebellum. This data can also be relevant for neurons synaptic plasticity. When considering Grin2B expression levels we have also shown equivalent data. Expression levels in cerebellum went down through adulthood while levels in the other three brain structures (cortex, striatum and hippocampus) were kept at high levels.

Elevated Grin2A subunit expression in cerebral cortex in schizophrenia has been observed, whereas Grin2B subunit expression appears not to be altered in the cerebral cortex (Kristiansen et al., 2007).

Altered expression of NMDA receptor subunits resulting from developmental behavior manipulations in periods of maternal separation at or prior to postnatal day 9 is reported to cause reductions in hippocampal Grin2A and Grin2B subunits expression when rats reach adulthood (Roceri et al., 2002).

The impact of Grin2A subunit composition on NMDA receptor channel function can be illustrated by decrease or increase in NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents (EPSCs) in cerebellar granule cells following Grin2A or Grin2B subunits overexpression, respectively (Prybylowski et al., 2002). Similarly, the switch from NMDA receptors at immature synapses in which Grin2B is the major Grin2 subunit to those at mature synapses in which Grin2A subunit predominates results in a marked shortening of channel opening time leading to a relative receptor “hypofunction” (Flint et al., 1997; Quinlan et al., 1999).

Evidences suggest that cortex is a site of several distinct activity-dependent plastic processes during early developmental ages (Liu et al., 2004; Li et al., 2006; Crozier et al., 2007), and Grin2A or Grin2B containing NMDARs may selectively contribute to these processes. For example, while the development of orientation selectivity is dependent on maturation and normal function of Grin2A, but not Grin2B containing circuitry (Fagiolini et al., 2003), plastic processes that are deemed to contribute to effects of mono-ocular deprivation seem to require both Grin2A and Grin2B function (Philpot et al., 2007).

In cerebellum, our study shows the highest Grin2B expression in 2-days old rats, but in other studies, Grin2B expression demonstrates a peak around 7<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> postnatal day, at a stage where Grin2A expression rises sharply while Grin2D drops. This was also observed in the present study. The most striking change in Grin 2B pattern of expression takes place between the first and second postnatal week. As a result, an almost complete disappearance of this subunit from

cerebellum is observed together with a confinement to forebrain structures, which corroborate with our study. We have also seen increase in Grin2C and, in a less extent, in Grin2A expression. In cerebellum, this switch in Grin2 subunit expression from Grin2B to Grin2A and Grin2C has been shown to occur in the same cell population, the granule cells (Farrant et al., 1994; Mony et al., 2009).

A dynamic spatiotemporal Grin2C expression pattern have been uncovered in the developing cerebellum and novel sites and cells that express the subunit were identified (Karavanova et al, 2006). Based on these findings, novel functions of Grin2C-containing NMDARs may be demonstrated in neuronal and non-neuronal cells, which could have important implications for development and hypoxic/ischemic damage. In our study, variation levels of Grin2C subunit expression are several folds higher than other subunits expression levels. The meaning of this feature remains to be establish, but it is relevant to mention that here high levels are more frequently found in cerebellum and striatum.

Grin2D investigations show contrasting results. No functional NMDAR-Grin2D receptors at any central synapses were suggested previously (Cull-Candy et al., 2001). On the other hand, pre-synaptic labeling carried out by independent groups located NMDAR-Grin2D in this site (Marvizon et al., 2002; Thompson et al., 2002). A more recent study suggested that NMDAR-Grin2D subunit is well-poised anatomically to play a role in pain neurotransmission and support general conclusions made attesting to NMDA receptor involvement in peripheral nociceptive processes (Hummel et al., 2008). We demonstrate that Grin2D expression is predominantly high at early ages in cerebellum which can be associated with synaptogenesis completion. High levels were also demonstrated at early stages in hippocampus and lower levels were found in adulthood in all brain structures included in this work.

Grin3A expression was quite high in hippocampus at early ages with a marked drop after 10 days of life. This behavior was also observed in expression profile of this subunit in cerebellum. These data suggest an important role of Grin3A in early postnatal age functions that are

associated to these two brain structures. This feature was not observed either in cortex or in striatum where we detected a different expression pattern. Other studies showed the same profile, that Grin3A is prominently expressed during a narrow temporal window of postnatal development that correlates with periods of intense synaptogenesis and pruning and later becomes downregulated, just prior to the onset of critical period plasticity (Wong et al., 2002; Pérez-Otaño et al., 2006).

A unique feature was observed in expression of Grin3B. In this case, a considerable change of this gene expression in cerebellum was represented by a peak with a high expression value in 10-days old rats. This result may express a single mechanism linked to a specific aspect of neurons maturation. However, it is relevant to call attention to the fact that Grin3B subunit is underrepresented in relation to Grin1 as well as to other subunits. Consequently, the meaning of this fact is even more intriguing to be elucidated. In an *in situ* hybridization study for the Grin3B subunit in motor neurons, the mRNA was first detected during the second postnatal week (Fukaya et al., 2005), and is upregulated thereafter, attaining maximal levels at the 21<sup>st</sup> postnatal day. Other study show that expression of the NMDAR-Grin3B plays a role in determining the morphology of dendrites of spinal motor neurons but suggest that upregulation, detected by Western blot techniques, occurs earlier than previously reported (Prithviraj and Inglis, 2008).

NMDA GluR activation has been reported to be able to produce either neuronal survival or death-promoting actions and it has been claimed that this dual action is mediated by receptor subunit composition or localization. Such opposing actions may explain, at least partially, failure of NMDA GluR antagonism-based clinical trials on stroke and provide scientific basis for developing novel and effective NMDA GluR-based stroke therapies (Liu et al., 2007). But large-scale clinical trials have failed to find the expected efficacy of NMDA GluR antagonists in reducing brain injuries (Lee et al., 1999; Ikonomidou et al., 1999; Kemp and McKernan, 2002). The reasons underlying the apparent contradiction between basic research data and those of clinical trials remain unknown but are likely multifactorial (Albensi et al., 2004). Thus, knowledge of GluR gene

expression and regulation in the different areas should contribute to understanding the mechanisms underlying different vulnerabilities of healthy and injured neurons.

## **Conclusion**

In summary, we have demonstrated time-dependent alterations in mRNA expression of each NMDA GluR subunits in postnatal development to adulthood in four different brain structures. As far as we are aware, this is a pioneer study to address these changes in NMDA GluR subunits at various postnatal periods, from 2 days old, stretching out to adulthood, 100 days old, by real time quantitative PCR. This work provided data that can underlie development/maintenance/damage of some cerebral functions such as learning/memory, behavior, cognition, development, and cerebral aging. Therefore it remains to be evaluated these subunits expression profiles in specific conditions. Changes in these profiles can become a potential target for the development of novel and more effective therapies for many disorders associated with glutamate receptors.

## References

- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347:150-160.
- Albensi, BC, Igoech, IC, Janigro, D, Ilkanich, E (2004) Why do many NMDA antagonists fail, while others are safe and effective at blocking excitotoxicity associated with dementia and acute injury? *Am. J. Alzheimer's Dis. Other Demen.* 19:269–274.
- Brennan EM, Martin LJ, Johnston MV, Blue ME (1997) Ontogeny of non-NMDA glutamate receptors in rat barrel field cortex: II. Alpha-AMPA and kainate receptors. *J Comp Neurol.* 386(1):29-45.
- Chen LW, Tse YC, Li C, Guan ZL, Lai CH, Yung KK, Shum DK, Chan YS (2006) Differential expression of NMDA and AMPA/KA receptor subunits in the inferior olive of postnatal rats. *Brain Res.* 1067(1):103-114.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8): 623-634.
- Colwell CS, Cepeda C, Crawford C, Levine MS (1998) Postnatal development of glutamate receptor-mediated responses in the neostriatum. *Dev Neurosci.* 20(2-3):154-163.
- Conn PJ and Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:205-237.
- Cromwell HC and Berridge KC (1996) Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. *J Neurosci* 16:3444–3458.
- Crozier RA, Wang Y, Liu CH, Bear MF (2007) Deprivation-induced synaptic depression by distinct mechanisms in different layers of mouse visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(4):1383–1388.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327–335.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65(1):1-105.
- Dang MT, Yokoi F, Yin HH, Lovinger DM, Wang Y, Li Y (2006) Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 15254-15259.
- Debanne D, Daoudal G, Sourdet V, Russier M (2003) Brain plasticity and ion channels. *J. Physiol. Paris.* 97(4-6): 403-414.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51:7-61.
- Dong Y, Fukuyama H, Honda M, Okada T, Hanakawa T, Nakamura K, Nagahama Y, Nagamine T, Konishi J, Shibasaki H (2000) Essential role of the right superior parietal cortex in Japanese kana mirror reading: An fMRI study. *Brain* 123:790–799.

- Dos-Anjos S, Martínez-Villayandre B, Montori S, Regueiro-Purriños MM, Gonzalo-Orden JM, Fernández-López A (2009) Transient global ischemia in rat brain promotes different NMDA receptor regulation depending on the brain structure studied. *Neurochem Int.* 54(3-4):180-185.
- Fagiolini M, Katagiri H, Miyamoto H, Mori H, Grant SG, Mishina M, Hensch TK (2003) Separable features of visual cortical plasticity revealed by N-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(5):2854–2859.
- Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Culcandy SG (1994) NMDA receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368: 335–339.
- Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci* 17:2469–2476.
- Fox K, Schlaggar BL, Glazewski S, O'Leary DDM (1996) Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4157–4161.
- Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M (2005) NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *Eur J Neurosci* 21:1432–1436.
- Gasic GP and Hollmann M (1992) Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 507-536.
- Genoux D and Montgomery JM (2007) Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34(10): 1058-1063.
- Harré EM, Galic MA, Mouihate A, Noorbakhsh F, Pittman QJ (2008) Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 27(3):644-653.
- Hofer M and Constantine-Paton M (1994) Regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function during the rearrangement of developing neuronal connections. *Prog Brain Res.* 102:277-285.
- Hummel M, Strassle B, Miller S, Kaftan E, Whiteside G (2008) Anatomical localization and expression pattern for the NMDA-2D receptor subunit in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 155(2):492-502.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283(5398):70-74.
- Insel TR, Miller LP, Gelhard RE (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35(1):31-43.
- Johnson JW and Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 11 325(6104):529-531.



- Karavanova I, Vasudevan K, Cheng J, Buonanno A (2007) Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit-beta-galactosidase knock-in mice. *Mol Cell Neurosci.* 34(3): 468-80.
- Katz LC and Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133–1138.
- Kemp JA and McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat. Neurosci.* 5: 1039–1042.
- Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2007) NMDA receptors and schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 7:48–55.
- Lai CH, Tse YC, Shum DK, Yung KK, Chan YS (2004) Fos expression in otolith-related brainstem neurons of postnatal rats following off-vertical axis rotation. *J. Comp. Neurol.* 470: 228–296.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399, A7–A14.
- Li Y, Fitzpatrick D, White LE (2006) The development of direction selectivity in ferret visual cortex requires early visual experience. *Nat Neurosci* 9(5):676–681.
- Lilliu V, Pernas-Alonso R, Trelles RD, di Porzio U, Zuddas A, Perrone-Capano C (2001) Ontogeny of AMPA receptor gene expression in the developing rat midbrain and striatum. *Brain Res Mol Brain Res.* 96(1-2):133-141.
- Liu XB, Murray KD, Jones EG (2004) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci* 4(40):8885–8895.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 27 (11), 2846–2857.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Lynch DR, Anegawa NJ, Verdoorn T, Pritchett DB (1994) N-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. *Mol Pharmacol.* 45(3):540-545.
- Maragakis NJ and Rothstein JD (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis.* 15(3):461-473.
- Marvizon JCG, McRoberts JA, Ennes HS, Song B, Wang X, Jinton L, Corneliussen B, Mayer EA (2002) Two N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *J Comp Neurol* 446:325–334.
- McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV (1988) Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 459(1):200-203.

- McDonald JW, Trescher WH, Johnston MV (1992) Susceptibility of brain to AMPA induced excitotoxicity transiently peaks during early postnatal development. *Brain Res.* 583(1-2):54-70.
- Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 130(4S Suppl):1007S-1015S.
- Mony L, Kew JNC, Gunthorpe MJ and Paoletti P (2009) Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British Journal of Pharmacology* 157: 1301–1317
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256(5060): 1217-1221.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(9):4926-4931.
- Nansen EA, Jokel ES, Lobo MK, Micevych PE, Ariano MA, Levine MS (2000) Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in the rat. *Dev Neurosci.* 22(4):329-340.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54(5):581-618.
- Pérez-Otaño I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.* 21(4): 1228-1237.
- Pérez-Otaño I, Lujan R, Tavalin SJ, Plomann M, Modregger J, Liu XB, Jones EG, Heinemann SF, Lo DC and Ehlers MD (2006) Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat. Neurosci.* 9: 611–621.
- Petralia RS, Esteban JA, Wang YX, Partridge JG, Zhao HM, Wenthold RJ, Malinow R (1999) Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci.* 2(1):31-36.
- Philpot BD, Cho KK, Bear MF (2007) Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. *Neuron* 53(4):495–502.
- Prithviraj R and Inglis FM (2008) Expression of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR3B regulates dendrite morphogenesis in spinal motor neurons. *Neurosci.* 155(1):145-53.
- Prybylowski K, Fu Z, Losi G, Hawkins LM, Luo J, Chang K, Wenthold RJ, Vicini S (2002) Relationship between availability of NMDA receptor subunits and their expression at the synapse. *J Neurosci.* 22:8902–8910.
- Quinlan EM, Philpot BD, Huganir RL, Bear MF (1999) Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat. Neurosci.* 2:352–357.

Reynolds JN, Hyland BI, Wickens JR (2001) A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* 413:67–70.

Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002) Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7:609–616.

Seeburg PH, Monyer H, Sprengel R, Burnashev N (1994) Molecular biology of NMDA receptors. In: *The NMDA receptor*, eds: Collingridge, G. L. and Watkins, J. C. 2<sup>nd</sup> ed., Oxford, Oxford University Press, 147-157.

Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev.* 122(1):1-29.

Sheldon AL and Robinson MB (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 51(6-7):333-355.

Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM (2004) Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J. Child Neurol.* 19(5): 343-360.

Simon DK, Pursky GT, O'Leary DDM, Constatine-Paton M (1992) N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10593–10597.

Sucher NJ, Awobuluyi M, Choi YB, Lipton SA (1996) NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 17(10): 348-355.

Thompson CL, Drewery DL, Atkins HD, Stephenson FA, Chazot PL (2002) Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the adult murine hippocampal formation: evidence for a unique role of the NR2D subunit. *Brain Res Mol Brain Res* 102:55–61.

Tomiyama M, Furusawa K, Kamijo M, Kimura T, Matsunaga M, Baba M (2005) Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus. *Brain Res Mol Brain Res* 20:2750–2781.

Villares JC and Stavale JN (2001) Age-related changes in the N-methyl-D-aspartate receptor binding sites within the human basal ganglia. *Exp Neurol.* 171(2):391-404.

Vizi ES (2000) Role of high affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 52:63–89.

Wong MH, Kang T, Park S, Jeon G, Kim Y, Seo JH, Choi E, Chung M, Cho SS (2001) The alterations of N-methyl-D-aspartate receptor expressions and oxidative DNA damage in the CA1 area at the early time after ischemia–reperfusion insult. *Neurosci. Lett.* 301 (2):139–142.

Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Pérez-Otaño I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS and Jones EG (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J. Comp. Neurol.* 450: 303–317.

Zhang FX, Lai CH, Tse YC, Shum DK, Chan YS (2005) Expression of Trk receptors in otolith-related neurons in the vestibular nucleus of rats. *Brain Res.* 1062:92–100.

## 4 CONCLUSÃO

Neste estudo foram evidenciadas alterações na expressão de subunidades do receptor de glutamato do tipo NMDA dependentes do estágio de desenvolvimento pós-natal até a vida adulta nas quatro estruturas cerebrais. Esse trabalho é o primeiro a investigar essas alterações no padrão de expressão dessas subunidades por PCR quantitativo em tempo real em idades que variam de 2 dias até 100 dias. Assim, os resultados encontrados podem ajudar na compreensão do desenvolvimento, manutenção e perda de algumas funções cerebrais como aprendizado/memória, comportamento, cognição, desenvolvimento e envelhecimento cerebral. Entretanto, é essencial avaliar os padrões de expressão dessas subunidades em condições específicas. Mudanças nesses padrões podem ser um potencial alvo para o desenvolvimento de novas e mais efetivas terapias para muitas doenças associadas com receptores de glutamato.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson, O.; Stenqvist, A.; Attersand, A. & von Euler, G. Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics*, 78: 178-184, 2001.

Brennan, E. M.; Martin, L. J.; Johnston, M. V. & Blue, M. E. Ontogeny of non-NMDA glutamate receptors in rat barrel field cortex: II. Alpha-AMPA and kainate receptors. *J Comp Neurol.* 386(1):29-45, 1997.

Bressan, R. A. & Pilowski, L. S. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 25(3), 2003.

Chatterton, J. E.; Awobuluyi, M.; Premkumar, L. S.; Takahashi, H.; Talantova, M.; Shin, Y.; Cui, J.; Tu, S.; Sevarino, K. A.; Nakanishi, N.; Tong, G.; Lipton, S. A. & Zhang, D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415: 793-798, 2002.

Chen, N.; Luo, T. & Raymond, L. A. Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J. Neurosci.*, 19: 6844-6854, 1999.

Choi, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1(8): 623-34, 1988.

Colwell, C. S.; Cepeda, C.; Crawford, C. & Levine, M. S. Postnatal development of glutamate receptor-mediated responses in the neostriatum. *Dev Neurosci.* 20(2-3):154-63, 1998.

Conn, P. J. & Pin, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 205-37, 1997.

Conti, F. Localization of NMDA receptors in the cerebral cortex: a schematic overview. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30(5): 555-60, 1997.

Cui, Z.; Wang, H.; Tan, Y.; Zaia, K. A.; Zhang, S. & Tsien, J. Z. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain. *Neuron*, 41: 781-793, 2004.

Danbolt, N. C. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65(1):1-105, 2001.

Debanne, D.; Daoudal, G.; Sourdet, V. & Russier, M. Brain plasticity and ion channels. *J. Physiol. Paris.*, 97(4-6): 403-14, 2003.

Deng, M. T.; Yokoi, F.; Yin, H. H.; Lovinger, D. M.; Wang, Y. & Li, Y. Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 103: 15254-15259, 2006.

Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D. & Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 51:7-61, 1999.

Dingledine, R. & McBain, C. J. Glutamate and Aspartate. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, eds: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Fisher, S. K.; Uhler, M. D. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; Part two, Chapter 15, 1999.

Dorus, S.; Vallender, E. J.; Evans, P. D.; Anderson, J. R.; Gilbert, S. L.; Mahowald, M.; Wyckoff, G. J.; Malcom, C. M. & Lahn, B. T. Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell*, 119: 1027-1040, 2004.

During, M. J.; Symes, C. W.; Lawlor, P. A.; Lin, J.; Dunning, J.; Fitzsimons, H. L.; Poulsen, D.; Leone, P.; Xu, R.; Dicker, B. L.; Lipski, J. & Young, D. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science*, 287: 1453-1460, 2000.

Gasic, G. P. & Hollmann, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.*, 54: 507-36, 1992.

Genoux, D. & Montgomery, J. M. Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34(10): 1058-63, 2007.

Greene, J. F. & Greenemyre, J. T. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.*, 48(6): 613-634, 1996.

Hardingham, G. E.; Fukunaga, Y. & Bading, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neurosci.*, 5: 405-414, 2002.

Hess, S. D.; Daggett, L. P.; Crona, J.; Deal, C.; Lu, C.-C.; Urrutia, A.; Chavez-Noriega, L.; Ellis, S. B.; Johnson, E. C. & Velicelebi, G. Cloning and functional characterization of human heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 278: 808-816, 1996.

Hess, S. D.; Daggett, L. P.; Deal, C.; Lu, C.-C.; Johnson, E. C. & Velicelebi, G. Functional characterization of human N-methyl-D-aspartate subtype 1A/2D receptors. *J. Neurochem.*, 70: 1269-1279, 1998.

Ikeda, K.; Araki, K.; Takayama, C.; Inoue, Y.; Yagi, T.; Aizawa, S. & Mishina, M. Reduced spontaneous activity of mice defective in the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *Brain Res. Molec.*, 33: 61-71, 1995.

Ikonomidou, C.; Bittigau, P.; Koch, C.; Genz, K.; Hoerster, F.; Felderhoff-Mueser, U.; Tenkova, T.; Dikranian, K. & Olney, J. W. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol.* 62(4):401-5, 2001.

Ikonomidou, C.; Bosch, F.; Miksa, M.; Bittigau, P.; Vöckler, J.; Dikranian, K.; Tenkova, T. I.; Stefovská, V.; Turski, L. & Olney, J. W. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 283(5398):70-4, 1999.

Insel, T. R.; Miller, L. P. & Gelhard, R. E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*. 35(1):31-43, 1990.

Johnson, J. W. & Ascher, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. 325(6104):529-31, 1987.

- Kadotani, H.; Hirano, T.; Masugi, M.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Katsuki, M. & Nakanishi, S. Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR2A and NR2C subunits, but not from single disruption of the NR2A or NR2C subunit. *J. Neurosci.*, 16: 7859-7867, 1996.
- Karp, S. J.; Masu, M.; Eki, T.; Ozawa, K. & Nakanishi, S. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.*, 268: 3728-3733, 1993.
- Kutsuwada, T.; Sakimura, K.; Manabe, T.; Takayama, C.; Katakura, N.; Kushiya, E.; Natsume, R.; Watanabe, M.; Inoue, Y.; Yagi, T.; Aizawa, S.; Arakawa, M.; Takahashi, T.; Nakamura, Y.; Mori, H. & Mishina, M. Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon-2 subunit mutant mice. *Neuron*, 16: 333-344, 1996.
- Lalonde, R. & Joyal, C. C. Effects of ketamine and L-glutamic acid diethyl ester on spatial and nonspatial learning tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44(3): 539-45, 1993.
- Lilliu, V.; Pernas-Alonso, R.; Trelles, R. D.; di Porzio, U.; Zuddas, A. & Perrone-Capano, C. Ontogeny of AMPA receptor gene expression in the developing rat midbrain and striatum. *Brain Res Mol Brain Res.*, 96(1-2):133-41, 2001.
- Lin, Y. J.; Bovetto, S.; Carver, J. M. & Giordano, T. Cloning of the cDNA for the human NMDA receptor NR2C subunit and its expression in the central nervous system and periphery. *Molec. Brain Res.*, 43: 57-64, 1996.
- Lisman, J.; Schulman, H. & Cline, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.*, 3(3):175-90, 2002.
- Liu, L.; Wong, T. P.; Pozza, M. F.; Lingenhoehl, K.; Wang, Y.; Sheng, M.; Auberson, Y. P. & Wang, Y. T. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 304: 1021-1024, 2004.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-8, 2001.
- Lynch, D. R.; Anegawa, N. J.; Verdoorn, T. & Pritchett, D. B. N-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. *Mol Pharmacol.* 45(3):540-545, 1994.
- Maragakis, N. J. & Rothstein, J. D. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis.* 15(3):461-73, 2004.
- McDonald, J. W.; Silverstein, F. S. & Johnston, M. V. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.*, 30;459(1):200-3, 1988.
- McDonald, J. W.; Trescher, W. H. & Johnston, M. V. Susceptibility of brain to AMPA induced excitotoxicity transiently peaks during early postnatal development. *Brain Res.*, 583(1-2):54-70, 1992.



- Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.*, 130:1007S-15S, 2000.
- Mohn, A. R.; Gainetdinov, R. R.; Caron, M. G. & Koller, B. H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98: 427-436, 1999.
- Monyer, H.; Sprengel, R.; Schoepfer, R.; Herb, A.; Higuchi, M.; Lomeli, H.; Burnashev, N.; Sakmann, B. & Seeburg, P. H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256(5060): 1217-21, 1992.
- Mothet, J. P.; Parent, A. T.; Wolosker, H.; Brady, R. O. Jr.; Linden, D. J.; Ferris, C. D. ; Rogawski, M. A. & Snyder, S. H. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(9):4926-31, 2000.
- Nansen, E. A.; Jokel, E. S.; Lobo, M. K.; Micevych, P. E.; Ariano, M. A. & Levine, M. S. Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in the rat. *Dev Neurosci.* 22(4):329-40, 2000.
- Nong, Y.; Huang, Y.-Q.; Ju, W.; Kalia, L. V.; Ahmadian, G.; Wang, Y. T. & Salter, M. W. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature*, 422: 302-307, 2003.
- Nowak, L.; Bregestovski, P.; Ascher, P.; Herbet, A. & Prochiantz, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307(5950): 462-5, 1984.
- Ozawa, S.; Kamiya, H. & Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54(5):581-618, 1998.
- Pérez-Otaño, I.; Schulteis, C. T.; Contractor, A.; Lipton, S. A.; Trimmer, J. S.; Sucher, N. J. & Heinemann, S. F. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 21(4): 1228-37, 2001.
- Petralia, R.S.; Esteban, J. A.; Wang, Y. X.; Partridge, J. G.; Zhao, H. M.; Wenthold, R. J. & Malinow, R. Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci.* 2(1):31-6, 1999.
- Sakimura, K.; Kutsuwada, T.; Ito, I.; Manabe, T.; Takayama, C.; Kushiya, E.; Yagi, T.; Aizawa, S.; Inoue, Y.; Sugiyama, H. & Mishina, M. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*, 373: 151-155, 1995.
- Seeburg, P. H.; Monyer, H.; Sprengel, R. & Burnashev, N. Molecular biology of NMDA receptors. In: *The NMDA receptor*, eds: Collingridge, G. L. & Watkins, J. C. 2<sup>nd</sup> ed., Oxford, Oxford University Press, p. 147-157, 1994.
- Segovia, G.; Porras, A.; Del Arco, A. & Mora, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev.* 122(1):1-29, 2001.
- Sheldon, A. L. & Robinson, M. B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 51(6-7):333-55, 2007.
- Shimizu, E.; Tang, Y.-P.; Rampon, C. & Tsien, J. Z. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290: 1170-1174, 2000.

- Simeone, T. A.; Sanchez, R. M. & Rho, J. M. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J. Child Neurol.*, 19(5): 343-60, 2004.
- Sprengel, R.; Suchanek, B.; Amico, C.; Brusa, R.; Burnashev, N.; Rozov, A.; Hvalby, O.; Jensen, V.; Paulsen, O.; Andersen, P.; Kim, J. J.; Thompson, R. F.; Sun, W.; Webster, L. C.; Grant, S. G. N.; Eilers, J.; Konnerth, A.; Li, J.; McNamara, J. O. & Seeburg, P. H. Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell*, 92: 279-289, 1998.
- Sucher, N. J.; Awobuluyi, M.; Choi, Y. B. & Lipton, S. A. NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17(10): 348-55, 1996.
- Tang, Y. P.; Shimizu, E.; Dube, G. R.; Rampon, C.; Kerchner, G. A.; Zhuo, M.; Liu, G. & Tsien, J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401: 63-69, 1999.
- Thomas, K. L.; Davis, S.; Hunt, S. P. & Laroche, S. Alterations in the expression of specific glutamate receptor subunits following hippocampal LTP in vivo. *Learn. Mem.*, 3: 197-208, 1999.
- Villares, J. C. & Stavale, J. N. Age-related changes in the N-methyl-D-aspartate receptor binding sites within the human basal ganglia. *Exp Neurol.* 171(2):391-404, 2001.
- Wang, J.; Liu, S.; Fu, Y.; Wang, J. H. & Lu, Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nature Neurosci.*, 6: 1039-1047, 2003.
- Zimmer, M.; Fink, T. M.; Franke, Y.; Lichter, P. & Spiess, J. Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene*, 159: 219-223, 1995.

## ANEXO I - MINI CURRÍCULO

### CURRICULUM VITÆ resumido

**Bock, H.**

#### 1. Dados Pessoais

**Nome:** Hugo Bock

**Local e data de nascimento:** Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. 25/12/1977

**Endereço profissional:** HCPA - rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, RS.

**Telefone profissional:** 3359-7689

**E-mail:** [hugohu2@yahoo.com.br](mailto:hugohu2@yahoo.com.br)

---

#### 2. Formação

- |                    |   |
|--------------------|---|
| <b>2008 - 2008</b> | Curso de curta duração em Oncogenética - Módulo I e II.<br>Sociedade Brasileira de Genética Médica, SBGM, Brasil                          |
| <b>2007 - 2007</b> | Curso de curta duração em Trein Upgrade Soft Seq Scape do ABI 3100 p/ 3130xl.<br>Applied Biosystems do Brasil, Applied, Sao Paulo, Brasil |
| <b>2007 - 2007</b> | Curso de curta duração em Trein Paternidade no GeneMapper ID.<br>Applied Biosystems do Brasil, Applied, Sao Paulo, Brasil                 |
| <b>2007 - 2007</b> | Curso de curta duração em Trein Soft GeneMapper ID v3.2, no ABI 3130xl.<br>Applied Biosystems do Brasil, Applied, Sao Paulo, Brasil       |
| <b>2004 - 2004</b> | Curso de curta duração em Trein Plataf 7500 Real Time PCR Systems em SNPs.<br>Applied Biosystems do Brasil, Applied, Sao Paulo, Brasil    |
| <b>1998 - 2002</b> | Graduação em Farmácia.<br>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  |

---

#### 3. Estágios

##### Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

- 
- |                     |  |
|---------------------|--|
| <b>2007 - Atual</b> | Vínculo: Bolsista de Pesquisa, Enquadramento funcional: Bolsista de Pesquisa da Fundação Médica, Orientadora: Maria Luiza Saraiva Pereira. |
| <b>2003 - 2007</b>  | Vínculo: Apoio Técnico, Enquadramento funcional: Bolsista de Apoio Técnico da Fundação Médica, Orientadora: Maria Luiza Saraiva Pereira.   |

## Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

### Vínculo institucional

**1999 - 2002** Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica CNPq, Orientadora: Margarete Suñè Mattevi.

---

## 4. Experiencia profissional

### Fundação de Apoio à Universidade Federal do Rio Grande do Sul - FAURGS

---

#### Vínculo institucional

**2005 - 2007** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Farmaceutico , Carga horária: 30, Regime: Parcial

---

#### Atividades

**04/2005 - 04/2007** Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Identificação Genética  
*Linhas de Pesquisa:*  
*Sexagem Fetal , Investigação de Paternidade*

---

## 5. Produção Bibliográfica

---

### Artigos completos publicados em periódicos

1. TRAMONTINA JF, YATES D, MAGALHÃES PV, TRENTINI C, SANT'ANNA MK, FRIES GR, BOCK H, SARAIVA-PEREIRA ML, KAPCZINSKI F (2009) Brain-derived neurotrophic factor gene val66met polymorphism and executive functioning in patients with bipolar disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 31: 136 - 140.
2. SOCAL M, BOCK H, MICHELIN-TIRELLI K, HILBIG A, SARAIVA-PEREIRA ML, RIEDER C, JARDIM L (2009) Parkinson's disease and the heterozygous state for glucocerebrosidase mutations among Brazilians. *Parkinsonism & Related Disorders* 15: 76 - 78.
3. MICHELIN K, WAJNER A, BOCK H, FACHEL A, ROSENBERG R, PIRES RF, SARAIVA-PEREIRA ML, GIUGLIANI R, COELHO JC (2005) Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clinica Chimica Acta* 362: 101 - 109.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SIEBERT, M., SARAIVA-PEREIRA, ML, SOCAL, M. P., MICHELINTIRELLI, K, BOCK, H, RIEDER, C, JARDIM, L.B.  
Intermediate activities of beta-glucosidase screened new GBA mutations carriers among Parkinson patients. In: 9th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases,, 2009, Frankfurt.  
Abstracts of the 9th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. , 2009. v.1. p.83 - 83
2. KIEHL, M. F., EMMEL, V. E., BOCK, H, JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Is there association between BDNF Val66Met polymorphism and Machado-Joseph disease? In: V International Workshop on Machado-Joseph Disease, 2009, São Miguel, Açores.  
Abstract book of the V International Workshop on Machado-Joseph Disease. , 2009. v.1. p.83 - 83

3. SIEBERT, M., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Mutation Analysis of 12 Gaucher Disease Patients: Identification of Rare and Novel Mutations In: XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, Águas de Lindóia.  
Abstract book of the XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). , 2009. v.1. p.1 - 1
4. LEMOS, H., BOCK, H., SOUZA, C. F. M., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Aplicação de PCR em tempo real na identificação das mutações A3243G, A8344G e T8993G no MTDNA In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
5. LEMOS, H., BOCK, H., SOUZA, C. F. M., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Aplicação de PCR em tempo real na identificação das mutações A3243G, A8344G e T8993G no mtDNA In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.81 - 81
6. GIACOMAZZI, J., AGUIAR, E., PALMERO, E. I., SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., SCHMIDT, A. V., CAMEY, S. A., FACCINI, L. S., CALEFFI, M., GIUGLIANI, R., PROLLA, P. A.  
Associação entre o polimorfismo STK15 F31I e fatores de risco para câncer de mama em mulheres submetidas a rastreamento mamográfico no sul do Brasil In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
7. GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SIEBERT, M., VEIT, T. D., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Atrofia muscular espinhal: diagnóstico molecular de pacientes com deleção do gene SMN1 In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
8. GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SIEBERT, M., VEIT, T. D., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Atrofia muscular espinhal: diagnóstico molecular de pacientes com deleção do gene SMN1 In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.81 - 81
9. KIEHL, M. F., EMMEL, V. E., BOCK, H., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Avaliação da frequência do polimorfismo Val66Met do gene do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) em pacientes com doença de Machado Joseph In: 28ª Semana Científica do hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 28ª Semana Científica do hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
10. KIEHL, M. F., BOCK, H., EMMEL, V. E., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Avaliação da frequência do polimorfismo Val66Met do gene do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) em pacientes com doença de Machado-Joseph In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.81 - 81
11. KIEHL, M. F., EMMEL, V. E., BOCK, H., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Avaliação da frequência do polimorfismo Val66Met do gene do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) em pacientes com doença de Machado Joseph In: 28ª Semana Científica do hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Oral na 28ª Semana Científica do hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
12. RODRIGUES, G. F., KIEHL, M. F., FRIEDRICH, D. C., BOCK, H., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Detecção de mutações no gene CFTR através de PCR em tempo real e sondas de hibridização fluorescentes In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.85 - 85
13. RODRIGUES, G. F., KIEHL, M. F., FRIEDRICH, D. C., BOCK, H., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Detecção de mutações no gene CFTR através de PCR em tempo real e sondas de hibridização fluorescentes In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.

- Tema Livre Poster na 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
14. GUENO, T. C., EMMEL, V. E., BOCK, H., CARGNIN, S. T., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Distribuição e frequência dos alelos mutantes e normais no gene da huntingtina In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.97 - 97
15. SIEBERT, M., BOCK, H., MICHELIN K, PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Doença de Gaucher: identificação de mutações raras no gene da glicocerebrosidase em pacientes brasileiros In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.  
Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008.
16. SIEBERT, M., BOCK, H., MICHELIN K, PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação de alterações no gene da glicocerebrosidase em pacientes com doença de Gaucher In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
17. SIEBERT, M., BOCK, H., MICHELIN K, PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação de alterações no gene da glicocerebrosidase em pacientes com doença de Gaucher In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.88 - 88
18. VACCARO, T., GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SILVA, L. C. S., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação semi-automatizada de mutações frequentes no gene da fenilalanina hidroxilase In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.89 - 89
19. BOCK, H., RODRIGUES, G. F., CARPES, E. A., MARI, J., BURIN, M. G., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Leucodistrofia Metacromática: a aplicação do PCR em tempo real na detecção molecular de mutações frequentes em pacientes brasileiros In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.  
Livro de resumos do XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008. v.1. p.89 - 89
20. BOCK, H, RODRIGUES, G. F., CARPES, E. A., MARI, J., BURIN, M. G., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Leucodistrofia Metacromática: a aplicação do PCR em tempo real na detecção molecular de mutações freqüentes em pacientes brasileiros In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Pôster 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
21. AGUIAR, E., GIACOMAZZI, J., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML, SANTOS, P. A. C., PALMERO, E. I., GIUGLIANI, R., CALEFFI, M., FACCINI, L. S., CAMEY, S. A., PROLLA, P. A.  
Polimorfismos nos genes GSTM1, GSTT1 e GSTP1 em 750 mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico de cancer de mama (NMPOA) no Sul do Brasil In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
22. GIACOMAZZI, J., AGUIAR, E., PALMERO, E. I., EWALD, I. P., SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., SCHMIDT, A. V., CAMEY, S. A., CALEFFI, M., GIUGLIANI, R., PROLLA, P. A.  
Prevalência de fatores de risco para câncer de mama e polimorfismos ER&#945;-397 PVUII C/T, ER&#945;-351 XBAI A/G e PR PROGINS em mulheres submetidas a rastreamento mamográfico no Sul do Brasil In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.  
Tema livre Poster na 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2008.
23. CARGNIN, S. T., EMMEL, V. E., BOCK, H., GUENO, T. C., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Análise de repetições CAG no gene da atrofina 1 In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.  
Anais do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2007.

24. CARGNIN, S. T., EMMEL, V. E., BOCK, H., GUENO, T. C., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Análise de repetições CAG no gene da atrofina 1 In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema livre Poster na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.
25. GUENO, T. C., EMMEL, V. E., BOCK, H., CARGNIN, S. T., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Análise de repetições CAG no gene da Huntingtina e sua aplicação no diagnóstico laboratorial da doença de Huntington In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.  
Anais do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2007.
26. GUENO, T. C., EMMEL, V. E., BOCK, H., CARGNIN, S. T., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Análise de repetições CAG no gene da Huntingtina e sua aplicação no diagnóstico laboratorial da doença de Huntington In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.
27. ALEGRA, T., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML, KRUG, B. C., PICON, P. D., SCHWARTZ, I. V. D.  
Análise do gene GBA em pacientes com doença de Gaucher atendidos no centro de referência do Rio Grande do Sul In: Revista do HCPA, 2007, Porto Alegre.  
Revista HCPA. , 2007. v.27. p.108 - 109
28. KRUG, B. C., ALEGRA, F. L., SCHWARTZ, I. V. D., PICON, P. D., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Analysis of the GBA gene in patients with Gaucher disease evaluated in the center of reference of the state of Rio Grande do Sul In: 3rd IC-BDD-DW, 2007, Rio de Janeiro.  
Journal of 3rd IC-BDD-DW. , 2007.
29. SOCAL, M. P., MICHELIN K, SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., GIUGLIANI, R., RIEDER, M., JARDIM, L.B.  
Biochemical and/or molecularly confirmed GBA mutations carriers among Parkinson patients In: 7th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases, 2007, Rome, Italy.  
Poster abstracts 7th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. , 2007. v.1. p.78 - 78
30. FRIEDRICH, D. C., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Detecção de mutações no gene CFTR através de PCRs em tempo real e sondas de hibridização fluorescentes In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema livre poster na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.
31. BOCK, H., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Determinação o sexo fetal através de uma amostra de sangue materno In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema Livre poster na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.
32. GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Estudo de polimorfismos de ancestralidade genômica em indivíduos do Sul do Brasil In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia.  
Anais do 53º Congresso Brasileiro de Genética. , 2007.
33. GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Frequencia de polimorfismos de ancestralidade genômica em uma amostra de indivíduos do Rio Grande do Sul In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.  
Anais do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2007.
34. GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Frequencia de polimorfismos de ancestralidade genômica em uma amostra de indivíduos do Sul do Brasil In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema Livre Oral na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.
35. GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Frequencia de polimorfismos de ancestralidade genômica em uma amostra de indivíduos do Sul do Brasil In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.

36. GIACOMAZZI, J., AGUIAR, E., CALEFFI, M., BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML, FACCINI, L. S., GIUGLIANI, R., SKONIESKI, G., FILHO, D. D., CAMEY, S. A., PROLLA, P. A.  
Genetic polymorphisms in a sample of women enrolled in the mammographic breast cancer program from nucleo mama Porto Alegre cohort In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema Livre Poster na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.
37. CARPES, E. A., BOCK, H., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação de mutações no gene da arilsulfatase A através de PCR em tempo real In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia.  
Anais do 53º Congresso Brasileiro de Genética. , 2007.
38. CARPES, E. A., BOCK, H., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação de mutações no gene da arilsulfatase A através de PCR em tempo real In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
Tema Livre poster na 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2007.
39. CARPES, E. A., BOCK, H., CARDOSO, B. D., BURIN, M. G., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação de mutações no gene da arilsulfatase A através de PCR em tempo real In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.  
Anais do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2007.
40. CARDOSO, B. D., LAGRANHA, V. L., GIUGLIANI, R., MARI, J., SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., BURIN, M. G.  
Padronização da técnica da arilsulfatase A em tecidos de camundongos para posterior aplicação com pesquisa de terapia gênica In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.  
Anais do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2007.
41. MICHELIN K, WAJNER A, SOUZA, F. T. S., BURIN, M. G., SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C.  
Detecção das Doenças de Gaucher, Niemann-Pick, Fabry, MPS I e Pompe através de sangue colhido em papel filtro In: XI Simpósio Latino-Americano de Doenças de Depósito Lisossômico, 2006, Florianópolis.  
Reversibilidade nas Doenças de Depósito Lisossômico: Necessidade de Diagnóstico e Tratamento a Tempo. , 2006. p.160 - 160
42. MICHELIN K, WAJNER A, SOUZA, F. T. S., BURIN, M. G., SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C.  
Doença de Gaucher no Brasil: 557 casos diagnosticados bioquimicamente In: XI Simpósio Latino-Americano de Doenças de Depósito Lisossômico, 2006, Florianópolis.  
Reversibilidade nas Doenças de Depósito Lisossômico: Necessidade de Diagnóstico e Tratamento a Tempo. , 2006. p.92 - 92
43. BOCK, H., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação de alterações no gene da glicocerebrosidase em pacientes com Doença de Gaucher In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto, 2006, Porto Alegre.  
26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto. , 2006.
44. SIEBERT, M., BOCK, H., Michelin K, PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Identificação de alterações no gene da glicocerebrosidase em pacientes com Doença de Gaucher In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto, 2006, Porto Alegre.  
26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto. , 2006.
45. BOCK, H., MARI, J., CARDOSO, B. D., BURIN, M. G., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Leucodistrofia Metacromática: a aplicação do PCR em tempo real na detecção molecular de mutações frequentes em pacientes brasileiros In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre.  
26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2006.
46. SIEBERT, M., BOCK, H., MICHELIN K, PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Protocolo de identificação de mutações raras no gene da glicocerebrosidase em pacientes com doença de



gaucher In: XVIII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2006, Porto Alegre.

XVIII Salão de Iniciação Científica UFRGS. , 2006. p.466 - 466

47. CARDOSO, B. D., MARI, J., SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., GIUGLIANI, R., BURIN, M. G.

Protocolo diagnóstico para Leucodistrofia Metacromática - resultados preliminares de análise bioquímica In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre.

26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto. , 2006.

48. SOUZA, C. F. M., LAYBAUER, L., BOCK, H., CERSKI, M., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML

Análise de Deleções no DNA Mitochondrial Através de PCR em Tempo Real: Aplicação no Diagnóstico das Doenças Mitochondriais. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA, 2005, Curitiba-PR.

XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA. , 2005.

49. COELHO, J. C., MICHELIN K, WAJNER A, BOCK, H., FACHEL A, ROSENBERG, R., PIRES, R. F., SARAIVA-PEREIRA, ML, GIUGLIANI, R.

Biochemical Properties of B-glucosidase in Leukocytes from Patients and Obligated Heterozygotes for Gaucher Disease who are Carriers of Identified Mutation In: XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBq, 2005, Águas de Lindóia.

XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBq. , 2005.

50. BOCK, H., MICHELIN K, WAJNER A, GIUGLIANI, R., PIRES, R. F., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML

Detection of The 24 bp Duplication in the Chitotriosidase Gene: Allele Frequency Determination in the Brazilian Population. In: XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBq, 2005, ÁGUAS DE LINDÓIA.

XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBq. , 2005.

51. BOCK, H., MICHELIN K, WAJNER A, GIUGLIANI, R., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML

Detection of 24-bp Duplication in the Chitotriosidase Gene by Real Time PCR: Frequency in the Brazilian Population In: V Congresso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal, 2005, San José.

V Congresso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. , 2005. p.427 - 427

52. BOCK, H., VACCARO, T., BURLAMAQUE NETO, A. C., FACHEL A, MICHELIN K, PIRES, R. F., GIUGLIANI, R., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML

Gaucher Disease: Detection of Common Mutations in the Glucocerebrosidase Gene of Brazilian Patients. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA, 2005, CURITIBA-PR.

XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA. , 2005.

53. SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., MICHELIN K, WAJNER A, GIUGLIANI, R., PIRES, R. F., COELHO, J. C.

Incidence of the 24-bp Duplication in the Chitotriosidase Gene in the Brazilian Population In: SSIEM 42st Annual Symposium, 2005, Paris.

Journal of Inherited Metabolic Disease. Springer, 2005. v.28. p.174 - 174

54. BOCK, H., MARI, J., BURIN, M. G., MATTE, U., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML

Leucodistrofia Metacromática: A Aplicação do PCR em Tempo Real na Detecção Molecular de Mutações Frequentes em Pacientes Brasileiros. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA, 2005, CURITIBA-PR.

XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA. , 2005.

55. BOCK, H., GIUGLIANI, R., SARAIVA-PEREIRA, ML

Metachromatic Leukodistrophy: Application of Real Time PCR for Detecting Common Mutations in Brazilian Patients In: V Congresso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal, 2005, San José.

V Congresso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. , 2005. p.429 - 429

56. SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., GIUGLIANI, R.

Quantitative Analysis of Mitochondrial DNA Deletion by Real Time PCR: Application to Diagnosis of Mitochondrial Disorders In: SSIEM 42st Annual Symposium, 2005, Paris.

Journal of Inherited Metabolic Disease. Springer, 2005. v.28. p.136 - 136

57. BOCK, H., MICHELIN K, WAJNER A, GIUGLIANI, R., PIRES, R. F., COELHO, J. C., SARAIVA-PEREIRA, ML

detecção molecular da duplicação de 24pb no da quitotriosidase humana: resultados preliminares In: 24ª Semana Científica do HCPA, 2004, Porto Alegre.

Anais do 24ª Semana Científica do HCPA. , 2004.

58. BOCK, H., SILVA, L. P. M., MATTEVI, M. S.

A variação de seqüências anônimas de DNA (RAPD) em quatro espécies de primatas de diferentes locais da Amazônia In: XIV Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre.

XIV Salão de Iniciação Científica. , 2002.

59. BOCK, H., MORELLI, F., MATTEVI, M. S.

Análise de duas espécies crípticas de roedores, Akodon montensis e A. cursor por polimorfismos anônimos de DNA (RAPD) In: XII Salão de Iniciação Científica, 2000, Porto Alegre.

XII Salão de Iniciação Científica. , 2000.

#### Apresentação de Trabalho

1. GODINHO, F. M. S., BOCK, H., SIEBERT, M., VEIT, T. D., SARAIVA-PEREIRA, ML

Análise de deleções e conversões nos genes SMN1 e SMN2 de pacientes com suspeita clínica de Atrofia Muscular Espinhal, 2009. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

2. SIEBERT, M., SOCAL, M. P., BOCK, H., MICHELIN K, RIEDER, C, JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, ML

Mutações no gene da Glicocerebrosidase em pacientes com Doença de Parkinson, 2009. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

3. BOCK, H., LEMOS, H., MOREIRA, J. D., PORTELA, L. V. C., SOUZA, D. O. G., SARAIVA-PEREIRA, ML  
Perfil transcricional de subunidades dos receptores glutamatérgicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) em ratos., 2009. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

4. SARAIVA-PEREIRA, ML, BOCK, H., CUNHA, G. R., EMMEL, V. E., FURTADO, G. V., GUENO, T. C., GIUGLIANI, R., GODINHO, F. M. S., KIEHL, M. F., LEMOS, H., RODRIGUES, G. F., SANTA-RITA, T., SIEBERT, M., VIRGENS, M. Y. F.

Laboratório de Identificação Genética, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)