

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Gabrielle do Amaral e Silva Müller

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO HIPOCAMPO DE  
CAMUNDONGO SUBMETIDO AO TRATAMENTO COM  
N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA) PARA INDUÇÃO DE  
PRÉ-CONDICIONAMENTO QUÍMICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Cardoso Severino.

Co-orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi.

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

M958a Müller, Gabrielle do Amaral e Silva  
Análise proteômica do hipocampo de camundongos submetidos  
ao tratamento com N-metil-D-aspartato (NMDA) para indução de  
pré-condicionamento químico [dissertação] / Gabrielle do  
Amaral e Silva Muller ; orientadora, Patricia Cardoso  
Severino. - Florianópolis, SC, 2012.

88 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Proteínas - Análise. 3. Espectrometria  
de massa. 4. Hipocampo (Cérebro). I. Leal, Rodrigo Bainy.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

Dedico esta dissertação à pessoa mais importante da minha vida: à minha mãe, Josiane do Amaral e Silva Müller. Sua presença em minha vida foi decisiva para a realização deste trabalho.

Esta conquista também é sua.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Patricia Cardoso Severino, obrigada por ter confiado a mim o projeto e pela paciência em passar seus conhecimentos científicos. Sua disponibilidade, apoio e orientação foram muito importantes para eu seguir em frente durante estes dois anos.

Ao professor Hernán Terenzi por ter me aceitado no laboratório em 2009 sem me conhecer e pela oportunidade de desenvolver pesquisa em um laboratório com tamanha infra-estrutura e por ter me proporcionado uma nova área de estudo.

À professora Carla Tasca pelas ideias iniciais do projeto e pelos conhecimentos passados na realização deste trabalho. Ao seu laboratório Neuroquímica IV, especialmente ao doutorando Samuel Vandressen-Filho pelo tratamento dos animais.

Ao prof. Dr Javier Vernal por ser um pesquisador exemplar: disciplinado e inteligente. Agradeço pelo apoio, alegria, conselhos e bom humor muito bem-vindos em momentos difíceis.

Aos colegas de laboratório do Centro de Biologia Estrutural Molecular (CEBIME): Angela, Angélica, Cami, Carol, Deise, Gisa, Guilherme, Jean, Louise, Ricardo, Pri, Patizinha, Tiago e Vanessa. Gostaria de agradecer e enaltecer a participação de cada um de vocês no dia-a-dia do laboratório, pelas risadas, convivência e bons momentos durante todos esses anos. Um agradecimento todo especial a Angélica com a qual aprendi, mas, sobretudo passei bons momentos de risadas e conversas animadas que com certeza deixaram meus dias mais leves e alegres.

Gostaria de enfatizar ainda a colaboração da dupla Carolina T. Botelho e Angela C. Menegatti por passarem seus conhecimentos, experiências e dicas sobre proteômica. Obrigada por sanarem minhas dúvidas com muita boa vontade mesmo com o desenvolvimento de seus projetos.

Um agradecimento particular a Priscila G. Martins por ter compartilhado parte de seu projeto de mestrado comigo, onde dividimos conhecimentos, bancada e discussões.

Muito obrigada à “Prof<sup>a</sup>. Pasquale” Camila Matiollo com suas correções muito bem colocadas da língua portuguesa.

À minha mãe, minha ouvinte, minha conselheira, minha protetora, minha paz, minha luz por suportar minhas tristezas doando-me todo o carinho e atenção. Obrigada por suportar meus momentos difíceis de mau-humor e dúvidas. Tentou de todas as maneiras deixar

nosso cotidiano mais leve, esperando-me em casa com muito carinho. Agradeço pela educação que você me passou e principalmente por ter-me servido de inspiração no meu caminho. Muito obrigada pela sua preocupação, doação e participação em todos os momentos da minha vida. Agradeço muito por sua paciência, seu conforto e todo o seu amor.

À minha Vó Dirce juntamente com minha tia Joci pelas orações e preocupações durante minha caminhada. Obrigada por estarem sempre disponíveis a ouvir e dar conselhos, e também por sempre nos receber em sua casa com muito amor e comilanças.

Gostaria ainda de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante esses dois anos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao INBEB-CNPq, MCT/FINEP, GENOPROT, FAPESC, que financiaram a aquisição e montagem do laboratório para de espectrometria de massa no CEBIME.

À Deus, meu guia em todos os momentos.

"A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)





## RESUMO

O pré-condicionamento induzido por N-metil-D-aspartato (NMDA) é uma poderosa ferramenta terapêutica contra insultos neuronais posteriores, por diversas razões: administração periférica, interação específica com receptores NMDA (NMDAR) e pelo quadro de neuroproteção gerado. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na geração do pré-condicionamento por NMDA no cérebro. A descoberta do mecanismo de sinalização celular gerado é crucial para delinear novas abordagens neuroprotetoras. Por essa razão, o objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis mecanismos envolvidos no pré-condicionamento por NMDA utilizando uma abordagem proteômica para identificar proteínas expressas entre os camundongos pré-condicionados após 24h de administração de NMDA e após 1h e 72h de indução com NMDA (não protegidos). Ao grupo controle foi administrado solução salina (0,9% NaCl) e os demais grupos foram sacrificados após 1 hora, 24 horas ou 72 horas de administração com N-metil-D-aspartato (NMDA, 75mg/Kg de animal). O hipocampo de cada animal foi removido para extração das proteínas totais. Foram aplicados 250 mg / mL de proteína para análise em gel bidimensional (pI linear 3-10, gel SDS-PAGE 12,5%). Em seguida, os géis 2-DE foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250* e analisados no programa Image Master 7.0 Platinum. A média de intensidade dos *spots* foram analisados (dados em % volume) entre os diferentes tempos de indução (1h, 24h e 72h). Foram encontradas seis proteínas com expressão diferencial significativa com  $p < 0,05$  com base em ANOVA duas vias e Bonferroni pós-teste, sendo que quatro proteínas indicaram níveis de expressão elevada em 24h (proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70), creatina cinase, aspatil-tRNA sintetase e proteína de ligação a fosfatidiletanolamina) e duas mostraram expressão diminuída (proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) e a proteína vacuolar V-ATPase). Além disso, a identificação e caracterização por espectrometria de massa (MALDI-TOF) de 22 proteínas não alteradas mostrou-se útil, uma vez que essas proteínas desempenham funções celulares cruciais e também são necessárias para a geração da neuroproteção, entre essas se destacaram duas proteínas detectadas somente nos animais protegidos após 24h de administração com NMDA: subunidades alfa e beta da proteína de choque térmico 90 kDa (HSP90) e uma subunidade de HSP70. Todos esses resultados indicam que são necessárias diversas vias intracelulares associadas para mediar o pré-condicionamento e a neuroproteção. A identificação das

proteínas relacionadas ao pré-condicionamento podem ajudar a elucidar os mecanismos celulares e moleculares de prevenção bem como na descoberta de novos alvos terapêutico por meio da determinação de uma janela de tempo mais efetiva nos tratamentos.

**Palavras-chave:** Proteoma, pré-condicionamento por NDMA, hipocampo.

## ABSTRACT

The preconditioning induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) is a powerful therapeutic tool against later neuronal insults for several reasons: non-invasive administration, specific interaction with NMDA receptors (NMDAR) and created the framework for neuroprotection. However, little is known about the molecular mechanisms involved in the generation of pre-conditioning by NMDA in the brain. The discovery of cell signaling mechanisms is crucial to delineate new neuroprotective approaches. For this reason, the aim of this study was to investigate the putative mechanisms involved in NMDA preconditioning-induced using a proteomics approach to identify proteins expressed between preconditioned mice 24 hours after NMDA administration and 1 h and 72 h after NMDA administration (non-preconditioned). In the control group it was injected saline solution (0,9% NaCl) the other groups of animals were sacrificed 1 hour, 24 hours or 72 hours after NMDA (75 mg/Kg de animal) administration. The hippocampus of each animal was removed and the total protein extracted. It was submitted 250 mg / mL of protein to two-dimensional gel analysis (pI 3-10 linear, gel SDS-PAGE 12.5%). After, gels were stained with *Coomassie Brilliant Blue G-250* (G250) and analyzed in Image Master 7.0 Platinum. The intensity average of *spots* (data in % volume) was analyzed between different time induction (1h, 24h and 72h). It was found six proteins with differential expression ( $p < 0.05$ ) based on two-way ANOVA and Bonferroni post-test, four protein were found super-expressed in 24h (heat shock protein 70 kDa (HSP70), creatine kinase, aspartyl-tRNA synthetase and phosphatidylethanolamine binding protein) and two was found decreased expression (heat shock protein 70 kDa and protein vacuolar V-ATPase). In addition, the identification and characterization by mass spectrometry (MALDI-TOF) of 22 non-altered proteins was useful due to these proteins have crucial cell functions and they are also necessary to achieved neuroprotection, two of them were detected only in protected animals after 24h of NMDA administration: heat shock protein 90 kDa (HSP90) subunit alpha and beta and a subunit of HSP70. These results indicate that diverse intracellular pathways act together to mediate the preconditioning and neuroprotection. The identification of proteins related to pre-conditioning can help to elucidate the cellular and molecular mechanisms of prevention as well as the discovery of new therapeutic targets and determinate the time window for more effective treatments.

**Key Word:** Proteome, NMDA preconditioning, hippocampus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - A sinalização sináptica do glutamato.....	24
<b>Figura 2</b> - Modelo do receptor NMDA composto pelas subunidades NR1 e NR2 e seus respectivos ligantes.....	26
<b>Figura 3</b> - Localização dinâmica dos receptores NMDA da área CA1 no hipocampo em ratos visualizada pela técnica de imunoeletromicrografia.....	28
<b>Figura 4</b> – Estrutura molecular do N-metil-D-aspartato (NMDA) e do ácido glutâmico ou glutamato, respectivamente.....	32
<b>Figura 5</b> - A) Clivagem das pontes dissulfeto pelo reagente DTT; B) Ação da iodoacetamida durante a carbamidometilação dos resíduos de cisteína.....	38
<b>Figura 6</b> - Monômeros ácidos e básicos usados para a fabricação dos gradientes de pH mobilizados em fitas - IPGstrips.....	39
<b>Figura 7</b> - Fluxograma das principais etapas experimentais.....	43
<b>Figura 8</b> - Gel de poliacrilamida 10% com a separação das proteínas oriundas de seis extrações (amostras I a VI) e solubilizadas com tampão de lise.....	51
<b>Figura 9</b> - Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo controle.....	53
<b>Figura 10</b> - Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo 1h após administração com NMDA.....	54
<b>Figura 11</b> - Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo 24h após administração com NMDA.....	55
<b>Figura 12</b> - Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo 72h após administração com NMDA.....	56
<b>Figura 13</b> - Gráfico de dispersão (% vol x% vol) entre as réplicas de 2-DE gel de proteínas.....	58

- Figura 14** - Ampliação da região do gel com destaque aos seis spots encontrados com expressão diferencial  $p < 0,05$ .....59
- Figura 15** – Histograma de cada spot representando a média de intensidade (em % de volume) e desvios-padrão das triplicatas.....60
- Figura 16** - Proteínas diferenciais identificadas por espectrometria de massa.....61
- Figura 17** - Variação da expressão das seis proteínas de acordo com o tempo de administração com NMDA (1h, 24h e 72h).....62
- Figura 18** - Gel 2-DE da fração proteica de hipocampo (gel referência) destacando as 28 proteínas identificadas e caracterizadas por MALDI-TOF.....63
- Figura 19** - Ampliação da região do gel contendo spots exclusivos em 24h localizados pelo programa Image Master.....67
- Figura 20** - Modelo de interação entre proteínas identificadas durante o pré-condicionamento.....78

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Relação das concentrações de proteínas obtidas no processo de extração para cada hipocampo.....50
- Tabela 2** - Valores de slope e  $R^2$  de cada grupo obtidos para avaliar a repetibilidade entre as replicatas de géis de cada tratamento.....59
- Tabela 3** – Relação das proteínas identificadas por MALDI-TOF.....65





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE	Eletroforese em gel bidimensional (Two-dimensional gel electrophoresis)
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína cinase B
AMPA	Alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato
AQ	Ácido quinolínico
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Célula-B de linfoma tipo 2
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Soro albumina bovina
CA1	Cornus Ammonis área 1
CAMII	Proteína Cinase dependente de Cálcio-calmodulina II
GBB G-250	Coomassie Brilliant Blue G-250
CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato)
CPT	8-ciclopentil-1, 3, dimetilxantina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EAATS	Transportador de aminoácidos excitatórios
ER	Retículo endoplasmático
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
FOXO	Fatores de transcrições Forkhead Box subgrupo O
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLAST/EAAT1	Transporte de glutamato e aspartato
GLT/EAAT2	Transporte de glutamato
GLUP2	Glutamato desidrogenase-2
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSK3	Glicogênio sintase cinase-3
GST	Glutaciona S- transferase
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4 hidroxicinâmicos
HCNP	Peptídeo estimulador do nervo colinérgico
HSP	Proteína de choque térmico
HSP70	Proteína de choque térmico 70kDa
HSP90	Proteína de choque térmico 90kDa
HUPO	Organização do proteoma humano cerebral
IAA	Iodoacetamida

IEF	Focalização isoeletrica
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
IPG	Gradiente de pH imobilizado ( <i>Immobilized pH Gradient</i> )
KA	Kainato
MALDI	Ionização/desorção por laser assistida por Matriz ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
MALDI-TOF	Ionização/desorção por laser assistida por Matriz – tempo de vôo ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight</i> )
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCA	Oclusão da artéria média cerebral
mGluRs	Receptores metabotrópicos
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor NMDA
NO	Óxido nítrico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PSD	Densidade pós-sináptica
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA <sub>t</sub>	Ácido ribonucléico transportador
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrilamide Gel</i> )
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TrkB	Tirosina cinase B
V-ATPase	Proteína vacuolar relacionada ao transporte de prótons.
V-GLUT	Vesícula transportadora de glutamato

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	21
1.2 RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA).....	25
1.3 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA.....	28
1.4PRÉ-CONDICIONAMENTO E NEUROPROTEÇÃO INDUZIDOS POR NMDA.....	30
1.5ANÁLISE PROTEÔMICA.....	35
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1TRATAMENTO DOS ANIMAIS E EXTRAÇÃO DO HIPOCAMPO.....	43
3.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE HIPOCAMPO.....	44
3.3 REIDRATAÇÃO DAS FITAS DE IEF.....	45
3.4 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) E GEL BIDIMENSIONAL (2-DE).....	45
3.5 ANÁLISE DA IMAGEM DO GEL E APLICAÇÃO DE TESTE ESTATÍSTICO.....	46
3.6 DIGESTÃO <i>IN GEL</i> , ESPECTROMETRIA DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	47
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	49
4.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE HIPOCAMPO...	50
4.3FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) E GEL BIDIMENSIONAL (2-DE).....	51
4.4PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DURANTE O PRÉ-CONDICIONAMENTO.....	59
4.5IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	62
<b>5. DISCUSSÃO</b>	
5.1ALTERAÇÃO DA RESPOSTA DE CHOQUE TÉRMICO PELAS PROTEÍNAS HSPS.....	67
5.2REDUÇÃO DE GLUTAMATO INTRACELULAR PELA PROTEÍNA VACUOLAR ATPASE.....	69
5.3 INIBIÇÃO DA TRANSDUÇÃO DE SINAL (VIA MAPK/ERK) PELA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A FOSFATIDILETALOAMINA.....	70

5.4 AUMENTO DA CREATINA CINASE AUXILIA A MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA.....	71
5.5AUMENTO DA SÍNTESE PROTÉICA COM A PARTICIPAÇÃO DA ASPARTIL-TRNA SINTETASE...	72
5.6 MODELO PROPOSTO DE INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DURANTE O PRÉ-CONDICIONAMENTO.....	73
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O funcionamento preciso do sistema nervoso depende do estabelecimento das conexões entre os neurônios e células-alvo específicas por meio das sinapses. Essa comunicação é feita por neurotransmissores, localizados em neurônios pré-sinápticos, que quando liberados na fenda sináptica interagem com neurônios pós-sinápticos. Para a liberação de neurotransmissores faz-se necessário um estímulo, isto é, um potencial de ação que se propaga através da membrana pré-sináptica rica em canais de cálcio sensíveis à voltagem, permitindo a entrada de cálcio na terminação nervosa (KOLB, 2002). Na face citosólica, o cálcio se liga a calmodulina formando um complexo que participa na liberação de neurotransmissores armazenados em vesículas. Na fenda sináptica o neurotransmissor se liga a receptores localizados na membrana pós-sináptica, que pode agir de duas formas: despolarizando a membrana pós-sináptica e assim tendo uma resposta excitatória sobre a célula ou ainda por meio da hiperpolarização da membrana pós-sináptica, neste caso, exercendo uma ação inibitória sobre a célula (KOLB, 2002; NELSON, 2005; RIVERA-CERVANTES et al., 2009). Em seguida, o neurotransmissor é removido rapidamente da fenda sináptica podendo ser difundido para fora da fenda, degradado por enzimas ali presentes ou retornando novamente ao neurônio pré-sináptico (KOLB, 2002).

No século passado, na década de 20, Otto Loewi descobriu que compostos químicos excitatórios e inibitórios comandavam a frequência cardíaca, e muitos pesquisadores acreditavam que o cérebro deveria, em grande parte, funcionar da mesma maneira. Hoje, estima-se que exista mais de 100 neurotransmissores que controlam todas as complexas atividades de um mamífero e apesar da grande variedade de sinapses, a mensagem transmitida é binária: excitatória e inibitória. Os primeiros neurotransmissores a serem identificados foram acetilcolina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). Estes são constituídos de pequenas moléculas, rapidamente sintetizados e muitos deles provêm da alimentação, portanto, a dieta pode alterar sua atividade (KOLB, 2002).

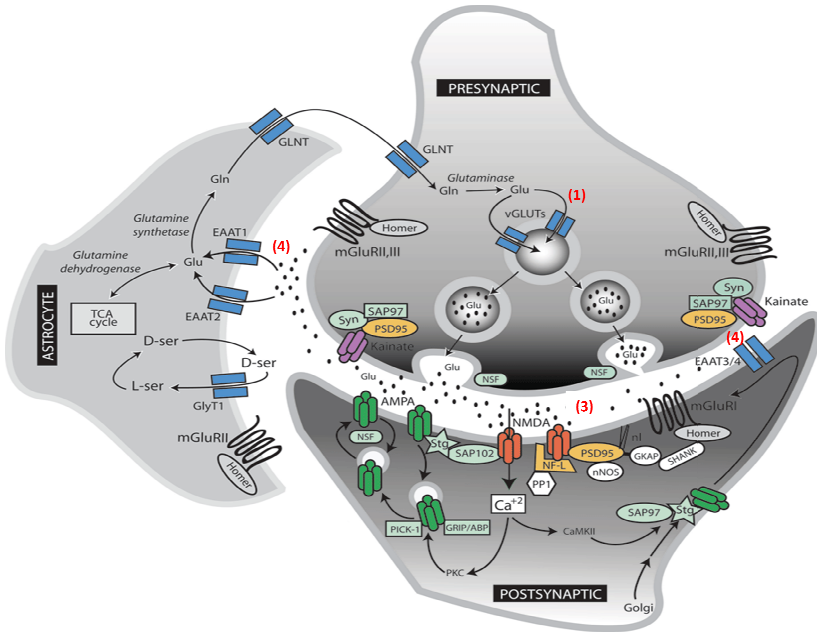
O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos (BOECK et al., 2004; BOECK et al., 2005; FEATHERSTONE, 2009; RIVERA-CERVANTES et al., 2009) principalmente em regiões como o pró-encéfalo e no cerebelo, seguido pelo GABA (formado por uma modificação simples do

glutamato) com função inibitória. A biossíntese de glutamato ocorre principalmente por meio da transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato. Assim, em alta demanda energética é possível desviar o  $\alpha$ -cetoglutarato do ciclo do ácido cítrico por meio da doação de um grupo amino oriundo de um aminoácido (leucina, isoleucina, valina ou aspartato), formando o glutamato. As formas  $\alpha$ -cetoglutarato e glutamato estão em constante equilíbrio, sendo continuamente reconvertidos (Alanina +  $\alpha$ -cetoglutarato  $\rightarrow$  piruvato + glutamato) pela enzima glutamato desidrogenase- 2 (GLUP2), que é regulada pela relação ATP/ADP, essa relação alta conduz a formação de glutamato. Após sintetizado, o glutamato é acumulado em vesículas sinápticas por meio da ação de proteínas vesiculares transportadoras de glutamato (VGLUTs) (FEATHERSTONE, 2009). Os VGLUTs são complexos de proteínas multiméricas próton/glutamato antiporte, que acumulam prótons ( $H^+$ ) no lúmen da vesícula com gasto de ATP (ATPase  $H^+$  dependente). Este gradiente é a principal força de acúmulo de glutamato, no qual prótons são dirigidos para fora da vesícula enquanto glutamato é bombeado para seu interior (NELSON, 2005). Dessa maneira, variações citosólicas do  $Ca^{+2}$  permitem que as vesículas sinápticas fuscionem-se à membrana plasmática, liberando o glutamato no meio extracelular (FEATHERSTONE, 2009).

Após liberado na fenda sináptica o glutamato pode se unir a diversos receptores, em uma região denominada densidade pós-sináptica (PSD). O seu efeito excitatório é mediado por receptores ionotrópicos (iGluRs) como N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA), alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato (AMPA) e receptores metabotrópicos (mGluRs) (AHMADIAN et al., 2004; GRAZIOSO et al., 2005). Os receptores ionotrópicos possuem duas partes: um local de união ao neurotransmissor e um poro ou canal. A união do neurotransmissor muda a conformação do canal, abrindo-o, o que permite o fluxo de íons através dele, dessa maneira, produzem alterações muito rápidas no potencial de membrana. Os receptores metabotrópicos, por outro lado, agem de maneira indireta nos canais iônicos adjacentes, pois, possuem somente a porção de união ao neurotransmissor. Geralmente, esse tipo de neurotransmissor está associado a proteínas de ligação à nucleotídeos de guanina (ou proteínas G) que ativam segundos mensageiros que por fim podem alterar a permeabilidade de íons na membrana plasmática (KOLB, 2002; FEATHERSTONE, 2009). O restante de glutamato que permanece na fenda sináptica é absorvido pelos astrócitos por meio de proteínas de membrana conhecidas como transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATS), cessando sua

atividade na fenda sináptica. Há cinco tipos de EAATS que diferem com relação à função e localização: transporte de glutamato-aspartato (GLAST-1/EAAT1), transporte de glutamato (GLT/EAAT2) expressos em células gliais, transporte de aminoácidos excitatórios carregados (EAAC/EAAT3) e transporte de aminoácidos excitatórios (EAAT4 e EAAT5), sendo que o EAAT4 é expresso preferencialmente em neurônios e EAAT5 expresso na retina. Nos astrócitos, o glutamato reage com a amônia e forma a glutamina através da glutamina sintetase. Em seguida, a glutamina é exportada ao espaço intercelular e absorvida pelos neurônios, onde é convertida novamente em glutamato pela glutaminase, enzima mitocondrial cerebral. O tráfego de glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos é chamado de ciclo da glutamina e é responsável por 40% do *turnover* de glutamato (FEATHERSTONE, 2009).

A sinalização sináptica do glutamato pode ser resumida nas seguintes etapas em destaque na Figura 1: (1) O glutamato é sintetizado no citoplasma de neurônios glutamatérgicos e bombeado para vesículas sinápticas. Em seguida, quando essas vesículas se fundem com a membrana plasmática o glutamato é liberado para o espaço extracelular; (2) Neste momento há um aumento transitório da concentração de glutamato na fenda sináptica; (3) Este aumento transitório de glutamato é detectado e traduzido por receptores glutamatérgicos; (4) O glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica por meio de EAATs localizados em astrócitos (FEATHERSTONE, 2009).



**Figura 1. A sinalização sináptica do glutamato pode ser resumida nas seguintes etapas:** (1) O glutamato sintetizado no citoplasma de neurônios pré-sinápticos e bombeado para vesículas sinápticas por meio de proteínas de membrana V-GLUTs. Em seguida, quando essas vesículas se fundem com a membrana plasmática o glutamato é liberado para o espaço extracelular; (2) Neste momento há uma aumento transitório da concentração de glutamato na fenda sináptica; (3) Aumento transitório de glutamato é detectado e transduzido por receptores glutamatérgicos (NMDA, GABA, Kainato); (4) O glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica por meio de EAATs localizados nos astrócitos. É possível observar também o *turnover* de glutamato nos astrócitos, o qual é novamente liberado para o espaço extracelular e recaptado pelos neurônios (FEATHERSTONE, 2009).



## 1.2 RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA)

Diversos estudos sugerem que os receptores de glutamato, especialmente o receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) desempenham um papel crucial no desenvolvimento (SNC), na sobrevivência neuronal, na estrutura de axônios e dendritos, na plasticidade sináptica e na sinaptogênese. Além disso, esses receptores estão implicados no aprendizado e na memória (RIVA et al., 1997; BEAS-ZÁRATE et al., 2001; GIELEN et al., 2009).

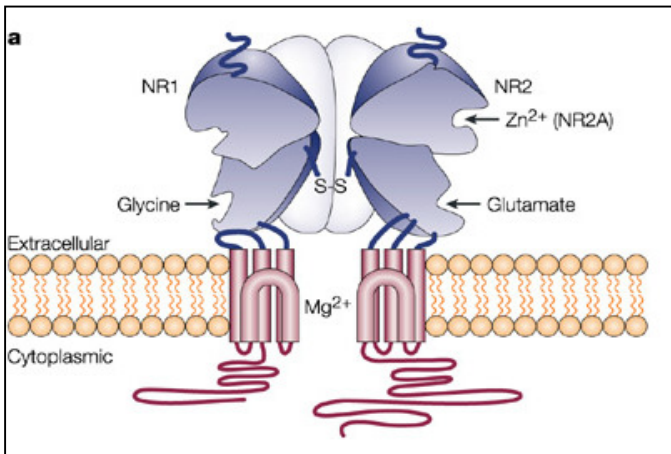
O papel do receptor NMDA na sobrevivência de muitos tipos de células neuronais e a atividade sináptica do receptor NMDA está bem caracterizada (IKONOMIDOU; TURSKI, 2002; HARDINGHAM; BADING, 2003);(HARDINGHAM; BADING, 2010). A eliminação da atividade do receptor NMDA *in vivo* pode provocar a morte e agravar a neurodegeneração em curso no SNC em adultos (IKONOMIDOU, 1999; OLNEY et al., 2002; ADAMS; DE RIVERO VACCARI; CORRIVEAU, 2004). O bloqueio da atividade do receptor NMDA *in vitro* também agrava a neurodegeneração em curso (PAPADIA et al., 2005; HARDINGHAM; BADING, 2010).

Os receptores de glutamato possuem uma composição heterodimérica, formado pelas subunidades NR1, NR2 e NR3, sendo que cada subunidade possui diferentes isoformas. A subunidade NR1 é expressa em oito isoformas, enquanto a NR2 em quatro (NR2A-D), nesse caso, codificadas por quatro genes diferentes. Esta composição variável, responsável pela heterogeneidade de receptores NMDA possivelmente determina as propriedades farmacológicas desse receptor no SNC (BEAS-ZÁRATE et al., 2001; GIELEN et al., 2009) e pode explicar as mudanças na composição ao longo do desenvolvimento pós-natal.

Um receptor NMDA precisa ter combinadas as subunidades NR1 com a NR2 (A ou B) ou NR3 (MONYER et al., 1992; GIELEN et al., 2009). Os receptores NR2A e NR2B contêm uma porção longa carbóxi-terminal na face citosólica, bem como, um motivo de ligação proteína-proteína - PDZ, que aparentemente, desempenha um papel crítico no direcionamento e estabilização de sítios de ligação na sinapse. Em contrapartida, o NR1 é bem menor e sem o motivo PDZ (BARRIA; MALINOW, 2002; SCOTT; BLANPIED; EHLERS, 2003). Funcionalmente, o NR1 é essencial para a estrutura do receptor, ao passo que, o NR2 determina suas propriedades farmacológicas e funcionais (SCOTT; BLANPIED; EHLERS, 2003; WAXMAN; LYNCH, 2005).

Estruturalmente, o receptor NMDA é o único receptor ionotrópico que requer dois ligantes nos seus sítios de ligação (co-

ligantes), representados na Figura 2 um para glicina ou serina e outro de glutamato, localizados em subunidades NR1 e NR2, respectivamente (GRAZIOSO et al., 2005; FEATHERSTONE, 2009). A ligação da glicina aos sítios da subunidade NR1 induz à ligação do glutamato a subunidade NR2 (GRAZIOSO et al., 2005). Além disso, este receptor é altamente dependente de voltagem: em estado potencial de repouso, o canal encontra-se bloqueado por  $Mg^{2+}$  (WOLLMUTH et al., 1998) e a remoção do  $Mg^{2+}$  só ocorre quando a membrana fica despolarizada. O receptor pode ainda, ser positivamente regulado por meio da fosforilação e por poliaminas (FEATHERSTONE, 2009).

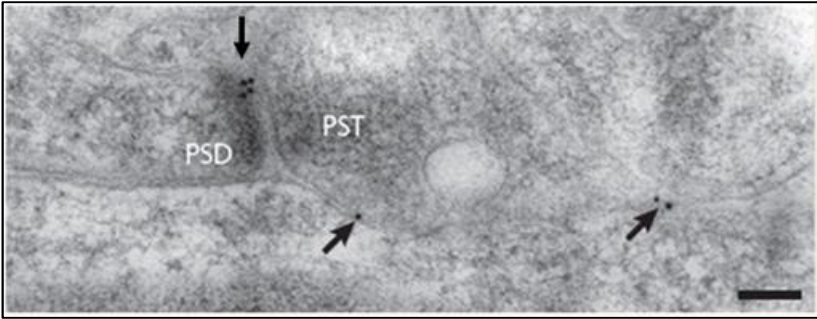


**Figura 2. Modelo do receptor NMDA composto pelas subunidades NR1 e NR2 e seus respectivos ligantes.** O canal iônico é bloqueado por magnésio de forma voltagem-dependente. A ligação de glutamato e glicina resultam em uma modificação estrutural do receptor e remoção do  $Mg^{+2}$ , com conseqüente abertura do canal, o que permite a passagem do cálcio para o meio intracelular (WITT; MACDONALD; KIRKPATRICK, 2004).

As diferentes subunidades do NMDAR diferem em suas propriedades cinéticas, sensibilidade aos ligantes, permeabilidade a íons divalentes e interações com proteínas na face intracelular. As subunidades NR2A e NR2B estão ligadas a diferentes cascatas intracelulares, além de estarem relacionadas com condições patológicas específicas. Dessa maneira, a expressão de algumas subunidades ocorre

em certas condições fisiopatológicas e por isso podem estar diretamente relacionada com a excitotoxicidade glutamatérgica (RIVERA-CERVANTES et al., 2009). Os principais quadros patológicos relacionados com a excitotoxicidade glutamatérgica são: dor crônica (GIELEN et al., 2009) hipóxia ou isquemia, choque hipoglicêmico, epilepsia, enfermidades neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (BEAS-ZÁRATE et al., 2001), Parkinson (GRAZIOSO et al., 2005; NOH; LEE; CHUNG, 2009); RIVA et al., 1997) e disfunções psiquiátricas como esquizofrenia (RIVA et al., 1997; GIELEN et al., 2009);(RIVERA-CERVANTES et al., 2009).

Além da diversidade da composição das subunidades do receptor, os NMDARs possuem uma localização dinâmica. Técnicas de imuno-histoquímica e eletrofisiologia mapearam a presença de receptores em diversos locais, denominadas regiões perisinápticas e regiões extra-sinápticas descritos na Figura 3. Em indivíduos jovens, o NMDAR extra-sináptico representa até três quartos de todos os NMDARs e os perisinápticos aumentam com o desenvolvimento tornando-se maioria na vida adulta em regiões hipocâmpais. Além disso, acredita-se que a localização dos receptores está diretamente ligada à complexidade das respostas mediadas pelos mesmos. A função fisiológica dos receptores extra-sinápticos parece estar envolvida com respostas patológicas, ao contrário das respostas de sobrevivência neuronal promovida pelos receptores NMDA localizados em regiões sinápticas. Supõe-se que ativação de vias “downstream” são completamente diferentes para cada tipo de receptor NMDA. O influxo de cálcio em regiões sinápticas além de serem mais toleradas pelos neurônios hipocâmpais também ativam genes relacionados a resistência contra apoptose e ao stress oxidativo. Por outro lado, o influxo de cálcio pelos receptores extra-sinápticos gera disfunção mitocondrial e morte celular. Entretanto, deve-se avaliar que na prática muito provavelmente ocorra a ativação de ambos, sendo que o balanço entre eles é que irá definir qual o tipo de resposta que irá prevalecer (HARDINGHAM; BADING, 2010).



**Figura 3. Localização dinâmica dos receptores NMDA da área CA1 no hipocampo em ratos visualizada pela técnica de imunoeletromicrografia.** Em destaque estão as regiões com densidade pós-sináptica (PSD) e o terminal pré-sináptico (PST). As setas inferiores indicam os receptores NMDA extra-sinápticos localizados em diversas regiões do corpo celular. A seta acima indica a localização dos receptores de NMDA sinápticos próximo a fenda sináptica (Adaptado de (HARDINGHAM; BADING, 2010).

### 1.3 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

A neurotoxicidade do glutamato foi relatada pela primeira vez há 50 anos quando neurônios da retina foram expostos à injeções de glutamato capaz de destruir as camadas internas da retina de camundongo (KARLSEN; FONNUM, 1976). Mais tarde (1969), John W. Olney mostrou que a toxicidade do glutamato não se restringia a retina e sugeriu-se o termo excitotoxicidade para indicar toxicidade por aminoácidos excitatórios (OLNEY, 1969). Posteriormente, Choi e colaboradores (1987), demonstraram que a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  era um importante mediador de excitotoxicidade do glutamato e que os receptores de NMDA eram os principais canais de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (CHOI, 1987). Assim, excitotoxicidade refere-se ao processo no qual as células nervosas respondem inapropriadamente a concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica e que culmina na morte celular (LYNCH; GUTTMANN, 2002).

Grande parte do processo de excitotoxicidade ocorre devido à taxa metabólica especial do cérebro, como a armazenagem limitada de energia e a crítica dependência de glicose. Devido a essa característica, o cérebro exibe uma vulnerabilidade a danos isquêmicos maior que outros tecidos. Quando ocorrem estados de hipóxia ou isquemia, os níveis de

ATP caem, em seguida ocorre o desequilíbrio das bombas de  $K^+/Na^+$  que despolarizam a membrana celular, assim, ocorre o influxo de  $Ca^{2+}$ . A entrada de cálcio faz com que as vesículas de neurotransmissores sejam liberadas no meio extracelular, contendo principalmente o glutamato, e também, ativando uma cascata de reações que culmina na morte celular programada (SIEGEL, 2006).

Para retirar o excesso de glutamato secretado no meio extracelular, diversos receptores são ativados como NMDA, AMPA e kainato (BOECK et al., 2005; CORASANITI et al., 2007). Estudos *in vitro* mostram que a morte neuronal é causada principalmente pelo excesso de ativação de receptores de NMDA em regiões hipocâmpais, isso porque esse receptor medeia a entrada de cálcio mais rapidamente que outros receptores. O excesso de cálcio, ativa diversas enzimas do catabolismo como fosfolipases, proteases e endonucleases bem como cinases, que provocam desregulação metabólica e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Diversas proteínas cálcio-dependentes são ativadas: (i) a protease cálcio-dependente Calpain I é ativada nos estágios iniciais e faz a desestabilização do citoesqueleto; (ii) endonucleases também são ativadas por cálcio e geram a fragmentação do DNA; (iii) as cinases dependentes de cálcio como a Calmodulina (CaMK) e proteína cinase C (PKC) podem modificar a função dos receptores voltagem-dependente de cálcio NMDA e AMPA. A formação de ROS também está ligada com uma série de eventos como: (i) ativação da fosfolipase A2, formando o ácido araquidônico que gera a peroxidação lipídica (SIEGEL, 2006); (ii) ativação da óxido nítrico sintase e formação de óxido nítrico (NO), que quando ligada a ROS libera peróxido nitritos, os quais iniciam a morte celular programada (SIEGEL, 2006; CORASANITI et al., 2007); (iii) disfunção da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria o que aumenta a produção de radicais livres. Tendo em vista que os radicais livres são os últimos mediadores da excitotoxicidade, a diminuição destes poderia atenuar a morte neuronal (SIEGEL, 2006).

Alguns grupos de pesquisa verificaram que compostos sintéticos agonistas do receptor de NMDA resultavam em efeito excitatório e quando super-expressos, esses receptores respondiam com excitotoxicidade neuronal. Assim, eles poderiam mimetizar os efeitos patológicos em modelos animais. Trevor Stone e Martin Perkins (1983) analisaram a ação excitatória do composto ácido quinólfínico (AQ) e de seus análogos injetados em diferentes regiões do SNC. A toxicidade promovida pelo AQ envolve a ativação dos receptores NMDA, formação

de radicais livres, peroxidação lipídica, carbonilação proteica e disfunção mitocondrial (STONE; ADDAE, 2002)

#### 1.4 PRÉ-CONDICIONAMENTO E NEUROPROTEÇÃO INDUZIDOS POR NMDA

Praticamente qualquer estímulo capaz de causar lesão a um tecido ou órgão pode, quando aplicada abaixo de um limiar de danos ativar mecanismos de proteção endógenos diminuindo, portanto, o impacto de danos subsequentes. Um pequeno insulto isquêmico aplicado ao cérebro, por exemplo, ativa determinadas vias celulares que podem ajudar a reduzir os danos causados por subsequentes episódios isquêmicos – um fenômeno conhecido como "pré-condicionamento isquêmico ou "tolerância isquêmica" Isso ocasiona uma neuroproteção endógena e, potencialmente, uma oportunidade para utilizar esse método na clínica para tratar pacientes com distúrbios causados por acidente vascular cerebral entre outras doenças do SNC (DIRNAGL; SIMON; HALLENBECK, 2003).

Os efeitos benéficos induzidos por pequenas doses de um agente ou estímulo foram marcadas por expressões famosas por diversos filósofos há muitos séculos atrás, citadas a seguir: "A dose faz o veneno" (Paracelso), "A adaptação às perturbações é a base para homeostase" (Cannon), "A síndrome de adaptação geral" (Selye), "Venenos são estimulantes em pequenas doses" (Arndt-Schultz) e "*Similia similibus curentur*" que significa "Semelhante curam semelhantes" por Hipócrates (DIRNAGL; SIMON; HALLENBECK, 2003). Somente no século XX, que Janoff introduziu os termos de "tolerância" e de pré-condicionamento para esse fenômeno (JANOFF, 1964).

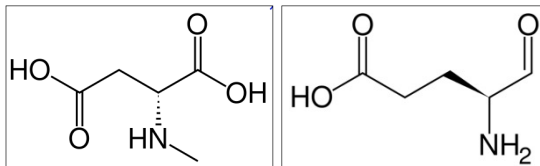
O pré-condicionamento foi identificado pela primeira vez com experimentos realizados em modelos de isquemia, no qual após a oclusão da artéria coronária circunflexa esquerda durante 5 minutos aplicadas quatro vezes produziu uma tolerância contra uma oclusão posterior de 40 minutos. Esses breves períodos de isquemia puderam reduzir ou evitar danos substanciais causados por um subsequente episódio mais prolongado de isquemia e ficou denominado de pré-condicionamento (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986). *O princípio geral do pré-condicionamento é a obtenção de um estado de proteção da célula, tecido ou organismo através da exposição a insultos sub-letais que, portanto, geram certa tolerância a um insulto letal posterior* (DIRNAGL; SIMON; HALLENBECK, 2003; COSTA et al., 2010;

ZHENG, 2010). Esse fenômeno não se limitava somente ao sistema cardíaco e que ocorria de maneira semelhante no tecido nervoso.

O pré-condicionamento isquêmico neuronal foi demonstrado em diversos trabalhos: *in vivo* (KITAGAWA et al., 1991), em fatias de cérebro (SCHURR et al., 2001) e em culturas neuronais (KHASPEKOV et al., 1998). O trabalho de Pugliese e colaboradores explora os aspectos desse fenômeno (PUGLIESE et al., 2003). Outros trabalhos demonstraram que este estado de tolerância no cérebro pode ser obtido de outra maneira quando expostos por pequeno período a hipóxia, choques elétricos, privação de glicose e oxigênio (YOUSSEF; ADDAE; STONE, 2006) e químicos (SORIANO et al., 2006; COSTA et al., 2010).

O pré-condicionamento químico trouxe aspectos que o tornaram mais vantajoso em relação aos demais métodos. O fato de não ser invasivo e com a possibilidade de privar os pacientes de exercício ou estimulação que possam ser opções impraticáveis ou perigosas. Além disso, a administração da droga é metodologicamente mais fácil e rápida (STONE; ADDAE, 2002). Em vista disso, diversos estudos têm demonstrado um quadro de neuroproteção após a administração de compostos químicos assim como quetamina, MK-801 (BOND et al., 1999; REJDAK et al., 2001; SCHALLER; GRAF, 2002) e o composto N-metil-D-aspartato (NMDA) (OLNEY et al., 2002; SORIANO et al., 2006; COSTA et al., 2010) Esses estudos também comprovaram a participação de receptores NMDA na geração endógena de neuroproteção em diferentes modelos de pré-condicionamento químico pela administração de antagonistas (ketamina e MK-801) e agonistas (NMDA).

O ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) é uma excitotoxina sintética derivada de aminoácido, que atua como um agonista específico ao receptor NMDA, mimetizando a ação do glutamato sobre esse receptor (Figura 4). Em contraste com o glutamato, o NMDA liga-se e regula o receptor NMDA, sem nenhum efeito sobre outros receptores de glutamato (BOECK et al., 2004).



**Figura 4.** Estrutura molecular do N-metil-D-aspartato (NMDA) e do ácido glutâmico ou glutamato, respectivamente.

O efeito protetor do NMDA foi demonstrado com doses subletais desse composto no neocórtex de ratos. Foi demonstrado em 1986 que a atividade neuronal e a transmissão sináptica perdidas, produzidas por aplicações corticais de NMDA, *in vivo*, foram recuperadas espontaneamente durante as aplicações subseqüentes (STONE; ADDAE, 2002). Em seguida, a aplicação subtóxica de NMDA durante 24 horas foi capaz de antagonizar a toxicidade provocada por altas concentrações de glutamato, o que denotou que o pré-condicionamento por NMDA é concentração e tempo dependente (CHUANG; GAO; PAUL, 1992). Essa mesma janela terapêutica foi verificada em outros estudos *in vitro* (RAVATI et al., 2001; MA et al., 2005) e *in vivo*, o pré-condicionamento foi alcançado em 24 a 48 horas após a administração sistêmica NMDA no cérebro de ratos (BOECK et al., 2004). Porém, nos trabalhos de Boeck (2004) verificou-se que o efeito neuroprotetor por NMDA é observado em cerca de 50% dos animais quando expostos ao ácido quinolínico (AQ) em camundongos, após esse período o efeito protetor é revertido, provocando novamente convulsões e danos ao tecido neuronal (BOECK et al., 2004). Aparentemente, esse tempo é necessário para ativar mecanismos endógenos de neuroproteção e provavelmente é necessário para estabelecer "tolerância cruzada" (*cross tolerance*) induzidos por NMDA.

No pré-condicionamento uma baixa concentração ou estímulo criará uma "janela de tolerância" a um insulto subseqüente, mas doses maiores irão causar apoptose ou/ e necrose. Esta tolerância não é somente concentração/dose –dependente, onde respostas tardias pelo organismo, tais como mudanças de expressão gênica, poderiam ser importantes para alcançar esta condição e neuroproteção. Assim, o pré-condicionamento pode ser subdividido em mecanismos precoces e tardios, dependendo se o efeito aparece imediatamente após o estresse não-letal ou com um atraso de algumas horas ou dias. Em geral, os primeiros efeitos podem



ser ligados a adaptação de receptores de membrana enquanto efeitos tardios são o resultado de *up* ou *downregulation* de genes.

No compartimento celular, as respostas por NMDA são divididas em resposta “precoce” com modificações rápidas (como por ex. fosforilação) e, posteriormente por uma fase tardia caracterizada por alterações no conteúdo proteico ou na síntese proteica. Acredita-se que a indução da tolerância é alcançada não somente pela proteção do tecido-alvo, mas sim protegendo os demais órgãos através de um mecanismo parácrino (DIRNAGL; SIMON; HALLENBECK, 2003).

Os mecanismos subjacentes à tolerância no cérebro induzida pelo pré-condicionamento por NMDA não são totalmente compreendidas. No entanto, a maioria dos estudos têm sugerido que a neuroproteção pode ocorrer pelo cruzamento de vias de sinalização ou “cross-talking” especialmente entre as vias PI3K e Akt. No trabalho de Papadia e colaboradores (PAPADIA et al., 2005) foi sugerido que a sinalização por PI3K e Akt é necessária e suficiente para as fases anteriores da neuroproteção. A fase seguinte de ativação dos genes de CREB chamada de fase de longa duração são dependentes das proteínas responsivas ao cálcio. Além do cruzamento entre as vias de sinalização, evidências sugerem que há a cooperação de diferentes receptores na geração da neuroproteção (BOECK et al., 2004).

A via PI3K-Akt pode mediar a neuroproteção por diversas maneiras (BRUNET; DATTA; GREENBERG, 2001). A cinase Akt fosforila a glicogênio sintase-cinase 3 (GSK3) inativando-a, sua inibição evita a morte celular e promove, portanto, a sobrevivência neuronal (CROWDER; FREEMAN, 2000). A Akt promove a fosforilação da proteína proapoptótica bcl-2 pertencente à família BAX (Bcl -2-proteína associada à morte). A fosforilação desta proteína protege as células contra os efeitos deletérios da ação apoptótica e atenua a via de sinalização de morte celular (DATTA et al., 2002). A AKT ainda fosforila os fatores de transcrições *Forkhead Box sub-group* (FOXO), que têm a capacidade de induzir a expressão de genes tumorais como p53, quando ativada a proteína p53 medeia a expressão de genes pró-apoptóticos incluindo a proteína bcl-2 (BRUNET; DATTA; GREENBERG, 2001). Além da sua função como supressor de genes de morte celular, a via PI3K-Akt em algumas condições pode controlar a expressão de genes sobrevivência como AMPc e também pelo fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que induz a expressão de genes de sobrevivência (BRUNET; DATTA; GREENBERG, 2001). Quando a atividade proteica da AKT cessa, marca da fase de longa duração na neuroproteção, quando CREB é fosforilada possivelmente pela cálcio-calmodulina (Papadia et

al., 2005a). Portanto, após o início da expressão dos genes de CREB, assume-se que, esses genes permanecem ativados muito tempo depois (PAPADIA et al., 2005).

A cooperação do receptor de adenosina tipo A1 no pré-condicionamento por NMDA foi reportado por Boeck e colaboradores (2004). Demonstrou-se que após a administração de 8-ciclopentil-1, 3, dimetilxantina (CPT), um antagonista A1, impediu a proteção evocada por NMDA contra convulsões induzidas por AQ, mas não a morte celular. Por outro lado, na indução do antagonista ZM241385 do receptor A2 não houve interferência na neuroproteção promovida pelo pré-condicionamento com NMDA (BOECK et al., 2005).

Um dos principais mecanismos de neuroproteção por NMDA envolve a rápida libertação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A exposição à concentrações brandas de NMDA (50 mM) em culturas do hipocampo provocou a liberação de BDNF no prazo de 2 min, sem alterações na expressão gênica de BDNF. O aumento de BDNF no meio intracelular é seguido por um aumento na fosforilação (ativação) de receptores TrkB que induz um aumento de síntese de BDNF. Em alguns trabalhos verificou-se que o BDNF está envolvido na fosforilação da subunidade NR1, ativando-a (SUEN et al., 1997) tal como a subunidade NR2B (LIN et al., 1998). Recentemente, a morte celular neuronal mediada pelo bloqueio dos receptores NMDA *in vivo* foi impedido pelo BDNF (HANSEN, 2004). A baixa estimulação do receptor NMDA induziu a proteção de neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica alcançada principalmente via BDNF. Esses resultados mostram que a ativação da via de sinalização por neurotrofinas desempenham um papel fundamental na neuroproteção por NMDA (JIANG, 2005)

Além da interconexão de vias de sinalização, supõe-se que o estresse oxidativo poderia contribuir para o desenvolvimento de tolerância isquêmica cerebral induzida por NMDA (VANDRESEN-FILHO et al., 2007). Ao contrário das expectativas, 24h após a administração de NMDA seguido de insulto por AQ não mostrou alterações no sistema de recompensa da glutatona. Observou-se uma diminuição na atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) no hipocampo, mas não foi efetivo na área cortical. Além disso, o tratamento com NMDA não provocou qualquer alteração no teor na atividade de: glutatona (GSH), glutatona redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), exceto, a glutatona S-transferase (GST) teve um aumento na atividade no córtex cerebral de ratos (VANDRESEN-FILHO et al., 2007). A fim de explicar a inalteração das

enzimas antioxidantes no modelo NMDA contra isquemia foi demonstrado que uma resposta antioxidante pode atuar por mecanismos diferentes, não por meio da regulação de enzimas antioxidantes e sim particularmente através da diminuição de radicais livres por essas enzimas (PUISIEUX et al., 2004).

No trabalho de Anh e colaboradores sugeriu-se um papel importante da atividade da resposta de choque térmico no pré-condicionamento por NMDA. Pequenas doses de NMDA (0,8 nM) foi capaz de aumentar significativamente a expressão da proteína de choque térmico HSP72 (*heat shock protein*) e GRP94. Nesse mesmo contexto, por meio de técnicas de proteômica foi demonstrado um aumento da expressão de proteínas de choque térmico como HSP70, HSP27, HSP90, guanilato ciclase, muskelin, receptor do fator de ativação plaquetária e beta-actina em 24 h após o pré-condicionamento por NMDA seguido por oclusão da artéria média cerebral (MCA) transitória por 10 min (AHN et al., 2008).

## 1.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

Com o advento de técnicas de sequenciamento de DNA muitos genomas tornaram-se disponíveis, o que tornou possível prever por meio de técnicas *in silico* possíveis produtos gênicos. Contudo, a sequencia nucleotídica não reflete a função de uma proteína diretamente. Dessa maneira, surgiu a necessidade da identificação das proteínas presentes em uma célula como um todo o que indicaria as vias metabólicas em curso e conseqüentemente tornando possível a identificação de alvos terapêuticos. Assim, surgiu o proteoma, isto é, o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma (WESTERMEIER, 2002), termo que foi cunhado na década de 1990 como um análogo do genoma. Por definição, proteômica significa a análise quantitativa simultânea de uma mistura complexa de proteínas oriundas de uma célula ou tecido, onde podem ser avaliadas mudanças no nível de expressão de uma proteína (WESTERMEIER, 2002). Com o advento da técnica, logo em seguida surgiu um novo ramo da proteômica denominada Neuroproteômica especializada no estudo de proteomas do Sistema Nervoso. A caracterização do proteoma do cérebro sob condições normais e patológicas é uma das iniciativas lançadas pela Organização do Proteoma Humano (HUPO) em 2006. Além de obter mapas proteômicos em diferentes estágios do desenvolvimento humano, espera-se a descoberta de novos alvos para fármacos para o tratamento de anomalias como

esquizofrenia, derrame, tumores, demência e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (HAMACHER; MEYER, 2005).

A aplicação da Neuroproteômica estendeu-se, a qual foi subdivida em quatro categorias: (a) neuroproteômica de expressão dedicada ao catálogo de proteínas qualitativamente e quantitativamente. Essa categoria inclui os perfis proteômicos totais e proteomas diferenciais; (b) neuroproteômica funcional que se refere às propriedades funcionais das proteínas e sua organização em estruturas e complexos; (c) neuroproteômica clínica voltada à procura de biomarcadores e fármacos; (d) neuroproteômica de informação que envolve os bancos de dados e plataformas de pesquisa necessária ao desenvolvimento e execução da técnica de proteômica (PARDANANI et al., 2002).

Uma das áreas cerebrais que são mais vulneráveis a doenças neurodegenerativas é o hipocampo, responsável pela memória, aprendizado e plasticidade neuronal de maneira geral. Com o intuito de melhor caracterizá-lo, em 1999 Edgar e colaboradores obtiveram o mapa proteômico de hipocampo humano, no qual foram identificadas 266 proteínas, constituindo 165 proteínas diferentes e 101 prováveis isoformas ou modificações pós-traducionais (EDGAR et al., 1999).

Em outros estudos, empregou-se a análise proteômica para esclarecer de que maneira as células estão lidando frente à diferentes estímulos do meio. Para esse fim analisou-se o hipocampo de camundongos submetidos a duas condições adversas como exercício físico (CHEN et al., 2008) e suplementação de progesterona (DIAO et al., 2007). O estabelecimento das vias em que estas proteínas estão envolvidas, e de uma maneira geral, quais moléculas estão envolvidas na sobrevivência e morte celular. Assim, a obtenção do mapa proteômico é de suma importância na compreensão dos eventos moleculares relacionados a estados fisiológicos como cognição e plasticidade neuronal bem como nos estados patológicos.

A neuroproteômica de expressão diferencial é umas das áreas mais promissoras, onde diversos estudos têm sido realizados, e revelando proteínas de grande interesse. Um estudo comparativo entre cérebros humanos adultos e de neonatos revelou que 50 proteínas são diferencialmente expressas entre os dois estágios. Além disso, por meio da análise comparativa de proteomas foi possível salientar os diferentes subtipos celulares formados durante a diferenciação celular. Outra área de grande importância é a identificação das proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelular, bem como, a regulação dessas proteínas (hipo ou hiper-regulação) possivelmente relacionadas na plasticidade sináptica (YANG et al., 2008). A neuroproteômica vem tornando possível ainda

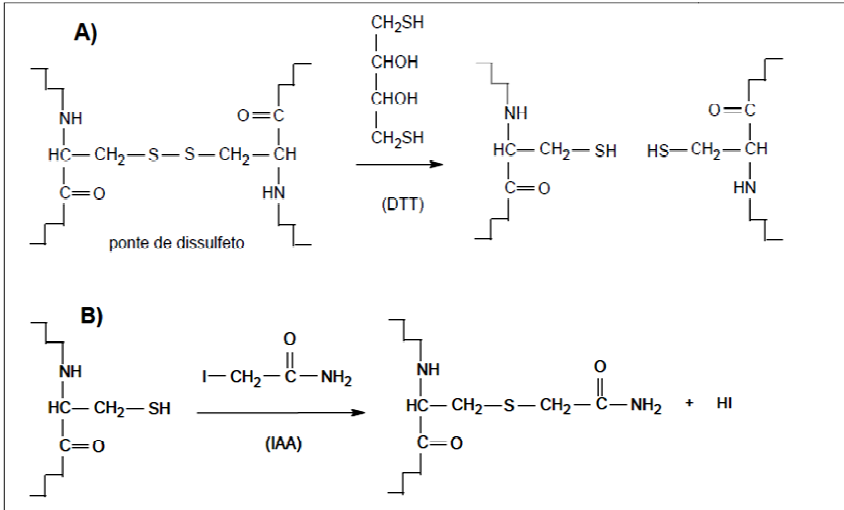
identificar proteínas expressas durante o sono, a puberdade, o ciclo circadiano e o aprendizado e como os neurônios respondem a alterações celulares sinalizadas por hormônios e moléculas de stress. Com a proteômica funcional foi possível identificar algumas proteínas que constituem o complexo receptor NMDA. Verificou-se cerca de 301 proteínas isoladas, sendo 118 envolvidas no coração do complexo que inclui a maquinaria eletrofisiológica pós-sináptica excitatória do receptor. Além disso, o receptor liga-se a proteína PSD95, o qual é membro da família de multi-domínios (MAGUKs) (HUSI et al., 2000).

A grande expectativa da proteômica diz respeito à indústria farmacêutica no intuito de procurar proteínas alvo ou alvos terapêuticos relacionados com doenças ou que caracterizem indivíduos saudáveis, na procura de marcadores para diagnóstico, monitoramento de doenças e seus tratamentos entre outras aplicações na microbiologia e botânica. Para esta finalidade diversas condições amostrais podem ser analisadas quantitativamente em gel 2DE como diferentes estágios de estimulação, deleção gênica ou super-expressão do mesmo, tratamento de drogas entre outros (WESTERMEIER, 2002).

A alta resolução da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE) tornou-se a principal técnica de separação de proteínas utilizadas atualmente na proteômica. A separação respeita parâmetros físico-químicos como ponto isoelétrico e o tamanho da proteína. Esta técnica foi inicialmente criada por Stegemann (1970), porém tornou-se reconhecida com a introdução de condições desnaturantes por O'Farrel (1975). Mas, somente após o desenvolvimento de gradientes de pH imobilizados por Bjellqvist et al, (1982) a análise proteômica tornou-se reproduzível (WESTERMEIER, 2002).

A preparação da amostra de proteínas é realizada sob diversas condições desnaturantes e solubilizantes: (a) Ureia solubiliza e desnatura proteínas, produz a clivagem de complexos proteicos permitindo a exposição de regiões ionizáveis. A partir da estrutura proteica primária é realizado o cálculo de massa e pI teóricos, depois utilizado para comparar aos dados de espectrometria de massa obtido. A adição de tiureia à ureia pode melhorar a solubilização, particularmente de proteínas de membrana; (b) Agentes redutores clivam as pontes dissulfeto resultando em proteínas totalmente desenoveladas como a clivagem dessas pontes é um processo reversível, faz-se necessário proteger os agrupamentos SH por meio de uma reação química com iodoacetamida (Os processos de clivagem e redução estão esquematizados na Figura 5); (c) Detergentes não-iônicos ou

zwitteriônicos fazem a solubilização sem adição de sal às proteínas hidrofóbicas; (d) Anfólitos ajudam na separação e solubilização das proteínas; (e) Azul de Bromofenol: fornece o monitoramento da eletroforese (WESTERMEIER, 2002).



**Figura 5.** A) Clivagem das pontes dissulfeto pelo reagente DTT; B) Ação da iodoacetamida durante a carbamidometilação dos resíduos de cisteína (CANTÚ, 2007).

A separação das proteínas por ponto isoelétrico, é realizada em gradientes de pH imobilizados (*Immobilized pH Gradient - IPG*). O gradiente de pH é formado, basicamente, por monômeros de acrilamida ( $\text{CH}_2\text{-CH-CH-CO-NH}_2$ ), acrilamidas modificadas ( $\text{CH}_2\text{-CH-CH-CO-NHR}$ ) e bis-acrilamida (moléculas anfóteras). Esses grupos ligam-se covalentemente a poli(acrilamida) formando um gradiente de pH fixo e não influenciável pela corrente elétrica nem pelo pH da amostra de proteínas. Portanto, uma fita de IPG possui um conjunto desses monômeros os quais definem o intervalo de gradiente. A Figura 6 exemplifica alguns desses monômeros. Assim, à medida que as proteínas são submetidas a uma corrente elétrica elas migram eletroforéticamente até o ponto isoelétrico obtido pelo caráter anfotérico correspondente, o qual é capaz de fornecer uma região tamponante e com boa condutividade elétrica a proteína (WESTERMEIER, 2002).

	Nome	Fórmula	pKa
monômeros ácidos	2-acrilamida-2-ácido metilpropano sulfônico	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C} - \text{CH}_3 \\   \\ \text{C} - \text{SO}_3\text{H} \end{array}$	1,0
	Ácido 2-acrilamidoglicólico	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	3,1
	N-acriloglicina	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	3,6
	Ácido 4-acrilamidobutírico	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{COOH}$	4,6
monômeros básicos	2-morfolinoetilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$	6,2
	3-morfolinopropilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$	7,0
	N,N-dimetilaminoetilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{N}(\text{CH}_3)_2$	8,5
	N,N-dimetilaminopropilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{N}(\text{CH}_3)_2$	9,3
	N,N-dietilaminopropilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{N}(\text{CH}_2\text{H}_5)_2$	10,3
	N,N,N-trietilaminoetilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{N}(\text{CH}_2\text{H}_5)_3$	> 12

**Figura 6.** Monômeros ácidos e básicos usados para a fabricação dos gradientes de pH mobilizados em fitas - IPGstrips (Adaptado de CANTÚ, 2007).

Após a separação das proteínas pelo seu ponto isoeletrico (primeira dimensão), em seguida, os mesmos polipeptídios são separados por massa molecular (MW) (segunda dimensão). Essa migração ocorre por meio de eletroforese em gel de poliácrlamida com adição do detergente aniônico duodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS atua envolvendo a proteína, atribuindo-a carga aniônica, dessa maneira todas as proteínas poderão migrar em direção a região catiônica (anódica) do campo eletromagnético. A mobilidade da proteína tratada com SDS depende muito do seu massa molecular, de tal maneira em que há uma relação linear entre o logaritmo do massa molecular e a distância migratória do complexo SDS-proteína (WESTERMEIER, 2002).

Uma vez isoladas as proteínas na matriz do gel, elas tornam-se mais estáveis e podem ser identificadas por espectrometria de massa. Os

passos metodológicos desde a extração das proteínas do gel até a sua identificação é realizada por meio da técnica *peptide mass fingerprint* (PMF), o qual foi introduzido por quatro grupos independentes, entre eles Pappin e colaboradores (1993). A região que contém a proteína (chamada de *spot*) é excisada e tratada com uma enzima proteolítica que irá digerir a proteína eluída no gel, normalmente utiliza-se tripsina. Os produtos de clivagem, peptídeos, são eluídos e submetidos análise por espectrometria de massa. O espectro de massa gerado com acurado valor das massas dos peptídeos é comparada aos espectros de massa de peptídeos teóricos obtidos a partir de banco de dados (WESTERMEIER, 2002).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise proteômica de hipocampo de camundongos, visando identificar as proteínas e consequentemente os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos no pré-condicionamento com NMDA na tentativa de compreender os mecanismos utilizados pelo cérebro para neuroproteção.

Analisar, em diferentes tempos de indução, possíveis alterações na expressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular e na sinalização para entender como estas alterações possibilitam a aquisição e posterior perda do pré-condicionamento dentro da janela de tempo observada em modelos de pré-condicionamento com NMDA.

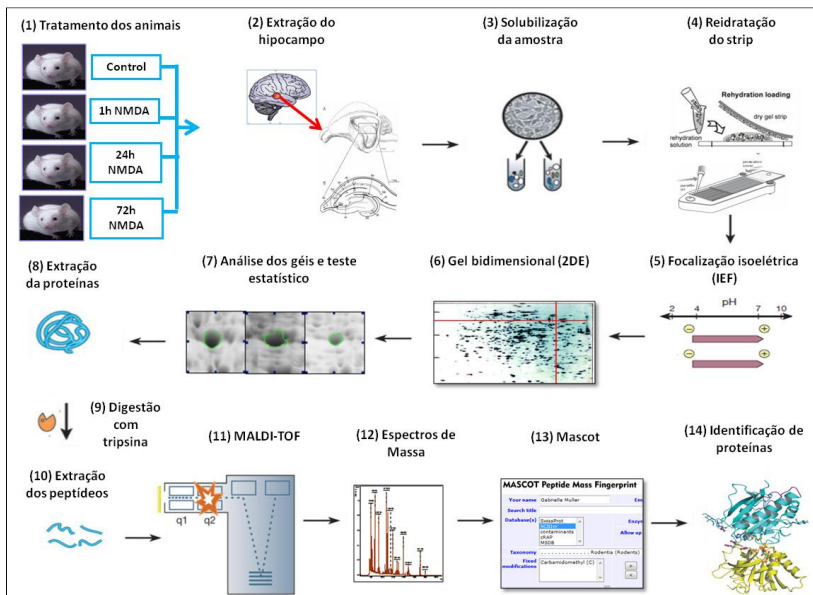
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração das proteínas totais de hipocampo de camundongos tratados com NMDA em diferentes tempos (1h, 24h e 72 h).
- Separar as proteínas de hipocampo de camundongos tratados com NMDA por focalização isoelétrica (IEF) e gel bidimensional (2DE-PAGE).
- Identificar as proteínas por espectrometria de massa MALDI-TOF, utilizando o método *Peptide Mass Finger Print* (PMF).
- Obter o perfil proteômico de hipocampo de camundongos no pré-condicionamento com NMDA.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma a seguir (Figura 7) resume as etapas metodológicas que foram realizadas neste trabalho:



**Figura 7.** Fluxograma das principais etapas experimentais realizadas neste trabalho.

#### 3.1 TRATAMENTO DOS ANIMAIS E EXTRAÇÃO DO HIPOCAMPO

As amostras de hipocampo analisadas foram fornecidas pelo Laboratório de Neuroquímica 4 em 2009 sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Inês Tasca do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos (30 - 40g), sendo que todos os experimentos com animais foram projetados de maneira que o animal tivesse o menor sofrimento possível e com limite de animais sacrificados conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC.

Os camundongos foram anestesiados com 700 mg/kg de hidrato de cloral. A administração de NMDA (75 mg/Kg de animal) ou salina (0,9% de NaCl) foi intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 µL/Kg por peso de animal. De acordo com o período de administração de NMDA foram formados quatro grupos: (i) grupo controle, tratado somente com salina; (ii) grupo sacrificado 1 hora após a administração de NMDA; (iii) grupo sacrificado 24 horas após administração de NMDA e (iv) grupo sacrificado 72 horas após a administração de NMDA. Para cada grupo foram utilizados três animais. Assim, os 12 animais utilizados nas análises receberam doses de salina (0,9% de NaCl) ou NMDA (75 mg/Kg de animal), e, em seguida foram colocados individualmente em caixas de acrílico e observados por 10 minutos para ocorrência de mudanças comportamentais (HALLAK, 2003). Aqueles que não apresentaram convulsões logo após o tempo de indução foram sacrificados por decapitação e as amostras de hipocampo dos camundongos tratados nos diferentes tempos de indução com NMDA foram armazenadas a -80 °C.

### 3.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE HIPOCAMPO

As amostras de hipocampo fresco (10 mg/hipocampo) armazenadas foram homogeneizadas com 400 µl de Tampão de lise (25 mM Tris HCl pH 7,2, 10 mM CHAPS, 0,5 M NaCl, 5% glicerol (v/v), 1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF)) para extração total das proteínas e posterior análise proteômica (WESTERMEIER, 2002; GÖRG, 2004). O tecido foi submetido à lise mecânica (maceração) e incubado em gelo por 20 minutos, em seguida, submetido à centrifugação por 30 minutos a 12.000 x g a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e o precipitado foi ressuspenso com tampão de lise para “re-extração” e centrifugação. Os sobrenadantes foram unidos em um único tubo e armazenados -20 °C.

Foi utilizado um hipocampo por animal tratado para extração de proteínas. Assim, as proteínas extraídas foram quantificadas com 2D-Quant Kit (Amersham Biosciences) e purificadas com 2D-Clean Up Kit (Amersham Biosciences), conforme protocolo descrito pelo fabricante.

Foi testado também o método ácido tricloroacético (TCA) e acetona para purificação da amostra. Nesse processo foi adicionado 20% do ácido tricloroacético (TCA) que promove a precipitação das proteínas. Em seguida, o precipitado foi incubado 1 hora no gelo, centrifugado 16.000 x g por 15 min. a 4° C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de acetona. A acetona, como solvente orgânico, elimina

contaminantes em solução como ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos, sais e o reagente TCA por meio de uma série de 4 ou 5 lavagens. A remoção desses contaminantes evita possíveis interferências durante a focalização isoeletrica (IEF) e a formação de artefatos nos gel bidimensionais.

### 3.3 REIDRATAÇÃO DAS FITAS IPG

Após a etapa de purificação, as amostras foram solubilizadas em 250 µl tampão de reidratação (7 M Ureia, 2 M Tiureia, 4% (p/v) CHAPS, 1% de IPG buffer pH 3-10, 40 mM DTT e 0,002% (p/v) azul de bromofenol) (PINTO et al., 2007), contendo 250 µg de proteína. As amostras de proteínas foram aplicadas em tiras de pH imobilizadas (ImmobilineDrystrip Gels - IPG strips - GE Healthcare) de 13 cm de comprimento com gradiente de pH 3-10 e reidratadas passivamente por mais de 20 horas em temperatura ambiente no aparato IPGphor strip holder e cobertas com 1 ml de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes e cristalização da ureia durante a reidratação.

### 3.4 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) E GEL BIDIMENSIONAL (2-DE)

A IEF e a eletroforese em gel bidimensional seguiram o protocolo de (WESTERMEIER, 2002), sendo avaliados os quatro tratamentos (0h, 1h, 24h e 72h) simultaneamente em cada etapa. Assim, na IEF foram colocadas 4 tiras de pH imobilizado previamente hidratado com as amostras controle, 1h, 24h e 72h no aparato de IPGphor. Todo o processo de IEF foi acompanhado pelo programa Ettan IPGphor 3 a 20°C seguindo quatro passos com voltagem total de 15500 V/h e amperagem máxima de 25µA/strip: (Passo 1) 500 V - 500 V/h; (Passo 2) 1000 V - 800 V/h; (Passo 3) 8000 V - 113000 V/h; (Passo 4) 8000 V - 2900V/h. Em seguida, as tiras foram retiradas do equipamento e armazenadas a -80 °C.

Posteriormente as tiras IPG com as proteínas já separadas pelo seu ponto isoeletrico, foram equilibradas em duas etapas. Na primeira etapa, foi adicionado no momento do experimento, DTT (10 mg/mL) ao tampão de equilíbrio (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 2% (p/v) SDS, 6 M Ureia, 29,3% (v/v) glicerol, 0,002% Azul de bromofenol) com a finalidade de quebrar as ligações dissulfeto. As amostras ficaram sob agitação, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Como a clivagem dessas pontes é um processo reversível, faz-se necessário proteger os

agrupamentos SH por meio de uma reação química. Assim, o tampão anterior foi removido e na segunda etapa da equilibraco, adicionou-se iodoacetamida – IAA (25 mg/ mL) ao novo tampão de equilibraco (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 2%, (p/v) SDS, 6 M Ureia, 30% (v/v) Glicerol, 1% Azul de bromofenol) e a amostra agitada por 15 minutos.

Em seguida, as fitas IPG foram submetidas à eletroforese bidimensional em gel bidimensional 12,5% desnaturante SDS-PAGE (18 x 16 x 1,5 mm<sup>3</sup>). Esse processo foi realizado na cuba vertical Hoefer SE Ruby (Amersham Biosciences) com tampão de corrida Tris-glicina (125 mM Tris Base, 0,96 mM Glicina, 0,5% SDS). Durante a corrida a concentrao do tampão de corrida superior foi 2X e o tampão inferior é 1X, sob corrente elétrica de 30 µA por gel. Logo após o término da segunda dimenso, os géis foram colocados em soluo de fixao (8 % de ácido fosfórico, 50 % de etanol) por 1 hora e imediatamente, corados com soluo de colorao (5 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad), 20 % de metanol, 10 % sulfato de amônio e 2 % ácido fosfórico) sob agitao por 24 horas. Os géis corados foram escaneados no aparelho ImageScanner (Amersham Biosciences) e as imagens analisadas com o programa ImageMaster (GE Healthcare). As posiões dos *spots* isolados foram registradas em cada gel, determinando seu pI e sua massa molecular aparentes. Para cada tratamento foram analisados três géis.

### 3.5 ANÁLISE DA IMAGEM DO GEL E APLICAO DE TESTE ESTATÍSTICO

Após a digitalizao das imagens dos géis, estes foram analisados utilizando programa ImageMaster: (1) Ajuste do “background” e alinhamento dos géis; (2) Posicionamento manual do padro massas moleculares (250 kDa, 160 kDa, 105 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 15 kDa e 10 kDa) (Full-range rainbow molecular weight Markers – GE Healthcare) e posicionamento dos pontos isoelétricos iniciais em finais 3 e 10; (3) Deteco automática e manual dos *spots*; (4) Edio dos *spots* (formato, adio, deleo); (5) Adio de cinco “landmarkers” em *spots* comuns a todos os géis; (6) Match automático e manual entre os géis de mesmo tratamento pra verificar reprodutibilidade dos mesmos dentro do “MatchSet”; (7) Match automático e manual entre todos os géis buscando *spots* diferenciais dentro das “Classes”.

Depois da execuo dessas etapas, o programa gerou tabelas e gráfcos com diversos dados. Foram priorizados os seguintes parâmetros gerados: média de intensidade (em % volume) calculado pela estimativa

da intensidade relativa de cada *spots* em relação ao total de proteínas no gel, localização dos *spots* no gel e abundância dos mesmos. Em seguida, os dados de porcentagem de volume foram submetidos ao teste ANOVA uma via e Bonferroni pós-teste duas vias, sendo que foram considerados *spots* diferencialmente expressos aqueles que mostraram diferença do percentual (%) de volume menores que  $p < 0,05$ .

### 3.6 DIGESTÃO *IN GEL*, ESPECTROMETRIA DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foram analisados *spots* de diferentes géis e diferentes tratamentos. Em seguida os *spots* foram cortados do gel, reduzidos, alquilados e digeridos com tripsina (LINK et al., 1999; GYGI; AEBERSOLD, 2000). A excisão foi feita segundo protocolo (SHEVCHENKO et al., 2006) com algumas modificações. Os *spots* cortados do gel foram descorados três vezes em 300 a 500  $\mu$ L de solução de descoloração (50 mM bicarbonato de amônio e 50 % acetoneitrila). Em seguida, foram desidratados com 100  $\mu$ L de acetoneitrila 100% e os fragmentos de géis foram secos em sistema de concentração à vácuo (Eppendorf). Os fragmentos foram colocados em gelo e incubados com 10  $\mu$ L de solução de tripsina contendo 25 ng /  $\mu$ L (Trypsin sequencing grade modified trypsin Promega, Madison, WI) diluída em 50 mM bicarbonato de amônio com 10% de acetoneitrila e as amostras incubadas por 16 horas a 40° C. Durante este processo a proteína sofre clivagem adjacente aos resíduos de lisina e arginina, gerando diversos peptídeos.

Em seguida, os peptídeos trípticos foram extraídos em três etapas contendo 30  $\mu$ L de solução de extração com 50% de acetoneitrila e 5% trifluoroacético (TFA) por 30 minutos. Depois, as amostras foram secas novamente em sistema a vácuo, e estocadas a -20 °C até a análise de espectrometria.

A análise por espectrometria de massa foi realizada no espectrômetro de massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os peptídeos extraídos foram ressuspensos em 5  $\mu$ L TFA 0,1%, em seguida, 1 $\mu$ L desses foi misturado com 1 $\mu$ L de solução de matriz saturada contendo ácido  $\alpha$ -ciano-4 hidroxicinâmico (HCCA -5 mg / ml ) e TFA 0,1% em uma concentração de 1:1 acetoneitrila / metanol. Logo após, 1 $\mu$ L dessa mistura foi aplicado na placa de MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e deixada a temperatura ambiente para secar. Os espectros foram adquiridos no modo refletor com tensão de aceleração de 20 kV e frequência de laser de 50 Hz utilizando o método *Peptide Mass Finger Print* (PMF). Os íons

positivos foram acumulados automaticamente usando o programa FlexControl. A calibração externa foi realizada utilizando uma mistura de peptídeos com  $([M + H] + \text{íons de angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina e hormônios adrenocorticotrófico})$ . Foram acumulados cerca de 1200 tiros para a obtenção dos espectros. Os espectros gerados foram analisados pelo programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados contendo relação massa/carga ( $m/z$ ) adquiridos foram pesquisados contra o banco de dados NCBIInr e foi utilizado programa *on line* MASCOT acessado pelo endereço eletrônico <http://www.matrixscience.com/>. Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: categoria Roentia, uma falta de clivagem, 100 ppm tolerância de medição, cisteínas foram assumidas como carbometiladas e oxidação da metionina.



## 4. RESULTADOS

O pré-condicionamento químico vem se destacando na pesquisa como uma poderosa ferramenta terapêutica principalmente devido à atenuação dos sintomas provocados por doenças mais severas ou até mesmo evitando o desenvolvimento de patologias. Essa proteção pode ser alcançada por meio de uma intervenção farmacológica, preferencialmente por um método não invasivo aos grupos submetidos ao tratamento. Nesse contexto, a administração branda de NMDA, um agonista específico para os receptores NMDA vem obtido ótimos resultados no que se refere à atenuação da sintomatologia ou prevenção de doenças no SNC que estão relacionadas direta ou indiretamente com o receptor em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Tendo o conhecimento das proteínas envolvidas no pré-condicionamento por NMDA pode auxiliar no descobrimento de novos alvos terapêuticos e auxiliar em uma maior compreensão sobre os mecanismos de sobrevivência neuronal e suas vias por eles relacionadas. Para essa finalidade utilizou-se uma abordagem de gel bidimensional associada e espectrometria de massa que possibilitam a avaliação quantitativa e qualitativa das proteínas expressas, podendo contribuir significativamente para avançar na compreensão da biologia e das bases moleculares de processos relacionados ao condicionamento por NMDA.

Com o objetivo de obter o mapa bidimensional fez-se necessário a total extração e solubilização das proteínas presentes no tecido de hipocampo de camundongos previamente tratados com NMDA em diferentes tempos. Portanto, neste trabalho utilizamos o detergente CHAPS em solução com Tris e NaCl para total extração das proteínas. Para solubilização e desestabilização protéica foram utilizados os reagentes ureia, tiureia, DTT e iodacetamida. Posteriormente, todas as proteínas foram separadas em géis bidimensionais onde obtivemos quatro perfis para cada tratamento em estudo. Após comparação e análise estatística, foram encontradas seis proteínas com expressão diferencial e a partir delas inferimos quais vias metabólicas poderiam estar envolvidas no pré-condicionamento por NMDA.

### 4.1 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 12 hipocampos (direito ou esquerdo) congelados  $-80^{\circ}\text{C}$ , com aproximadamente 10 mg cada hipocampo. As amostras foram extraídas simultaneamente. Após a indução com NMDA

nenhum animal apresentou alteração de comportamento conforme observado.

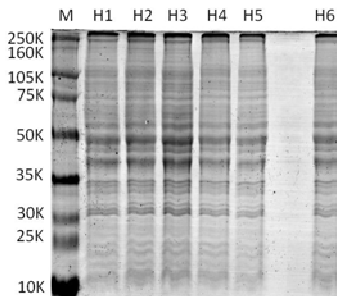
#### 4.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE HIPOCAMPO

As proteínas de hipocampo foram extraídas em duas etapas de extração ao final totalizando um volume final de 800  $\mu\text{L}$  de amostra. A concentração de proteínas obtida por hipocampo extraído está relacionada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação das concentrações de proteínas obtidas no processo de extração para cada hipocampo.

Amostras #	Tratamento	Concentração de proteína obtida $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
I	Controle	1,50
II	1h NMDA	1,50
III	24h NMDA	1,30
IV	72h NMDA	1,80
V	Controle	2,40
VI	1h NMDA	1,47
VII	24h NMDA	1,86
VIII	72h NMDA	1,64
IX	Controle	0,80
X	1h NMDA	2,28
XI	24h NMDA	1,63
XII	72h NMDA	2,45

O tampão de lise utilizado foi escolhido visando que a amostra pudesse ser utilizada em outros processos sem comprometimento da mesma com ureia ou tiureia. A qualidade da extração foi visualizada por eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional 10%, Figura 8.



**Figura 8. Gel de poliacrilamida 10% com a separação das proteínas oriundas de seis extrações (amostras I a VI) e solubilizadas com o tampão de lise.** Na primeira coluna está o marcador de peso molecular padrão e nas colunas subsequentes refere-se aos hipocampus (amostras I a VI) os quais foram submetidos à análise proteômica.

As proteínas extraídas foram quantificadas com 2D-Quanti Kit (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, tendo como base concentrações crescentes de soro albumina bovina (BSA) como curva padrão. A partir das equações da reta obtida oriunda da titulação do BRADFORD, considerou-se somente o  $R^2$  maior que 0,97 ( $y = -0,007 + 0,8182x$ ,  $R^2 = 0,9883$ ) para mensurar as concentrações de proteínas na amostra.

Em seguida, as amostras foram inicialmente purificadas com 2D-Clean Up Kit (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Porém, optamos por utilizar o método de precipitação utilizando TCA/acetona, pois obtivemos géis semelhantes àqueles obtidos com o kit.

#### 4.3 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) E GEL BIDIMENSIONAL (2-DE)

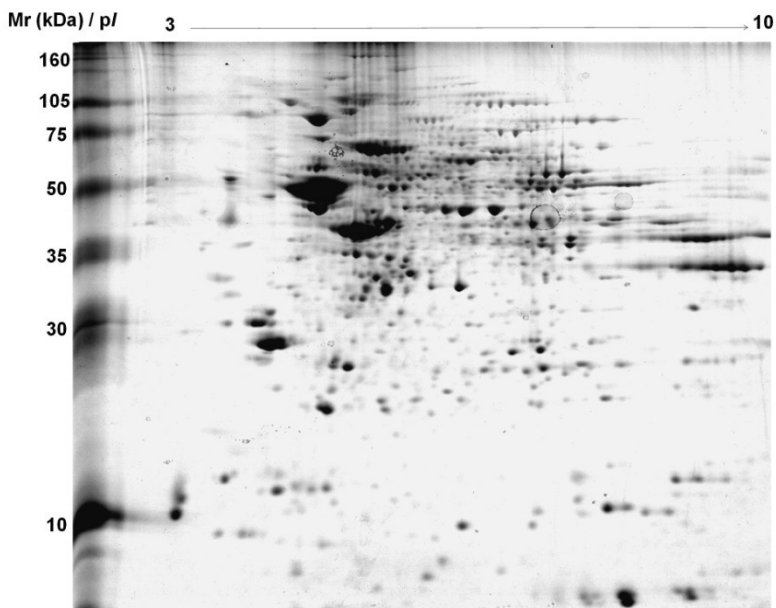
Durante a IEF foram monitorados parâmetros como voltagem e corrente, sendo que a voltagem aplicada manteve-se bem semelhante ao padrão fornecido pelo protocolo descrito por Westermeier e Naven, 2002: (1) 500 V - 500 V/h; (2) 1000 V - 800 V/h; (3) 8000 V - 113000 V/h; (4) 8000 V - 2900V/h com 15500 V/h totais. Em geral, a IEF alcançou 15.504 V/h e a corrente oscilou entre os valores 25 $\mu$ A/tira.

A total separação das proteínas pôde ser visualizada por meio de *spots* (manchas de proteínas) que permitiram a quantificação dos

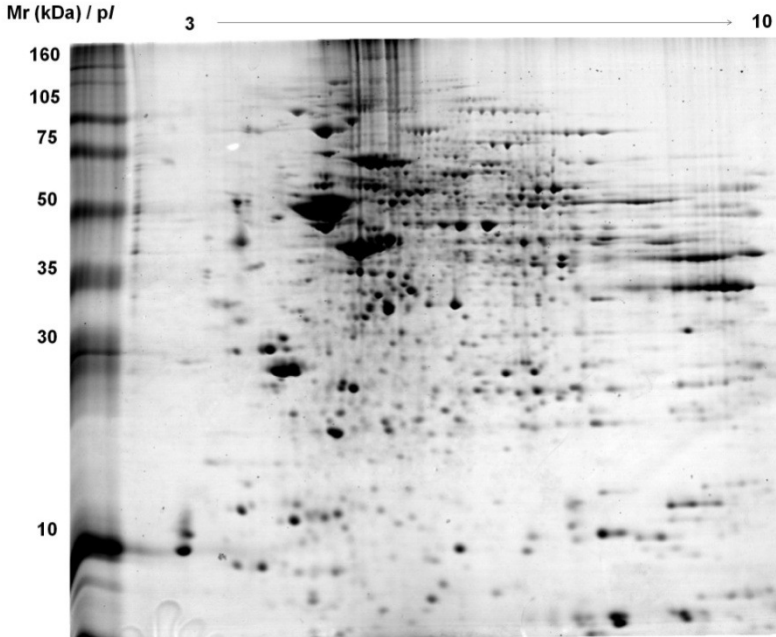
níveis de proteínas individuais através da intensidade cada *spot* e localização. Os mapas representativos da fração proteica de cada grupo de estudo estão nas Figuras de 9 a 12.

A quantidade de spots por gel foi em média de 971 spots (controle), 1106 spots (1h NMDA), 1028 spots (24h NMDA) e 992 spots (72 NMDA), sendo que para cada tratamento realizou-se os experimentos em triplicata de animais por tratamento. No total foram detectados em média 900 *spots* entre todos os géis, na escala de pI experimental 3-10, onde verificou-se mais proteínas ácidas, destacando-se no intervalo 5-7. Observou-se também maior abundância de proteínas hipocampais nos diferentes tempos de indução que apresentaram altos pesos moleculares 35-75 kDa (Figuras 9 a 12).

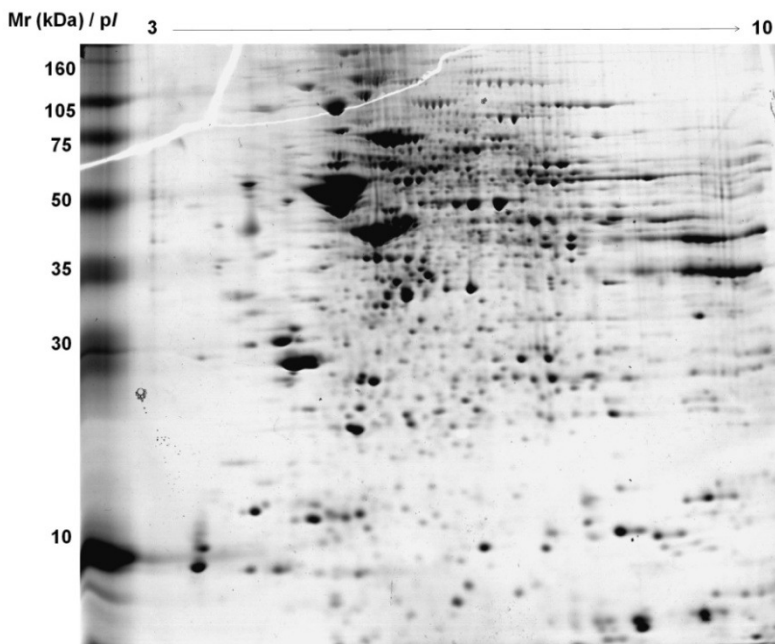
Para verificar a repetibilidade dos géis 2-DE em cada tratamento (1h, 24h e 72h) foi analisado o gráfico de dispersão ou *Scatter Plots*, comparando-se a percentagem de volume de *spots* das replicatas (% vol x % vol) a cada dois géis. Para isso foram considerados como géis de referência aquele com um maior número de *spots* em cada grupo. Assim, ao comparar os *spots* dentro do mesmo grupo (tratamento) de géis foram observados diferentes valores de correlação: 0,9037 (grupo controle), 0,88 (1h de grupo), 0,80 (24h de grupo) e 0,72 (72h de grupo) e slope ( $R^2$ ) variou de 0,75 a 0,93.



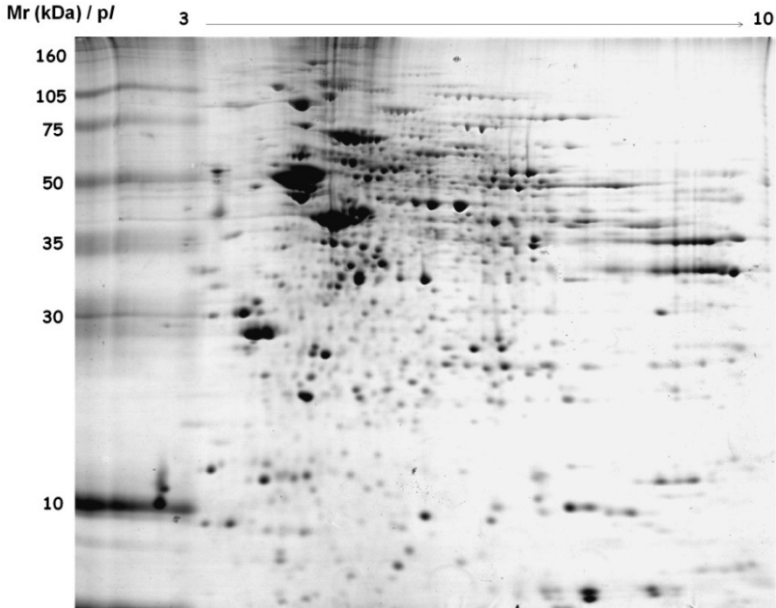
**Figura 9. Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo controle.** Os pesos moleculares estão em kDa e acima o gradiente de pH 3-10 está indicado nas extremidades do gel. O extrato total proteico solúvel em CHAPS (250  $\mu$ g) foi separado em *strip* de 13 cm (pH 3-10) seguido por gel bidimensional 12% e corado com CBB G-250.



**Figura 10. Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo 1h após administração com NMDA.** Os pesos moleculares estão em kDa e acima o gradiente pH 3-10 está indicado nas extremidades do gel. O extrato total proteico solúvel em CHAPS (250  $\mu$ g) foi separado em *strip* de 13 cm (pH 3-10) seguido por gel bidimensional 12% e corado com CBB G-250.

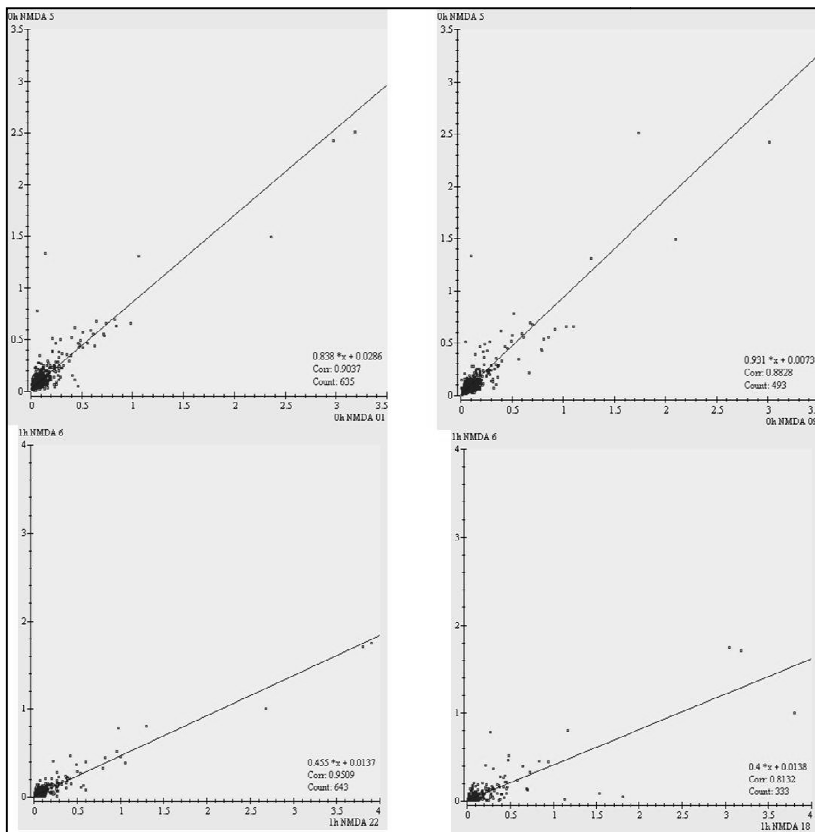


**Figura 11. Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo 24h após administração com NMDA.** Os pesos moleculares estão em kDa e acima o gradiente pH 3-10 está indicado nas extremidades do gel. O extrato total proteico solúvel em CHAPS (250  $\mu$ g) foi separado em *strip* de 13 cm (pH 3-10) seguido por gel bidimensional 12% e corado com CBB G-250.

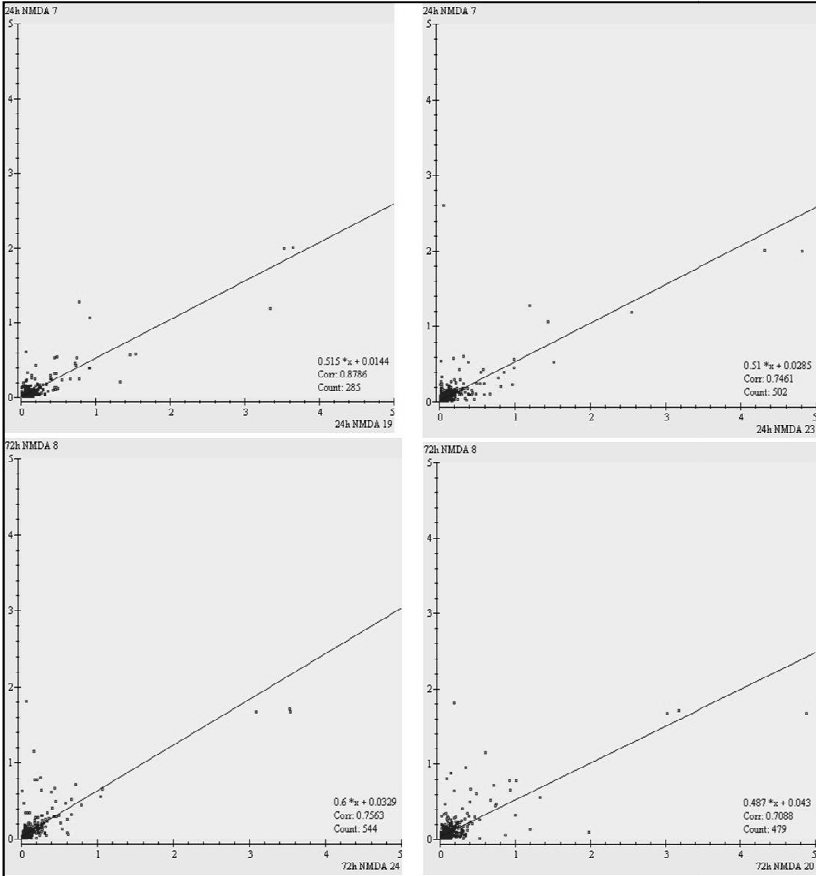


**Figura 12. Gel bidimensional representativo da fração proteica do grupo 72h após administração com NMDA.** Os pesos moleculares estão em kDa e acima o gradiente pH 3-10 está indicado nas extremidades do gel. O extrato total proteico solúvel em CHAPS (250 µg) foi separado em *strip* de 13 cm (pH 3-10) seguido por gel bidimensional 12% e corado com CBB G-250.





Continua na próxima página.



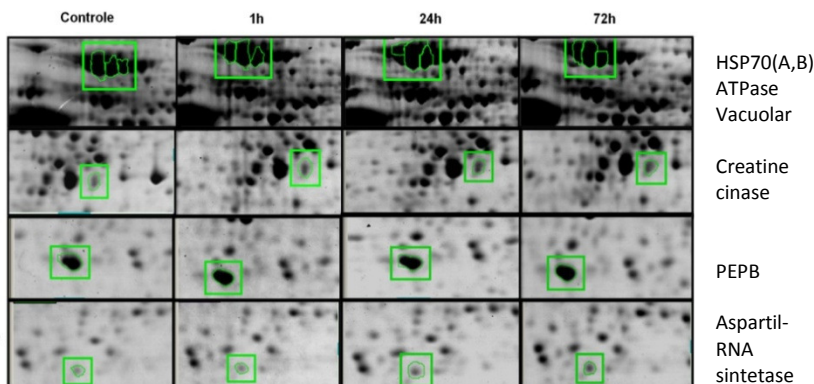
**Figura 13. Gráfico de dispersão (% vol x % vol) entre as réplicas de géis 2-DE de proteínas. Réplica do controle versus controle, 1h versus 1h, 24h versus 24h, 72h versus 72h. A variação entre repetições foi determinada pelo fator de correlação superior ou  $R^2$  a > 0,7.**

**Tabela 2.** Valores de slope e  $R^2$  de cada grupo obtidos para avaliar a repetibilidade entre as replicatas de géis de cada tratamento.

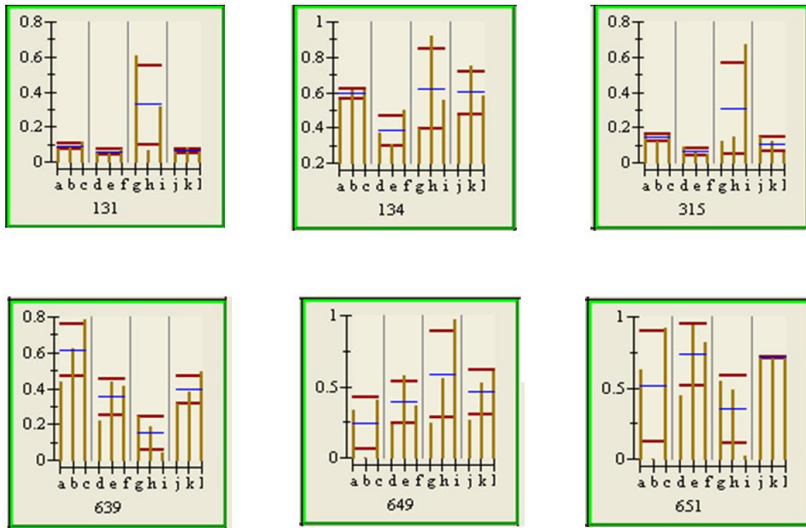
Grupos	Slope	$R^2$
Controle	0,88	0,93
1h	0,45	0,95
24h	0,51	0,87
72h	0,60	0,75

#### 4.4 PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DURANTE O PRÉ-CONDICIONAMENTO

Ao comparar os *spots* entre os diferentes tratamentos utilizando teste estatístico ANOVA uma via e Bonferroni pós-teste duas vias foi possível determinar seis *spots* com expressão diferencial significativa, isto é, com  $p < 0,05$ . Os seis *spots* com diferença de expressão entre as quatro condições estudadas estão em destaque ampliado do gel (referência do controle) na Figura 14. Os valores de média e desvio padrão da intensidade (%volume) destes *spots* podem ser observados em histogramas na Figura 15.

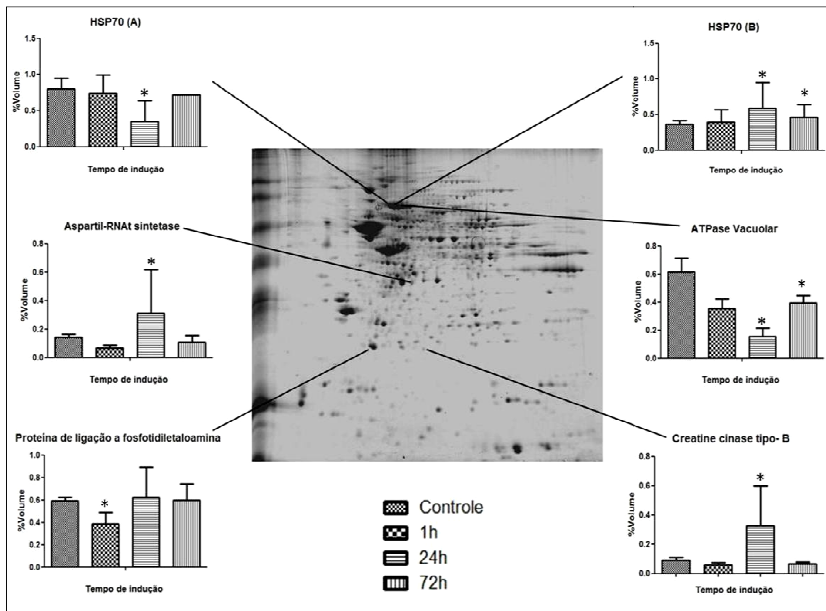


**Figura 14.** Ampliação do gel com destaque aos seis *spots* encontrados com expressão diferencial  $p < 0,05$ . A quantificação local foi baseada na estimativa da intensidade relativa de cada *spots* calculada como porcentagem do volume *spot* (% volume) em relação ao total de proteínas no gel.



**Figura 15. Histograma de cada spot representando a média de intensidade (em % de volume) e os desvios padrão das triplicatas.** As letras **a,b,c** representam os géis controle, **d,e,f** com 1h de indução com NMDA, as letras **g, h, i** representam os géis com 24h de indução com NMDA e **j,k,l** os géis com 72h de indução com NMDA. As linhas em azul indicam a média de intensidade e as linhas vermelhas os valores máximos e mínimos de desvio padrão.

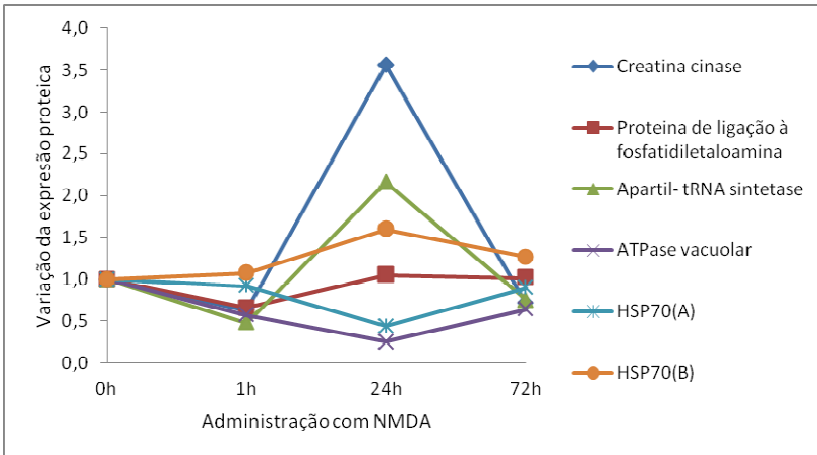
As seis proteínas diferenciais estão em destaque no gel bidimensional com histogramas que indicam o percentual de volume alcançado para cada proteína e os desvio-padrão obtidos entre as triplicatas de cada tratamento 1h, 24h e 72h (Figura 16). As proteínas diferenciais são: duas proteínas de choque térmico com peso molecular de 70 kDa (HSP70) (designadas A e B), creatina cinase, proteína de ligação à fosfatidiletanolamina, subunidade catalítica da proteína vacuolar ATPase e aspartil-tRNA sintetase.



**Figura 16. Proteínas diferenciais identificadas por espectrometria de massa.** Os histogramas indicam o percentual de volume alcançado para cada proteína e o desvio-padrão obtido entre as triplicatas de cada tratamento 1h, 24h e 72h e nos controles. Os asteriscos representam as significâncias estatísticas com  $p < 0,05$  obtidas em relação ao grupo controle.

As seis proteínas identificadas foram avaliadas ao longo do tempo de indução em 1h, 24h e 72h após administração com NMDA mostrados na Figura 17. Quatro dessas proteínas responderam com um aumento na expressão em 24 horas, partindo de níveis basais de expressão no controle a um aumento em 24h e voltando aos níveis normais em 72 horas, dessa maneira, esses *spots* foram considerados super-expressos. Ao passo que, dois *spots* partiram de níveis basais no controle, diminuíram em 24 horas e voltaram aos níveis normais em 72 horas, sendo considerados com expressão reprimida. Entre as super-expressas, as intensidades de volume variaram do controle para 24h com os seguintes valores: (a) HSP70 (B): de 0,366 para 0,586; (b) a creatina cinase: de 0,092 para 0,328; (c) proteína de ligação a fosfatidiletanolamina: de 0,143 para 0,308. As duas proteínas com

expressão diminuída variaram da seguinte maneira: (a) proteína vacuolar V-ATPase: de 0,798 para 0,349, (b) HSP70 A: de 0,781 na para 0,736.



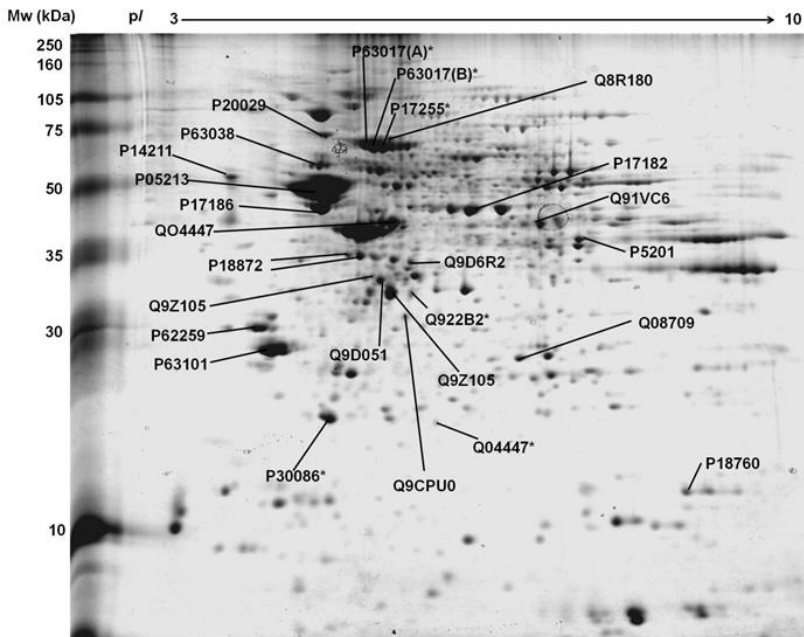
**Figura 17. Variação da expressão das seis proteínas de acordo com o tempo de administração com NMDA (1h, 24h e 72h).** Quatro proteínas foram encontradas super-expressas em 24h (HSP70, proteína de ligação à fosfatidiletanolamina, creatine cinase tipo-B e aspartil – tRNA sintetase) e duas com expressão reprimida em 24h (HSP70 A e a proteína vacuolar V-ATPase).

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Além das proteínas diferenciais foi designado para identificação e caracterização por espectrometria de massa (MALDI-TOF) 22 proteínas não alteradas, uma vez que diversas proteínas seriam necessárias para a geração do quadro de neuroproteção, entre essas se destacaram duas proteínas detectadas somente nos animais protegidos após 24h de administração com NMDA: subunidades alfa e beta da proteína de choque térmico 90 kDa (HSP90) e uma subunidade de HSP70. A localização dessas proteínas estão em destaque no gel na Figura 18.

No processo de identificação proteica foram analisados prioritariamente os valores de pontuação ou *score* (maiores que o limite de significância, no caso era em torno de 76) bem como a percentagem

de cobertura testados contra o banco de proteínas oriundas do *National Center Biotechnology Information* (NCBI) de Rodentia, ambos visualizados no resultado da busca do programa *on line* Mascot. Todos esses dados estão relacionados na Tabela 03.



**Figura 18.** Gel 2-DE da fração proteica de hipocampo (gel de referência) destacando as 28 proteínas identificadas e caracterizadas por MALDI-TOF. A codificação de cada proteína encontrada está de acordo com o banco de dados *Universal Protein Resource* (UniProt) no endereço eletrônico de livre acesso (<http://www.uniprot.org/>).

**Tabela 3. Relação das proteínas identificadas por MALDI-TOF.** A codificação ou número de acesso de cada proteína segue o padrão encontrado no banco de dados UniProt no endereço eletrônico (<http://www.uniprot.org/>), assim como os valores teóricos de *pI* e massa molecular (kDa) foram obtidos a partir banco de dados UniProt. Os valores observados referem-se ao *pI* e massa molecular observados no gel. Foram considerados valores de pontuação ou de *score* maiores que o limite de significância com  $p < 0,05$  (MASCOT, <http://www.matrixscience.com>).

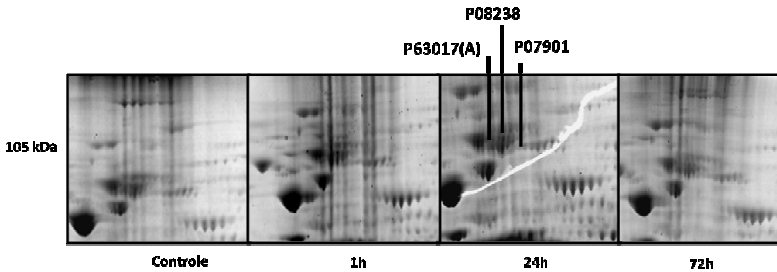
Nº Acesso UniProt	Nome da proteína	Mascot score	% Cobertura	Nº de matches	Observado		Teórico	
					<i>pI</i>	Mw(kDa)	<i>pI</i>	Mw(kDa)
<b>Proteína de choque térmico /Chaperonas</b>								
P07901	Proteína de choque térmico 90 kDa (HSP-90) subunidade alfa**	90	19	13	4,95	98	4,93	84
P08238	Proteína de choque térmico 90 kDa (HSP-90) ou (HSP84) subunidade beta **	83	18	12	4,06	98	4,96	84
P14281	Calreticulina, cadeia A	83	36	5	3,55	51	4,33	47
P20029	Proteína precursora a glicose com78kDa	115	17	9	4,55	72	5,07	72
P63017	Proteína de choque térmico cognata 71 kDa (HSP70)A*	119	34	16	5,01	68	5,37	70
P63017	Proteína de choque térmico cognata 71 kDa (HSP70)B*	157	36	18	4,92	66	5,37	70
P63017	Proteína de choque térmico cognata 71 kDa, cadeia A (HSP70)a**	69	32	11	6,12	69	5,37	70
P63038	Proteína de choque térmico com 60kDa (HSP60)	94	41	7	4,51	57	5,91	60
Q8R180	Proteína alfa ERO-1	66	14	6	5,29	69	6,12	54
<b>Proteínas estruturais</b>								
P68373	Tubulina, cadeia 1C	151	31	10	4,41	47	4,96	49



<b>Proteínas sinalizadoras</b>									
P18872	Nucleotídeo (guanina) de ligação à subunidade alfa da proteína G, isoforma B (2)	94	31	9	4,96	35	5,34	40	
P62814	ATPase vacuolar, subunidade catalítica A *	106	46	9	5,19	66	5,57	56	
P63101	14-3-3 Zeta	70	36	8	4	27	4,73	27	
P70296	Proteína de ligação a fosfotitilatoamina 1 (PEBP-1) *	93	58	6	4,62	19	5,19	20	
<b>Proteínas metabólicas</b>									
O08709	Peroxiredoxina-6	132	45	8	6,72	25	5,71	24	
P05201	Aspartate aminotransferase	77	21	9	7,31	37	6,68	46	
P17182	Alpha-enolase	280	44	19	6,13	43	6,37	47	
P17183	Gama-enolase	227	47	12	4,57	44	4,99	47	
P18760	Cofilin-1	72	43	6	8,54	13	8,22	18	
P62259	14-3-3 proteína épsilon	87	40	11	3,87	30	4,63	29	
Q04447	Aspartil - tRNA sintetase, citoplasmática*	126	41	7	5,54	32	6,06	57	
Q91VC6	Glutamina sintetase	161	36	15	7,05	37	6,64	42	
Q922B2	Creatina cinase tipo B *	60	37	14	6,16	20	5,4	42	
Q9CPU0	Lactoilglutatomina liase	67	26	5	5,48	31	5,24	20	
Q9D051	Pinuvate desidrogenase E1 subunidade beta	60	43	10	5,19	33	6,41	38	
Q9D6R2	Isocitrato desidrogenase 3 (NAD) alfa	92	33	9	5,54	34	6,27	39	
Q9Z105	Fosfatase subunidade regulatória 7	62	26	6	5,34	32	4,85	41	

\*Proteínas com expressão diferencial significativa com  $p < 0,05$ . \*\* Proteínas encontrados exclusivamente em 24h.

Além dos *spots* diferenciais foi possível localizar *spots* exclusivos em géis de 24h. Três deles estão em destaque na Figura 19. A localização dos *spots* pode ser justificada pela adição de cargas positivas ou negativas às proteínas como fosforilação, acetilação, glicosilação, acarretando em seu aparecimento em géis 24h. Estes *spots* foram identificados por MALDI-TOF: HSP70 cognate 70-kDa, proteína de choque térmico (HSP-90) subunidade alpha e proteína de choque térmico (HSP-90) subunidade beta (HSP84). Proteínas de choque térmico são consideradas cruciais para geração da resposta de neuroproteção em diversos modelos.



**Figura 19. Ampliação da região do gel contendo *spots* exclusivos em 24h, localizados pelo programa Image Master.** Após a identificação por MALDI-TOF foi possível verificar que tais proteínas referem-se a HSP70 cognate 10 kDa indicada pela letra (A), e duas HSP90 subunidade alfa e beta, respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

Foram encontradas seis proteínas com expressão diferencial e significância estatística  $p < 0,05$  entre as condições de indução, as quais foram identificadas e caracterizadas por MALDI-TOF, sendo as funções celulares determinadas como: enovelamento e estabilização proteica realizadas pelas proteínas HSP70, transporte de prótons pela proteína vacuolar ATPase, metabolismo energético representado pela creatina cinase, transdução de sinal realizada pela proteína ligada a fosfatidiletalamina e síntese proteica com a participação da aspartil-tRNA sintetase. A diversidade de funções mediadas por essas proteínas corrobora que o pré-condicionamento por NMDA é um processo relacionado com um extensivo conjunto de respostas, anteriormente reportado por variações na via excitotóxica, inibição da apoptose e aumento dos mecanismos de reparo (SIEGEL, 2006). O entendimento de todas as respostas mediadas por essas proteínas podem ser determinantes no que diz respeito à neuroproteção entre os animais pré-condicionados frente aos não condicionados.

A seguir será discutida cada uma das proteínas encontradas com expressão diferencial para por fim interligar suas funções dentro de um contexto intracelular durante o pré-condicionamento.

### 5.1 ALTERAÇÃO DA RESPOSTA DE CHOQUE TÉRMICO PELAS PROTEÍNAS HSPS

Um dos processos que contribuem com neuroproteção durante o pré-condicionamento é a resposta de choque térmico, proteínas conhecidas por serem induzidas por estresse e que resultem em desnaturação proteica. A super- expressão de HSPs, essencialmente HSP70 têm mostrado proteger células contra apoptose e necrose. Além disso, o aumento da expressão da HSP70 protege o cérebro contra injúrias isquêmicas ou injúrias prolongadas *in vivo*. Estratégias que envolvem a indução dessas proteínas têm sido utilizadas como potenciais alvos terapêuticos contra isquemia em diversos órgãos, incluindo o cérebro de diversas maneiras: (1) aumentando programas de neuroproteção usando a resposta de choque térmico, (2) combinando agentes que atuem em alvos antioxidantes, (3) maximizando a habilidade do cérebro de recompor a integridade e função (SIEGEL, 2006).

Entre as proteínas identificadas neste trabalho, destacaram-se as proteínas de choque térmico HSP70 por estarem alteradas de maneira antagonica. A diferença observada entre as proteínas HSP70(A) e

HSP70(B), não parece estar relacionada às modificações pós-traducionais no período de 24h, as quais poderiam ocasionar um deslocamento do *spot* no gel. Como a expressão destas proteínas já é bastante diferente, mesmo no estado basal (controle), trata-se, portanto, de duas isoformas de HSP70. A grande quantidade de HSP70 cognatas foi demonstrada em estudos anteriores no mapa proteômico de hipocampo em condições normais por Pollak e colaboradores (2006), em que foi possível identificar cerca de 24 cópias da HSP70 com p/Is que partiam de 4,30 até 8,30 (POLLAK et al., 2006).

Ainda neste contexto foi possível verificar que além da proteína HSP70, observou-se que a proteína de choque térmico HSP90 foi encontrada exclusivamente em camundongos tratados durante 24h com NMDA. Neste caso, as subunidades alfa e beta da HSP90 foram encontradas em locais no gel não observados nos outros tempos de indução. Estes resultados apontam uma possível modificação pós-traducional, não estando, portanto, necessariamente relacionado a alterações na expressão gênica das subunidades da proteína HSP90. O mesmo foi visto em (CHEN, 2004) ao reportar que durante o pré-condicionamento térmico a 44° C, foi capaz de proteger o grânulo cerebelar de neurônios de ratos por meio da modulação da expressão da HSP70, mas as outras HSPs como a HSP27 e HSP90 estavam inalteradas em todas as condições. A detecção de alterações da síntese de RNAm de HSP70 foi aumentada gradualmente de acordo com o tempo de indução 30, 60 e 90 minutos. Verificou-se também que a inibição do RNAm de HSP70 por oligodeoxinucleotídeos reverteram os efeitos protetores no pré-condicionamento termal contra a apoptose. Todos esses resultados implicam que a HSP70 possui um importante papel no pré-condicionamento termal (CHEN, 2004).

O papel da chaperona HSP70 é bem caracterizada e reportada como auxiliar durante o enovelamento proteico de proteínas parcialmente enoveladas ou não enoveladas, a qual se liga a fita de polipeptídeos recém-sintetizados em uma região hidrofóbica com sete aminoácidos, antes que a proteína saia do ribossomo. Para tanto as chaperonas utilizam vários ciclos de hidrólise de ATP para o reconhecimento de uma ampla variedade de estruturas erroneamente dobradas e na promoção do enovelamento correto. Além disso, a HSP70 possui função na translocação de proteínas para dentro da mitocôndria (NELSON, 2005). Além desses mecanismos de atuação, muitos outros têm sido descritos. Evidências sugerem que a HSP70 regula a morte celular por apoptose reduzindo os níveis da proteína bcl-2 (anti-morte). Esses resultados mostram que, o potencial neuroprotetor da HSP70 pode contribuir para a redução e

prevenção do dano cerebral por isquemia, melhorando a resposta de pacientes (YASUDA et al., 2005).

Foi verificado também que a HSP70 sofre alterações desde 1h hora de indução culminando em 24h e depois mostra uma tendência a retornar aos níveis encontrados no controle. Em outros trabalhos foi verificado que este tempo de 1h é suficiente para reduzir o volume de infarto em aproximadamente 70% com relação ao controle, quando administrados 1000 mg/Kg de geranylgeranylacetone (GGA) um indutor de HSP 1h antes do insulto isquêmico (YASUDA et al., 2005). Em insultos provocados por oclusão da artéria cerebral (MCA) os níveis de RNAm da HSP70 aumentaram após 1h a 2h de oclusão (MCA) e continuaram a aumentar até 24h. Neste trabalho, em condições normais, os níveis de RNAm de HSP70 não são detectados no cérebro.

Os efeitos de neuroproteção mediados pela resposta de proteínas de choque térmico também foi demonstrado em insultos por hipóxia. Verificou-se que a super-expressão da HSP70 de camundongos neonatos mediava à redução da liberação do citocromo *c* da mitocôndria e a clivagem da caspase-9 também ocorreu por meio do aumento da ligação da proteína HSP70 ao fator de ativação de apoptose -1 (Apaf-1) gerando neuroproteção. Para este fim, o autor criou um camundongo transgênico que super-expressava a HSP70. A super-expressão da HSP70 também reduziu a clivagem da caspase-8. Estudos anteriores do mesmo autor mostraram que a indução da expressão de HSP70 em camundongos selvagens 6 horas antes da injúria não foi capaz de proteger o cérebro contra a isquemia (MATSUMORI et al., 2006), o que indica que a resposta mediada por aumento da expressão de HSP é um evento precoce, que com o passar do tempo é diminuída.

## 5.2 REDUÇÃO DE GLUTAMATO INTRACELULAR PELA PROTEÍNA VACUOLAR ATPASE

A proteína vacuolar ATPase pertence a família de proteínas relacionados ao transporte de prótons. Essa bomba é crucial para a acidificação do meio intracelular de compartimentos, para controlar a concentração de neurotransmissores em vesículas sinápticas, importantes na fusão de membranas. Aparentemente, esta função de dirigir a bomba de prótons em varias membranas inclui: clatrina, vesículas sinápticas, endossomos, vesículas de armazenamento, lisossomos, vacúolo central e membrana plasmática de vários tipos celulares. As ATPases são altamente distribuídas entre procariotos a eucariotos. São ubíquas em todas as células eucarióticas e podem ser encontradas em membranas de

secreção, mas também membranas que envolvem as organelas. A inativação desta proteína está ligada ao aumento da letalidade no desenvolvimento em camundongos. Além disso, um grande número de doenças está relacionado com a sua disfunção como Alzheimer, Parkinson, osteoporose, infecção viral, diabetes entre outras (MOREL, 2003).

Em neurônios, esta proteína é especializada em gerar um gradiente eletroquímico gerado pela entrada glutamato nas vesículas pré-simpáticas e conseqüente saída de íons  $H^+$  da vesícula. Estas vesículas são chamadas de vesículas de transporte de glutamato (V-GLUTS) por mecanismo de antiporte. As V-GLUTS são complexos proteínas multiméricas próton/glutamato antiporte e o gradiente gerado é depende de ATP (MOREL, 2003).

A expressão desta proteína em vesículas sinápticas pode conduzir a um aumento de neurotransmissores nas vesículas sinápticas e geração de uma resposta excitotóxica ainda maior. Trabalhos recentes indicam que o aumento de cálcio e glutamato intracelular é reduzido durante o pré-condicionamento por NMDA (SEVERINO, 2011 manuscrito em conclusão), da mesma maneira esta proteína foi encontrada com diminuição na sua expressão no presente estudo. A redução da proteína vacuolar ATPase no meio intracelular implica em menor influxo de glutamato para as vesículas diminuindo a liberação de glutamato na fenda sináptica, conseqüentemente. Todos esses eventos ocorrem pra diminuir o processo excitotóxico como influxo de glutamato e diminuição da liberação de glutamato, onde ambos contribuem para sustentar as mudanças do glutamato extracelular.

### 5.3 INIBIÇÃO DA TRANSDUÇÃO DE SINAL (VIA MAPK/ERK) PELA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A FOSFATIDILETALOAMINA

Na membrana plasmática, a proteína de ligação a fosfatidiletaloamina é uma proteína básica e ubíqua, que desempenha diversas funções pela ligação a fosfatidiletaloamina e a nucleotídeos, agindo como inibidor endógeno de *raf* cinases e bem como na regulação da transdução de sinal. Além disso, é uma precursora do peptídeo estimulador de nervo colinérgico (HCNP) em hipocampo, um peptídeo com 11 aminoácidos que aumentam a produção de acetilcolinesterases (CHAT) e assistem no desenvolvimento de projeções colinérgicas no septo do núcleo do hipocampo, o qual é clivado na região terminal da proteína (Fundação Oswaldo Cruz/Casa de Oswaldo Cruz- biblioteca *on line*).

Um detalhe que nos chamou atenção foi que em 24 horas os níveis de expressão da proteína de ligação a fosfatidiletaloamima (PEPB) está normal, ou seja, semelhante ao controle. Mas em 1h aparece uma diminuição considerável desta proteína em relação ao controle. Assim, sugere-se que em 1 hora após administração de NMDA a diminuição de PEPB determine a ativação da *raf*, que por sua vez ativa a via de sinalização por MAPK/ERK. Desta maneira, a ativação via MAPK/ERK marcaria um evento precoce do pré-condicionamento por determinar a transcrição de genes que irão mediar às respostas em 24h (evento tardio). No período entre 24h a 72h, observou-se que a expressão de PEPB volta aos níveis basais, isto é, ocorre a inibição de *raf* e por fim diminuindo a sinalização por MAP/ERK. Portanto, a sinalização MAPK/ERK no pré-condicionamento foi considerada parcial. O mesmo foi verificado por Herculano e colaboradores, após a inibição de MAPK/ERK em animais tratados 24h com NMDA, verificou-se que a inibição do pré-condicionamento também foi parcial, o que corrobora com os resultados observados em nosso trabalho (HERCULANO et al., 2011). Assim, inibir a via MAPK/ERK em animais tratados (24h) não seria muito efetivo, mas se os testes tivessem sido realizados até 1h depois da administração de NMDA talvez fosse observada uma inibição total do pré-condicionamento, por inibir os eventos precoces ou os gatilhos do pré-condicionamento.

#### 5.4 AUMENTO DA CREATINA CINASE AUXILIA A MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

A creatina cinase é uma enzima que desempenha um papel central no metabolismo energético essencialmente em tecidos com alta demanda energética como: cérebro, tecido esquelético cardíaco e tecido esquelético. Esta proteína funciona como um efetivo sistema de tampão para o os níveis celulares de ATP, matendo na homeostase energética por meio da transferência do grupo fosfato da fosfocreatina para o ADP, formando o ATP (PILLA et al., 2003).

A creatina cinase possui cinco isoformas em compartimentos celulares diferenciados, sendo duas mitocondriais e três citoplasmáticas. No citosol encontramos os dímeros da creatina cinase sendo denominada creatina cinase tipo B, encontrada predominantemente no cérebro, creatina cinase tipo MB, encontrada predominantemente no miocárdio e creatina cinase tipo MM, predominante do músculo esquelético (LOPES, 2005).

A fosfocreatina tem um papel na manutenção da adenosina trifosfato no cérebro. A concentração da fosfocreatina no cérebro é ainda maior que o ATP, e a creatina fosfoquinase é extremamente ativa. Os níveis de fosfocreatina são extremamente sensíveis a mudanças de oxigenação o que promove a fosforilação do ADP e então a manutenção dos níveis de ATP. O sistema creatina cinase e fosfocreatina desempenha diferentes funções no cérebro tais como: proteção da energia temporária, capacidade metabólica, transferência de energia e controle metabólico. Devido a estas funções cruciais este sistema é reconhecido como um regulador metabólico importante entre estados fisiológicos e patológicos (PILLA et al., 2003). A creatina cinase é empregada como bioindicador, pois é a primeira enzima a ser detectada após um ataque cardíaco, porém desaparece rapidamente. Em seguida aparecem outras proteínas como a lactato desidrogenase (NELSON, 2005).

É importante ressaltar que o cérebro possui uma taxa metabólica especial, com a armazenagem limitada de energia e crítica dependência de glicose. Devido a esta característica, o cérebro exibe uma vulnerabilidade a injúrias isquêmicas mais que outros tecidos. Assim, quando ocorrem estados de hipóxia ou isquemia, os níveis de ATP caem, em seguida ocorre o desequilíbrio das bombas de  $K^{1+}/Na^{1+}$  que despolarizam a membrana celular, assim, ocorre o influxo de  $Ca^{2+}$  (SIEGEL, 2006).

Para evitar o processo desencadeador de exitotoxicidade faz-se necessário que o ATP esteja nos nível normais, mantido em parte pela creatina cinase. Este fato corrobora a super-expressão desta enzima observada em nossas análises. Durante o pré-condicionamento o aumento da expressão desta enzima deve garantir o equilíbrio energético durante o condicionamento e quando um insulto maior foi fornecido. Foi possível observar um crescimento significativo desta enzima em 24h, quando comparado aos demais grupos.

## 5.5 AUMENTO DA SÍNTESE PROTÉICA COM A PARTICIPAÇÃO DA ASPARTIL-TRNA SINTETASE

A biossíntese de proteínas é realizada em 5 etapas: (1) ativação dos aminoácidos, (2) iniciação, (3) alongamento, (4) terminação e liberação, (5) enovelamento e processamento (NELSON, 2005). Surpreendentemente foram encontradas duas proteínas diferenciais envolvidas na tradução. A aspartil-tRNA sintetase na iniciação e as proteínas de choque térmico HSPs atuam na última etapa no enovelamento e processamento pós-traducional de proteínas, chaperonas



responsáveis por conferir conformação à algumas proteínas. Assim, concluímos que a biossíntese de proteínas é um evento crítico durante o pré-condicionamento. Este quadro denota também que em 24h está ocorrendo a fase longa de alteração da expressão de proteínas, comentada anteriormente.

A síntese de proteínas ocorre por meio da leitura do código genético realizado pelos tRNA, sendo que cada molécula de tRNA liga-se a um dos 20 aminoácidos, especificamente. A aminoacil- tRNA sintetase ligada ao tRNA parece com o anticódon à região do RNAm inserido no ribossomo. A interação entre aminoacil-tRNA sintetases ao tRNA têm sido referidas como o segundo código genético, o que reflete seu papel crítico na manutenção da acurácia da síntese de proteínas.

A reação catalisada pela sintetase que liga o aminoácido à extremidade 3' do tRNA é umas das muitas reação celulares associadas à hidrólise de ATP com liberação de energia. A energia dessa ligação é usada posteriormente, na síntese de proteínas, para ligar covalentemente o aminoácido à cadeia polipeptídica em formação. Na maioria das células existe uma enzima específica para cada aminoácido, isto é, 20 sintetases diferentes, entre elas está o aspartil tRNA sintetase específica ao aminoácido aspartato bem como para o tRNA referido.

## 5.6 MODELO PROPOSTO DE INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DURANTE O PRÉ-CONDICIONAMENTO

As seis proteínas determinadas como diferencialmente expressas, atuam em diversas vias intracelulares, que em conjunto irão mediar a neuroproteção durante o pré-condicionamento. Na Figura 20 foi proposto um modelo de interação entre as vias envolvidas pelas proteínas diferenciais juntamente com aquelas já reportadas na literatura, as quais são consideradas ativas durante o pré-condicionamento por NMDA. Estas vias estão associadas com as respostas mediadas pelos receptores NMDAR que culminam com a atenuação de processos que acarretam dano celular como a redução do estresse oxidativo e nitrosativo, disfunção metabólica, inflamação e processos relacionados com a morte celular por apoptose ou necrose, ocorre também ativação de mecanismos envolvidos com a sobrevivência celular e por aumento de reparos endógenos.

O pré-condicionamento inicia-se em 1h após a indução por NMDA, onde a via MAPK/ ERK está ativa e permite a transcrição de genes CREB. Sabe-se que a família das proteínas cinases ativadas por

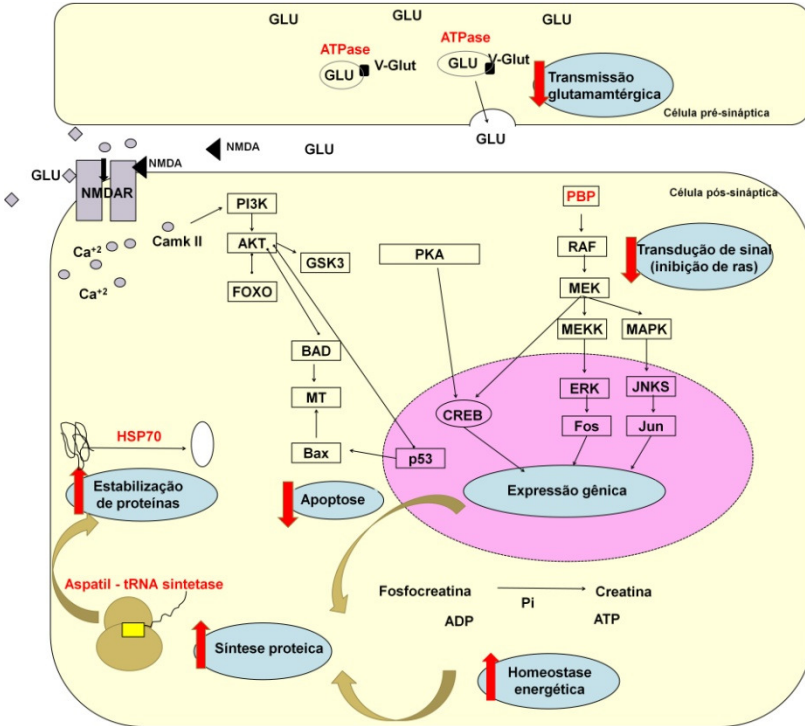
mitógenos (MAPK) são reguladas por sinais extracelulares (ERKs), os quais são componentes essenciais de vias de sinalização que ocasionam uma mudança na função específica de proteínas e expressão gênica. A ativação de MAPK/ERK por *raf* em 1h, portanto, trata-se de um evento precoce, que induz a síntese de genes que irão atuar nos eventos de neuroproteção (24h). Assim, em 24h, a proteína PEPB volta a seus níveis de expressão basais o que denota que a via MAPK/ERK volta a ser reduzida.

Os eventos tardios são marcados pelo aumento da expressão gênica pelas vias PI3K- AKT e PKA. Assim, após a ligação do agonista aos receptores NMDAR ocorrem modificações conformacionais ao receptor NMDAR que permitem a influxo (brando) de glutamato e cálcio. No meio intracelular, o cálcio liga-se a cálcio-calmodulina II (CAMKII), que fosforila e ativa a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), principal via responsável pelas respostas mediadas por NMDA em 24h. A PI3K ativada irá fosforilar a proteína cinase Akt, que fosforila a glicogênio sintase-cinase 3 (GSK3) inativando-a, sua inibição evita a morte celular e promove, portanto, a sobrevivência neuronal (CROWDER; FREEMAN, 2000). A Akt promove a fosforilação da proteína proapoptótica *bcl-2* pertencente à família BAX (*Bcl -2*-proteína associada à morte). A fosforilação desta proteína protege as células contra os efeitos deletérios da ação apoptótica e atenua a via de sinalização de morte celular (DATTA et al., 2002). A AKT ainda fosforila os fatores de transcrições *Forkhead Box sub-group* (FOXO), que têm a capacidade de induzir a expressão de genes tumorais como p53, quando ativada a proteína p53 medeia a expressão de genes pró-apoptóticos incluindo a proteína *bcl-2* (BRUNET; DATTA; GREENBERG, 2001). Além da sua função como supressor de genes de morte celular, a via PI3K-Akt em algumas condições pode controlar a expressão de genes sobrevivência como AMPc e também pelo fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que induz a expressão de genes de sobrevivência (BRUNET; DATTA; GREENBERG, 2001). Quando a atividade proteica da AKT cessa, marca a fase de longa duração na neuroproteção, quando CREB é fosforilada possivelmente pela cálcio-calmodulina (Papadia et al., 2005a). Portanto, após o início da expressão dos gene de CREB, assume-se que, esses genes permanecem ativados muito tempo depois (PAPADIA et al., 2005). O aumento da expressão proteica durante o pré-condicionamento foi observado nesse trabalho pela super-expressão de proteínas que desempenham atividades cruciais na síntese proteica como a aspartil-tRNA sintetase e as proteínas que realizam o envelamento e

estabilização de proteínas recém-sintetizada pelas HSPs em 24h de indução com NMDA.

Além dos eventos intracelulares, durante o pré-condicionamento, ocorre a cooperação de outros receptores como o receptor de adenosina que medeia a regulação de proteínas G que, por sua vez, atuam por meio da proteína adenilato ciclase (AMPC) que fosforila proteína cinase A (PKA) que por fim irá fosforilar e ativar CREB. A proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) é uma proteína cinase efetora da via de sinalização crucial para a plasticidade sináptica, síntese proteica e manutenção da Potenciação de Longa Duração (LTP) e a ativação da proteína de ligação de elementos dependentes de AMP cíclico (CREB).

Entre os eventos recentes e tardios que marcam o pré-condicionamento por NMDA sugerimos que ocorra a manutenção de alterações energéticas por meio da super-expressão da creatina cinase, que atua na transferência de grupos fosforila nas regiões de alto consumo para as de baixo consumo. Da mesma maneira, isto é, entre essas etapas a proteína ATPase vacuolar presente em vesículas sinápticas possivelmente deve atuar ativamente em todo processo diminuindo a transmissão glutamatérgica.



**Figura 20. Modelo de interação entre proteínas identificadas durante o pré-condicionamento.** Os seis proteínas com expressão diferencial atuam em diversas vias para mediar o pré-condicionamento. Após interação NMDA-NMDAR, logo em seguida ocorre o influxo de cálcio, o qual se liga a diversas proteínas cálcio dependentes como a cálcio-calmodulina II (CaMKII) que fosforila e ativa a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), principal via responsável pelas respostas mediadas pelos receptores de NMDA. A PI3K fosforila e ativa Akt que atua sobre várias proteínas de apoptose pela inativação de p53 e BAD. Há um aumento de proteínas envolvidas na tradução como aspartil-tRNA sintetase e proteínas de choque térmico. Durante o pré-condicionamento ocorre a manutenção energética através da creatina cinase, que atua na transferência de grupos fosforil no consumo de regiões de alto consumo. Os eventos finais do pré-condicionamento (durante 24h) a via MAPK / ERK não é ativada por RAF. Similarmente, a proteína presente em vesículas sinápticas vacuolares ATPase, deve desempenhar um papel na redução de todo o processo a transmissão glutamatérgica.

## 6. CONCLUSÕES

- Ao total 12 géis bidimensionais foram analisados provenientes de amostras de proteínas extraídas de hipocampo de camundongos. A solubilização das proteínas foi realizada com detergente CHAPS que mostrou-se eficiente na resolução e posterior identificação e caracterização por espectrometria de massa.

-Os géis 2DE com 13 cm apresentaram melhor resolução e separação proteica, onde foram visualizados em média 900 *spots* por gel corados com Coomassie G-250.

- A associação da técnica de 2-DE a espectrometria de massa mostrou-se adequada para a identificação proteica, entretanto, faz-se necessário aprimorar o método para obtenção de valores de pontuação (*scores*) maiores às proteínas identificadas. No presente estudo foram identificadas 28 proteínas, sendo 9 proteínas de choque térmico ou chaperonas, 5 proteínas de sinalização celular, 1 proteína estrutural e 13 proteínas metabólicas. Todas as proteínas identificadas já foram identificadas em outros proteomas de camundongo bem como em outros organismos. Além disso, a proteômica mostrou-se uma ferramenta para apontar alterações no volume de proteínas nos mapas bidimensionais, o que possivelmente denota a variação na expressão desta proteína bem como na visualização de proteínas exclusivas em cada tempo de indução.

-Seis proteínas destacaram-se por apresentar diferença no percentual de volume entre os perfis proteômicos oriundos de cada tratamento são elas: proteínas choque térmico HSP70 envolvidas estabilização proteica (entre outras inúmeras funções), proteína vacuolar ATPase envolvida no transporte de prótons, creatina cinase tipo-B envolvida no metabolismo energético, proteína de ligação a fosfatidiletalamina envolvida na transdução de sinal e aspartil tRNA sintetase envolvida na síntese proteica. A ativação e integração de todas essas proteínas denota que diversas vias intracelulares associadas atuam em conjunto para mediar o pré-condicionamento e a neuroproteção. A identificação das proteínas relacionadas ao pré-condicionamento pode ajudar a elucidar os mecanismos celulares e moleculares de prevenção bem como na descoberta de novos alvos terapêuticos e a determinar a janela de tempo ideal para tratamentos mais efetivos.

-Espera-se que o mapa proteômico proveniente destes perfis torne-se um instrumento para futuros estudos no que diz respeito ao pré-condicionamento por NMDA, no desenvolvimento de novas técnicas preventivas de doenças do SNC bem como na geração de um maior entendimento do mecanismo neuroprotetor gerado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M.; DE RIVERO VACCARI, J. C.; CORRIVEAU, R. A. Pronounced cell death in the absence of NMDA receptors in the developing somatosensory thalamus. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 9441-9450, 2004.

AHMADIAN, G. et al. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. **EMBO J**, v. 23, n. 5, p. 1040-1050, 2004.

AHN, J. et al. Expression of heat shock transcription factors and heat shock protein 72 in rat retina after intravitreal injection of low dose N-methyl-d-aspartate. **Neuroscience Letters**, v. 433, n. 1, p. 11-16, 2008.

BARRIA, A.; MALINOW, R. Subunit-Specific NMDA Receptor Trafficking to Synapses. **Neuron**, v. 35, n. 2, p. 345-353, 2002.

BEAS-ZÁRATE, C. et al. Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. **Neurochemistry International**, v. 39, n. 1, p. 1-10, 2001.

BOECK, C. R. et al. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 745-750, 2004.

BOECK, C. R. et al. Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 1, p. 17-24, 2005.

BOND, A. et al. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 380, n. 2-3, p. 91-99, 1999.

BRUNET, A.; DATTA, S. R.; GREENBERG, M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 3, p. 297-305, 2001.

CANTÚ, M. D. **Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros**. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos. 259. 2007.

CHEN, L. J. S., X.W.; QIU, P.X.; HUANG, Y.J.; YAN, G.M. Thermal preconditioning protected cerebellar granule neurons of mice by modulating HSP70 expression (*Acta Pharmacologica Sinica* (April 2004) 25, 4 (458-461)). **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 5, p. 553, 2004.

CHEN, W.-Q. et al. Modulation of the hippocampal protein machinery in voluntary and treadmill exercising rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1784, n. 3, p. 555-562, 2008.

CHOI, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 369-379, 1987.

CHUANG, D. M.; GAO, X. M.; PAUL, S. M. N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells. **Molecular Pharmacology**, v. 42, n. 2, p. 210-216, 1992.

CORASANITI, M. T. et al. Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 518-529, 2007.

COSTA, T. et al. N-methyl-D-aspartate preconditioning improves short-term motor deficits outcome after mild traumatic brain injury in mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 6, p. 1329-1337, 2010.

CROWDER, R. J.; FREEMAN, R. S. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34266-34271, 2000.

DATTA, S. R. et al. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. **Developmental Cell**, v. 3, n. 5, p. 631-643, 2002.

DIAO, W.-F. et al. Hippocampal signaling protein levels are different in early and late metestrus in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1774, n. 8, p. 1044-1051, 2007.

DIRNAGL, U.; SIMON, R. P.; HALLENBECK, J. M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 5, p. 248-254, 2003.



- EDGAR, P. F. et al. Proteome map of the human hippocampus. **Hippocampus**, v. 9, n. 6, p. 644-650, 1999.
- FEATHERSTONE, D. E. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 4-12, 2009.
- GIELEN, M. et al. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 703-707, 2009.
- GÖRG, A. **2-D Electrophoresis: Principles and Method**. GE Healthcare. 2004.
- GRAZIOSO, G. et al. Development of a Three-Dimensional Model for the N-Methyl-d-aspartate NR2A Subunit. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 17, p. 5489-5494, 2005.
- GYGI, S. P.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 489-494, 2000.
- HALLAK, M. I., S. M.; JANUSZ, C. A.; COTTON, D. B. . Stimulation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rats: developing a seizure model. **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, n. 3695-700, 2003.
- HAMACHER, M.; MEYER, H. E. HUPO Brain Proteome Project: Aims and needs in proteomics. **Expert Review of Proteomics**, v. 2, n. 1, p. 1-3, 2005.
- HANSEN, H. H. Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. **Neurobiol. Dis.**, v. 16, p. 440-453, 2004.
- HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 81-89, 2003.
- HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 682-696, 2010.
- HUSI, H. et al. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 7, p. 661-669, 2000.
- IKONOMIDOU, C. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Science**, v. 283, p. 70-74, 1999.

IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? **Lancet Neurol.**, v. 1, p. 383-386, 2002.

JANOFF, A. Alterations in Lysosomes (Intracellular Enzymes) During Shock; Effects of Preconditioning (Tolerance) and Protective Drugs. **International Anesthesiology Clinics**, v. 2, n. 2, p. 251-270, 1964.

JIANG, X. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. **J. Neurochem.**, v. 94, p. 713-722, 2005.

KARLSEN, R. L.; FONNUM, F. The toxic effect of sodium glutamate on rat retina: changes in putative transmitters and their corresponding enzymes. **Journal of Neurochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1437-1441, 1976.

KHASPEKOV, L. et al. Sublethal in vitro glucose-oxygen deprivation protects cultured hippocampal neurons against a subsequent severe insult. **NeuroReport**, v. 9, n. 7, p. 1273-1276, 1998.

KITAGAWA, K. et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. **Brain Research**, v. 561, n. 2, p. 203-211, 1991.

KOLB, B. W., L. Q. **Neurociência do comportamento**. 2002.

LIN, S. Y. et al. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. **Molecular Brain Research**, v. 55, n. 1, p. 20-27, 1998.

LINK, A. J. et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat Biotech**, v. 17, n. 7, p. 676-682, 1999.

LOPES, C. F. L. V. T. T. G. D. M. O. B. C. G. A. P. M. V. A. M. S. T. D. A. Determinação de creatina quinase em cães. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 12, p. 31-47, 2005.

LYNCH, D. R.; GUTTMANN, R. P. Excitotoxicity: Perspectives Based on N-Methyl-d-Aspartate Receptor Subtypes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 717-723, 2002.

MA, D. et al. Xenon preconditioning reduces brain damage from neonatal asphyxia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, n. 2, p. 199-208, 2005.

MATSUMORI, Y. et al. Reduction of caspase-8 and -9 cleavage is associated with increased c-FLIP and increased binding of Apaf-1 and

Hsp70 after neonatal hypoxic/ischemic injury in mice overexpressing Hsp70. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 507-512, 2006.

MONYER, H. et al. Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. **Science**, v. 256, n. 5060, p. 1217-1221, 1992.

MOREL, N. Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H+ATPase. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 7, p. 453-457, 2003.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, n. 5, p. 1124-1136, 1986.

NELSON, D. L. C., M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed, Freeman. 2005.

NOH, J.; LEE, E.-S.; CHUNG, J.-M. The novel NMDA receptor antagonist, 2-hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethylbenzylamino)-benzoic acid, is a gating modifier in cultured mouse cortical neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 5, p. 1261-1271, 2009.

OLNEY, J. W. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OLNEY, J. W. et al. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Brain Pathology**, v. 12, n. 4, p. 488-498, 2002.

PAPADIA, S. et al. Nuclear Ca<sup>2+</sup> and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 4279-4287, 2005.

PARDANANI, A. et al. Primer on Medical Genomics Part IV: Expression Proteomics. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 77, n. 11, p. 1185-1196, 2002.

PILLA, C. et al. Kinetic studies on the inhibition of creatine kinase activity by branched-chain  $\alpha$ -amino acids in the brain cortex of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 145-151, 2003.

PINTO, P. M. et al. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-

translationally modified and antigenic proteins. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 83-93, 2007.

POLLAK, D. D. et al. An integrated map of the murine hippocampal proteome based upon five mouse strains. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2787-2798, 2006.

PUGLIESE, A. M. et al. Brief, repeated, oxygen-glucose deprivation episodes protect neurotransmission from a longer ischemic episode in the in vitro hippocampus: Role of adenosine receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 305-314, 2003.

PUISIEUX, F. et al. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. **Brain Research**, v. 1027, n. 1-2, p. 30-37, 2004.

RAVATI, A. et al. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 4, p. 909-919, 2001.

REJDAK, R. et al. Brain tolerance and preconditioning. **Pharmacological Reports**, v. 53, n. 1, p. 73-79, 2001.

RIVA, M. A. et al. Regulation of NMDA receptor subunit messenger RNA levels in the rat brain following acute and chronic exposure to antipsychotic drugs. **Molecular Brain Research**, v. 50, n. 1-2, p. 136-142, 1997.

RIVERA-CERVANTES, M. C. et al. Changes in hippocampal NMDA-R subunit composition induced by exposure of neonatal rats to l-glutamate. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 2, p. 197-204, 2009.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemic preconditioning: An experimental phenomenon or a clinical important entity of stroke prevention? **Journal of Neurology**, v. 249, n. 11, p. 1503-1511, 2002.

SCHURR, A. et al. Excitotoxic preconditioning elicited by both glutamate and hypoxia and abolished by lactate transport inhibition in rat hippocampal slices. **Neuroscience Letters**, v. 307, n. 3, p. 151-154, 2001.

SCOTT, D. B.; BLANPIED, T. A.; EHLERS, M. D. Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and

regulates the surface delivery of NMDA receptors. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 6, p. 755-767, 2003.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SIEGEL, G. A., R. W.; BRADY, S.; PRICE, D. **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and aspects medical**. 7, Elsevier Academy Press. 2006.

SORIANO, F. X. et al. Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 17, p. 4509-4518, 2006.

STONE, T. W.; ADDAE, J. I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **European Journal of Pharmacology**, v. 447, n. 2-3, p. 285-296, 2002.

SUEN, P. C. et al. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 15, p. 8191-8195, 1997.

VANDRESEN-FILHO, S. et al. Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. **Brain Research**, v. 1184, n. 1, p. 38-45, 2007.

WAXMAN, E. A.; LYNCH, D. R. N-methyl-D-aspartate Receptor Subtypes: Multiple Roles in Excitotoxicity and Neurological Disease. **The Neuroscientist**, v. 11, n. 1, p. 37-49, 2005.

WESTERMEIER, R. N., T. **Proteomics in Practice**. Wiley VCH. 2002.

WITT, A.; MACDONALD, N.; KIRKPATRICK, P. Memantine hydrochloride. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 2, p. 109-110, 2004.

YANG, S. et al. Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. **Neuroscience**, v. 154, n. 3, p. 1107-1120, 2008.

YASUDA, H. et al. Neuroprotective effect of a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone in permanent focal cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 1032, n. 1-2, p. 176-182, 2005.

YOUSSEF, F. F.; ADDAE, J. I.; STONE, T. W. NMDA-induced preconditioning attenuates synaptic plasticity in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1073-1074, n. 1, p. 183-189, 2006.

ZHENG, S. NMDA-induced neuronal survival is mediated through nuclear factor I-A in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 120, p. 2446-2456, 2010.

NCBI- National Center Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acessos de setembro a dezembro de 2011.

EXPASY- Expert Protein Analysis System. Disponível em : <<http://expasy.org>>. Acessos de setembro a dezembro de 2011.

UNIPROT- Universal Protein Resource (UniProt). Disponível em <<http://www.uniprot.org>>. Acessos de setembro a dezembro de 2011.

MASCOT Matrix Science. Disponível em <<http://www.matrixscience.com>>. Acessos de setembro a dezembro de 2011.