

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE OS NUCLEOTÍDEOS DA GUANINA E O
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EM RATOS**

MARIBEL ANTONELLO RUBIN

UFRGS
BIBLIOTECA SETORIAL DE
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Orientador

Prof. Dr. DIOGO O. G. DE SOUZA

**Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.**

Porto Alegre

1996

AGRADECIMENTOS

Ao Diogo, pelo carinho e atenção com que me orientou na realização deste trabalho.

Agradeço especialmente ao Carlos pelo auxílio em todas as fases deste trabalho e, principalmente, pelo carinho e o amor que tem me dado durante todos esses anos.

Aos bolsistas de Porto Alegre que trabalharam diretamente neste trabalho, Alan, Carolina e Paula pelo auxílio no trabalho e companheirismo.

A Ana Lúcia, por ter me ensinado muitas das técnicas usadas neste trabalho e, principalmente pela amizade.

As demais pessoas do laboratório: Lucia Martini, Carla Tasca, Andréa, Deusa, Luciana e Tatiana.

A todas as pessoas do Dep. Bioquímica da UFRGS pelo carinho e amizade.

Aos acadêmicos de Santa Maria: Alexandre (especialmente pela datilografia), Gabriela (especialmente pela correção do português), Jairo, Rolando, Telmo, Gami, Venícius e Juliano pela dedicação no trabalho e principalmente pela amizade.

Ao João Batista pela revisão e sugestões dadas neste trabalho.

A minha família pelo carinho, especialmente a Mãe, Marlise e Nita pelo apoio que sempre me dedicaram.

A CAPES pela minha bolsa, e aos programas Institucionais de Bolsas de Iniciação Científica CNPq/UFRGS e CNPq/UFSM.

Aos colegas docentes do Departamento de Química da UFSM pelo apoio, especialmente à Rosinha, Vera, Ester, João Batista e Carlos.

Ao Diretor e funcionários do Biotério Central da UFSM, pela sua competência e esforço para nos suprir com animais, mesmo sem condições de verba e instalações adequadas para fazê-lo.

ÍNDICE

ÍNDICE	iii
RESUMO	v
APRESENTAÇÃO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
I. INTRODUÇÃO	1
GLUTAMATO.....	1
I.1. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	3
I.1.1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS.....	5
I.1.1.a. RECEPTORES NMDA.....	7
I.1.1.b. RECEPTORES AMPA E KAINATO.....	10
I.1.2. RECEPTORES METABOTRÓPICOS.....	11
I.2. PROTEÍNAS G.....	17
I.3. AÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS DA GUANINA SOBRE A UNIÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS AOS SEUS RECEPTORES.....	23
I.4. POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO.....	25
I.5. MEMÓRIA.....	28
II. OBJETIVOS GERAIS	32
III. OBJETIVOS DO ARTIGO I	33

IV. ARTIGO 1	34
V. ANEXO DO ARTIGO 1	42
V.1. Estudo da pureza do [³ H]glutamato.....	42
V.2. Curvas de concentração de proteína para o estudo da união do [³ H]glutamato sódio- independente e dependente.....	42
V.3. Efeito dos NG sobre a união do [³ H]glutamato sódio-dependente.....	43
V.4. Efeito do GTP sobre a união do [³ H]glutamato sódio-independente na presença de EDTA.....	43
V.5. Curva de união do [³ H]GMP-PNP em todos os sítios.....	44
V.6. Curva de união do [³ H]GMP-PNP em sítios extra-proteínas G.....	45
VI. OBJETIVOS DO ARTIGO 2	52
VII. ARTIGO 2	53
VIII. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	57
VIII.1. ARTIGO 1 E ANEXO DO ARTIGO 1.....	57
VIII.2. ARTIGO 2.....	60
VIII.3. GERAL.....	62
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Após ser liberado na fenda sináptica, o glutamato une-se a receptores específicos e induz, na maioria dos casos, despolarização dos neurônios. Os receptores glutamatérgicos são classificados em dois tipos: receptores ionotrópicos, que são ligados a canais iônicos, e receptores metabotrópicos, que são acoplados a proteínas G e produção de segundos mensageiros. A união do GTP e do GDP nas proteínas G regula a união do glutamato ao seu receptor assim como a atividade do efetor celular e produção de segundos mensageiros. No estado basal o GDP está ligado em proteínas G; neste caso tanto estas proteínas como o efetor estão no estado basal. A união do GTP em proteínas G provoca diminuição na afinidade do glutamato pelo receptor assim como ativação do efetor. Entretanto, existem fortes evidências que os nucleotídeos da guanina (NG) diminuem a união do glutamato ou de seus análogos nos seus receptores, unindo-se em locais extra-proteínas G.

Em geral a infusão de drogas que facilitam a ativação dos receptores glutamatérgicos melhora a memória, enquanto que antagonistas glutamatérgicos prejudicam a memória em muitas espécies animais. O glutamato injetado no hipocampo dos ratos causa facilitação da memória em uma tarefa de esQUIVA inibitória.

Levando em consideração que existem alguns trabalhos que indicam que os NG atuam em sítios de união extra-proteínas G para deslocar a união do glutamato de seus receptores, o primeiro artigo teve como objetivos: 1) Investigar o envolvimento das proteínas G na inibição da união do [³H]glutamato induzida por nucleotídeos da guanina em membranas sinápticas de cérebro de ratos; 2) Investigar o efeito do Mg²⁺ sobre a união do [³H]GMP-PNP em membrana sináptica de cérebro de ratos. Para este estudo preparamos membranas de cérebro total de ratos, nas quais o sítio de união para GTP em proteínas G estava previamente saturado com GMP-PNP. Usando-se esta preparação, todos os NG testados (GMP, GDP-S, GMP-PNP e GTP) inibiram a união do [³H]glutamato sódio-independente, enquanto que somente o GMP-PNP ativou a adenilato ciclase. A inibição da união do [³H]glutamato sódio-independente ocorre mesmo na ausência de Mg²⁺. Esses resultados sugerem que os NG inibem a união do glutamato em membranas de cérebro total de ratos atuando em um sítio de união extra-proteínas G.

O segundo artigo teve como objetivos: 1) Investigar se o GMP também é capaz de inibir a união do [³H]glutamato em membranas sinápticas rompidas de uma estrutura cerebral específica - o hipocampo; 2) Investigar se o GMP é capaz de reverter uma ação do glutamato *in vivo*. Para isso escolhemos a melhora da memória em uma tarefa de esQUIVA inibitória induzida pela injeção de glutamato no hipocampo de ratos. Os resultados desse artigo mostraram que o GMP inibiu a união do [³H]glutamato sódio-independente em membrana sináptica de hipocampo de ratos, assim como reverteu o efeito facilitatório do glutamato sobre a memória.

Os resultados do presente estudo indicam que em cérebro de ratos adultos os NG unem-se, pelo menos em parte, em local extra-proteínas G e com isso diminuem a união do [³H]glutamato a seus receptores de membranas sinápticas *in vitro*, assim como bloqueiam o efeito estimulatório do glutamato sobre a memória. Porém, o mecanismo preciso e o significado fisiológico dessa interação permanecem indefinidos.

APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta artigos publicados, os quais se encontram anexados nos itens correspondentes. Os itens MATERIAL E MÉTODOS e RESULTADOS encontram-se nos próprios artigos e no ANEXO DO ARTIGO 1, e representam a íntegra deste estudo.

O item DISCUSSÃO E CONCLUSÕES aborda o ARTIGO 1 E ANEXO DO ARTIGO 1, e o ARTIGO 2, assim como uma conclusão GERAL para o presente trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS apresentadas na seção final referem-se somente àquelas que aparecem no texto (excetuando as que aparecem nos artigos).

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Esquema de um terminal sináptico.....	2
Esquema I.1. Receptores glutamatérgicos.....	4
Figura I.2a. Estado basal do sistema de transdução do sinal celular.....	17
Figura I.2b. O hormônio se liga ao receptor, provocando uma alteração conformacional.....	17
Figura I.2c. A ligação do GTP à subunidade α provoca uma diminuição na afinidade do receptor pelo hormônio (ou glutamato), liberando-o.....	18
Figura I.2d. Após ativar a proteína efetora, a subunidade α termina seu efeito através da hidrólise do GTP unido, transformando-o em GDP e se dissociando do efector.....	18
Figura V. 1. Cromatografia do [3 H]glutamato para verificação da sua pureza.....	46
Figura V. 2. Curvas de concentração de proteína para o estudo da ligação do [3 H]glutamato sódio-independente e dependente.....	47
Figura V. 3. Efeito dos nucleotídeos da guanina (1 mM) sobre a união de [3 H]glutamato sódio-dependente (150 mM de NaCl) em membranas pré-incubadas com ou sem GMP-PNP.....	48
Figura V. 4. Efeito do GTP sobre a união do [3 H]glutamato sódio-independente na presença de EDTA, em membranas pré-incubadas com ou sem GMP-PNP.....	49
Figura V. 5. Curva de saturação e Plot de Scatchard (gráfico inserido) da união do [3 H]GMP-PNP na membrana sináptica.....	50
Figura V. 6. Curva de saturação e Plot de Scatchard (gráfico inserido) da união do [3 H]GMP-PNP nos sítios extra-proteínas G na membrana sináptica.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Receptores ionotrópicos.....	6
Tabela I.2. Distinção farmacológica entre os subtipos de mGluRs clonados.....	16
Tabela I.3. Proteínas G e seus efetores.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAE** - Aminoácidos excitatórios.
- AC** - Adenilato Ciclase.
- ACPD** - 1-Amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato.
- AMPA** - Ácido DL-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico.
- AMPc** - Adenosina monofosfato cíclica.
- AP-5** - Ácido-2-amino-5-fosfonopentanóico.
- Br-HIBO** - (S)-4-Bromo homoibotenato.
- 4C3HPG** - 4-Carboxi-3-hidroxifenilglicina.
- CNQX** - Ciano-3,3-diidro-7-nitroquinoxalina.
- CO** - Monóxido de carbono.
- 4CPG** - 4-Carboxifenilglicina.
- DAG** - 1,2 Diacilglicerol.
- DCG-IV** - 2-(2,3-Dicarboxiciclopropil)-glicina.
- DNQX** - 6,7- Dinitroquinoxalina-2,3-diona.
- GDP** - Guanosina difosfato.
- GDP-S** - Guanosina-5'-O-(2-tiodifosfato).
- Glu** - Glutamato.
- GMP** - Guanosina monofosfato.
- GMP-PNP** - Guanilil-imidodifosfato.
- GTP** - Guanosina trifosfato.
- GTP-C** - 5'-Guanililmetileno-difosfato.

HO - Heme oxigenase.

IP3 - Inositol 1,4,5-trifosfato.

KA - Kainato.

L-AP4 - L-2-Amino-4 fosfonobutanoato.

L-CCG-I - (2S,1'S,2'S)-2-(carboxiciclopropil)-glicina.

L-SOP - L-Serina-*O*-fosfato.

LTD - Depressão de longa duração.

LTP - Potenciação de longa duração.

MCPG - α -Metil-4-carboxifenilglicina.

mGluRs - Receptores glutamatérgicos metabotrópicos.

MK-801 - Dizocilpina.

NBQX - 2,3-Diidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(F)-quinoxalina.

NMDA - N-metil-D-aspartato.

NG - Nucleotídeos da guanina.

NO - Óxido nítrico.

NOS - Óxido nítrico sintetase.

PCP - Fenciclidina.

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

PKC - Proteína quinase C.

PLC - Fosfolipase C.

SNC - Sistema nervoso central.

(1S, 3R)-ACPD - (1S, 3R) 1-Amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato.

TCP - N-(1-Tienil)-Ciclohexil-3,4-piperidina.

I. INTRODUÇÃO

GLUTAMATO

A maioria das sinapses excitatórias do sistema nervoso central (SNC) têm glutamato e, em menor proporção, aspartato como neurotransmissor (Schoepp & Conn, 1993; Nakanishi & Masu, 1994; Westbrook, 1994; Brann, 1995; Cotman et al, 1995; Pin & Duvoisin, 1995). Em função desta particularidade, estes aminoácidos são denominados aminoácidos excitatórios (AAE). Os AAE estão envolvidos em uma grande variedade de processos fisiológicos, tais como reprodução, aprendizado e memória, regulação neuroendócrina, assim como algumas doenças neurodegenerativas, tais como doença de Huntington, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer e em processos agudos como epilepsia (McEntee & Crook, 1993; Lipton & Rosenberg, 1994; Brann, 1995).

O glutamato é sintetizado nos terminais nervosos a partir de: 1) glicose, via ciclo de Krebs e transaminação do α -cetoglutarato, e 2) glutamina, que é sintetizada nas células gliais, transportada para os terminais nervosos e neste local convertida em glutamato pela glutaminase (Scatton, 1993). Nos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, o glutamato é armazenado nas vesículas, de onde é liberado para a fenda sináptica por exocitose de uma maneira Ca^{2+} -dependente. A ação do glutamato é terminada através da recaptação do aminoácido pela glia e neurônios (Figura I.1). Nas células gliais, a glutamina sintetase converte glutamato em glutamina que é, então, transportada para os terminais nervosos vizinhos, onde serve como precursora para o glutamato (Scatton, 1993). A glutamina pode também ser oxidada nos astrócitos e formar α -cetoglutarato (via ciclo de Krebs) que pode ser transportado para os neurônios para repor o α -cetoglutarato perdido durante a síntese de glutamato neuronal (Carter et al., 1986).

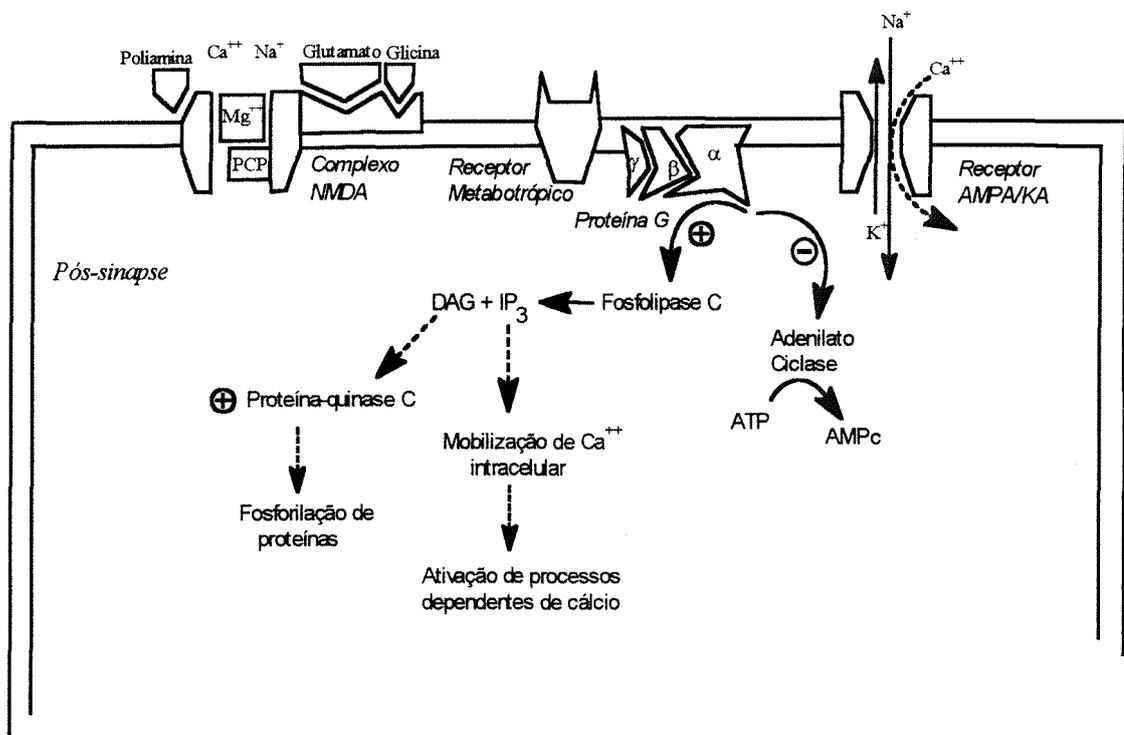
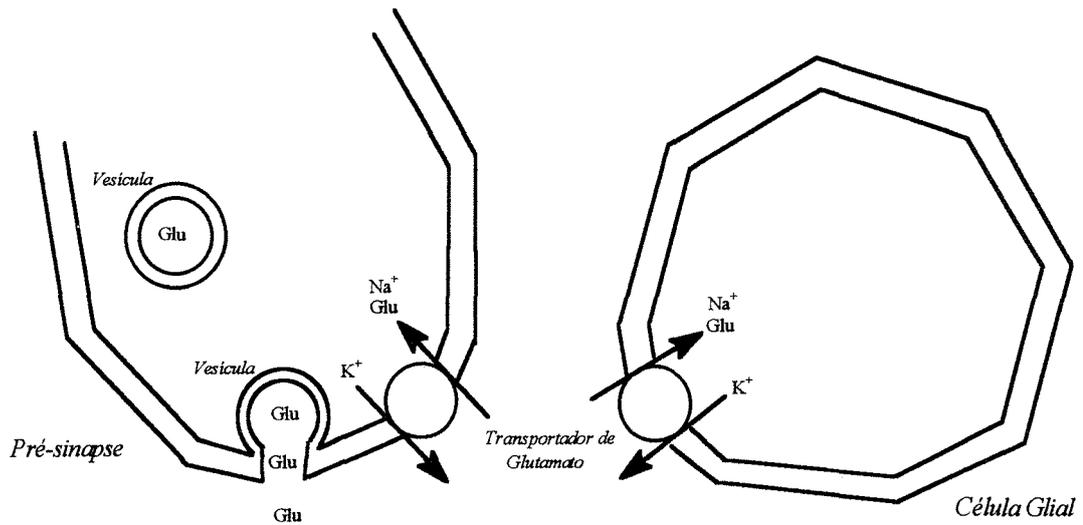
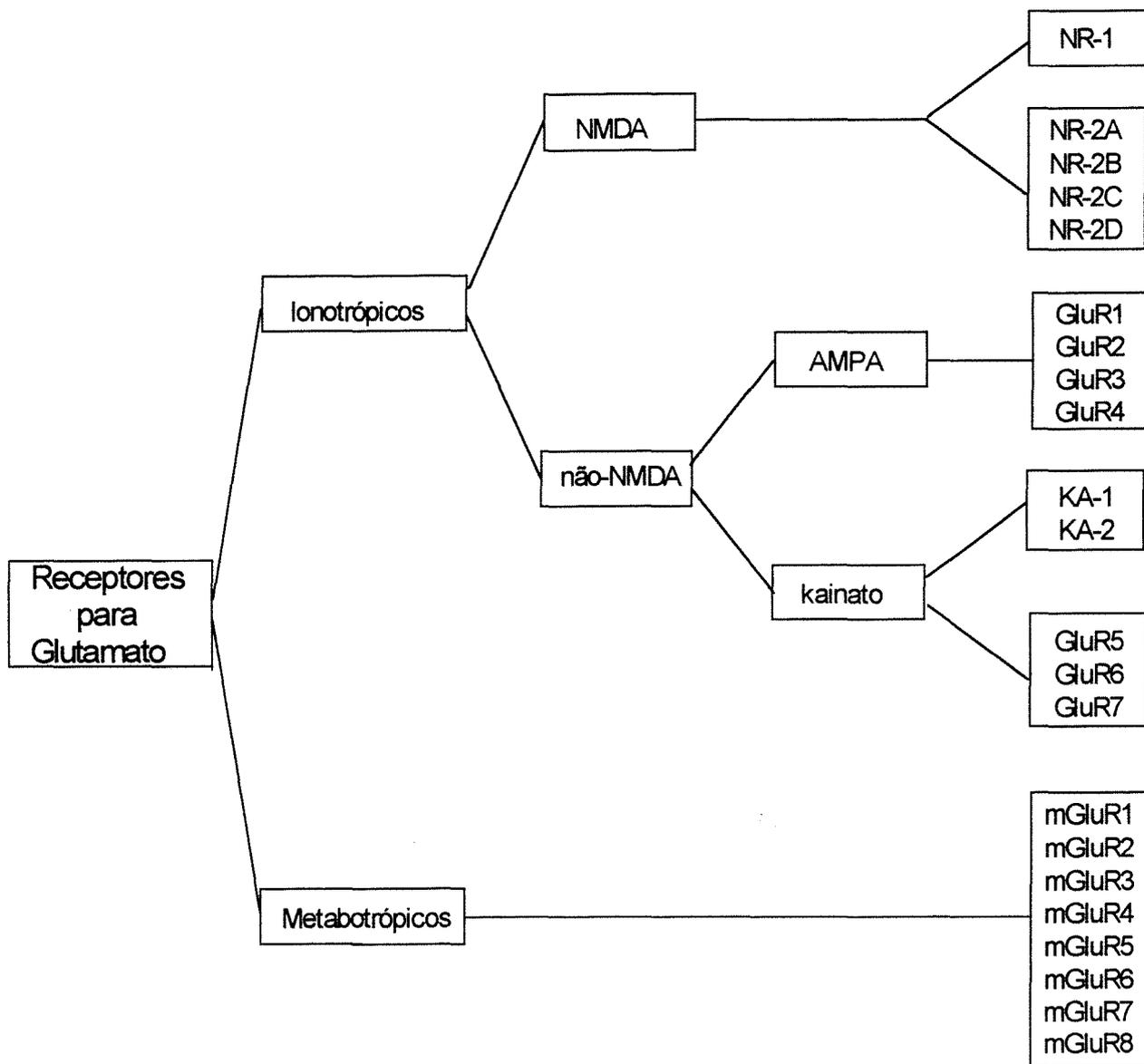


Figura I.1. Esquema de um terminal sináptico. Após ser liberado das vesículas dos terminais pré-sinápticos, o glutamato pode ligar-se em um de seus receptores específicos e induz, na maioria dos casos, despolarização dos neurônios pós-sinápticos. A ação do glutamato é terminada através da recaptação do aminoácido pela glia e neurônios.

I.1. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Após ser liberado na fenda sináptica, o glutamato une-se a receptores específicos e induz, na maioria dos casos, despolarização dos neurônios pós-sinápticos. De acordo com estudos farmacológicos e moleculares, os receptores glutamatérgicos (GluRs) são classificados em dois grandes grupos (Esquema I.1.): 1) receptores ionotrópicos, que são canais iônicos e cuja ativação resulta na abertura destes canais, com aumento do fluxo de íons através da membrana neuronal, e 2) receptores metabotrópicos, que estão acoplados a proteínas G e modulam a produção de segundos mensageiros tais como inositol fosfato e/ou AMPc (Figura I.1) (Schoepp e Conn, 1993; Brann, 1995; Cotman et al, 1995; Pin e Duvoisin, 1995). Os receptores ionotrópicos, por sua vez, podem ser subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato) e não-NMDA [AMPA (ácido DL-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) e KA (kainato)] (Gasic e Hollmann, 1992; Jorgensen et al., 1995).



Esquema I.1. Receptores glutamatérgicos.

Adaptado de Jorgensen e colaboradores, 1995

I.1.1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são canais iônicos caracterizados pela sua permeabilidade seletiva a Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , e sua estimulação causa uma estimulação neuronal (na ordem de milissegundos) (Tabela I.1) (Brann, 1995).

Os receptores ionotrópicos são estruturalmente similares a outros receptores ligados a canais iônicos, como os receptores colinérgico nicotínico (nAChR), GABAérgico (GABA_A) e glicinérgico. Todos estes receptores são proteínas transmembranas pentaméricas, compostas por subunidades iguais ou diferentes. Estas subunidades estão distribuídas ao redor de um poro central permeável a cátions. Estes receptores possuem quatro segmentos transmembrana (TMI até TMIV) e formam α -hélices em que o segmento TMII apresenta o lado polar voltado para o poro do canal. As porções carbóxi e amino-terminais da proteína estão voltadas para o lado externo da célula (Nakanishi, 1992).

Apesar do modelo descrito acima ser aceito como provável para os receptores glutamatérgicos ionotrópicos, existem autores que sugerem algumas diferenças. Uma delas seria que o domínio carbóxi-terminal estaria localizado no lado citoplasmático da membrana (Molnár et al., 1993; Taverna et al., 1994). Outra diferença seria a existência de um domínio transmembrana adicional (TMIIIa) introduzido entre TMIII e TMIV (Seeburg, 1993).

Tabela I.1: Receptores Ionotrópicos

Receptores e subunidades	Características	Agonistas	Antagonistas
NMDA NR ₁	medeia transmissão sináptica lenta; forma canais homoméricos ou heteroméricos.	NMDA, Glu homocisteína.	MK-801, AP-5, AP-7.
NR2A-2D	15% de homologia com NR ₁ ; não forma canais heteroméricos.	NMDA	como acima
AMPA GluR ₁ GluR ₃ GluR ₄ GluR ₂	medeia transmissão sináptica rápida; forma canais homoméricos ou heteroméricos. em canais heteroméricos esta subunidade determina a condutância do canal e permeabilidade ao Ca ²⁺	AMPA, Glu AMPA, Glu	CNQX, DNQX, NBQX como acima
Kainato GluR ₅ , GluR ₆ GluR ₇ KA ₁ , KA ₂	medeia transmissão sináptica rápida formam canais homoméricos ou heteroméricos. não forma canais homoméricos. não formam canais homoméricos.	KA, Glu KA, Glu KA, Glu	CNQX, DNQX CNQX, DNQX CNQX, DNQX

Adaptado de Brann, 1995

I.1.1.a. RECEPTORES NMDA

O receptor NMDA é um complexo formado por receptor e canal, ele foi inicialmente identificado e separado farmacologicamente dos outros receptores para AAE por sua ativação seletiva pelo agonista NMDA. Contudo, foi demonstrado que sua atividade é regulada através de uma série de reguladores alostéricos (Cotman et al., 1995). O receptor NMDA medeia transmissão sináptica excitatória lenta, e a sua ativação resulta no influxo de Ca^{2+} e Na^+ , assim como no efluxo de K^+ (Scatton, 1993; Lipton & Rosenberg, 1994). A ativação do receptor NMDA possui um papel muito importante na indução da potenciação de longa duração (LTP) (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo & Medina, 1995) e nos fenômenos eletrofisiológicos associados à plasticidade neuronal. Por outro lado, a sua estimulação excessiva acarreta um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular e morte celular (Scatton, 1993; Lipton & Rosenberg, 1994). Recentemente, tem sido proposto que os receptores NMDA possam estar envolvidos na morte celular observada em algumas doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Scatton, 1993; Nicoletti et al., 1996).

Os receptores NMDA estão amplamente distribuídos no SNC de mamíferos, com alta densidade nas camadas superficiais do córtex cerebral, nas regiões CA1 e giro denteado do hipocampo, nas células granulares do cerebelo, no estriado, septo, tálamo e medula espinhal (Scatton, 1993).

O receptor NMDA é regulado através de vários sítios onde se ligam diversos compostos endógenos e exógenos, sendo eles: 1) sítio de ligação para agonistas e antagonistas competitivos; 2) sítio que liga Mg^{2+} produzindo bloqueio voltagem-dependente do canal (Barnes & Henley, 1992); 3) sítio para cátion divalente localizado no canal, onde se liga o Zn^{2+} , produzindo um

bloqueio voltagem-independente (Mayer et al., 1992); 4) sítio de ligação para anestésicos dissociativos tais como quetamina e fenciclidina (PCP) chamado “sítio para PCP” (Mayer et al., 1992); 5) sítio modulatório para glicina (insensível a estriçnina) (Johnson & Ascher, 1987); 6) sítio regulatório de ligação para poliaminas (espermina e espermidina) que facilita a transmissão mediada por NMDA (Ransom & Stec, 1988). Estes sítios são específicos e se distribuem em locais distintos no canal NMDA (Scatton, 1993).

Uma peculiaridade do receptor NMDA é que no potencial de repouso o canal está totalmente bloqueado por Mg^{2+} (Ascher & Nowak, 1987), e é necessária uma despolarização da membrana neuronal pós-sináptica para que o Mg^{2+} seja retirado do canal e para que ocorra a passagem de íons pelo canal NMDA (Barnes & Henley, 1992; Cotman et al., 1995). Isto significa que somente um estímulo forte ou repetido, que causa despolarização da célula nervosa, permite a ativação do receptor NMDA. O bloqueio voltagem-dependente do canal do NMDA por Mg^{2+} pode ser visto como um mecanismo protetor intrínseco contra a entrada excessiva de Ca^{2+} na célula e subsequente toxicidade neuronal (Scatton et al., 1991). Em condições de hipóxia/isquemia este mecanismo protetor não existe, por causa da grande despolarização, ocorrendo entrada maciça de Ca^{2+} e subsequente morte neuronal (Scatton et al., 1991).

Além do controle inibitório exercido pelo Mg^{2+} , o receptor NMDA possui um controle positivo que ocorre nos sítios da glicina e das poliaminas. A ligação da glicina ao receptor parece ser fundamental para sua ativação, funcionando como co-agonista (Johnson & Ascher, 1987). As poliaminas potenciam as respostas do receptor NMDA na presença de concentrações saturantes de glutamato e glicina, mas ao contrário da glicina sua presença não é necessária para a ativação do receptor NMDA (Carter et al., 1991).

As ações do glutamato podem ser antagonizadas farmacologicamente utilizando compostos capazes de competir diretamente com o glutamato no seu sítio de reconhecimento no receptor NMDA. Exemplos destes antagonistas competitivos são: ácido-2-amino-5-fosfonopentanóico (AP-5), ácido-2-amino-5-fosfoheptanóico (AP-7), 3-(2-carboxipiperazina-4-propil)-1-fosfato (CPP), 4-fosfometil-2-piperidina (CGS 19755) e CGP 37849 (Mayer et al., 1992). Além disso, existem bloqueadores do receptor NMDA que não competem no sítio de ligação para glutamato, mas bloqueiam o canal NMDA, por exemplo: alguns anestésicos dissociativos tais como ketamina e fenciclidina, além de TCP, dizocilpina (MK-801), memantina e dextrorfan. Foram identificados também antagonistas do sítio regulatório da glicina, que são derivados do ácido quinurênico e ácido indolacético (Rowley & Leeson, 1992). Estes compostos têm se mostrado bloqueadores efetivos do dano excitotóxico induzido por glutamato em cultura de células e em diversos modelos experimentais *in vivo* incluindo hipóxia, isquemia e trauma crânio-encefálico. (Hirose & Chan, 1993; Prehn et al., 1995; Steinberg et al., 1995).

A estrutura do receptor NMDA, assim como dos demais receptores ionotrópicos, é pentamérica (Mayer et al., 1992) e consiste de várias subunidades com diferentes massas moleculares (33-67 kD). Estas subunidades estão agrupadas em duas famílias (Esquema I.1 e Tabela I.1): NR-1 e NR-2A-2D. A família NR-1 apresenta características eletrofisiológicas e farmacológicas do próprio receptor do NMDA, incluindo permeabilidade ao Ca^{2+} , bloqueio voltagem-dependente pelo Mg^{2+} e estimulação por glicina (Nakanishi, 1992). A segunda família de subunidades dos receptores do NMDA (NR-2A-2D) é considerada como sendo de subunidades modulatórias, e não forma canais sozinha (canais homoméricos), mas forma canais heteroméricos (canais compostos de mais do que um tipo de subunidade). A família NR-1 serve como subunidade fundamental para a formação do receptor NMDA e forma configuração

heteromérica com diferentes membros das subunidades NR-2A-2D. A combinação de NR-1 com diferentes subunidades repercute em propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas diferentes. Desse modo, dependendo da composição das subunidades, tanto a afinidade por agonistas como a resposta cinética, sensibilidade ao bloqueio por Mg^{2+} e o efeito estimulatório da glicina podem ser alterados (Ishii et al., 1993).

I.1.1.b. RECEPTORES AMPA E KA

Os receptores AMPA e KA medeiam transmissão sináptica excitatória rápida e estão associados a canais voltagem-independentes. São permeáveis a Na^+ e K^+ (Ascher & Nawak, 1988; Vyklicky et al., 1988) e, em geral, têm baixa permeabilidade para Ca^{2+} (Mayer & Westbrook, 1987). A permeabilidade ao Ca^{2+} foi demonstrado em neurônios hipocâmpais (Iino et al., 1990) e em retina (Gilbertson et al., 1991).

Os receptores AMPA estão amplamente distribuídos no SNC de mamíferos, em geral nos mesmos locais dos receptores NMDA. Os receptores KA, ao contrário, estão concentrados em poucas áreas cerebrais (Scatton, 1993).

O receptor AMPA contém 4 tipos de subunidades (GluR1 - GluR4, também chamado GluR-A até GluR-D) enquanto que o receptor KA possui 2 tipos de subunidades diferentes (GluR5 - GluR7, KA-1 e KA-2) (Esquema I.1 e Tabela I.1) (Jorgensen et al., 1995). Os receptores homoméricos formados pelas subunidades GluR1, GluR3 e GluR4 são permeáveis ao Ca^{2+} , enquanto que GluR2 forma canais impermeáveis a este íon. Quando o GluR2 forma canal heteromérico com outras subunidades do receptor AMPA formam-se canais com permeabilidade semelhante ao GluR2 (Jorgensen et al., 1995). A baixa permeabilidade ao Ca^{2+} apresentada pelos receptores AMPA está relacionada com a presença de um resíduo de arginina na subunidade GluR2 (McEntee & Crook, 1993). A substituição deste resíduo de arginina por glutamina resulta em aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} (Hume et al., 1991; Verdoorn et al., 1991).

Atualmente são conhecidos oito genes que codificam mGluRs e, provavelmente, no futuro outros serão isolados (Pin & Duvoisin, 1995). Os mGluRs podem ser classificados em três grupos baseados em sua homologia de aminoácidos, mecanismo de transdução e farmacologia (Tabela I.2). Os receptores do mesmo grupo apresentam 70% de homologia na sequência de aminoácidos, enquanto que entre os grupos esta porcentagem cai para 45% (Pin & Duvoisin, 1995).

Os mGluRs estão envolvidos em muitas funções cerebrais, por exemplo, eles participam na indução da plasticidade neuronal tal como LTP (Bliss & Collingridge, 1993) e LTD (Nakanishi, 1992). Eles também possuem um papel importante na indução de convulsões e morte neuronal (Sacaan et al., 1992; McDonald et al., 1993; McEntee & Crook, 1993; Tizzano et al., 1995; Nicoletti et al., 1996). O agonista de mGluR, (1S,3R) 1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato (1S,3R-ACPD) induz rotação contralateral quando injetado unilateralmente no estriado de ratos (Sacaan et al., 1991), e induz convulsão em ratos (Sacaan et al., 1992; McDonald et al., 1993) e em camundongos (Tizzano et al., 1995). A convulsão provocada pelo 1S,3R-ACPD provavelmente está relacionada com a ativação dos mGluRs associados à PLC e com a mobilização de Ca^{2+} intracelular, uma vez que a convulsão é bloqueada por agentes que inibem a mobilização intracelular deste íon (Tizzano et al., 1993).

Muitos agonistas do glutamato, incluindo derivados da ciclopropilglicina [(2S,1'S,2'S)-2-(carboxiciclopropil)-glicina (L-CCG-I) e 2-(2,3-dicarboxiciclopropil)-glicina (DCG-IV)] e os diferentes estereoisômeros do 1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato (ACPD) tem sido de grande utilidade para discriminar os mGluRs nos diferentes grupos. Além do mais, algumas moléculas permitem a diferenciação entre os receptores no mesmo grupo (Pin & Duvoisin, 1995) (ver Tabela I.2). O análogo do glutamato, L-2-amino-4 fosfonobutanoato (L-AP4) é um potente agonista do mGluR4 e inibe a transmissão sináptica ao se ligar no receptor pré-sináptico do glutamato, diminuindo a liberação deste (Koerner & Johnson 1992; Trombley & Westbrook, 1992).

Um dos passos necessários para elucidar o papel fisiológico dos receptores foi a caracterização de antagonistas específicos. Recentemente Watkins e Collingridge (1994) caracterizaram alguns

antagonistas competitivos para mGluRs incluindo derivados da fenilglicina [α -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG), 4-carboxifenilglicina (4CPG) e 4-carboxi-3-hidroxifenilglicina (4C3HPG)].

Através da afinidade seletiva pelos agonistas e pelos antagonistas dos mGluRs podemos diferenciá-los dentro do mesmo grupo. Por exemplo: no grupo I - 4CPG e 4C3HPG são potentes antagonistas do mGluR1 mas não do mGluR5, 4C3HPG tem fraca atividade agonista em mGluR5 (Joly et al., 1995); no grupo II - quisqualato é ativo em mGluR3 mas é quase inativo em mGluR2; no grupo III - os agonistas apresentam baixa potência em mGluR7 (Okamoto et al., 1994; Saugstad et al., 1994).

Os mGluRs possuem sete domínios transmembrana, mas não apresentam homologia de seqüência com outros receptores acoplados a proteínas G. Eles possuem um grande domínio amino-terminal extracelular com aproximadamente 600 resíduos de aminoácidos. O'Hara e colaboradores (1993) usando análise computacional revelaram que esse domínio possui homologia com as proteínas periplasmáticas bacterianas (PPBs) que ligam aminoácidos ou íons. A proteína homóloga que tinha a maior semelhança com a seqüência observada em receptores metabotrópicos (proteína que liga leucina/isoleucina/valina - PLIV) foi usada para construir um modelo para o sítio de ligação de glutamato no mGluR1. Este modelo propõe que a região amino-terminal do mGluR1 forma duas estruturas globulares com um sulco central que liga glutamato. A segunda alça intracelular e a porção amino-terminal do domínio carbóxi-terminal intracelular estão envolvidas no acoplamento do mGluR1 com as proteínas G (Pin et al., 1994). Uma questão até agora não resolvida é como a interação do glutamato com o domínio extracelular pode induzir mudanças conformacionais na alça intracelular levando à ativação de proteínas G? Uma hipótese é que uma região rica em cisteína transmite para os segmentos transmembrana as mudanças conformacionais induzidas pela união do glutamato no domínio semelhante ao PLIV (Pin & Bockaert, 1995). Os mGluRs do grupo I possuem também um longo domínio carbóxi-terminal. Análises do mGluR1 revelaram que esse domínio está envolvido nas propriedades de transdução do sinal extracelular (Pickering et al., 1993) e, possivelmente, é responsável pela orientação dos

receptores a diferentes compartimentos neuronais (Fotuhi et al., 1993). Além disso, a presença de múltiplos resíduos de serina e treonina e de sítios de fosforilação de muitas proteína quinases sugerem que este domínio está envolvido na regulação do receptor (Pin & Bockaert, 1995).

Os mGluRs do grupo I ativam PLC, isto é, o glutamato ao se ligar a esses receptores ativa uma proteína G que, por sua vez, ativa a enzima PLC (Figura I.1). Essa enzima ativada hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) liberando 1,2 diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). O DAG ativa a proteína quinase C na presença de cálcio e fosfatidilserina. O IP₃, por sua vez, libera Ca²⁺ dos estoques intracelulares aumentando os níveis deste íon no citosol (Nakanishi, 1992). Ainda não foram identificadas claramente as proteínas G envolvidas na ativação da PLC pelos mGluRs deste grupo (Pin & Duvoisin, 1995). A hidrólise de PIP₂, mediada por glutamato, é grande durante as primeiras semanas de vida pós-natal em muitas regiões cerebrais e decai progressivamente com o desenvolvimento (Catania et al., 1994). Os mGluRs ligados à ativação da PLC estão ativados em diferentes condições em cérebro de animais adultos, tais como isquemia (Seren et al., 1989), LTP (Bliss & Collingridge, 1993), aprendizado espacial (Nicoletti et al., 1988), e “kindling” (Yamada et al 1989). Estes achados sugerem que os mGluRs do grupo I possuem um papel importante na sinaptogênese e plasticidade sináptica tanto nos estágios iniciais do desenvolvimento como na vida adulta (Catania et al., 1994).

Os mGluRs dos grupos II e III estão acoplados à inibição da AC (Prézeau et al., 1994). No caso dos mGluRs do grupo II foi observada uma inibição acentuada da produção de AMPc estimulada por forskolina (Tanabe et al., 1992, 1993). Por outro lado, dependendo do receptor examinado e da linha de células, a inibição máxima obtida com os mGluRs do grupo III foi menor do que 50% (Nakajima et al., 1993; Okamoto et al., 1994; Saugstad et al., 1994; Tanabe et al., 1993). Contudo, em todos os mGluRs dos grupos II e III a transdução foi totalmente inibida pela toxina pertussis (TPX), sugerindo que, como no caso de outros receptores que inibem AC, as proteínas G envolvidas neste acoplamento são da família das Gi (Pin & Duvoisin, 1995).

Como citado acima, classicamente os mGluRs do grupo I estão ligados à ativação da PLC, enquanto que os mGluRs dos grupos II e III estão ligados à inibição da AC. Entretanto, o

mecanismo exato da transdução dos mGluRs em neurônios e células gliais parece ser mais complexo (Pin & Bockaert, 1995). Por exemplo, o uso de um agonista específico para mGluRs do grupo II inibe a formação de AMPc somente em células granulares do cerebelo que expressam mGluR4 (Prézeou et al., 1994). Em neurônios, mGluRs do grupo III estão ligados à inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (Trombley & Westbrook, 1992). Outro exemplo é que com o uso de agonistas específicos para os mGluRs do grupo I revelou-se que estes receptores possuem muitos efeitos tais como: bloqueio do canal de K^+ , ativação de canais de cátions não seletivos, potenciação de respostas do NMDA, inibição ou potenciação das respostas de AMPA e regulação de canais de Ca^{2+} (para revisão ver Pin & Duvoisin, 1995). Portanto, outros mecanismos mais complexos podem estar envolvidos na transdução do sinal através dos mGluRs.

Tabela I.2: Distinção farmacológica entre os subtipos de mGluRs clonados.

Subtipo de mGluR	Transdução	Ordem de potência dos agonistas	Antagonista
Grupo I mGluR1, mGluR5	+ PLC	Quisqualato>Glutamato>Ibotenato> LCCG-I>(1S,3R)-ACPD Inativo: DCG-IV e (1S,3S)-ACPD	MCPG
Grupo II mGluR2, mGluR3	- AC	DCG-IV>L-CCG-I>Glutamato> (1S,3R)-ACPD>4C3HPG> Ibotenato>Quisqualato	MCPG
Grupo III mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8	- AC	L-AP4>L-SOP>Glutamato>Ibotenato> Quisqualato>(1S,3R)-ACPD	

Adaptado de Pin & Bockaert, 1995

+ PLC significa que os mGluRs deste grupo ativam a fosfolipase C.

- AC significa que os mGluRs destes grupos inibem a adenilato ciclase.

I.2. PROTEÍNAS G

A captação e o processamento das informações através das células é mediada por um grande número de proteínas existentes nas suas membranas plasmáticas. Estas proteínas incluem receptores de superfície que reconhecem mensageiros químicos ou físicos do exterior tais como hormônios, neurotransmissores ou fatores de crescimento e que transmitem estes sinais para efetores. Essas moléculas efetoras, usualmente associadas às membranas, ativam segundos mensageiros químicos que exercem ações específicas em proteínas alvo dentro das células. A comunicação entre receptores e efetores em muitos casos é mediada pelas proteínas G. Estas proteínas são cruciais para a especificidade, velocidade e amplificação da transdução do sinal através das membranas celulares (Birnbaumer, 1990; Hepler & Gilman, 1992; Baldwin, 1994; Strader et al., 1994; Müller & Lohse, 1995; Neer, 1995; Nurnberg et al., 1995; Gudermann et al., 1996).

A interação do hormônio com o receptor representa o primeiro passo na cascata de eventos que envolve a transdução do sinal e a ação do hormônio. Entre a ligação do hormônio ao seu receptor e a ação do efector, proteínas G atuam com elementos intermediários. As proteínas G são compostas por três subunidades distintas, denominadas α (39-52 kDa), β (35-36 kDa) e γ (6-8 kDa); e são assim chamadas porque a subunidade α é capaz de ligar nucleotídeos da guanina (GDP e GTP) (Hepler & Gilman, 1992; Müller & Lohse, 1995). Seguiremos passo a passo estes eventos, mostrando de que forma ocorre a transmissão do sinal, e a participação de cada uma das subunidades das proteínas G nesse processo (figuras I.2a- I.2d) (Adaptado de Silva e colaboradores, 1994). Os passos mostrados a seguir serão de proteínas Gs, isto é, acopladas à estimulação da adenilato ciclase.

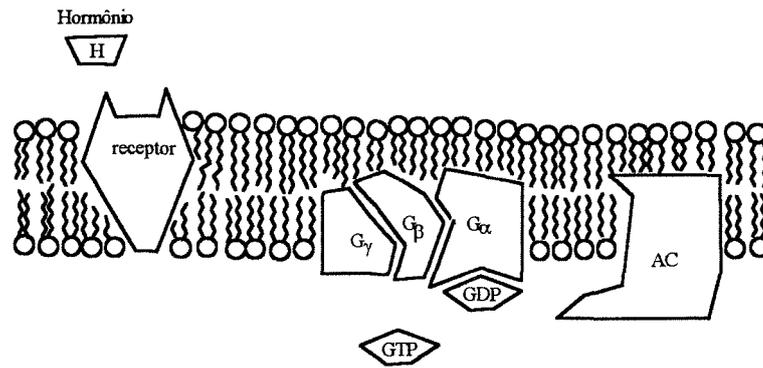


Figura I.2a. Estado basal do sistema de transdução do sinal celular. O receptor não está ocupado. As proteínas G estão na forma de heterotrímero (as três subunidades unidas entre si), e a subunidade α apresenta uma molécula de **GDP** ligada, o que deixa esta subunidade **inativa**. O efetor (neste exemplo, colocamos a enzima adenilato ciclase -AC- como efetor) também se encontra no estado basal.

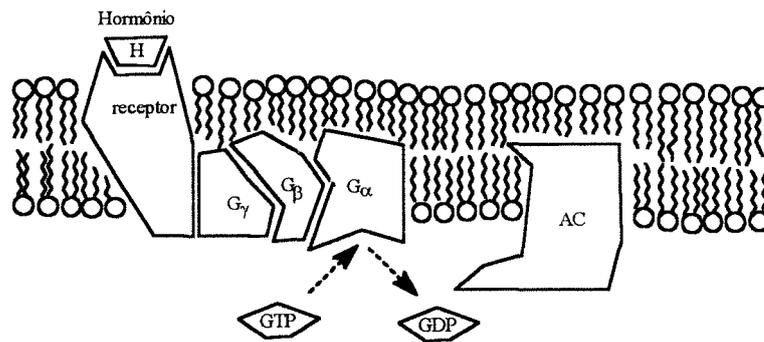


Figura I.2b. O hormônio se liga ao receptor, provocando uma alteração conformacional. O receptor interage com o heterotrímero, produzindo uma alteração conformacional no complexo e deslocando o GDP da subunidade α . O GTP se liga ao sítio anteriormente ocupado pelo GDP na subunidade α , **ativando-a**.

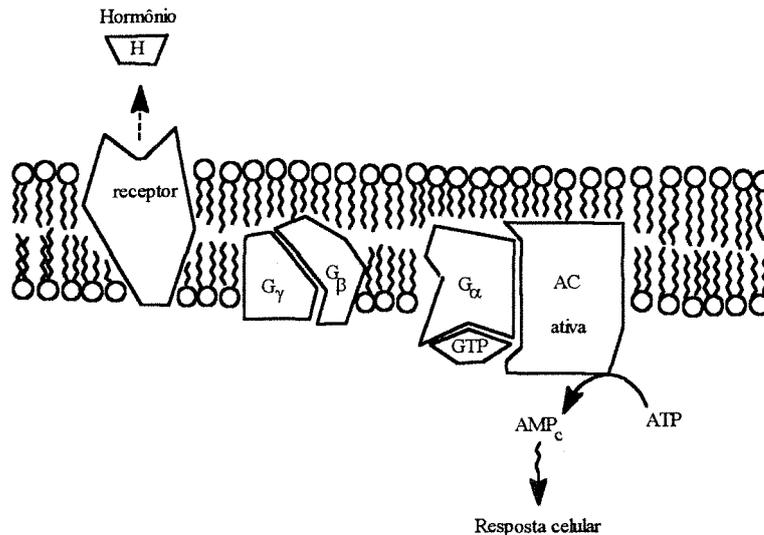


Figura I.2c. A ligação do GTP à subunidade α provoca uma diminuição na afinidade do receptor pelo hormônio (ou glutamato), liberando-o. Simultaneamente, diminui a afinidade entre as moléculas do heterotrîmero, e a subunidade α ativada se dissocia do complexo $\beta\gamma$ (que teria, entre outras, uma função de ancoramento da subunidade α à membrana (Muller & Lohse, 1995), e se liga ao efetor, **ativando-o**. A proteína efetora (adenilato ciclase), fica ativada gerando o segundo mensageiro (neste caso, é o AMP_c).

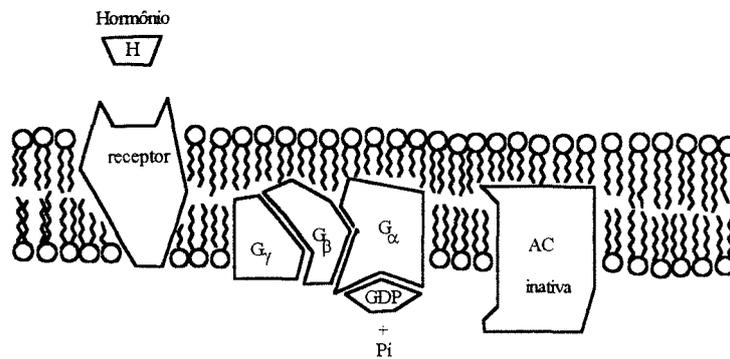


Figura I.2d. Após ativar a proteína efetora, a subunidade α termina seu efeito através da hidrólise do GTP unido, transformando-o em GDP e se dissociando do efetor. Esta hidrólise é catalisada pela própria subunidade α , que possui uma atividade GTPásica (Sunyer et al., 1984; Birnbaumer, 1990; Hepler & Gilman, 1992; Spiegel et al., 1992; Muller & Lohse, 1995). A presença do GDP aumenta a afinidade da subunidade α pelas subunidades β e γ , recompondo o heterotrîmero e voltando todo sistema ao estado basal.

Está bem estabelecido que o Mg^{2+} é essencial para a ativação de proteínas G pelo GTP (Cassel & Selinger, 1978; Limbird & Lefkowitz, 1978; Iyengar & Birnbaumer, 1982). Em membrana plasmática de fígado de rato a ativação da AC por GTP-S (GTP não hidrolisável) só ocorre na presença do Mg^{2+} (Iyengar & Birnbaumer, 1982). Além disso, neste trabalho os autores submetem a preparação a pré-incubação com GTP-S na presença de Mg^{2+} , lavam a preparação na presença ou ausência deste íon e medem a atividade da AC. A AC está ativada na preparação pré-incubada com GTP-S e lavada na presença de Mg^{2+} , sugerindo a necessidade deste íon para ligação do GTP-S em proteínas G, ativando-as. Portanto, o Mg^{2+} e o GTP-S promovem a dissociação das subunidades α e β γ das proteínas G e a ativação destas proteínas.

As proteínas G foram inicialmente classificadas de acordo com o papel desempenhado pela subunidade α . No nosso exemplo, mostramos proteínas G cujas subunidades α tinham um papel estimulatório da adenilato ciclase, e portanto se tratava de proteínas G_s (do inglês *s: stimulatory*). Se esta proteína G tivesse um papel inibitório sobre a adenilato ciclase, ela seria uma proteína G_i (*i: inhibitory*). Atualmente, esta classificação vem sendo abandonada, e uma nova nomenclatura baseada na homologia da sequência de aminoácidos das várias proteínas G tem sido proposta (Hepler & Gilman, 1992; Spiegel et al., 1992). Por isso, algumas proteínas G_i não terão ação sobre a adenilato ciclase, mas sim sobre outro efetor que pode ser, por exemplo, uma fosfodiesterase específica para GMPc. Na tabela I.3, mostra-se algumas proteínas G e os efetores associados a estas, a título de ilustração.

Tabela I.3. Proteínas G e seus efetores

Proteína	EFETOR
Gs	Adenilato ciclase - ativação Canal de Ca ²⁺ - abertura
Golf	Adenilato ciclase - ativação
Gt1	Fosfodiesterase GMPc - ativação
Gt2	Fosfodiesterase GMPc - ativação
Gi1, Gi2, Gi3	Adenilato ciclase - inibição Canal de K ⁺ - abertura Canal de Na ⁺ - fechamento
Go	Canal de Ca ²⁺ - fechamento Fosfolipase C - ativação
Gz	desconhecido
Gq, G11, G14, G15/16	Fosfolipase C - ativação
G12, G13	desconhecido

Adaptada de Spiegel e colaboradores, 1992.

Foram identificados até 1995, através de clonagem gênica, vinte e uma subunidades α , quatro β e seis γ diferentes (Müller & Lohse, 1995). Esta diversidade molecular levantou questões sobre as funções destas subunidades e sobre as combinações possíveis (Iñiguez-Lluhi et al., 1993; Sternweis, 1994). Além disso, por que existiriam tantas subunidades β e γ diferentes, se essas exercessem apenas uma função de ancoramento da subunidade α à membrana? Atualmente, existem evidências indicando que o complexo $\beta\gamma$ participa no processo de ativação das proteínas G, interagindo com receptores e proteínas efetoras. A nível de receptor, existem evidências mostrando que o tipo de subunidade $\beta\gamma$ associada modifica a capacidade da subunidade α de ligar GTP. A nível de proteínas efetoras tem sido demonstrado que existem algumas isoformas de adenilato ciclase (AC) que são reguladas pelo complexo $\beta\gamma$. O subtipo I é inibido pelo complexo $\beta\gamma$, e os subtipos II e IV são estimulados. O efeito estimulatório do complexo $\beta\gamma$ sobre o subtipo II e IV da AC é, entretanto, dependente da presença da subunidade α s, o que confere um papel modulatório à subunidade $\beta\gamma$. Por outro lado, o efeito inibitório sobre a AC tipo I não depende da presença da subunidade α , o que demonstra um papel

independente da subunidade $\beta\gamma$ como elemento ativo na transdução do sinal através da membrana plasmática (Müller & Lohse, 1995).

Pode ocorrer uma produção aumentada de AMPc resultante de uma ativação da G_s por um aumento na produção celular de G_s , mutação ou modificação estrutural catalisada por toxina colérica. A toxina colérica catalisa a transferência de uma ADP-ribose do NAD para o resíduo de Arg 201 da subunidade α da G_s , ativando-a (Spiegel et al., 1992).

Por outro lado, o mesmo resultado metabólico (aumento na concentração de AMPc) pode ocorrer por diminuição da atividade da G_i . Isso pode ocorrer através de modificações estruturais induzidas por toxinas como a toxina pertussis. A toxina pertussis ADP ribosila um resíduo de cisteína da região carbóxi-terminal da subunidade α das G_i 1, 2, 3 e G_o , resultando no desacoplamento destas proteínas G de seus receptores (Spiegel et al., 1992).

As proteínas G podem apresentar algumas modificações covalentes que facilitam a associação com membrana e com outros componentes do sistema de transdução do sinal (Casey, 1994; Bouvier et al., 1995; Mumby & Muntz, 1995; Neer, 1995). Por exemplo, a subunidade γ pode ser carboximetilada em seu domínio carbóxi-terminal, a subunidade α_i pode ser miristoilada ou palmitoilada. Essas modificações podem regular a atividade das proteínas G.

Em função da sua presença em todas as células, certamente serão descobertas muito mais funções das proteínas G do que as atualmente descritas e a exploração destes mecanismos de transdução do sinal celular abrirá não só novas portas para o entendimento do fenômeno da comunicação celular, bem como outras áreas como a farmacologia, serão beneficiadas pelo desenvolvimento potencial de drogas que atuem a nível de proteínas G.

I.3. AÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS DA GUANINA SOBRE A UNIÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS AOS SEUS RECEPTORES

Várias evidências da literatura sugerem que os nucleotídeos da guanina (NG) inibem a união de ligantes a seus receptores. Por exemplo, os NG inibem a união dos ligantes dopaminérgicos D2 (Senogles et al., 1987), opióides (Szucs et al., 1987), β adrenérgicos (Maguive et al., 1970), colinérgicos muscarínicos (Haga et al., 1986; Raskovsky et al., 1988), serotoninérgicos (Peroutka et al., 1979), da substância P (Smith and Hoss, 1985), e do neuropeptídeo Y (Widdowson & Halaris, 1990). Além disso, os NG inibem a ligação de agonistas e antagonistas glutamatérgicos a seus receptores metabotrópicos e ionotrópicos (Butcher et al., 1986; Monaghan & Cotman, 1986; Monahan & Michel, 1987; Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Souza & Ramírez, 1991; Gorodinsky et al., 1993; Paz et al., 1994; Ibarra & Ortega, 1995; Paas et al., 1996).

Foi demonstrado que GMP, GDP e GTP inibem a ligação do [3 H]glutamato em membranas sinápticas de cérebro de ratos (Baron et al., 1989). Também existe um estudo demonstrando que o GTP-S diminui a ligação do antagonista não-NMDA [3 H]CNQX em membrana de cérebro de *Carassius auratus* (Barnes et al., 1993). Outro estudo mostra que GTP, GDP, GMP, GMP-PNP, e 5'-guanililmetileno-difosfato (GTP-C) inibem a ligação do antagonista NMDA [3 H]TCP na membrana sináptica de cérebro de ratos (Hood et al., 1990). Esses nucleotídeos também foram capazes de inibir a ligação do [3 H]glutamato no sítio NMDA em preparações de membranas sinápticas (Monahan et al., 1988) e GMPc, GMP-PNP, GTP e GDP se mostraram potentes inibidores da ligação do [3 H]AP4, que é um agonista glutamatérgico metabotrópico, em membranas sinápticas de cérebro de ratos (Butcher et al., 1986). Finalmente, a

ligação do [³H]kainato foi inibida por NG em preparações de membranas de cérebro de *Carassius auratus* em condições que excluem as proteínas G (Barnes et al., 1993).

Levando-se em consideração que o GMP e o GMPc não se ligam em proteínas G (Birnbaumer, 1990; Silva et al., 1994), e que a ligação dos NG em proteínas G não diminui ou, ao contrário, aumenta a afinidade dos antagonistas pelos seus receptores (Gilman, 1987; Schutz & Freissmuth, 1992), podemos sugerir que o efeito inibitório dos NG sobre a ligação de agonistas e antagonistas glutamatérgicos é exercido pela sua ligação em local extra-proteínas G.

Existem outros estudos que reforçam a teoria de que os NG atuam em local extra-proteínas G para diminuir a afinidade do glutamato ou de seus análogos. Primeiro, o GDP-S (GDP não hidrolisável), que é impermeável à membrana plasmática, inibe respostas funcionais causadas por NMDA como o acúmulo de GMPc, liberação de noradrenalina e aumento do influxo de Ca²⁺ em células intactas de ratos (Baron et al., 1989). Segundo, o GDP-S reduz correntes elétricas induzidas por NMDA em células ganglionares de retina de ratos (Budson et al., 1991). Terceiro, usando-se preparações de fatias, nas quais a integridade da célula é mantida, foi observado que os NG inibem a estimulação da fosforilação da proteína glial fibrilar ácida induzida por glutamato ou pelo agonista metabotrópico ACPD em hipocampo de ratos jovens (Tasca et al., 1995). Como nestes trabalhos foram usadas células íntegras, os NG, que só poderiam ligar-se a um sítio localizado na face extracelular da membrana, não teriam acesso ao sítio clássico de ligação de NG em proteínas G que está voltado para a face intracelular de membrana. Quarto, os NG inibem a ligação do [³H]kainato em seus receptores de vesículas e de preparações de membrana de cérebro de pintos em condições em que a participação das proteínas G foi excluída (Souza & Ramirez, 1991; Paz et al., 1994). Quinto, foi clonada uma proteína que liga [³H]kainato em cérebros de pinto. Essa proteína possui uma região que liga NG no domínio extracelular e não

intracelular como seria esperado se fosse ligado às proteínas G (Teichberg et al., 1993; Paas et al., 1996). Portanto, é provável que o efeito inibitório dos NG sobre a ligação do glutamato e de seus análogos seja exercida via ligação dos mesmos em um local na face externa da membrana.

Portanto, é possível que a ligação do glutamato ou de seus agonistas ou antagonistas modulada pela ligação dos NG em locais extra-proteínas G seja uma propriedade comum a todos os receptores glutamatérgicos. Porém são necessários mais estudos em relação a outros subtipos de receptores glutamatérgicos e espécies animais para determinar o mecanismo exato e as possíveis implicações fisiológicas desta regulação.

L4. POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO

A potenciação de longa duração (LTP) é um fenômeno bioelétrico de aumento abrupto e sustentado na eficiência da transmissão sináptica, desencadeado pela aplicação de estímulos breves e de alta frequência. Esse fenômeno pode durar várias horas, dias ou mesmo semanas no animal intacto (Bliss & Collingridge, 1993) e foi descrito primeiramente na formação hipocampal de coelho em 1973 (Bliss & Gardner-Medwin, 1973; Bliss & Lomo, 1973). Posteriormente, a LTP foi descrita em todas as vias excitatórias do hipocampo, assim como em muitas outras regiões do cérebro (Shen et al., 1994). Existem evidências que a LTP seja um modelo celular possivelmente correlacionado à formação de pelo menos alguns tipos de memória (Bliss e Collingridge, 1993; Izquierdo, 1993; McEntee & Crook, 1993; Reymann, 1993; Izquierdo & Medina, 1995).

A LTP é caracterizada por três propriedades básicas: cooperatividade, associatividade e especificidade. A cooperatividade diz respeito à existência de um limiar de intensidade para indução da LTP por estimulação tetânica, ou seja, para desencadear a LTP é necessário um estímulo forte que induza a liberação do Mg^{2+} que bloqueia o canal NMDA. Isso só ocorre quando várias fibras são ativadas em sincronia por estímulos fortes, de forma cooperativa. A

despolarização se espalha entre sinapses vizinhas e diminui o bloqueio do Mg^{2+} no canal NMDA. A LTP é associativa à medida que um estímulo fraco pode ser potencializado se associado com um estímulo forte convergindo para uma mesma via sináptica. Finalmente, a LTP possui especificidade de via de aferência, porque estímulos que não são ativos no momento da estimulação tetânica não participam da LTP (Bliss & Collingridge, 1993).

O mecanismo envolvido na indução da LTP na região CA1 do hipocampo tem sido o mais estudado e será descrito a seguir. Um estímulo de alta frequência aplicado na fibra colateral de Schaffer do hipocampo ou a ativação concomitante desta via neuronal com a despolarização de um neurônio piramidal libera o glutamato do terminal pré-sináptico, causando ativação dos receptores AMPA e KA e despolarização pós-sináptica. Isso permite a remoção do Mg^{2+} do receptor NMDA com concomitante influxo de Ca^{2+} (Colino & Malenka, 1993). Apesar de necessária, a ativação dos receptores NMDA com a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} não é suficiente para a indução da LTP (Bliss & Collingridge, 1993). Este sinal é amplificado pelo influxo de Ca^{2+} através do canal de Ca^{2+} voltagem-dependente e pela liberação dos estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (Alford et al., 1993). Outro fator importante é a ativação dos mGluRs. Esses receptores através da produção de DAG e IP3 e da regulação dos níveis de AMPc estão envolvidos na indução ou potenciação da LTP de uma maneira não completamente entendida até hoje (Bortolotto et al., 1994). O que se sabe é que tanto o IP3 como os íons Ca^{2+} que entram pelo canal do NMDA estão envolvidos na liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Outro fator envolvido é a ativação da PKC (que será abordado com mais detalhes adiante) (Pin & Duvoisin, 1995). Pesquisas recentes sugerem que o GMPC (Zhuo et al., 1994) e o AMPc (Frey et al., 1993) estão envolvidos nos estágios inicial e tardio da LTP, respectivamente.

O mecanismo da expressão da LTP no hipocampo não está completamente esclarecido, mas quatro fatores têm sido propostos: (1) modificações pré-sinápticas que resultam em aumento da liberação de glutamato, (2) modificações pós-sinápticas, tais como aumento no número de receptores glutamatérgicos ou uma mudança em suas características funcionais, (3) mudança extra-sináptica, tal como redução da captação de glutamato pelas células gliais levando ao

aumento deste neurotransmissor na fenda sináptica, ou (4) modificações morfológicas (Bliss & Collingridge, 1993). Cada um destes fatores podem ocorrer isoladamente ou, provavelmente, em combinação para expressão da LTP.

A indução da LTP está correlacionada com o aumento da concentração pós-sináptica de Ca^{2+} . Entretanto, como visto anteriormente, esta resposta é mantida em parte por mecanismos pré-sinápticos. Portanto, um sinal retrógrado deve fazer a ligação entre a indução e a expressão da LTP. Recentemente tem sido proposto que o ácido araquidônico poderia facilitar a liberação pré-sináptica de glutamato agindo como mensageiro retrógrado. Outros mensageiros retrógrados que participariam da LTP seriam o óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e fator de ativação plaquetária (Bliss & Collingridge, 1993; Stevens & Wang, 1993; Izquierdo & Medina, 1995).

O sinal de indução da LTP (o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+}) é convertido em modificações sinápticas persistentes através de muitas enzimas sensíveis ao Ca^{2+} . Essas incluem calpaina, fosfatases (como calcineurina), fosfolipases e proteínas quinases. A maioria dos estudos estão voltados para a cascata de fosforilação e, em particular, ao papel das proteínas quinases, principalmente a PKC (Bortolotto & Collingridge, 1993). Inibidores desta enzima invariavelmente bloqueiam a indução da LTP (Aniksztejn et al, 1992; Bortolotto & Collingridge, 1993). Estas proteínas quinases fosforilam proteínas entre elas estariam os receptores AMPA e NMDA (Bliss & Collingridge, 1993).

Outro componente que está envolvido na LTP é a síntese protéica. Isso foi demonstrado pelo uso de anisomicina, um composto que inibe a tradução do mRNA. Se estiver presente no momento da estimulação tetânica a anisomicina reduz a duração da LTP para 3-6 horas (Frey et al., 1988; Otani et al., 1989). Um resultado similar foi obtido com LTP induzida em sinapses que foram cirurgicamente isoladas sem o sítio de síntese protéica (Otani et al., 1989). Esses resultados sugerem que a síntese protéica é necessária para manutenção da LTP.

Em resumo, apesar de se conhecer alguns mecanismos envolvidos na indução da LTP, isto é, ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA, KA e metabotrópicos levando a um

aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , muito pouco se conhece a respeito dos mecanismos bioquímicos que levam à manutenção da LTP.

I.5. MEMÓRIA

Segundo Shen e colaboradores (1994), memória é “o processo neuronal através do qual experiências adquiridas através do aprendizado são armazenadas e eventualmente evocadas”. Entretanto, a memória e seus mecanismos intrínsecos intrigam o homem há muito tempo. Um dos textos que mais diretamente trata deste assunto são as confissões de Santo Agostinho, que datam do século IV D.C., e que comparam a memória a um imenso palácio, onde as recordações se escondem em suas inúmeras salas.

“...Chego aos campos e vastos palácios da memória onde estão tesouros de inumeráveis imagens trazidas por percepções de toda espécie. Ai está também escondido tudo o que pensamos, quer aumentando quer diminuindo ou até variando de qualquer modo os objetos que os sentidos atingiram. Enfim, jaz aí tudo o que se lhes entregou e depôs, se é que o esquecimento ainda o não absorveu e sepultou. ...”

“...Quem poderá explicar o modo como elas se formaram, apesar de se conhecer por que sentidos foram recolhidas e escondidas no interior? ...” (Santo Agostinho em: Confissões, livro X, cap. 8)

Dezesseis séculos separam esta pergunta feita por Santo Agostinho dos primeiros entendimentos dos mecanismos neurais envolvidos na formação de alguns tipos de memória, que veremos em brevidade a seguir.

O hipocampo é uma estrutura importante do sistema límbico que está envolvida no aprendizado e na memória (Shen et al., 1994). Várias manipulações farmacológicas e bioquímicas nesta área afetam a retenção da memória em diferentes tarefas em diversas espécies animais (Morris et al., 1986; Shen et al., 1994; Chou & Lee, 1995; Izquierdo & Medina, 1995; Bernabeu et al., 1996).

Morris e colaboradores (1986) mostraram que a administração intra-cérebro-ventricular de AP5 em doses que bloqueiam a LTP hipocampal em ratos inibe o aprendizado no labirinto aquático de Morris. Diversos autores descreveram que a administração de bloqueadores de canal NMDA prejudica várias formas de memória (Izquierdo & Medina, 1995).

A infusão de AP5, muscimol ou escopolamina no hipocampo, na amígdala ou no septo medial, imediatamente após o treino em uma tarefa de esquiva inibitória, causa amnésia retrógrada (Izquierdo et al., 1992, 1993). Efeitos similares foram descritos com infusão intra-hipocampal imediatamente após o treino de MCPG (Bianchin et al., 1994). A infusão pós-treino de glutamato no hipocampo, na amígdala ou no septo medial (Izquierdo et al., 1992) ou de ACPD no hipocampo (Bianchin et al., 1994) causa facilitação da memória na tarefa de esquiva inibitória em ratos. O ACPD antagoniza o efeito amnésico do MCPG quando infundido imediatamente após o treino em hipocampo de ratos (Bianchin et al., 1994). A infusão intra-cerebral em pintos de MCPG ou outro antagonista de mGluRs, L-2-amino-4-ácido-fosfonobutanóico, bloqueia a retenção da memória em uma forma de esquiva inibitória (Holscher, 1994). Esses dados sugerem que drogas que facilitam a ativação dos receptores glutamatérgicos melhoram a memória, enquanto que antagonistas glutamatérgicos prejudicam a memória em muitas espécies animais. Além do mais, em algumas doenças neurológicas como Doença de Alzheimer, na qual existe déficit de memória, encontramos anormalidades nos neurônios glutamatérgicos e na união do glutamato aos seus receptores (Kowall & Beal, 1991).

Como citado anteriormente, a LTP tem sido considerada a base molecular e eletrofisiológica de pelo menos algumas formas de memória. A LTP e a memória se relacionam porque ambas possuem algumas características em comum: indução rápida (aquisição), labilidade

nos estágios iniciais (consolidação), especificidade para estímulos, manutenção por períodos longos na ausência de estimulação, e expressão rápida em resposta ao estímulo original (Bliss & Collingridge, 1993; Reymann, 1993; Izquierdo & Medina, 1995). Outra razão pela qual se relaciona memória com LTP é que algumas drogas que afetam a LTP, afetam da mesma maneira a memória, como será visto a seguir.

O CO, produzido pela heme oxigenase (HO) (Bernabeu et al., 1995), assim como o NO, produzido pela NO sintetase (NOS) (Bliss & Collingridge, 1993) têm sido descritos como mensageiros retrógrados necessários para indução da LTP. Baseado nisso, experimentos mostraram que as atividades da HO (Bernabeu et al., 1995a) assim como da NOS (Bernabeu et al., 1995b) aumentam no hipocampo imediatamente após o treino em esquila inibitória em ratos. Estes dados sugerem que a produção de CO e NO no hipocampo é importante nos estágios iniciais da memória.

Tem sido estudada a participação de alguns nucleotídeos da guanina e da adenina na LTP e na memória. O GMPc tem sido descrito como modulador do aprendizado e da memória (Morimoto & Koshland, 1991). A administração pós-treino de dibutilil AMPc facilita a retenção e previne a amnésia causada por α -metil- ρ -tirosina em camundongos (Chute et al., 1981). Certos mutantes de *Drosophila* com déficits de memória possuem alterações em diferentes passos da cascata do AMPc. Esses mutantes revelaram déficits de potenciação pós-tetânica que é um tipo de plasticidade celular semelhante à LTP (Zhong & Wu, 1991). Estes dados sugerem o envolvimento da cascata do AMPc na plasticidade celular e na memória. O GMPc e o AMPc participam nos estágios inicial e tardio da LTP respectivamente (Zhuo et al., 1994; Frey et al., 1993). Análogos lipossolúveis desses nucleotídeos cíclicos foram injetados pós-treino em uma tarefa de esquila inibitória no hipocampo de ratos. A injeção de 8 Br-GMPc aumentou a memória quando administrado imediatamente (0 min), mas não quando administrado 180 min após o treino. Por outro lado, a infusão de 8 Br-AMPc facilitou a consolidação da memória quando administrado 180 min mas não 0 min após o treino (Bernabeu et al., 1996). Esses resultados indicam que o GMPc possui um importante papel nos estágios iniciais da memória, enquanto que AMPc está

envolvido nos estágios posteriores da memória. Foi investigada também a participação do GDP-S na LTP e demonstrou-se que a injeção deste nucleotídeo no septo dorsolateral bloqueou a LTP induzida por estimulação tetânica (Zheng & Gallagher, 1992). Como demonstrado acima, vários tratamentos farmacológicos capazes de alterar a LTP também alteram a formação da memória. Contudo são necessários estudos mais detalhados para definir precisamente se existe uma relação causal entre a memória e este fenômeno eletrofisiológico.

II. OBJETIVOS GERAIS

Levando-se em consideração alguns trabalhos, os quais sugerem que os nucleotídeos da guanina podem se unir em local distinto das proteínas G, inibindo a ligação do glutamato ou de seus agonistas ou seus antagonistas e que o glutamato é capaz de melhorar a memória em uma tarefa de esQUIVA inibitória, decidimos estudar a interação entre os nucleotídeos da guanina e o sistema glutamatérgico em ratos nos seguintes aspectos:

- 1) Investigar o envolvimento das proteínas G na inibição da união do [³H]glutamato nos seus receptores, induzida por NG em membranas sinápticas de cérebro total de ratos.
- 2) Investigar o efeito do Mg²⁺ sobre a união do [³H]GMP-PNP nos seus receptores de membranas sinápticas de cérebro total de ratos.
- 3) Investigar se o GMP é capaz de inibir a união do [³H]glutamato nos seus receptores em membranas sinápticas de uma estrutura cerebral específica de ratos - o hipocampo.
- 4) Investigar se o GMP é capaz de reverter uma ação do glutamato *in vivo*. Para isso escolhemos a melhora da memória em uma tarefa de esQUIVA inibitória induzida pela injeção de glutamato no hipocampo.

III. OBJETIVOS DO ARTIGO 1

O primeiro artigo teve como objetivo principal investigar o envolvimento de proteínas G na inibição da união do [³H]glutamato induzida por nucleotídeos da guanina. Frações enriquecidas em membranas sinápticas obtidas a partir de cérebro de ratos foram pré-incubadas com GMP-PNP na presença de Mg²⁺ e submetidas a várias lavagens de modo a saturar estavelmente o sítio de ligação de NG existente em proteínas G (Tamir & Tolkovsky, 1985; Paz et al., 1994). A ligação do GMP-PNP assegura uma ativação estável do sistema de transdução associado à subunidade G α , uma vez que este NG é resistente à atividade GTPásica intrínseca a esta subunidade (Paz et al., 1994). Uma vez saturado o sítio de ligação dos NG em proteínas G, supõe-se que qualquer efeito induzido pela adição posterior de NGs deva envolver outros mecanismos que não incluem proteínas G. Nesta preparação, a saturação com GMP-PNP dos sítios de ligação dos NG em proteínas G foi avaliada pela estimulação da atividade adenilato ciclásica, bem como pela ausência de estimulação adicional desta atividade pela adição posterior de GMP-PNP.

Também investigamos o efeito do Mg²⁺ sobre a união de [³H]GMP-PNP em membrana de cérebro de ratos, uma vez que está demonstrado que a união do GMP-PNP em proteínas G é dependente de Mg²⁺.

IV. ARTIGO 1

Effect of Guanine Nucleotides on [³H]Glutamate Binding and on Adenylate Cyclase Activity in Rat Brain Membranes

Maribel A. Rubin,^{1,4} Alan C. Medeiros,² Paula C. B. Rocha,² Carolina B. Livi,² Galo Ramirez,³ and Diogo O. Souza²

(Accepted September 19, 1996)

GMP-PNP, a non-hydrolyzable analog of GTP binds tightly to G-protein in the presence of Mg²⁺, so that the binding is stable even after exhaustive washings. This property was exploited to prepare membrane samples of rat brain where G-protein GTP-binding sites were saturated with GMP-PNP. Experiments carried out with these membranes showed that GTP, GMP-PNP, GDP-S and GMP (1 mM) inhibit the sodium-independent [³H]glutamate binding by 30–40% [F(4,40) = 5.9; p < .001], whereas only GMP-PNP activates adenylate cyclase activity [F(6,42) = 3.56; p < .01]. The inhibition of sodium-independent [³H]glutamate binding occurred in the absence of Mg²⁺. These findings suggest that guanine nucleotides may inhibit glutamate binding and activate adenylate cyclase through distinct mechanisms by acting on different sites.

KEY WORDS: Glutamate; [³H]glutamate-binding; guanine nucleotides; adenylate cyclase; G-proteins.

INTRODUCTION

GTP binding proteins (G-proteins) couple cell surface receptors to cellular effectors, modulating cell responses to external stimuli. The interaction of agonists with their receptors triggers the binding of GTP to G-protein, forming the active complex G-protein/GTP. This active complex simultaneously modulates the activity of effector systems and decreases the agonist binding to specific receptors. Intrinsic GTPase activity hydro-

lyzes bound GTP to bound GDP, inactivating the transducing system (1–5).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. Glutamate receptors can be categorized into two distinct groups, termed ionotropic and metabotropic receptors. The ionotropic receptors are ligand-gated ion channels and the metabotropic receptors are coupled to G-proteins, which modulate the increase in phosphoinositol levels and the decrease in cAMP levels (6–11). AC is a membrane-bound enzyme which produces intracellular cAMP, a second messenger that modulates phosphorylation of cellular proteins, affecting synaptic transmission and neural function (12,13). Although cloned mGlu receptors are involved in adenylate cyclase inhibition, glutamate and metabotropic analogs have been shown to stimulate adenylate cyclase (AC) activity (14–18). This stimulatory effect can be abolished by the addition of adenosine deaminase or methylxanthines (17,19) pointing to the involvement of adenosine in the stimulation of cAMP formation by mGlu receptors (20).

¹ Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), Universidad Autónoma, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

⁴ Address reprint requests to: Maribel A. Rubin, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900, Santa Maria, RS, Brasil, Telephone number 055 2261616 Extension 2140; Fax number 55-55-2261259; E-mail: CFMELLO@SUPER.UFSM.BR.

The G-protein-mediated inhibitory effect of intracellular GTP (or GDP) on agonist binding has been well demonstrated in various neurotransmitter systems (1,2). In contrast, there are results indicating that guanine nucleotides may inhibit the binding of glutamate and analogs acting from the outer surface of the membrane, through mechanisms not involving G-proteins (21-30).

In this study we present additional evidence that guanine nucleotides may inhibit glutamate binding in cell membranes from adult male rat forebrain by mechanism(s) not related to G-proteins.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Subjects. Adult male Wistar rats were obtained from our own breeding stock and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle in a constant temperature (22°C) colony room. Food and water were given ad libitum.

Materials. L-[³H]glutamic acid (Glu: 50 Ci/mmol), β,γ-Imido[8-³H]guanosine 5'-triphosphate ([³H]GMP-PNP: 19.2 Ci/mmol) and [³H]Adenosine-3',5'-cyclic-monophosphate (cAMP: 23 Ci/mmol) were purchased from Amersham International, UK; protein kinase for cAMP determination, guanylyl-imidodiphosphate (GMP-PNP), GTP, GDP-S and GMP were purchased from Sigma Company or Boehringer Mannheim. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Membrane Preparations. The membrane fraction was prepared as previously described (25). Briefly, forebrains were homogenized in 0.32 M sucrose containing 10 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) and 1 mM MgCl₂. The homogenate was centrifuged twice at 1,000 g for 15 min, and the final pellet was discarded. The supernatants were pooled and centrifuged at 27,000 g for 30 min. The resulting pellet was lysed in 10 mM Tris/acetate buffer (pH 7.4) for 30 min and centrifuged at 27,000 g for 30 min. This pellet was washed three times in 10 mM Tris/acetate buffer (pH 7.4) at 27,000 g for 30 min. All steps were carried out at 4°C.

Preincubation with GMP-PNP. The binding of GMP-PNP to G-proteins in membranes carried out at temperatures higher than 25°C becomes stable, reducing the temperature to less than 10°C (31). In order to saturate G-protein with GMP-PNP, the membrane was preincubated in Tris buffer [25 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM DTT] with 5 mM MgCl₂ (and/or 1 mM EDTA, as specified), with 10 μM GMP-PNP at 30°C for 15 min. Control membrane preparations were preincubated in Tris buffer without GMP-PNP. Membranes were then kept at 4°C for 15 min, centrifuged at 27,000 g for 30 min and washed three times at 27,000 g for 30 min in the same preincubation buffer to remove unbound and labile bound GMP-PNP (not bound to G-proteins). The final pellets were used for determination of [³H]glutamate, [³H]GMP-PNP or [³H]GDP binding, AC activity and protein content.

Stable Binding of [³H]GMP-PNP. Membranes (100-200 μg protein) were incubated in the reaction mixture containing 25 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4), 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂ and [³H]GMP-PNP at the concentrations specified in the figures, at 30°C for 15 minutes. Membranes were then kept at 4°C for 15 min, centrifuged at 27,000 g for 30 min and washed three times by centrifugation in the same preincubation buffer to remove unbound and labile bound [³H]GMP-PNP. The pellets were processed for radioactivity measure-

ment as previously described (25). To examine the role of Mg²⁺ in binding, [³H]GMP-PNP binding was also assayed in the presence of EDTA (1 mM) in order to remove endogenous Mg²⁺ (Fig. 7).

[³H]Glutamate Binding. [³H]glutamate binding was investigated according to Rao and Murthy (32). Briefly, membranes submitted to preincubation with or without 10 μM GMP-PNP (100-200 μg) were incubated in 0.5 ml reaction mixture containing 50 mM Tris/acetate buffer (pH 7.4), and 40 nM [³H]glutamate. Incubation was carried out at 30°C for 15 min and the reaction was stopped by centrifugation at 27,000 g for 30 min. The pellet was carefully and quickly washed with ice-cold distilled water. SDS (0.1%) and scintillation liquid were added to the resulting pellet and radioactivity was determined with a Beckman scintillation spectrometer at 40-45% efficiency.

[³H]GMP-PNP and [³H]GDP Binding. [³H]GMP-PNP and [³H]GDP binding was investigated according to Paz et al. (29). Briefly, membranes submitted to preincubation with or without 10 μM GMP-PNP (100-200 μg) were incubated in the reaction mixture containing 25 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4), 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂ and 40 nM [³H]GMP-PNP or [³H]GDP, at 30°C for 15 minutes ([³H]GMP-PNP) or 5 min ([³H]GDP). The reaction was stopped by centrifugation at 15,000 g for 2 min. The pellet was carefully and quickly washed with ice-cold distilled water and processed for radioactivity measurement as described for [³H]glutamate binding.

In all binding experiments, nonspecific binding was determined by adding 1000 times nonradioactive ligand to the medium in a parallel assay. Specific binding was considered to be the difference between total binding and nonspecific binding.

Adenylate Cyclase Activity. The AC assay was carried out at 30°C as described by Albano et al. (33). The reaction medium for the AC assay contained 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ and 1 g% albumin. After 15 min of membrane incubation in the reaction medium, cAMP synthesis was started by adding ATP (final concentration 1 mM), and stopped after 1 min by boiling the tubes for 5 min. The tubes were centrifuged at 12,000 g for 3 min and the supernatants were used to measure cAMP content by the protein binding method (34). The stimulation of AC activity by added guanine nucleotides (stimulation ratio) was calculated using the following formula:

$$\text{stimulation ratio} = \frac{\text{AC activity in the presence of guanine nucleotides}}{\text{AC activity in the absence of guanine nucleotides}}$$

Protein Measurement. Protein was measured according to the method of Lowry et al. (35).

Statistical Analysis. The results were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) and by post hoc analysis carried out using the Student-Newman-Keuls test or the Student's paired t-test when appropriate.

RESULTS

Fig. 1 shows that GMP and GMP-PNP reduced sodium-independent [³H]glutamate binding by 40% in lysed membrane preparations from adult rat forebrain. This inhibition occurred in the absence of Mg²⁺. We investigated the effects of guanine nucleotides on glutamate binding in the absence of sodium, in order to avoid the participation of glutamate carriers whose activities are sodium dependent. Considering that previous reports

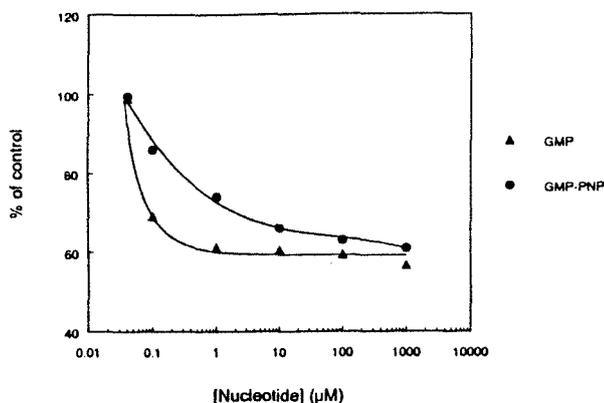


Fig. 1. GMP and GMP-PNP inhibition of specific sodium-independent [³H]glutamate binding in the absence of Mg²⁺. GMP or GMP-PNP (0.04–1000 µM) was incubated with 40 nM [³H]glutamate. The results are expressed as % of control specific basal [³H]glutamate binding (without guanine nucleotide). The result is a representative experiment among four separate experiments run in triplicate. The value without guanine nucleotide (100%) was 1.8 ± 0.5 pmol/mg of protein (mean ± SEM).

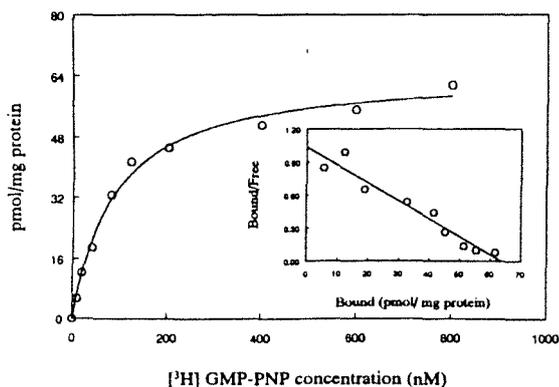


Fig. 2. Saturation curve and Scatchard plot (inset) of stable [³H]GMP-PNP binding (after incubation and three washes). The standard deviation of each point was less than 15% of the mean (n = 5).

from our group (25,29,36) and from the literature had indicated the interaction of guanine nucleotides with both ionotropic and metabotropic glutamate receptors, in the present study we decided to investigate the inhibitory effect of guanine nucleotides on glutamate binding, and not on specific glutamatergic ligands.

Fig. 2 shows the saturation curve for stable GTP binding in G-proteins. From 400 nM [³H]GMP-PNP the binding become saturated. The specifically bound radioactivity was measured after three washings to take advantage of the fact that the binding of GMP-PNP in G-proteins is practically irreversible under the experimental conditions used in this study. Scatchard analysis

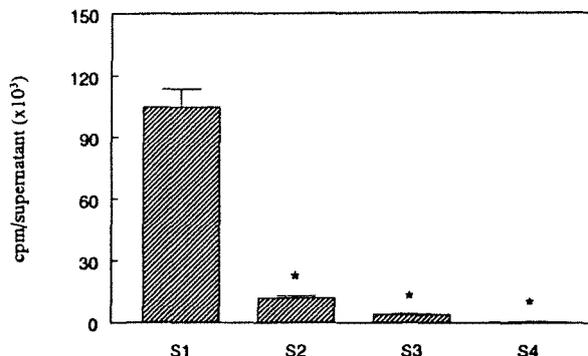


Fig. 3. Determination of free [³H]GMP-PNP released by washing procedures. After preincubation with 800 nM [³H]GMP-PNP, membranes were centrifuged at 27,000 g for 30 min and the radioactivity in the supernatant was measured. Each value is the mean ± SEM of 3 separate experiments done in triplicate. S₁–S₄: supernatants after the first to fourth centrifugation. *p < .0001 compared to S₁ (SNK test).

of the resulting saturation curve revealed a single component with a dissociation constant (K_d) of 59.5 nM ± 7.9 nM, and a maximal density of binding sites (B_{max}) of 62.1 ± 6.1 pmol/mg protein. Other readily washable GTP-binding sites would not be detected by this procedure. The efficiency of the washing procedure was determined by measuring the amount of [³H]GMP-PNP in the supernatants after preincubation carried out in the presence of 800 nM [³H]GMP-PNP. Fig. 3 shows that after three washes no significant amount of free [³H]GMP-PNP could be detected in the supernatants [F(3,11) = 130.3; p < .0001]. Therefore, the additional effects of GMP-PNP preincubation on the parameters studied (AC activity and [³H]glutamate, [³H]GMP-PNP or [³H]GDP binding) should be interpreted as being due to the stable binding of GMP-PNP to membrane preparations rather than to any contamination with free GMP-PNP.

In order to determine whether preincubation with non-radioactive GMP-PNP blocked G proteins GTP-binding sites, we measured AC activity and [³H]GMP-PNP or [³H]GDP binding after three washes under the same incubation conditions of preincubation (in the presence of GMP-PNP). An increase in AC activity and a decrease in [³H]GMP-PNP and [³H]GDP binding were observed compared to the control (preincubated without GMP-PNP) (Fig. 4), indicating the presence of stable GMP-PNP binding sites in G-proteins. Statistical analysis revealed a significant stimulation of AC activity [t(2) = 4.45; p < .05] and inhibition of [³H]GMP-PNP [t(3) = 3.39; p < .05] and [³H]GDP [t(3) = 3.86; p < .05] binding in membranes preincubated with GMP-PNP. These data indicate that there is a par-

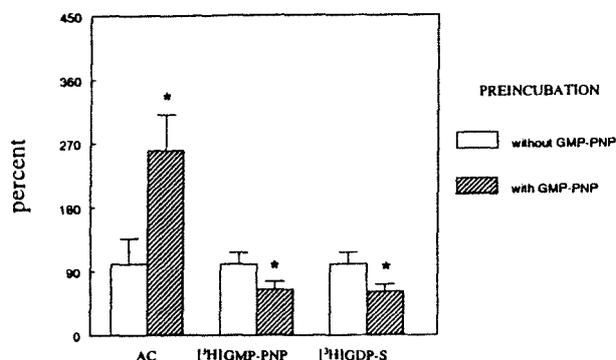


Fig. 4. Effect of preincubation with GMP-PNP in the presence of Mg^{2+} on AC activity and on 40 nM [3H]GMP-PNP or [3H]GDP binding. Each value is the mean \pm SEM of 4 separate experiments done in triplicate. * $p < .05$ when compared to preincubation without GMP-PNP (Student's paired t-test). Basal value (preincubation without GMP-PNP) for AC was 295.4 ± 68.5 pmol cAMP/mg.min, for [3H]GMP-PNP binding was 23.1 ± 4.3 pmol/mg and for [3H]GDP binding was 13.4 ± 2.2 pmol/mg.

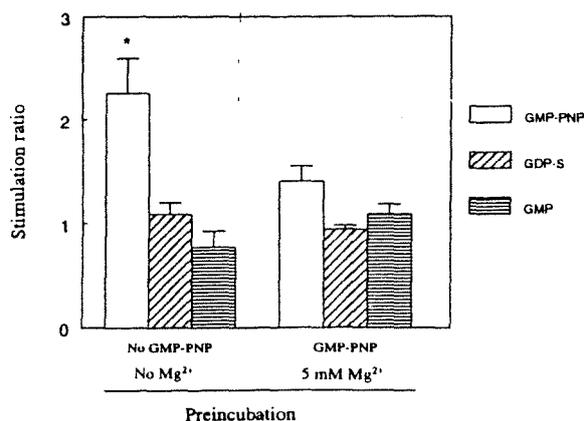


Fig. 5. Effect of guanine nucleotides (10 μ M GMP-PNP, GDP-S or GMP) on stimulation ratio of AC activity of membranes submitted to different preincubation conditions. Each value is the mean \pm SEM of 3-6 separate experiments done in triplicate. * $p < .05$ when compared to GDP-S or GMP in the same preincubation condition (Duncan's multiple range test). Values without added nucleotides were: 295.4 ± 68.5 pmol cAMP/mg.min in preincubation without GMP-PNP and Mg^{2+} ; 769.8 ± 217.2 pmol cAMP/mg.min in preincubation with GMP-PNP and Mg^{2+} . Values are expressed as mean \pm SEM.

allelism between AC stimulation and inhibition of guanine nucleotide binding.

Other evidence that GMP-PNP bound to G-proteins after preincubation was the effect of guanine nucleotides added during incubation on AC activity (Fig. 5). This effect was dependent on the preincubation conditions. Statistical analysis of stimulation ratio data (preincubation \times added nucleotide ANOVA) revealed a significant nucleotide \times preincubation interaction [$F(6,42) = 3.56$;

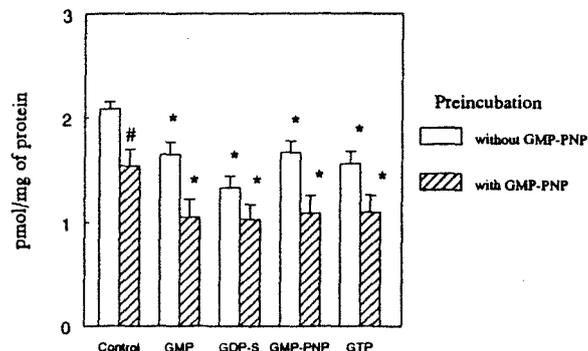


Fig. 6. Effects of guanine nucleotides (1 mM) on sodium-independent [3H]glutamate binding in washed membranes after preincubation with or without 10 μ M GMP-PNP. Binding was measured in the absence of added Mg^{2+} . Each value is the mean \pm SEM of 4-5 separate experiments done in triplicate. * $p < .05$ compared to respective control group (in the same preincubation conditions). Preincubation with GMP-PNP inhibits [3H]glutamate binding when compared to preincubation without GMP-PNP (* $p < .0001$ —Two-way ANOVA).

$p < .01$]. *Post hoc* analysis (Duncan's multiple range test) showed that GMP-PNP stimulated AC activity in membranes preincubated in the absence of GMP-PNP. The absence of additional stimulation of AC activity by GMP-PNP on membranes preincubated with GMP-PNP strongly suggests that GMP-PNP binding sites in G-proteins were already occupied during preincubation, and no further stimulation was observed.

In this membrane preparation, with G-protein GTP binding sites specifically blocked by GMP-PNP, we checked whether guanine nucleotides would decrease [3H]glutamate binding. Fig. 6 shows the effects of 1 mM GTP, GMP-PNP, GDP-S or GMP on sodium-independent [3H]glutamate binding. Membranes were preincubated as specified in the Experimental Procedure and were incubated after washing in the presence of guanine nucleotides and in the absence of added Mg^{2+} . Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant main effect of preincubation [GMP-PNP 10 μ M or no addition of guanine nucleotide — $F(1,40) = 32.3$; $p < .0001$] indicating that preincubation with GMP-PNP inhibits [3H]glutamate binding in membrane preparations. A significant main effect of nucleotide (GMP, GDP-S, GMP-PNP or GTP) was also observed [$F(4,40) = 5.9$; $p < .001$]. *Post hoc* analysis by the Student-Newman-Keuls test revealed that all nucleotides tested decreased sodium-independent [3H]glutamate binding. Two-way ANOVA showed that the preincubation \times nucleotide interaction was not significant [$F(4,40) = 0.38$; $p = .81$], indicating that nucleotides decreased sodium-independent [3H]glutamate binding regardless of preincubation. These results suggest that the saturation of the stable

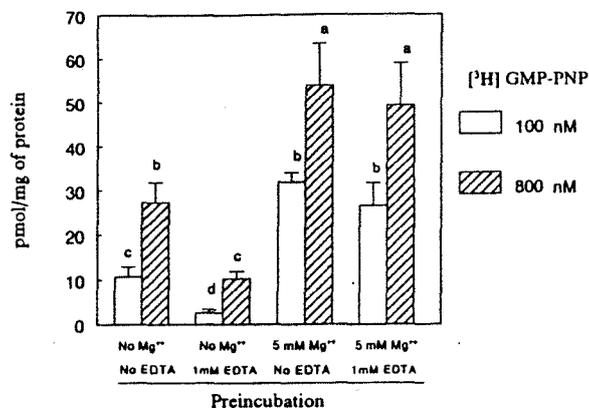


Fig. 7. Effects of Mg²⁺ and/or EDTA on 100 nM or 800 nM [³H]GMP-PNP stable binding, after preincubation and washing. Each value is the mean \pm SEM of 5 separate experiments done in triplicate. Columns that do not share the same letter are different at $p < .05$ (SNK test).

sites of GMP-PNP (in G-proteins) did not affect the inhibitory effects of the guanine nucleotides on sodium-independent [³H]glutamate binding and this inhibitory effect was not dependent on Mg²⁺ addition to the medium. Therefore, all the guanine nucleotides seem to act at sites unrelated to G-proteins. On the other hand, sodium-dependent (in the presence of high sodium concentration) [³H]glutamate binding was not significantly reduced by guanine nucleotides (data not shown). In order to determine the role of endogenous Mg²⁺ in this inhibition, we prepared some controls by adding 1 mM EDTA. The addition of EDTA did not modify this inhibitory effect (data not shown), reinforcing the hypothesis that Mg²⁺ does not participate in this process.

Since all tested guanine nucleotides displace sodium-independent [³H]glutamate binding in the absence of added Mg²⁺ we decided to investigate whether GMP-PNP binds to G-proteins in the absence of Mg²⁺. Figure 7 presents the stable binding of [³H]GMP-PNP after the washing procedure. Statistical analysis (two-way ANOVA with the concentration — 100 or 800 nM — factor treated as within-subject factor) showed a significant effect of incubation medium [$F(3,16) = 33.51$; $p < .001$] and [³H]GMP-PNP concentration [$F(1,16) = 85.12$; $p < .001$]. When [³H]GMP-PNP concentrations were increased there was a corresponding increase in binding regardless of incubation conditions (the incubation — concentration interaction was not significant). The level of stable [³H]GMP-PNP binding was dependent on Mg²⁺ presence in the incubation medium, being almost absent in the presence of EDTA without the addition of Mg²⁺. EDTA *per se* did not affect the binding of [³H]GMP-PNP, since additional Mg²⁺ reversed the effect of EDTA.

This indicated that stable binding of [³H]GMP-PNP (in G protein) depends on Mg²⁺.

DISCUSSION

Guanine nucleotides have been shown to inhibit the binding of several neurotransmitter agonists to specific receptors (1–5). In these studies, GMP, cGMP or adenine derivatives were ineffective. In contrast, it has been shown that the binding of glutamate agonists or antagonists is also inhibited by GMP, cGMP or guanosine (21–30), which suggests that the interaction of guanine nucleotides with the glutamatergic system has properties not shared by other neurotransmitter systems. These studies indicate that guanine nucleotides act from the outer side of the cell membrane without the involvement of G proteins. Studies from our group have shown that guanine nucleotides inhibit the binding of kainate by acting through the external surface of vesicle membrane preparations (25) and in membrane preparations where G-proteins are occluded to the binding to guanine nucleotides added to the medium (29). Additionally, there are studies showing that cellular responses to glutamatergic agonists in intact cells are inhibited by guanine nucleotides (24,26,28,36). Importantly, GMP, cGMP and guanosine do not bind to G proteins but inhibit glutamate binding, reinforcing the idea that other mechanisms which do not involve G-proteins may underlie the guanine nucleotide modulation of glutamatergic system function.

The present study indicates that all guanine nucleotides studied (GTP, GMP-PNP, GDP-S, or GMP) specifically inhibited sodium-independent [³H]glutamate binding in rat brain membrane preparations. Various strategies were used to investigate whether these inhibitory effects of guanine nucleotides on glutamate binding involved G-proteins. All results obtained indicated that the inhibition of [³H]glutamate binding by guanine nucleotides did not involve the classical G-protein site. The evidence obtained by each of these strategies is discussed below. First, membranes were preincubated with GMP-PNP and Mg²⁺ in order to obtain a stable binding of GMP-PNP (resistant to washing), which did not permit further stimulation of AC activity by additional GMP-PNP (Fig. 5). The permanent AC activation indicated that stable binding occurs in G-protein, which is in accordance with literature data (31,37,38). Under these conditions, further addition of GTP, GMP-PNP, or GDP-S to the medium still inhibited sodium-independent [³H]glutamate binding (Fig. 6). Second, the inhibitory action of GMP on sodium-independent [³H]glutamate

binding was studied because there is no report indicating that this guanine nucleotide binds to G-proteins. Consequently, the inhibition of [³H]glutamate binding by GMP observed in the present study could not be attributed to an effect on G-protein. Third, the influence of Mg²⁺ on the inhibitory actions of guanine nucleotides on glutamate binding was examined based upon the knowledge that neither the activation of G-proteins nor the formation of receptor/G-proteins complex occur in the absence of Mg²⁺ (2,39-42); however, it was observed that the inhibition of sodium-independent [³H]glutamate binding caused by guanine nucleotides was maintained in the absence of Mg²⁺ (Figs. 1 and 6). All of these results suggest that the inhibition of [³H]glutamate binding by guanine nucleotides could be exerted through mechanisms without G-protein participation. Finally, there is a significant body of evidence indicating the presence of closely related amino acid motifs that may bind GTP in glutamate-binding proteins, such as ionotropic and metabotropic glutamate receptors, in the putative extracellular domain. This contrasts to the obligatory intracellular location for G-protein coupling (36,43,44).

In the present study, preincubation with GMP-PNP in the presence of Mg²⁺ maintained AC activity stimulated even after exhaustive washings (Figs. 4 and 5). However, this preincubation does not modify the ability of different guanine nucleotides to displace sodium-independent [³H]glutamate binding. AC activity was stimulated by GMP-PNP only in the group preincubated in the absence of GMP-PNP and not in that preincubated with GMP-PNP (Fig. 5). However, [³H]glutamate binding was inhibited by all guanine nucleotides tested. These results suggest that the effects of guanine nucleotides on AC activity and on glutamate binding are mediated by distinct mechanisms. This observation corroborates our previous studies, where a clear distinction between the effects of guanine nucleotide on [³H]kainate binding and adenylate cyclase activity was demonstrated in chick optic tectum and cerebellum (25,29).

In summary, our results indicate that the effects of guanine nucleotides on AC activity and on glutamate binding seem to be exerted through distinct mechanisms. The effect on AC activity is mediated through G-proteins and the inhibitory effect on glutamate binding remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge Prof. Carlos F. de Mello and Prof. João B. T. da Rocha for revision of the manuscript. This study

was supported by CNPq grant, FINEP, FAPERGS, CAPES, PRO-PESP/UFRGS and by Contract N° C11*-CT94-0116 of the European Commission.

REFERENCES

1. Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A. M. 1990. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biophys. Biochim. Acta* 1031: 163-224.
2. Hepler, J. R., and Gilman, A. G. 1992. G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17:383-387.
3. Hille, B. 1992. G protein-couple mechanisms and nervous signaling. *Neuron*. 9:187-195.
4. Spiegel, A. M., Shenker, A., and Weinstein, L. S. 1992. Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr. Rev.* 13:539-565.
5. Nürnberg, B., Gudermann, T., and Schultz, G. 1995. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function *J. Mol. Med.* 73:123-132.
6. Monaghan, D. T., Bridges, R. J., and Cotman, C. W. 1989. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol.* 29:365-402.
7. Nakanishi, S., Ohkubo, H., Kakizuka, A., Yokota, Y., Shigemoto, R., Sasai, Y., and Takumi, T. 1990. Molecular characterization of mammalian tachykinin receptors and a possible epithelial potassium channel. *Rec. Prog. Hormones Res.* 46:69-84.
8. Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. 1992. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8: 169-179.
9. Schoepp, D. D., and Conn, P. J. 1993. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:13-20.
10. Cotman, C. W., Kahle, J. S., Miller, S. E., Ulas, J., and Bridges, R. J. 1995. Excitatory amino acid neurotransmission. Pages 75-85. *in* Floyd E. Bloom and David J. Kupfer (eds.), *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Raven Press, Ltd., New York.
11. Pin, J. P., and Duvoisin, R. 1995. Neurotransmitter receptors 1. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
12. Walaas, S. I., and Greengard, P. 1991. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol. Rev.* 43:299-349.
13. Rodnight, R., and Wolfchuk, S. T. 1992. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. *Essays Biochem.* 27:91-102.
14. Baba, A., Nishiuchi, Y., Uemura, A., and Iwata, H. 1988. Mechanism of excitatory amino acid-induced accumulation of cyclic AMP in hippocampal slices: role of extracellular chloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245:299-304.
15. Winder, D. G., and Conn, P. J. 1992. Activation of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus increases cyclic AMP accumulation. *J. Neurochem.* 59:375-378.
16. Schoepp, D. D., and Conn, P. J. 1993. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *TIPS.* 14:13-20.
17. Schoepp, D. D., and Johnson, B. G. 1993. Metabotropic glutamate receptor modulation of cAMP accumulation in the neonatal rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 32:1359-1365.
18. Winder, D. G., and Conn, P. J. 1995. Metabotropic glutamate receptor (mGluR) mediated potentiation of cyclic AMP responses does not require phosphoinositide hydrolysis: mediation by a group II-like mGluR. *J. Neurochem.* 64:592-599.
19. Bruns, R. F., Pons, F., and Daly, J. W. 1980. Glutamate- and veratridine-elicited accumulations of cyclic AMP in brain slices: a role for factors which potentiate adenosine-responsive systems. *Brain Res.* 189:550-559.

20. Schoepp, D. D., Johnson, B. G., Salhoff, C. R., Wright, R. A., Goldsworthy, J. S., and Baker, S. R. 1995. Second-messenger responses in brain slices to elucidate novel glutamate receptors. *J. Neurosci. Methods*. 59:105-110.
21. Sharif, N. A., and Roberts, P. J. 1981. Regulation of cerebellar L-[³H]glutamate binding-influence of guanine nucleotides and Na⁺ ions. *Biochem. Pharmacol.* 30:3019-3022.
22. Butcher, S. P., Roberts, P. J., and Collins, J. F. 1986. Purine nucleotides inhibit the binding of DL-[³H] 2-amino-4-phosphonobutyrate (DL-[³H]APB) to L-glutamate-sensitive sites on rat brain membranes. *Biochem. Pharmacol.* 35:991-994.
23. Monahan, J. B., Hood, W. F., Michel, J., and Compton, R. P. 1988. Effects of guanine nucleotides on N-methyl-D-aspartate receptor-ligand interactions. *Mol. Pharmacol.* 34:111-116.
24. Baron, B. N., Dudley, M. W., McCarty, D. R., Miller, F. P., Reynolds, I. J., and Schmidt, C. J. 1989. Guanine nucleotides are competitive inhibitors of N-methyl-D-aspartate at its receptor site both in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 250:162-169.
25. Souza, D. O., and Ramirez, G. 1991. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylyl cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J. Mol. Neurosci.* 3:39-45.
26. Barnes, J. M., Murphy, P. A., Kirkham, D., and Henley, J. M. 1993. Interaction of guanine nucleotides with [³H]kainate and 6-[³H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. *J. Neurochem.* 61:1685-1691.
27. Gorodinsky, A., Paas, Y., and Teichberg, V. I. 1993. A ligand binding study of the interactions of guanine nucleotides with non-NMDA receptors. *Neurochem. Int.* 23:285-291.
28. Budson, A. E., Jackson, P. S., and Lipton, S. A. 1991. GDPβS antagonizes whole-cell current responses to excitatory amino acids. *Brain Res.* 548:346-348.
29. Paz, M. M., Ramos, M., Ramirez, G., and Souza, D. 1994. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylyl cyclase activity in chick optic tectum. *FEBS Lett.* 355:205-208.
30. Ibarra, C., and Ortega, A. 1995. Interaction of guanine nucleotides with the kainate binding protein from chick cerebellum. *NeuroReport* 6:1149-1152.
31. Tamir, A., and Tolkovsky, A. M. 1985. Transient states of adenylyl cyclase in brain membranes. *J. Neurochem.* 44:1006-1013.
32. Rao, R., and Murthy, Ch. R. K. 1993. Characteristics of [³H]glutamate binding sites in rat cerebellum. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30:861-866.
33. Albano, J. D. M., Barnes, G. D., Maudsley, D., Brown, B. L., and Etkins, R. P. 1974. Factors affecting the saturation assay of cyclic AMP in biological systems. *Anal. Biochem.* 60:130-141.
34. Tovey, K. C., Oldham, K. G., and Welan, J. A. M. 1974. A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clin. Chim. Acta.* 56:221-234.
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
36. Tasca, C. I., Wofchuk, S. T., Souza, D. O., Ramirez, G., and Rodnight, R. 1995. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *NeuroReport* 6:249-252.
37. Lefkowitz, R. J. 1974. Stimulation of catecholamine-sensitive adenylyl cyclase by 5-guanylyl-imidodiphosphate. *J. Biol. Chem.* 249:6119-6124.
38. Lad, P. M., Welton, A. F., and Rodbell, M. 1977. Evidence for distinct guanine nucleotide sites in the regulation of the glucagon receptor and of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 252:5942-5946.
39. Iyengar, R., and Birnbaumer, L. 1982. Hormone receptors modulate the regulatory component of adenylyl cyclases by reducing its requirement of Mg²⁺ ion and increasing its extent of activation by guanine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5179-5183.
40. Sunyer, T., Codina, J., and Birnbaumer, L. 1984. GTP hydrolysis by pure Ni, the inhibitory regulatory component of adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 259:15447-15451.
41. Birnbaumer, L., Hildebrandt, J. D., Codina, J., Mattera, R., Cerione, A., Sunyer, T., Rojas, F. J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Iyengar, R. 1985. Molecular Mechanisms of Signal Transduction. Pages 131-182, in Cohen, P. and Houslay, M. D. (eds.), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
42. Brandt, D. R., and Ross, E. M. 1986. Catecholamine-stimulated GTPase cycle. Multiple sites of regulation by beta-adrenergic receptor and Mg²⁺ studied in reconstituted receptor-G_i vesicles. *J. Biol. Chem.* 261:1656-1664.
43. Teichberg, V. I., Mano, I., Paperna, T., and Paas, Y. 1993. The chick bergmann glia kainate binding protein: an update on function. *J. Neurochem.* 61 (Suppl.) S60D.
44. Paas, Y., Devillers-Thiery, A., Changeux, J. -P., Medevielle, F., and Teichberg, V. I. 1996. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. *EMBO J.* 15:1548-1551.

V. ANEXO DO ARTIGO 1

Neste anexo serão apresentados alguns dados de padronização da técnica e alguns resultados que estão como “resultados não mostrados” referentes ao artigo publicado no *Neurochemical Research*.

V.1. Estudo da pureza do [³H]glutamato

Com o objetivo de determinar a pureza do [³H]glutamato usado nos experimentos, uma amostra de [³H]glutamato foi submetida a cromatografia em camada delgada e foi contada a radioatividade das frações em cintilador. O resultado está na figura V.1, onde pode ser observado um único pico de radioatividade. Com isto demonstra-se o alto grau de pureza do [³H]glutamato usado nos experimentos.

V.2. Curvas de concentração de proteína para o estudo da união do [³H]glutamato sódio-independente e dependente

Com o objetivo de padronizar a melhor concentração de proteína para o estudo da ligação do [³H]glutamato em membranas sinápticas rompidas de cérebro de ratos, concentrações de 100, 200, 400, 500, 600, 800 e 1000 µg de proteína foram incubadas com 40 nM de [³H]glutamato na ausência ou na presença de alta concentração de sódio. As preparações foram incubadas e medida a união de [³H]glutamato conforme descrito no artigo 1. Os resultados destas curvas de concentração de proteína estão na figura V.2, onde podemos observar que a maior ligação de [³H]glutamato tanto sódio-independente como dependente, em pmol/mg de

proteína, ocorre nas concentrações entre 100 e 200 µg de proteína. Com estes resultados a concentração de proteína para o estudo da união de [³H]glutamato foi padronizado em 100-200 µg.

V.3. Efeito dos NG sobre a união do [³H]glutamato sódio-dependente

Usando-se as preparações de membrana pré-incubadas com ou sem GMP-PNP testamos o efeito de GMP, GDP-S, GMP-PNP ou GTP (1 mM) sobre a ligação de 40 nM de [³H]glutamato sódio-dependente (na presença de 150 mM de NaCl). A união de [³H]glutamato na presença de alta concentração de sódio ocorre principalmente nos sítios de recaptação deste aminoácido. O método usado neste experimento está descrito no artigo 1. O resultado do efeito dos NG sobre a ligação do [³H]glutamato sódio-dependente está na figura V.3. A análise estatística (ANOVA de duas vias) revelou que não ocorreu efeito da pré-incubação [$F(1,40)=2,135; p>0,1$] nem da adição dos nucleotídeos [$F(4,40)=0,44; p>0,7$] indicando que nem a pré-incubação, nem os nucleotídeos afetaram a união do [³H]glutamato nos sítios de recaptação desse aminoácido.

V.4. Efeito do GTP sobre a união do [³H]glutamato sódio-independente na presença de EDTA

Usando-se as preparações de membrana pré-incubadas, na ausência de EDTA, com ou sem GMP-PNP testamos o efeito de GTP (1 mM) sobre a união do [³H]glutamato sódio-independente na presença de EDTA (1 mM). O método usado nesse experimento está descrito no artigo 1. O EDTA foi usado para impedir um possível efeito dos íons Mg²⁺ endógenos. Portanto, o EDTA impede que o GTP se una em proteínas G, uma vez que para isso

acontecer seria necessária a presença de Mg^{2+} (Gilman, 1987). O resultado do efeito do GTP sobre a união de 40 nM de [3H]glutamato na presença de EDTA está na figura V.4. A análise estatística (ANOVA de duas vias) revelou que ocorreu efeito da pré-incubação [$F(1,12)=21,62$; $p<0,01$] indicando que a pré-incubação com GMP-PNP diminuiu a união do [3H]glutamato na presença de EDTA. Foi observado, também, efeito do GTP [$F(1,12)=5,81$; $p<0,05$] mas não interação entre pré-incubação e GTP [$F(1,12)=0,49$; $p>0,40$] indicando que o GTP diminuiu a união do [3H]glutamato sódio-independente na presença de EDTA, independentemente da pré-incubação com ou sem GMP-PNP. Esses dados corroboram aqueles encontrados no artigo 1 que demonstram que os NG se ligam em sítio extra-proteínas G para diminuir a união do [3H]glutamato sódio-independente.

V.5. Curva de união do [3H]GMP-PNP em todos os sítios

Com o objetivo de investigar os sítios de ligação do [3H]GMP-PNP nas membranas sinápticas, concentrações variadas de [3H]GMP-PNP foram incubadas com membrana e medida a união conforme descrito no artigo 1. A figura V.5 mostra a curva de saturação da união do [3H]GMP-PNP em todos os sítios, isto é, em proteínas G e extra-proteínas G. Como pode ser observado, a partir de 400 nM de [3H]GMP-PNP a união torna-se saturável. A análise de Scatchard da curva de saturação revelou dois sítios de ligação, um sítio com alta afinidade (K_d 12 ± 4 nM e $B_{máx}$ 26 ± 8 pmol/mg de proteína) e outro com baixa afinidade (K_d 230 ± 25 nM e $B_{máx}$ 80 ± 12 pmol/mg de proteína) do ligante pelos seus receptores. Provavelmente, o sítio de alta afinidade seja em proteínas G, enquanto que o sítio de baixa afinidade seja extra-proteínas G.

V.6. Curva de união do [³H]GMP-PNP em sítios extra-proteínas G

Com o objetivo de investigar a união do [³H]GMP-PNP nos sítios extra-proteínas G, membranas sinápticas foram pré-incubadas com 10 μM de GMP-PNP para saturar os sítios de união deste NG em proteínas G. A seguir, a preparação foi incubada com concentrações variadas de [³H]GMP-PNP e medida a radioatividade conforme descrito no artigo 1. A figura V.6 mostra a curva de saturação da união do [³H]GMP-PNP em sítios extra-proteínas G. Como pode ser observado, a partir de 400 nM de [³H]GMP-PNP a ligação torna-se saturável. A análise de Scatchard da curva de saturação revelou apenas um sítio de ligação, com constante de dissociação (K_d) de 101 ± 22 nM e B_{máx} de 77 ± 13 pmol/mg de proteína.

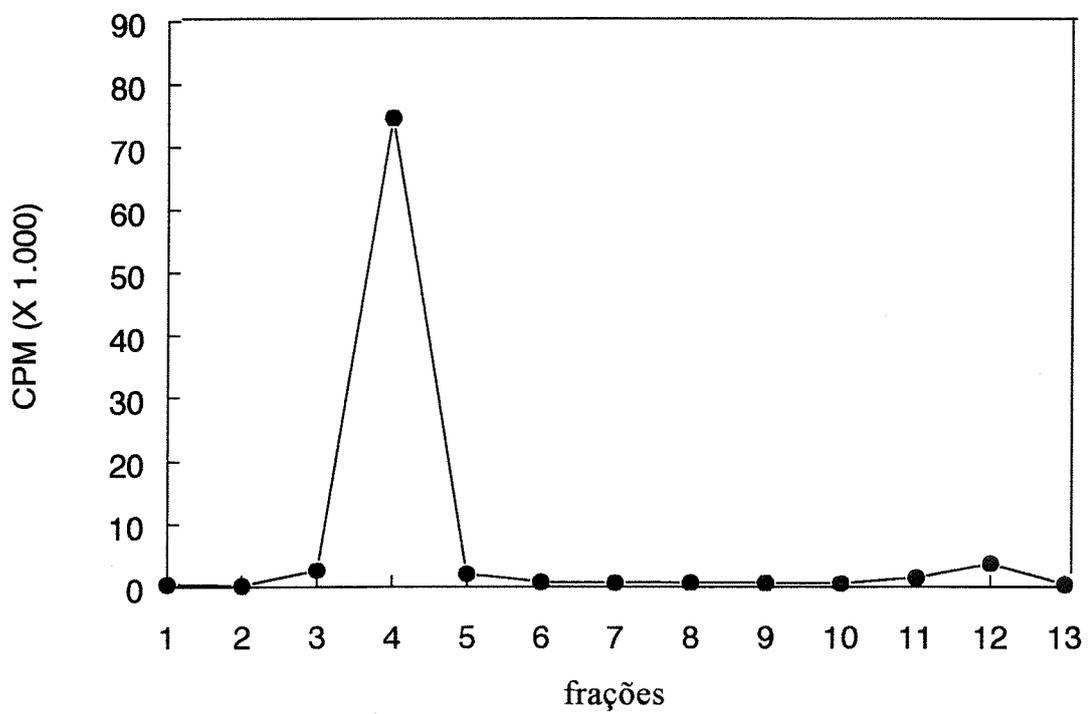


Figura V. 1. Cromatografia do $[^3\text{H}]$ glutamato para verificação da sua pureza. O $[^3\text{H}]$ glutamato foi submetido a cromatografia em camada delgada em sílica gel. Esta foi cortado em frações de 0,5 cm, e contada a radioatividade em cintilador. Os dados são de um experimento representativo.

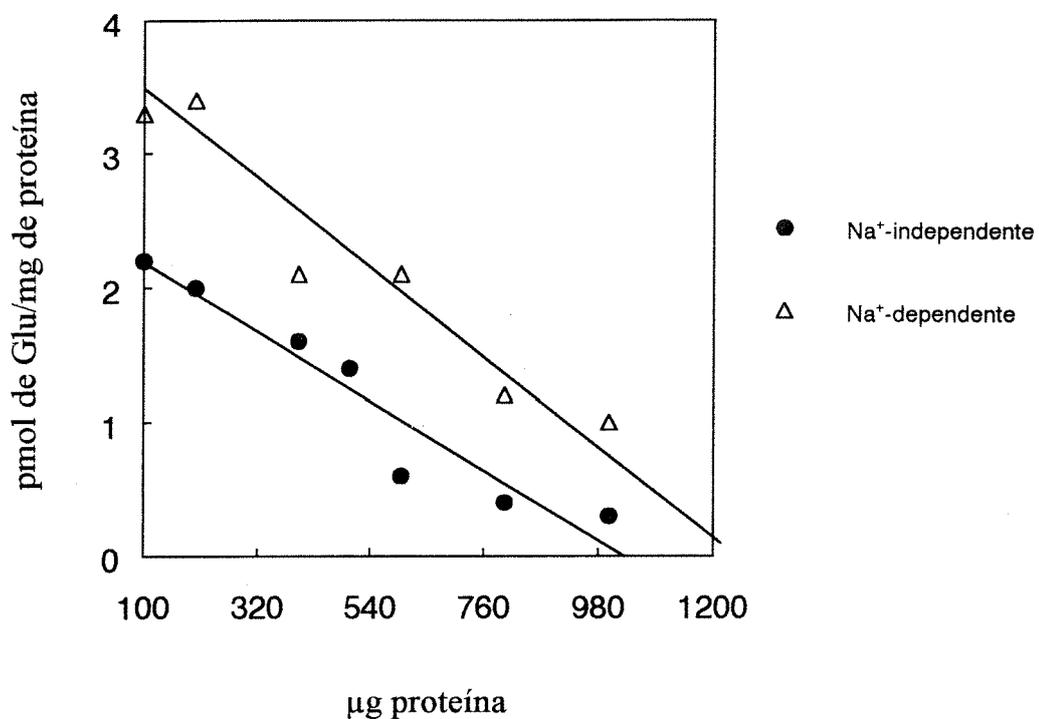


Figura V. 2. Curvas de concentração de proteína para o estudo da ligação do [³H]glutamato sódio-independente e dependente. 40 nM de [³H]glutamato foi incubado na presença de diferentes concentrações de membrana sináptica rompida e na ausência (Na⁺-independente) ou na presença (Na⁺-dependente) de 150 mM de sódio. A medida da ligação do [³H]glutamato foi conforme descrita no artigo 1. Os dados são de um experimento representativo repetido 4 vezes com resultados semelhantes.

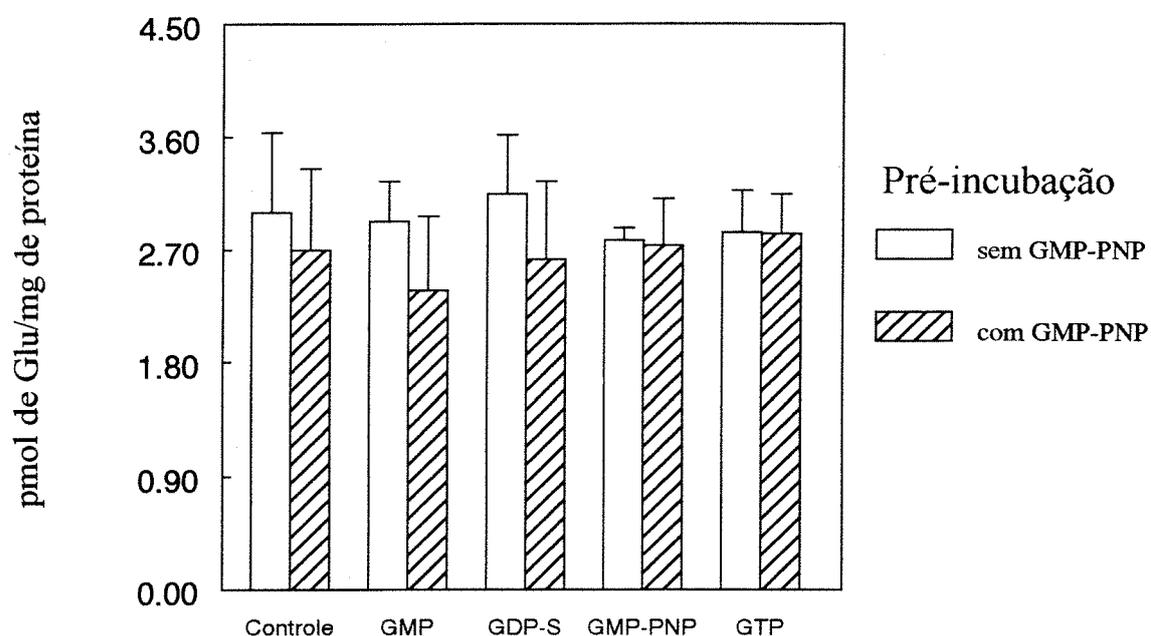


Figura V. 3. Efeito dos nucleotídeos da guanina (1 mM) sobre a união de 40 nM de [³H]glutamato sódio-dependente (150 mM de NaCl) em membranas pré-incubadas com ou sem 10 μM de GMP-PNP. A incubação e a medida da união do [³H]glutamato foi conforme descrito no artigo 1. Os dados são os valores de média + erro padrão médio de 4 experimentos independentes feitos em triplicata.

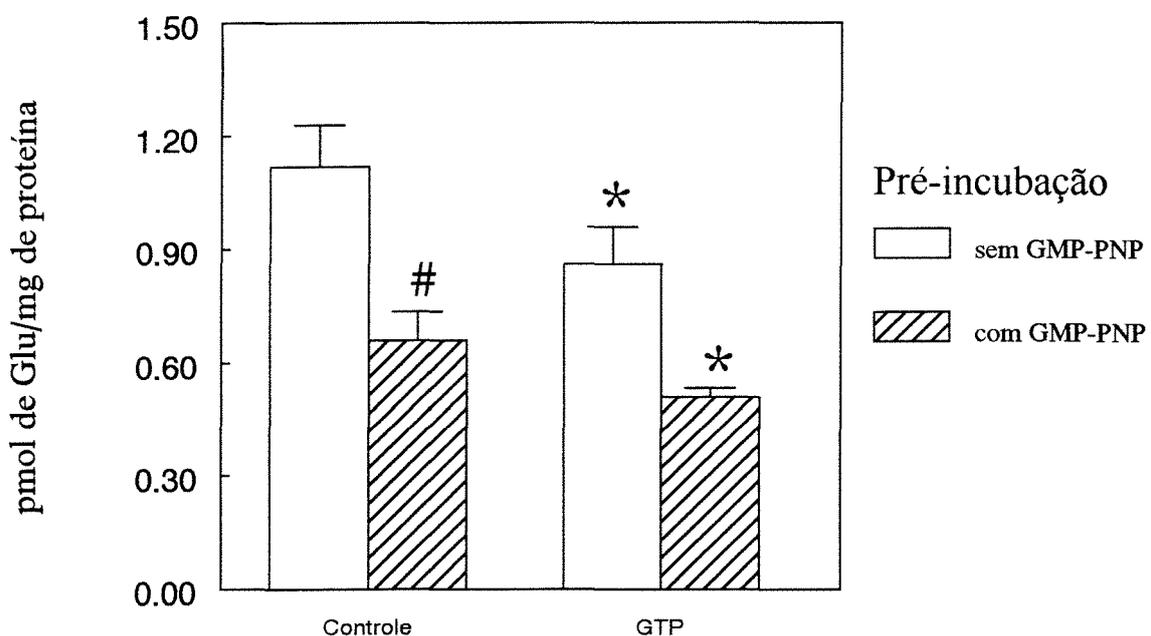


Figura V. 4. Efeito do GTP sobre a união do [^3H]glutamato sódio-independente na presença de EDTA, em membranas pré-incubadas com ou sem 10 μM de GMP-PNP. A pré-incubação foi feita na presença de Mg^{2+} e ausência de EDTA. A incubação foi realizada na presença de 50 mM de Tris/acetato (pH 7,4), 1 mM de EDTA e 40 nM de [^3H]glutamato. Os dados são os valores de média + erro padrão médio de 4 experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (na mesma condição de pré-incubação). # $p < 0,01$ em relação ao controle pré-incubado sem GMP-PNP.

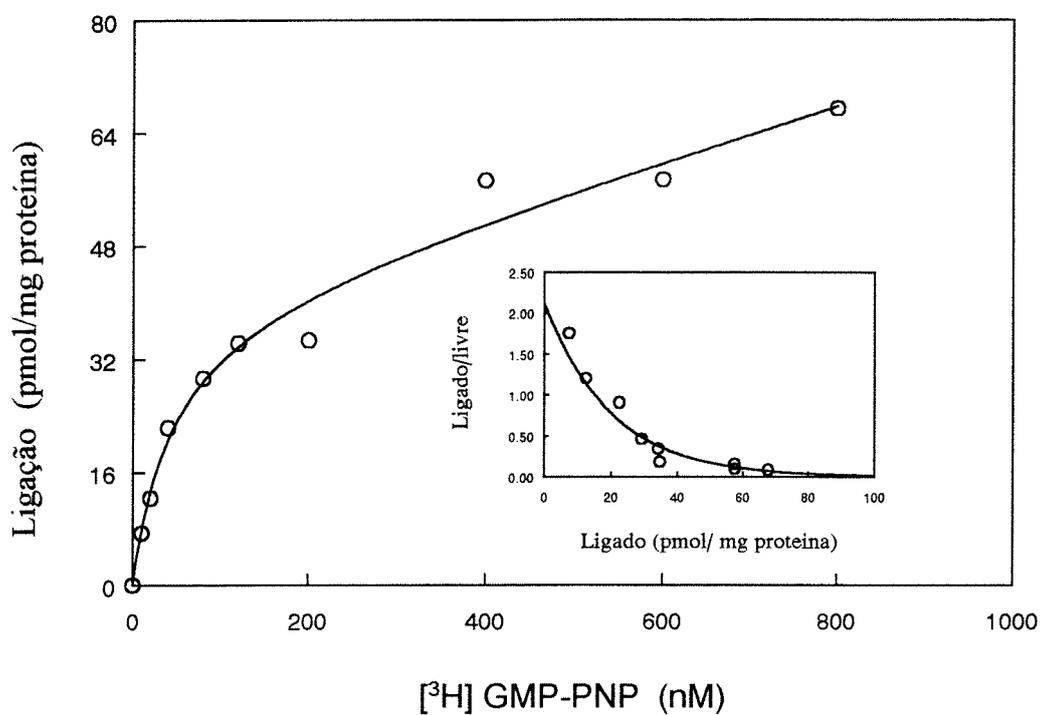


Figura V. 5. Curva de saturação e Plot de Scatchard (gráfico inserido) da união do $[^3\text{H}]\text{GMP-PNP}$ na membrana sináptica. A membrana sináptica foi incubada com concentrações variadas de $[^3\text{H}]\text{GMP-PNP}$ na presença de 25 mM de Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM de DTT e 5mM de MgCl_2 , por 15 minutos a 30°C . A reação foi interrompida por centrifugação e a ligação foi medida conforme descrito no artigo 1. Os dados são valores médios de 4 experimentos independentes feitos em triplicata (o desvio padrão de cada ponto foi menor do que 15%).

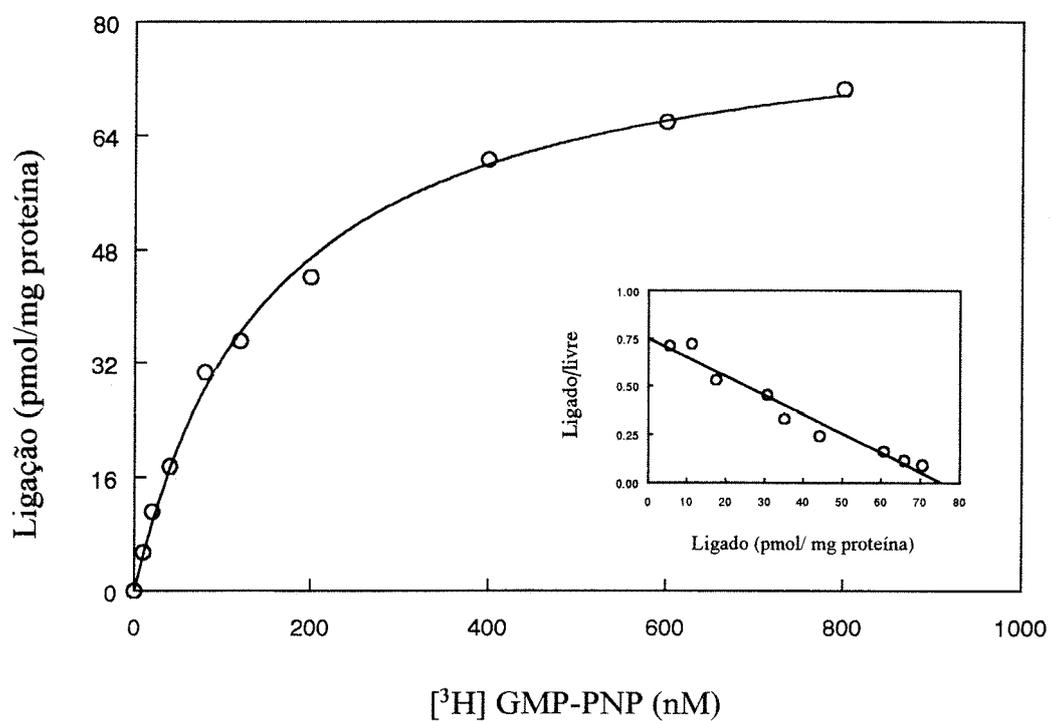


Figura V. 6. Curva de saturação e Plot de Scatchard (gráfico inserido) da união do $[^3\text{H}]$ GMP-PNP nos sítios extra-proteínas G na membrana sináptica. A membrana sináptica foi pré-incubada com $10\ \mu\text{M}$ de GMP-PNP, lavada 3 vezes, incubada com concentrações variadas de $[^3\text{H}]$ GMP-PNP na presença de $25\ \text{mM}$ de Tris/HCl (pH 7,4), $1\ \text{mM}$ de DTT e $5\ \text{mM}$ de MgCl_2 por 15 minutos a 30°C . A reação foi interrompida por centrifugação e a união foi medida conforme descrito no artigo 1. Os dados são valores médios de 4 experimentos independentes feitos em triplicata (o desvio padrão de cada ponto foi menor do que 15%).

VI. OBJETIVOS DO ARTIGO 2

No primeiro artigo verificamos que os NG (incluindo o GMP) diminuíram a união do [³H]glutamato sódio-independente em membranas sinápticas rompidas de cérebro total de ratos (portanto *in vitro*), e que os NG unem-se, provavelmente, em local extra-proteínas G para exercer essa ação. O segundo artigo teve os seguintes objetivos: 1) Investigar se o GMP também é capaz de inibir a união do [³H]glutamato em membranas sinápticas rompidas de uma estrutura cerebral específica - o hipocampo; 2) Investigar se o GMP é capaz de reverter uma ação do glutamato *in vivo*. Para isso, escolhemos a melhora da memória em uma tarefa de esQUIVA inibitória induzida pela administração de glutamato no hipocampo de ratos. Esse efeito comportamental induzido por glutamato foi descrito por Izquierdo e colaboradores (1992). Nós decidimos testar a ação do GMP *in vivo* para verificar se existe uma correlação entre os resultados encontrados *in vitro* e a resposta comportamental, portanto *in vivo*. Neste artigo foi escolhido o hipocampo porque a administração de drogas nesta estrutura pode alterar a memória em uma tarefa de esQUIVA inibitória (Izquierdo et al., 1992; 1993; Shen et al., 1994; Izquierdo & Medina, 1995; Bernabeu et al., 1996).

VII. ARTIGO 2

PREVIOUS studies have demonstrated that post-training intrahippocampal glutamate administration improves inhibitory avoidance task performance in rats. Antagonism of the agonist actions of glutamate by guanine nucleotides has been shown at the molecular and behavioural level. In the present investigation we demonstrate that intrahippocampal co-administration of GMP (guanosine 5'-monophosphate) reverses the facilitatory effect of glutamate on the inhibitory avoidance learning paradigm and inhibits [³H]glutamate binding in hippocampal synaptic plasma membranes. These results suggest that guanine nucleotides may modulate glutamate actions.

Key Words: Learning; Memory; Glutamate; GMP; [³H]glutamate binding; LTP

GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats

Maribel A. Rubin,^{CA} Alexandre Jurach, Edison M. da Costa Jr, Telmo T. F. Lima, Rolando E. Jiménez-Bernal, Jairo Begnini, Diogo O. Souza¹ and Carlos F. de Mello

Departamento de Quimica, Centro de Ciencias Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900, Santa Maria;
¹Departamento de Bioquimica, Instituto de Biociencias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil

^{CA}Corresponding Author

Introduction

Glutamate has been described as a neurotransmitter playing a pivotal role in learning and memory. Pharmacological manipulation by intrahippocampal or intracerebroventricular administration of glutamate agonists or antagonists during the consolidation period induces improvement and impairment of inhibitory avoidance performance, respectively.^{1–4} The facilitatory action of glutamate on memory has been correlated with the concomitant induction of long-term potentiation (LTP) in the hippocampus and other brain structures.⁵ Indeed, a large body of pharmacological evidence shows that administration of NMDA, non-NMDA and metabotropic glutamate antagonists or GABA agonists at doses that interfere with LTP induction impair memory.⁵

Guanine nucleotides inhibit NMDA-specific glutamate binding in rat forebrain⁶ and kainate binding in chick cerebellum and tectum opticum.^{7,8} Further evidence for antagonism of guanine nucleotides in the glutamatergic system comes from the demonstration that they inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate,⁹ the whole-cell current responses to glutamate agonists,¹⁰ the

NMDA-elicited elevation of cyclic GMP levels in neonatal rat cerebellar slices, the release of [³H]norepinephrine (NE) in prelabelled superfused hippocampal slices and the elevation of cytosolic calcium in cultured rat forebrain neurones.¹¹ Furthermore, GDP-S block quinolinic acid-induced seizures in mice, supporting the view that they are able to reverse the behavioural effects of glutamate.¹² In the present study we investigated the effect of a guanine nucleotide (GMP) on glutamate-induced improvement of inhibitory avoidance performance.

Materials and Methods

Male Wistar rats (230–250 g) were housed five to a cage on a natural day/night cycle at a temperature of 21°C with water and standard lab chow (Guabi, Santa Maria, RS, Brazil) *ad lib*. Membranes from the hippocampus were prepared as previously described.⁸ [³H]Glutamate binding was carried out according to Rao and Murthy.¹² Briefly, membranes were incubated in 0.5 ml of a reaction mixture containing 50 mM Tris/acetate (pH 7.4), 40 nM [³H]glutamate and GMP (0–1000 μM). After incubation at 30°C for 15 min the reaction was stopped by centrifugation at

27 000 × [BI]g for 30 min. The pellet was quickly and carefully washed with ice-cold distilled water. SDS (0.1%) and scintillation liquid were added to the resulting pellet and radioactivity was determined with a Beckman scintillation spectrometer. Non-specific binding was determined by adding 40 μM non-radioactive glutamate to the medium in a parallel assay. Sodium-dependent [³H]glutamate binding was assayed as above, except that 150 mM sodium acetate was added to the incubation medium. The method of Lowry *et al.*¹³ was used for protein determination.

For behavioural experiments, rats were implanted under thionembutal anaesthesia (30 mg kg⁻¹, i.p.) with a 27-gauge guide cannulae aimed 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus at coordinates A -4, L 3.0, V 2.0, according to the atlas of Paxinos and Watson.¹⁴ Four days after surgery, the animals were trained in the step-down inhibitory avoidance task, returned to their home cage and tested for retention 24 h later. The apparatus consisted of a 25 × 25 × 35 cm box with a grid floor whose left portion was covered by a 7 × 25 cm platform, 2.5 cm high. The rat was gently placed on the platform facing the rear left corner, and when the rat stepped down with all four paws on the grid, a 3 s 0.4 mA shock was applied to the grid.¹⁵ Immediately after training, the animals were injected with 0.5 μl of 200 mM phosphate buffer (pH 7.4), GMP (5 mg ml⁻¹ in PO₄ buffer), L-glutamate (10 mg ml⁻¹ in PO₄ buffer) or L-glutamate plus GMP. The injection was carried out using 30-gauge cannulae that were fitted into the guide cannula, with the tip of the infusion cannulae protruding 1.0 mm beyond that of the guide cannulae, and therefore aimed at CA1 in the dorsal hippocampus. Test step-down latency was taken as a measure of retention. Injection placements were histologically verified as described elsewhere.¹ Only data from the animals with correct cannula placement were analysed.

Behavioural data were submitted to two-way ANOVA (GMP or PO₄) factor × (glutamate or PO₄) factor.

Results

Figure 1 shows the dose-dependent inhibitory effect of GMP on sodium-independent [³H]glutamate binding. Sodium-dependent [³H]glutamate binding was not affected by addition of the nucleotide (data not shown). GMP inhibited 50% of the glutamate binding.

Statistical analysis of test step-down latencies revealed a significant main effect of glutamate administration ($F(1,52) = 6.63$; $p < 0.05$) and a significant GMP × glutamate interaction ($F(1,52) = 4.34$; $p < 0.05$; Fig. 2). Intrahippocampal glutamate administration caused an increase in the test step-down laten-

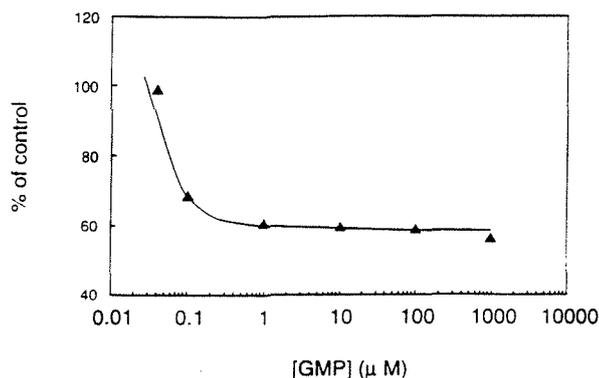


FIG. 1. GMP inhibition of specific [³H]glutamate binding. The results are expressed as percentage of control specific [³H]glutamate binding. The results are from one representative experiment of four separate experiments each run in triplicate. The value without guanine nucleotide (100%) was 1.8 ± 0.5 pmol mg⁻¹ of protein (mean \pm s.e.m.).

cies. Furthermore, the significant interaction indicated that GMP was able to reverse the glutamate-induced behavioural effect. It is important to point out that no significant effect of GMP administration was observed, indicating that the nucleotide had no effect per se. The results obtained from the behavioural analysis agreed with those obtained in the binding studies.

Discussion

Intrahippocampal administration of GMP inhibited the glutamate-induced improvement of inhibitory avoidance performance of adult rats, as well as [³H]glutamate binding to synaptic plasma membranes. Various studies have demonstrated that guanine nucleotides reverse the binding of glutamate or its agonists and cell responses to the activation of the glutamatergic system.⁵⁻¹⁰ However, to our knowledge, only one study has demonstrated such an interaction *in vivo*, using GDPβS to block quinolinic acid-induced convulsions.¹¹ This anticonvulsant action of guanine nucleotides was attributed to a putative action at an extracellular site, probably at the NMDA receptors, since a significant displacement of NMDA binding sites was obtained with these nucleotides.¹¹ This inhibitory action on NMDA receptors is consistent with our neurochemical findings, which revealed that GMP reduced [³H]glutamate binding, and may help explain the presently observed reversal by glutamate of behavioural actions in the inhibitory avoidance test, since systemic and intrahippocampal administration of antagonists of NMDA receptors hinders memory for diverse behaviours in rats.^{1,2,5} On the other hand, the decrease in binding affinity in the presence of guanine nucleotides, namely GTP analogues, is characteristic

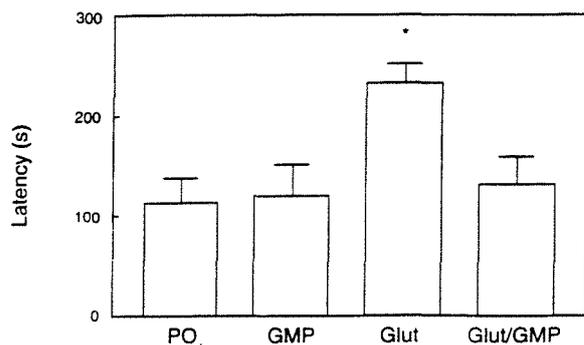


FIG. 2. Effect of glutamate or GMP on the inhibitory avoidance task performance of adult rats. Data are mean \pm s.e.m. for 14 animals in each group.

of G-protein-linked receptors and is the result of the dissociation of receptor-G-protein complex in the presence of GTP or its analogues.¹⁶ The participation of G-proteins in the inhibition of glutamate binding by GMP observed here cannot, therefore, be excluded. However, it seems fairly unlikely that GMP exerted its behavioural effects through G-protein interaction, for two reasons: first, GMP does not promptly cross membranes and could not have access to G-protein (the classical effects of guanine nucleotides on membrane transduction systems are exerted from inside the membrane). Second, it has not been reported whether GMP interacts with G-proteins.^{7,8} Guanine nucleotide inhibition of [³H]kainate binding in chick tectum opticum, cerebellum and goldfish brain through a mechanism that does not involve G-proteins has recently been reported.¹⁷ Furthermore, the major [³H]kainate binding protein from chick brain has been cloned, and a guanine nucleotide binding region has been identified in the putative extracellular amino-terminal domain.¹⁸ These results suggest a possible direct modulatory role for extracellular guanine nucleotides at the glutamate binding sites, but whether these modulatory sites are endogenously involved in the presently observed behavioural results remains to be determined.

The facts that GMP inhibited glutamate binding to membranes and that glutamate antagonists have been reported to hinder memory *per se*¹⁻⁴ make it difficult to explain why GMP had no behavioural effect *per se* when administered *in vivo*. Considering that it is difficult to promptly correlate *in vitro* and *in vivo* results, this point merits further investigation.

Conclusion

GMP inhibited glutamate binding *in vitro* and reversed the facilitatory effect of glutamate on the inhibitory avoidance memory of rats. Although the binding results do not necessarily imply a direct role for GMP as a glutamate antagonist, it is tempting to propose such a role in the behavioural alterations observed.

References

- Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R et al. *Behav Neural Biol* **58**, 16-26 (1992).
- Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Walz R et al. *Behav Neural Biol* **58**, 76-80 (1992).
- Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK et al. *Behav Pharmacol* **5**, 356-359 (1994).
- Riedel G, Wetzel W and Reymann KG. *Learning Memory* **2**, 243-265 (1995).
- Izquierdo I and Medina JH. *Neurobiol Learning Memory* **63**, 19-32 (1995).
- Monahan JB, Hood WF, Michel J et al. *Mol Pharmacol* **34**, 111-116 (1988).
- Paz MM, Ramos M, Ramirez G et al. *FEBS Lett* **355**, 205-208 (1994).
- Souza DO and Ramirez G. *J Mol Neurosci* **3**, 39-45 (1991).
- Tasca CI, Wolfchuk ST, Souza DO et al. *NeuroReport* **6**, 249-252 (1995).
- Budson AE, Jackson PS and Lipton SA. *Brain Res* **548**, 346-348 (1991).
- Baron BM, Dudley MW, McCarty DR et al. *J Pharmacol Exp Ther* **250**, 162-169 (1989).
- Rao R and Murthy ChRK. *Mol Biol Int* **30**, 861-866 (1993).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
- Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, (1986).
- Souza DO, Vendite D, Mello CF et al. *Braz J Med Biol Res* **25**, 275-280 (1992).
- Ross EM. *Neuron* **3**, 141-152 (1989).
- Barnes JM, Murphy PA, Kirkham D et al. *J Neurochem* **61**, 1685-1691 (1993).
- Teichberg VI, Maoz I, Paperna T et al. *J Neurochem* **61** (Suppl.), S60D (1993).

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Mr. Antoninho Macuglia (Central Animal House, UFSM) for competent breeding and care of the animals used in this study, and Prof. Joao Batista T. da Rocha for a critical reading of the manuscript.

Received 2 May 1996;
accepted 6 June 1996

VIII. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

VIII.1. ARTIGO 1 E ANEXO DO ARTIGO 1

1. Os NG testados (GMP, GDP-S, GTP e GMP-PNP) foram capazes de diminuir a união do [³H]glutamato sódio-independente em membranas de cérebro de ratos adultos na ausência de GMP-PNP na pré-incubação (figuras 1 e 6 - artigo 1). Esse resultado confirma dados da literatura que descrevem que os NG são capazes de diminuir a união do glutamato ou de seus análogos em várias espécies animais (Butcher et al., 1986; Monaghan & Cotman, 1986; Murphy et al., 1987; Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Hood et al., 1990; Souza & Ramírez, 1991; Willard et al., 1991; Barnes et al., 1993; Gorodinsky et al., 1993; Paz et al., 1994; Ibarra & Ortega, 1995). Entretanto, um fato interessante em relação a esse resultado é que o GMP, que não está descrito que se una em proteínas G, também foi capaz de inibir a união do [³H]glutamato, sugerindo que este efeito talvez não envolva proteínas G.

2. Submetemos a preparação de membranas celulares obtidas de cérebro de ratos à pré-incubação com GMP-PNP na presença de Mg²⁺ de modo a saturar o sítio para NG em proteínas G, o que acarreta a ativação permanente deste sistema de transdução. A ativação de proteínas G foi demonstrada pelo fato de que, nesta preparação, a AC estava ativada (figura 4 - artigo 1). Outra comprovação da ativação de proteínas G com o tratamento descrito foi que a adição posterior de GMP-PNP, GDP-S e GMP se mostrou incapaz de ativar a AC, ao contrário da pré-incubação sem GMP-PNP, em que a adição posterior deste nucleotídeo foi capaz de ativar a AC (figura 5 - artigo 1), provavelmente, pelo mecanismo clássico do GTP se unir em proteínas Gs

e ativar o efetor para formar o segundo mensageiro (AC). Outra evidência da ativação de proteínas G foi o fato de que nessa preparação a união de [³H]GMP-PNP e do [³H]GDP-S diminuiu aproximadamente 35% (figura 4 - artigo 1) indicando que pelo menos parte dos sítios de ligação destes nucleotídeos estavam ocupados pelo GMP-PNP da pré-incubação. Estes provavelmente são os sítios ligados às proteínas G.

3. Na preparação de membrana submetida a pré-incubação com GMP-PNP na presença de Mg²⁺, portanto com as proteínas G ativadas, a união do [³H]glutamato sódio-independente se apresentou diminuída em relação à pré-incubação sem GMP-PNP (figura 6 - artigo 1), indicando que esse nucleotídeo ao se unir em proteínas G diminuiu a união do glutamato a seus receptores. O resultado confirma os dados da literatura que mostram que o GTP, ao se ligar em proteínas G, diminui a afinidade do agonista pelo receptor (Birnbaumer, 1990).

4. Na preparação citada no item 3, a adição dos NG foi capaz de diminuir ainda mais a união do [³H]glutamato sódio-independente em relação ao controle, submetido à mesma pré-incubação (figura 6 - artigo 1). O resultado sugere que os NG se ligam em local extra-proteínas G para ter este efeito, uma vez que as proteínas G já estavam ativadas e, portanto, saturadas com GMP-PNP. Em relação a esse resultado é interessante observar que o GMP, que não está descrito que se una nas proteínas G, também foi capaz de inibir a união do [³H]glutamato, sugerindo, mais uma vez, que tal efeito talvez não envolva proteínas G.

5. A presença de Mg²⁺ é fundamental para que ocorra a ativação de proteínas G por NG. Em função disso, testamos o efeito do Mg²⁺ sobre a união do [³H]GMP-PNP em proteínas

G. Para tal, medimos a união do [³H]GMP-PNP na presença ou ausência de Mg²⁺ após várias lavagens. Isto possibilita a união deste nucleotídeo apenas em proteínas G. Como pode ser observado na figura 7 do artigo 1, à medida que diminui a concentração de íons Mg²⁺ no meio de incubação (pela falta de adição destes íons e/ou pela adição de EDTA) também diminui a união do [³H]GMP-PNP. Com esse resultado, podemos concluir que qualquer efeito dos NG sobre a união do glutamato na presença de EDTA não envolve o sítio de ligação desses nucleotídeos em proteínas G.

6. Na experiência em que testamos o efeito dos NG sobre a união de [³H]glutamato sódio-independente realizada na ausência de Mg²⁺ no meio de incubação (figura 6 - artigo 1) os NG poderiam, mesmo assim, unirem-se nas proteínas G, uma vez que poderiam existir íons Mg²⁺ endógenos. Para excluir essa possibilidade, foi testado o efeito do GTP sobre a ligação do [³H]glutamato sódio-independente na presença de 1mM de EDTA (portanto, na ausência total de Mg²⁺) utilizando-se as preparações pré-incubadas como descrito no item 3. A união do [³H]glutamato na presença de EDTA na preparação pré-incubada com GMP-PNP, apresentou-se diminuída em relação à pré-incubada sem GMP-PNP (figura V.4 - anexo do artigo 1). Isso indica que este nucleotídeo ao se unir em proteínas G diminuiu a união do glutamato nos seus receptores, mesmo na ausência de Mg²⁺ na incubação. O GTP também diminuiu a união do [³H]glutamato na presença de EDTA independentemente da pré-incubação. O fato do GTP diminuir a união do [³H]glutamato, mesmo na ausência de Mg²⁺, confirma os dados apresentados anteriormente de que tal nucleotídeo se une em sítio extra-proteínas G para modular a ligação do glutamato nos seus receptores, uma vez que na presença de EDTA os íons Mg²⁺ endógenos são quelados e o GTP não se une em proteínas G.

7. A união do [³H]glutamato sódio-dependente não foi alterada pela pré-incubação com GMP-PNP nem pela adição dos NG (figura V.3 - anexo do artigo 1). Tal resultado sugere que nem a pré-incubação nem os NG são capazes de afetar a união do glutamato ao seu sítio de recaptação em membrana sináptica de cérebro de ratos.

8. Quando medimos a união do [³H]GMP-PNP em membranas sinápticas podemos observar que a ligação é dependente da concentração do ligante e saturável (figura V.5 - anexo do artigo 1). O gráfico de Scatchard mostra pelo menos dois sítios de ligação do GMP-PNP. Com o objetivo de caracterizar esses sítios, a união do [³H]GMP-PNP foi medida após várias lavagens para retirar o excesso de ligante radioativo. Como mostrado na figura 2 do artigo 1, o gráfico de Scatchard mostra um único sítio de ligação (ou um único conjunto de sítios) provavelmente em proteínas G, uma vez que o mesmo procedimento manteve a adenilato ciclase ativada (figura 4 - artigo 1). O outro sítio foi caracterizado usando-se a preparação de membrana submetida a pré-incubação com GMP-PNP (não radioativo) e foi medida a união do [³H]GMP-PNP nessa preparação. Como mostrado na figura V.6 (anexo do artigo 1), existe apenas um sítio de ligação que, provavelmente, é extra-proteínas G uma vez que o sítio de união em proteínas G estava saturado com o GMP-PNP usado na pré-incubação.

VIII.2. ARTIGO 2

1. O GMP diminuiu a união do [³H]glutamato em hipocampo de ratos *in vitro* (figura 1 - artigo 2). Tal resultado mostra um efeito modulatório dos nucleotídeos da guanina sobre o

sistema límbico, que está envolvido no aprendizado e na memória (Shen et al., 1994). Portanto, o GMP poderia alterar as funções mediadas por glutamato no hipocampo, inclusive a memória.

2. O GMP reverteu o efeito facilitatório sobre a memória induzido por glutamato *in vivo* em uma tarefa de esquiiva inibitória (figura 2 - artigo 2). Esse resultado pode estar relacionado com a inibição da união do [³H]glutamato *in vitro* por GMP, sendo portanto o correlato comportamental das alterações verificadas *in vitro*. Embora tais resultados não nos permitam esclarecer o mecanismo molecular exato pelo qual o GMP interfere na melhora da memória induzida por glutamato, algumas especulações podem ser feitas. Uma hipótese seria que o GMP poderia interagir com algum sítio extracelular e impedir a união do glutamato nos seus receptores. Essa hipótese é sustentada pelas seguintes evidências: primeiro, o GMP injetado *in vivo*, portanto em tecido intacto, provavelmente não atinge o espaço intracelular, o que impossibilita a união com proteínas G, que interagem com NG intracelularmente; segundo, não está descrito que o GMP se una a proteínas G. A correlação entre os resultados encontrados com os NG *in vitro* e em células intactas já foi descrita por outros autores. Assim, o GDP-S foi capaz de bloquear convulsões induzidas por ácido quinolínico (agonista glutamatérgico no receptor NMDA) em camundongos (Baron et al., 1989), bem como de reduzir respostas fisiológicas produzidas por NMDA, KA e quisqualato em células de retina de ratos (Budson et al., 1991). Nesses dois trabalhos, assim como no presente estudo, os autores sugerem que os NG atuam no lado de fora da célula, portanto sem envolver o sítio de união desses nucleotídeos em proteínas G.

VIII.3. GERAL

Os resultados desse estudo sugerem que em cérebro de ratos adultos os NG se unem, pelo menos em parte, em local extra-proteínas G e com isso, diminuem a união do [³H]glutamato a seus receptores de membranas sinápticas *in vitro*, assim como bloqueiam o efeito estimulatório do glutamato sobre a memória. Isso abre caminho para investigarmos o mecanismo preciso e o significado fisiológico e patológico da interação dos NG com esse novo sítio. Caso os NG sejam liberados para o fluido extracelular, eles poderiam atuar como agentes protetores endógenos contra danos excitotóxicos causados pelo glutamato. Até o momento, não existem evidências da liberação e da presença dos NG no meio extracelular, apesar de algumas vesículas sinápticas armazenarem nucleotídeos da adenina e da guanina (Zimmermann, 1994). Durante a anóxia, os níveis de nucleotídeos da adenina aumentam 30 a 100 vezes no meio extracelular (Hagberg et al., 1987), porém, como os NG podem ser co-armazenados com os nucleotídeos da adenina, os NG também poderiam estar aumentados no meio extracelular. Portanto, o tecido nervoso está exposto a alta concentração de nucleotídeos purinérgicos em condições de insultos como hipóxia, tumor cerebral maligno ou após trauma. Sabemos que a morte celular causada pela isquemia, por exemplo, é mediada pela liberação de grande quantidade de glutamato com conseqüente dano excitotóxico (McEntee & Crook, 1993; Lipton & Rosenberg, 1994). Como a concentração de NG poderia estar aumentada quando ocorre morte neuronal, eles poderiam ter um efeito neuroprotetor ao se ligar nas células vizinhas e com isso impedir a união do glutamato e, conseqüentemente, a morte de mais células. O papel dos NG estimulando respostas fisiológicas foi sugerido por Kim e colaboradores (1991). Esses

autores demonstraram que os NG estimularam a proliferação celular em cultura de astroblastos de cérebro de pintos, atuando, provavelmente, através de receptores localizados na superfície da célula.

Compostos guanidínicos, como os NG, apresentam afinidade pelo sítio das poliaminas no receptor NMDA (Reynolds, 1990). Isso abre a possibilidade de que os NG atuem através desse sítio para operar pelo menos alguns dos seus efeitos. Por outro lado, os compostos guanidínicos são antagonistas GABAérgicos (Kabuto et al., 1995), o que torna possível que eles interajam com outros sistemas, além do glutamatérgico, para exercer seus efeitos farmacológicos.

O fato dos NG possuírem, potencialmente, uma ação neuroprotetora torna possível que esses compostos sejam testados como possíveis agentes neuroprotetores em casos de isquemia ou de algumas doenças neurodegenerativas crônicas tais como Huntington, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFORD, S., FRENGUELLI, B.G., SCHOFIELD, J.G. e COLLINGRIDGE, G.L. Characterization of Ca^{2+} signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. **J. Physiol.** **469**: 693-716, 1993.
- ANIKSZETEJN, L., OTANI, S. e BEN-ARI, Y. Quisqualate metabotropic receptors modulate NMDA currents and facilitate induction of long-term potentiation through protein kinase C. **Eur. J. Neurosci.** **4**: 500-505, 1992.
- ASCHER, P. e NOWAK, L. Electrophysiological studies of NMDA receptors. **Trends Neurosci.** **10**: 284-288, 1987.
- ASCHER, P. e NOWAK, L. Quisqualate- and kainate-activated channels in mouse central neurones in culture. **J. Physiol.** **399**: 227-246, 1988.
- BALDWIN, J.M. Structure and function of receptors coupled to G protein. **Curr. Opin. Cell Biol.** **6**: 180-190, 1994.
- BARNES, J. e HENLEY, J.M. Molecular characteristics of excitatory amino acid receptors. **Prog. Neurobiol.** **39**: 113-133, 1992.
- BARNES, J.M., MURPHY, P.A., KIRKHAM, D. e HENLEY, J.M. Interaction of guanine nucleotides with [3H]kainate and [3H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. **J. Neurochem.** **61**:1685-1691, 1993.
- BARON, B.M., DUDLEY, M.W., MCCARTY, D.R., MILLER, F.P., REYNOLDS, I.J. e SCHIMIDT, C.J. Guanine nucleotides are competitive inhibitors of N-Methyl-D-Aspartate at its receptor site in vitro and in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **250**: 162-169, 1989.
- BERNABEU, R., PRINC, F., STEIN, M.L., FIN, C., JUKNAT, A.A., BATILE, A., IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Evidence for the involvement of hippocampal CO production in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **NeuroReport** **6**:516-518, 1995a.
- BERNABEU, R., STEIN, M.L., FIN, C., IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **NeuroReport** **6**:1498-1500, 1995b.
- BERNABEU, R., SCHMITZ, P., FAILLACE, M.P., IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. **NeuroReport** **7**:585-588, 1996.
- BIANCHIN, M., FIN, C., SCHIMITZ, P.R., DA SILVA, R.C., MEDINA, J.H. e IZQUIERDO, I. Memory on inhibitory avoidance in rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. **Behav. Pharmacol.** **5**: 356-359, 1994.

- BIRNBAUMER, L. G proteins in signal transduction. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** **30**: 675-705, 1990.
- BLISS, T.V.P. e COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature** **361**:31-39, 1993.
- BLISS, T.V.P. e GARDNER-MEDWIN, A.R. Long-lasting potentiating of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. II. **J. Physiol.** **232**:257-374, 1973.
- BLISS, T.V.P. e LOMO, T. Long-lasting potentiating of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.I. **J. Physiol.** **232**:331-356, 1973.
- BORTOLOTTI, Z.A. e COLLINGRIDGE, G.L. Characterization of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. **Neuropharmacol.** **32**: 1-6, 1993.
- BORTOLOTTI, Z.A., BASHIR, Z.I., DAVIES, C.H. e COLLINGRIDGE, G.L. A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. **Nature** **368**: 740-743, 1994.
- BOUVIER, M., MOFFETT, S., LOISEL, T.P., MOUILLAC, B., HEBERT, T. e CHIRAC, P. Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. **Biochem. Soc. Trans.** **23**: 116-120, 1995.
- BRANN, D.W. Glutamate: A major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinol.** **61**:213-225, 1995.
- BUDSON, A.E., JACKSON, P.S. e LIPTON, S.A. GDP β -S antagonizes whole-cell current responses to excitatory amino acids. **Brain Res.** **548**: 346-348, 1991.
- BUTCHER, S.P., ROBERTS, P.J. e COLLINS, J.F. Purine nucleotides inhibit the binding of DL-[³H]2-amino-4-phosphonobutyrate (DL-[³H]APB) to L-glutamate-sensitive sites on rat brain membranes. **Biochem. Pharmacol.** **45**: 991-994, 1986.
- CARTER, C., SAVASTA, M., FAGE, D. e SCATTON, B. 2-oxo-[¹⁴C]-glutamate is taken up by glutamatergic nerve terminals in the rat striatum. **Neurosci. Lett.** **72**: 227-231, 1986.
- CARTER, C., BENAVIDES, J. DANA, C., SCHOEMAKER, H., PERRAULT, G., SANGER, D. e SCATTON, B. Non-competitive NMDA receptor antagonists acting on the polyamine site. In: **Excitatory Amino Acid Antagonists** (Meldrum BS, Ed). Scientific Publications, London, pp 130-163, 1991.
- CASEY, P.J. Lipid modifications of G proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.** **6**: 219-225, 1994.

- CASSEL, D. e SELINGER, Z. Mechanism of adenylate cyclase activation through the β -adrenergic receptor: Catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **75**: 4155-4178, 1978.
- CATANIA, M.V., SOCARRAZ, H., PENNEY, J.B. e YOUNG, A.B. Metabotropic glutamate receptor heterogeneity in rat brain. **Mol. Pharmacol.** **45**:626-636, 1994.
- CHOU, J.C. e LEE, E.H.Y. Differential involvement of hippocampal G-protein subtypes in the memory process of rats. **Neurosci.** **64**: 5-15, 1995.
- CHUTE, D.L., VILLIGER, J.W. e KIRTON, N.F. Testing cyclic AMP mediation of memory: reversal of α -methyl-*p*-tyrosine-induced amnesia. **Psychopharmacol.** **74**: 129-131, 1981.
- COLINO, A. e MALENKA, R.C. Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro. **J. Neurochem.** **69**: 1150-1159, 1993.
- COTMAN, C.W., KAHLE, J.S., MILLER, S.E., ULAS, J. e BRIDGES, R.J. Excitatory amino acid neurotransmission. in **Psychopharmacology: The Forth Generation of Progress**. Floyd, E., Bloom and Kupfer, D.J. eds. Raven Press, Ltd., New York, p. 75-85, 1995.
- FOTUHI, M., SHARP, A.H., GLATT, C.E., HWANG, P.M., VON KROSIGK, M., SNYDER, S.H. e DAWSON, T.M. Differential localization of phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat brain. **J. Neurosci.** **13**:2001-2012, 1993.
- FREY, U., KRUG, M., REYMANN, K.G. e MATTHIES, H. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis blocks the late phases of LTP phenomena in the the hippocampal CA1 region in vitro. **Brain Res.** **462**: 57-65, 1988.
- FREY, U., HUANG, Y. -Y. e KANDEL E.R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. **Science** **260**: 1661-1664, 1993.
- GASIC, G.P. e HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu. Rev. Physiol.** **54**: 507-536, 1992.
- GILBERTSON, T.A., SCOBAY, R. e WILSON, M. Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. **Science** **251**: 1613-1615, 1991.
- GILMAN, A.G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Ann. Rev. Biochem.** **56**: 615-649, 1987.
- GORODINSKY, A., PAAS, Y. e TEICHBERG, V.I. A ligand binding study of the interactions of guanine nucleotides with non-NMDA receptors. **Neurochem. Int.** **23**: 285-291, 1993.
- GUDERMANN, T., KALKBRENNER, F. e SCHULTZ, G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** **36**: 429-459, 1996.

- HAGA, K., HANA, T. e ICHLYAMA, A. Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptors. **J. Biol. Chem.** **261**: 10133-10140, 1986.
- HAGBERG, H., ANDERSON, P., LACAREWICZ, J., JACOBSON, I., BUTCHER, S. e SANDBERG, M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. **J. Neurochem.** **49**: 227-231, 1987.
- HEPLER, J.R. e GILMAN, A.G. G proteins. **Trends Biochem. Sci.** **17**: 383-387, 1992.
- HIROSE, K. e CHAN, P.H. Blockade of glutamate excitotoxicity and its clinical applications. **Neurochem. Res.** **18**: 479-483, 1993.
- HOLSCHER, C. Inhibitors of metabotropic glutamate receptors produce amnesic effects in chicks. **NeuroReport** **5**: 1037-1040, 1994.
- HOOD, W.F., THOMAS, J.W., COMPTON, R.P. e MONAHAN, J. Guanine nucleotide modulation of [³H]TCP binding to the NMDA complex. **Eur. J. Pharmacol.** **188**: 43-49, 1990.
- HUME, R.I., DINGLEDINE, R. e HEINEMANN, S.F. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. **Science** **253**: 1028-1031, 1991.
- IBARRA, C. e ORTEGA, A. Interaction of guanine nucleotides with the kainate binding protein from chick cerebellum. **NeuroReport** **6**: 1149-1151, 1995.
- IINO, M., OZAKAWA, K. e TSUZUKI, K. Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. **J. Physiol.** **424**: 151-165, 1990.
- ÑIGUEZ-LLUHI, J., KLEUSS, C. e GILMAN, A.G. The importance of G-protein $\beta\gamma$ subunits. **Trend Cell Biol.** **3**: 230-236, 1993.
- ISHII, T., MORIYOSHI, K., SUGIHARA, H. e SAKURADA, K. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. **J. Biol. Chem.** **268**: 2836-2843, 1993.
- IYENGAR, R. e BIRNBAUMER, L. Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylyl cyclase by reducing its requirement for Mg^{2+} and enhancing its extent of activation by guanine nucleotides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**: 5179-5183, 1982.
- IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. **Drug Dev. Res.** **30**: 1-17, 1993.

- IZQUIERDO, I., DA CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M.B.C. e MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behav. Neurol Biol.** **58**: 16-26, 1992.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H., BIANCHIN, M. WALZ, R., ZANATTA, M.S., DA SILVA, R.C., BUENO E SILVA, M., RUSCHEL, A.C. e PECZKO, N. Memory processing by the limbic system: Role of specific neurotransmitter systems. **Behav. Brain Res.** **58**: 91-98, 1993.
- IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of Long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol. Learn. Mem.** **63**:19-32, 1995.
- JOHANSEN, T.H., DREJER, J., WATJEN, F. e NIELSEN, E.O. A novel non-NMDA receptor antagonist shows selective displacement of low-affinity [³H]kainate binding. **Eur. J. Pharmacol.** **246**: 195-204, 1993.
- JORGENSEN, M., TYGESEN C.K. e ANDERSEN P.H. Ionotropic glutamate receptors - focus on non-NMDA receptors. **Pharmacol. Toxicol.** **76**:312-319, 1995.
- JOHNSON, J.W. e ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response of mouse central neurones. **Nature** **325**:529-531, 1987.
- JOLY, C., GOMEZA, J., BRABET, I., CURRY, K., BOCKAERT. J. e PIN, J-P. Molecular, functional and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1. **J. Neurosci.** **15**: 3970-3981, 1995.
- KABUTO, H., YOKOI, I., IWAYA, K. e MORI, A. Monoamine release in the rat striatum is induced by guanidinovaleric acid and inhibited by GABA agonists. **Life Sci.** **56**: 3970-3981, 1995.
- KIM, J.-K., RATHBONE, M.P., MIDDLEMISS, P.J., HUGHES, D.W. e SMITH, R.W. Purinergic stimulation of astroblast proliferation: guanosine and its nucleotides stimulate cell division in chick astroblasts. **J. Neurosci. Res.** **28**: 442-455, 1991.
- KOERNER, J.F. e JOHNSON, R.L. L-AP4 receptor ligands. In: Excitatory Amino Acid Receptors; Design of Agonists and Antagonists (Krogsgaard-Larsen P. and Hansen J.J., Eds), pp.308-330. Ellis Horwood Limited, West Sussex, U.K. 1992
- KOWALL, N.W. e BEAL, M.F. Glutamate-, glutaminase-, and taurine immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Ann. Neurol.** **29**: 162-167, 1991.
- LIMBIRD, L.E. e LEFKOWITZ, R.J. Agonist-induced increase in apparent β -adrenergic receptor size. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **75**: 228-232, 1978.
- LIPTON, S.A. e ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New Engl. J. Med.** **330**: 613-622, 1994.

- MAGUIVE, M.E., VAN ARSDALE, P.M. e GILAN, A.G. An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the β -adrenergic receptor. **Mol. Pharmacol.** **12**: 335-339, 1970.
- MAYER, M.L. e WESTBROOK, G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. **J. Physiol.** **394**: 501-527, 1987.
- MAYER, M.L., BENEVISTE, J.M., PATNEAU, D.K. e VYKLIČKY Jr., L. Pharmacologic properties of NMDA receptors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **648**: 194-204, 1992.
- MCDONALD, J.W., FIX, A.S. TIZZANO, J.P. e SCHOEPP, D.D. Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1S,3R-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist. **J. Neurosci.** **13**: 4445-4455, 1993.
- MCENTEE, W. e CROOK, T.H. Glutamate: its role in learning, memory, and aging brain. **Psychopharmacol.** **111**: 391-401, 1993.
- MOLNÁR, E., BAUDE, A., RICHMOND, S.A., PATEL, P.B., SOMOGYI, P. e MCLLHINNEY, R.A.J. Biochemical and immunocytochemical characterization of antipeptide antibodies to a cloned GluR1 glutamate receptor subunit: Cellular and subcellular distribution in the rat forebrain. **Neurosci.** **53**: 307-326, 1993.
- MONAGHAN, D.T., e COTMAN, C.W. Identification and properties of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain synaptic plasma membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 7532-7536, 1986.
- MONAHAN, J.B., e MICHEL, J. Identification and characterization of an N-methyl-D-aspartate-specific L-[³H]-glutamate recognition site in synaptic plasma membranes. **J. Neurochem.** **48**: 1699-1708, 1987.
- MONAHAN, J.B., HOOD, W.F., MICHEL, J. e COMPTON, R.P. Effect of guanine nucleotides on N-Methyl-D-Aspartate receptor-ligand interactions. **Mol. Pharmacol.** **34**: 111-116, 1988.
- MORIMOTO, B.H. e KOSHLAND, D.E. Jr. Identification of cyclic AMP as the response regulator for neurosecretory potentiation: a memory model system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 10835-10839, 1991.
- MORRIS, R.G.M., ANDERSON, E., LYNCH G.S. e BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature** **319**: 774-776, 1986.
- MÜLLER, S. e LOHSE, M.J. The role of G-protein $\beta\gamma$ subunits in signal transduction. **Biochem. Soc. Trans.** **23**: 141-148, 1995.
- MUMBY, S.M. e MUNTZ, K.H. Receptorregulation of G protein palmitoylation. **Biochem. Soc. Trans.** **23**: 156-160, 1995.

- MURPHY, D.E., SCHNEIDER, J. BOEHM, C., LEHMANN, J. e WILLIAMS, M. Binding of [³H]3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid to rat brain membranes: A selective, high-affinity ligand for N-methyl-D-aspartate receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **240**:778-784, 1987.
- NAKAJIMA, Y., IWAKABE, H., AKAZAWA, C., NAWA, H., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N. e NAKANISHI, S. Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. **J. Biol. Chem.** **268**:11868-11873, 1993.
- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science** **258**: 597-603, 1992.
- NAKANISHI, S. e MASU, M. Molecular diversity of glutamate receptors and functions of glutamate receptors. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** **23**: 319-348, 1994.
- NEER, E.J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. **Cell** **80**: 249-257, 1995.
- NICOLETTI, F., VALERIO, M., PELLEGRINO, C., DRAGO, F., SCAPAGNINI, U. e CANONICO, P.I. Spatial learning potentiates the stimulation of phosphoinositide hydrolysis by excitatory amino acids in rat hippocampal slices. **J. Neurochem.** **51**:725-729, 1988.
- NICOLETTI, F., BRUNO, V., COPANI, A., CASABONA, G. e KNOPFEL, F. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? **Trends Neurosci.** **19**: 267-272, 1996.
- NURNBERG, B., GUDERMANN, T. e SCHULTZ, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. **J. Mol. Med.** **73**: 123-132, 1995.
- O'HARA, P.J., SCHEPPARD, P.O., THOGERSEN, H., VENEZIA, D., HALDEMAN, B.A., MCGRANE, V., HOUAMED, K.M., THOMSEN, C., GILBERT, T.L. e MULVIHILL, E.R. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial preplasmic binding proteins. **Neuron** **11**:41-52, 1993.
- OKAMOTO, N., HORI, S., AKAZAWA, C., HAYASHI, Y., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N. e NAKANISHI, S. Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. **J. Biol. Chem.** **269**:1231-1236, 1994.
- OTANI, S., MARSHALL, C.J., TATE, W.P., GODDARD, G.V. e ABRAHAM, W.C. Maintenance of long-term potentiation in rat dentate gyrus requires protein synthesis but not messenger RNA synthesis immediately post-tetanic stimulation. **Neurosci.** **28**: 519-526, 1989.

- PAAS, Y., DEVILLERS-THIÉRY, A., CHANGEUX, J.-P., MEDEVIELLE, F. e TEICHBERG, V.I. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. **EMBO J.** **15**: 1548-1556, 1996.
- PAZ, M.M., RAMOS, M., RAMÍREZ, G. e SOUZA, D. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. **FEBS Lett.** **355**: 205-208, 1994.
- PEROUTKA, J.J., LEOVITZ, R.M. e SNYDER, S.H. Serotonin receptor binding sites affected differentially by guanine nucleotides. **Mol. Pharmacol.** **16**: 700-708, 1979.
- PICKERING, D.S., THOMSEN, C., SUZDAK, P.D., FLETCHER, E.J., RODITAILLE, R., SALTER, M.W., MACDONALD, J.F., HUANG, X. e HAMPSON, D.R. A comparison of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositides turnover. **J. Neurochem.** **61**:85-92, 1993.
- PIN, J.-P., JOLY, C. HEINEMANN, S.F. e BOCKAERT, J. Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C coupled metabotropic glutamate receptor. **EMBO J.** **13**:342-348, 1994.
- PIN, J.-P. e BOCKAERT. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. **Curr. Opin. Neurobiol.** **5**:342-349, 1995.
- PIN, J.-P. e DUVOISIN, R. Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacol.** **34**:1-26, 1995.
- PREHN, J.H.M., LIPPERT, K. e KRIEGLSTEIN, J. Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? **Eur. J. Pharmacol.** **292**: 179-189, 1995.
- PRÉZEAU, L., CARETTE, J., HELPAP, B., CURRY, K., PINU, J.-P. e BOCKARERT, J. Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in several types of brain cells in primary cultures. **Mol. Pharmacol.** **45**: 570-577, 1994.
- RANSOM, R.W., e STEC, N.L. Cooperative modulation of [³H]-MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. **J. Neurochem.** **51**: 830-836, 1988.
- RASKOVSKY, S., AGUILAR, J.S., JERUSALINSKY, D. e DE ROBERTIS, E. An [³H]oxotremorine binding method reveals regulatory changes by guanine nucleotides in cholinergic muscarinic receptors of cerebral cortex. **Neurochem. Res.** **13**: 525-530, 1988.
- REYMANN, K.G. Mechanisms underlying long-term potentiation in the hippocampus: Focus on postsynaptic glutamate receptors and protein kinases. **Funct. Neurol.** **8**: 7-32, 1993.
- REYNOLDS, I.J., Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the N-methyl-D-aspartate receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **255**: 1001-1007, 1990.

- ROGAWSKY, M.A. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. **Trends Pharmacol. Sci.** **14**: 325-331, 1993.
- ROWLEY, M. e LEESON, P.D. Excitatory amino acid antagonists. **Curr. Opin. Ther. Pathol.** **2**: 1201-1221, 1992.
- SACAAN, A.I. MONN, J.A. e SCHOEPP, D.D. Intrastratial injection of a selective metabotropic excitatory amino acid receptor agonist induces contralateral turning in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **259**: 1366-1370, 1991.
- SACAAN, A.I., MONN, J.A. e SCHOEPP, D.D. Activation of hippocamal metabotropic excitatory amino acid receptors leads to seizures and neuronal damage. **Neurosci Lett.** **139**: 77-82, 1992.
- SAUGSTAD, J.A., KINZIE, J.M., MULVIHILL, E.R., SEGERSON, T.P. e WESTBROOK, G.L. Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-class of metabotropic glutamate receptors. **Mol. Pharmacol.** **45**:367-372, 1994.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundam. Clin. Pharmacol.** **7**: 389-400, 1993.
- SCATTON, B., FROST, J., GEORGE, P., CARTER, C. e BENAVIDES, J. Present developments in NMDA receptor antagonists against cerebral ischaemia. **Curr. Opin. Ther. Pathol.** **4**: 523-545, 1991.
- SCHOEPP, D.D. e CONN, P.J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. **Trends Pharmacol.** **14**:13-20, 1993.
- SCHOEPP, D.D., JOHNSON, B.G., e MON, M.A. Inhibition of cyclic formation by a selective metabotropic glutamate antagonist. **J. Neurochem.** **58**: 1184-1186, 1992.
- SCHOEPP, D.D., JOHNSON, B.G., SALHOFF, C.R., WRIGHT, R.A., GOLDSWORTH, J.S. e BAKER, R. Second-messenger responses in brain slices to elucidate novel glutamate receptors. **J. Neurosci. Methods** **59**: 105-110, 1995.
- SCHUTZ, W. e FREISSMUTH, M. Reverse intrinsic activity of antagonists on G protein-coupled receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** **13**: 376-380, 1992.
- SEEBURG, P.H. The TINS/TIPS lecture: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. **Trends Neurosci.** **16**: 359-365, 1993.
- SENOGLES, S.E., BENOVIC, I.L., AMLISKY, N., UNSON, C., MILLIGAN, G., VINITSKY, R., SPIEGEL, A.M. e CARON, M.G. The D₂-dopamine receptor of anterior pituitary is functionally associated with a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein. **J. Biol. Chem.** **262**: 4860-4867, 1987.

- SEREN, M.S., ALDINIO, C., ZANONI, R., LEON, A. e NICOLETTI, F. Stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by excitatory amino acids is enhanced in brain slices from vulnerable regions after transient global ischemia. **J. Neurochem.** **53**:1700-1705, 1989.
- SHEN, Y., SPECHT, S.M., GHISLAIN, I.S. e LI, R. The hippocampus: a biological model for studying learning and memory. **Progress Neurobiol.** **44**:485-496, 1994.
- SILVA, D.O., AHMAD, N.R.M., SOARES, I.C., KRAEMER, C.K., BUSS, S.O. e MELLO, C.F. Proteínas G: mecanismos moleculares de comunicação celular. **Ciência e Natura** **16**: 105-112, 1994.
- SMITH, K.E. e HOSS, W.P. Guanine nucleotides regulate [³H]substance P binding in rat small intestine. **Regul. Peptides** **11**: 275-285, 1985.
- SOUZA, D.O. e RAMIREZ, G. Effect of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J. Mol. Neurosci.** **3**: 39-45, 1991.
- SPIEGEL, A.M., SHENKER, A. e WEINSTEIN, L.S. Receptor-effector coupling by G proteins: Implications for normal and abnormal signal transduction. **Endocr. Rev.** **13**: 536-565, 1992.
- STEINBERG, G.K., YOON, E.J., KUNIS, D.M., SUN, G.H., MAIER, C.M. e GRANT, G.A. Neuroprotection by N-methyl-D-aspartate antagonists in focal ischemia is dependent on continued maintenance dosing. **Neurosci.** **64**: 99-107, 1995.
- STERNWEIS, P.C., The active role of $\beta\gamma$ in signal transduction. **Curr. Opin. Cell Biol.** **6**: 198-203, 1994.
- STEVENS, C.F. e WANG, Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haeme oxygenase. **Nature** **364**: 147-149, 1993.
- STEWART, G.R., ZORUMSKI, C.F., PRICE, M.T. e OLNEY, J.T. Domoic acid: a dementia-inducing excitotoxic food poison with kainic acid receptor specificity. **Exp. Neurol.** **110**: 127-138, 1990.
- STRADER, C.D., FONG, T.M., TOTA, M.R. e UNDERWOOD, D. Structure and function of G protein-coupled receptors. **Annu. Rev. Biochem.** **63**: 101-132, 1994.
- SUNYER, T., CODINA, J. e BIRNBAUMER, L. GTP hydrolysis by pure Ni, the inhibitory regulatory component of adenylyl cyclases. **J. Biol. Chem.** **259**: 15447-15451, 1984.
- SZUCS, M., SPAIN, J.W., OETTING, G.M., MOUDY, A.M. e COSEIA, C.J. Guanine nucleotide and cation regulation of μ , δ , and κ opioid receptor binding: evidence for differential postnatal development in rat brain. **J. Neurochem.** **48**: 1165-1170, 1987.
- TAMIR, A. e TOLKOVSKY, A.M. Transient states of adenylate cyclase in brain membranes. **J. Neurochem.** **44**: 1006-1013, 1985.

- TANABE, Y., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R. e NAKANISHI, S. A family of metabotropic glutamate receptors. **Neuron** **8**:169-179, 1992.
- TANABE, Y., NOMURA, A., MASU, M., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N. e NAKANISHI, S. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. **J. Neurosci.** **13**:1372-1378, 1993.
- TASCA, C.I., WOFCHUK, S.T., SOUZA, D.O., RAMÍREZ, G. e RODNIGHT, R. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. **NeuroReport** **6**: 249-252, 1995.
- TAVERNA, F.A., WANG, L.-Y., MACDONALD, J.F. e HAMPSON, D.R. A transmembrane model for an ionotropic glutamate receptor predicted on the basis of the location of asparagine-linked oligosaccharides. **J. Biol. Chem.** **269**: 14159-14164, 1994.
- TEICHBERG, V.I., MANO, I., PAPERNA, T. e PAAS, Y. The chick bergmann glia kainate binding protein: an update on function. **J. Neurochem.** **61**: (suppl) S60D, 1993.
- TIZZANO, J.P., GRIFFEY, K.I., JOHNSON, J.A., FIX, S.A., HELTON, D.R. e SCHOEPP, D.D. Intracerebral 1S,3R-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R-ACPD) produces limbic seizures that are not blocked by ionotropic glutamate receptor antagonists. **Neurosci. Lett.** **162**: 12-16, 1993.
- TIZZANO, J.P., GRIFFEY, K.I. e SCHOEPP, D.D. Receptor subtypes linked to metabotropic glutamate receptor agonist-mediated limbic seizures in mice. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **765**: 230-235, 1995.
- TROMBLEY, P.Q. e WESTBROOK, G.L. L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. **J. Neurosci.** **12**: 2043-2050, 1992.
- VERDOORN, T.A. BURNASHEV, N., MONYER, H., SEEBURG, P.H. e SAKMANN, B. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. **Science** **252**: 1715-1718, 1991.
- VYKLIČKY, L.JR., KRUSEK, J. e EDWARDS, C. Differences in the pore size of the N-methyl-D-aspartate and kainate cation channels. **Neurosci. Lett.** **89**: 313-318, 1988.
- WATKINS, J. e COLLINGRIDGE, G. Phenylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors. **Trends Neurosci.** **15**:333-342, 1994.
- WESTBROOK, G.L. Glutamate receptor update. **Curr. Opin. Neurobiol.** **4**: 337-346, 1994.
- WIDDOWSON, P.S. e HALARIS, A.E. A comparison of the binding of [³H]propionyl-neuropeptide Y to rat and human frontal cortical membranes. **J. Neurochem.** **55**: 956-962, 1990.

- WILLARD, J.M. ZIEGRA, C.J. e OSWALD, R.E. The interaction of a kainate receptor from goldfish brain with a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein. **J. Biol. Chem.** **266**:10196-10200, 1991.
- YAMADA, N., AKIYAMA, K. e ITSUKI, S. Hippocampal kindling enhances excitatory amino acid receptor-mediated polyphosphoinositide hydrolysis in the hippocampus and amygdala-pyriform cortex. **Brain Res.** **490**:126-132, 1989.
- ZHENG, F. e GALLAGHER, J.P. Metabotropic glutamate receptors are required for the induction of long term potentiation. **Neuron** **9**: 163-172, 1992.
- ZHONG, Y e WU, C.-F. Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. **Science** **251**: 198-201, 1991.
- ZHUO, M., HU, Y., SCHULTZ, C., KANDEL, E.R e HAWKINS, R.D. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. **Nature** **368**: 635-639, 1994.
- ZIMMERMAN, H. Signaling via ATP in the nervous systems. **Trends Neurosci.** **17**: 420-426, 1994.