



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Vias de transdução envolvidas no efeito do VIP na LTP na área CA1 do hipocampo

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Diana Cunha Reis (Instituto de Farmacologia e Neurociências, IMM da Faculdade de Medicina da UL) e supervisão na FCTUC pelo Professor Doutor Carlos Duarte (Universidade de Coimbra)

Nádia Carolina Amorim Rodrigues

2009

AGRADECIMENTOS

No Instituto de Farmacologia e Neurociências, Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa:

Agradeço à Professora Doutora Ana Sebastião e ao Professor Doutor Alexandre Ribeiro por me terem proporcionado realizar o meu projecto de Mestrado no seu laboratório, onde desde o início senti um bom acolhimento e estímulo.

À minha orientadora Doutora Diana Cunha Reis agradeço a sua disponibilidade e apoio que foram fundamentais para a minha integração. Agradeço também a sua preciosa ajuda laboratorial, onde foi notória a sua inteligência e rigor científico, assim como durante a revisão e correcção da dissertação. A sua amizade, compreensão e competência proporcionaram-me uma constante motivação e crescimento do meu interesse científico.

A todos os meus Colegas da Unidade de Neurociências e Farmacologia e da Unidade de Neurociências Celular e Molecular agradeço as suas dicas e apoio laboratorial que sempre satisfizeram as minhas dúvidas e curiosidade científica.

Na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra:

Agradeço a todos os Professores que tive o prazer de conhecer durante o Mestrado e que contribuíram, com os seus ensinamentos, para enriquecer os meus conhecimentos. Ao Professor Doutor Carlos Duarte agradeço ter aceitado a supervisão da minha dissertação. À Professora Doutora Emília Duarte agradeço todo o seu apoio e empenho na coordenação do meu Mestrado. A todos os meus Colegas de Mestrado agradeço a sua colaboração, camaradagem e amizade.

À minha Família agradeço todo o apoio, ajuda e carinho incondicionais, pois estão sempre presentes na minha caminhada e permitem-me sonhar e ter esperança num futuro sempre melhor.

ÍNDICE

Abreviaturas	9
Resumo	13
Palavras-chave	14

Capítulo 1 – Introdução

1.1- Hipocampo	17
1.1.1- Organização anatómica do hipocampo	19
1.1.2- Interneurónios GABAérgicos	21
1.1.3- Ritmo <i>theta</i> no hipocampo	24
1.2- Plasticidade sináptica	25
1.3- Potenciação de longa duração no hipocampo	26
1.4- Receptores AMPA	30
1.4.1- Fosforilação nos receptores AMPA	31
1.5- Péptido vasoactivo intestinal	33
1.5.1- Localização do VIP no hipocampo	33
1.5.2- Receptores do VIP	36
1.5.3- VIP e LTP (resultados prévios)	39
1.6- Objectivos	40

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1- Fármacos	43
2.2- Animais	43
2.3- Dissecção do cérebro de rato e isolamento do hipocampo	43
2.4- Registos electrofisiológicos em fatias de hipocampo	45
2.5- Estimulação das fatias para o estudo da fosforilação da subunidade GluR1 dos Rs AMPA por <i>Western-Blot</i>	48
2.5.1- Isolamento de membranas de hipocampo	49
2.5.2- Determinação de concentração de proteína	50

2.5.3- Quantificação dos níveis de fosforilação das subunidades GluR1 por <i>Western-Blot</i>	50
2.6- Métodos Estatísticos	52
Capítulo 3 – Resultados	
3.1- Envolvimento da PKA e da PKC no aumento da LTP causado pelo bloqueio dos receptores VPAC ₁	55
3.2- Envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos Rs AMPA no aumento da LTP causado pelo bloqueio dos receptores VPAC ₁	58
Capítulo 4 – Discussão	63
Capítulo 5 – Conclusões	69
Referências Bibliográficas	73

ABREVIATURAS

aCSF	(“Artificial CerebroSpinal Fluid”), fluido cerebral-espinal artificial
AMPA	(“ α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate”), α -amino-3-hydroxilo-5-metilol-4-isoxazolo-propionato
ANOVA	(“analysis of variance”), análise de variância
BSA	(“bovine serum albumi”), albumina de soro bovino
CA1	Região <i>Cornu Ammonis</i> 1
CA2	Região <i>Cornu Ammonis</i> 2
CA3	Região <i>Cornu Ammonis</i> 3
CA4	Região <i>Cornu Ammonis</i> 4
CaMKII	(“Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II”), Cinase II dependente de Ca ²⁺ /calmodulina
cAMP	“Cyclic adenosine monophosphate”, Adenosina monofosfato cíclico
CREB	(“cAMP response element binding”), elemento de ligação de resposta ao cAMP
DMSO	(“Dimethyl sulfoxide”), dimetilsulfóxido
EDTA	(“Ethylenediamine tetraacetic acid”), ácido etilenodiamino tetraacético
fEPSPs	(“Field excitatory postsynaptic potentials”), potenciais excitatorios pós-sinápticos de campo
GABA	(“Gamma-AminoButyric Acid”), Ácido gama-aminobutírico

GF109203X	3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1Hpyrrole-2, 5-dione , Inibidor da PKC
GluR1	Subunidade 1 do receptor ionotrópico de glutamato, AMPA
H-89	N-[2-((p-bromocinnamyl)amino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, Inibidor da PKA
HEPES	(“4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanossulfónico
HRP	(“Horseradish Peroxidase), peroxidase de rábano
kDa	kilodaltons
LTD	(“long-term depression”), depressão de longa duração
LTP	(“long-term potentiation”), potenciação de longa duração
min	Minuto
ms	Milisegundos
mV/ms	MiliVolts/ milisegundos
NMDA	(“N-methyl-D-aspartic acid”), N-metil D-aspartato
PG 97-269	[Ac-His ¹ , D-Phe ² , K ¹⁵ , R ¹⁶ , L ²⁷] VIP(3-7)/GRF(8-27), Antagonista selectivo do receptor VPAC ₁
PKA	(“Protein Kinase A”), proteína cinase A
PKC	(“Protein Kinase C”), proteína cinase C
PPF	(“Paired Pulse Facilitation”), facilitação por pulso emparelhado
Rs	Receptores
SDS	(“sodium dodecyl sulfate”), dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina

TBS	(“Tris-Buffered Saline”), Tampão Tris-salino
TBST	(“Tris-Buffered Saline Tween 20”), Tampão Tris-salino com Tween 20
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS-Base)
VIP	(“ Vasoactive intestinal peptide”), péptido vasoactivo intestinal

RESUMO

O péptido vasoactivo intestinal (VIP) é um péptido neuromodulador que se encontra largamente distribuído no sistema nervoso central e periférico e tem um papel determinante em muitas acções biológicas em mamíferos. No hipocampo, é expresso exclusivamente em interneurónios, sugerindo que poderá estar envolvido na regulação da transmissão GABAérgica do hipocampo. O VIP actua através da activação de dois receptores selectivos, o VPAC₁ e o VPAC₂.

Em estudos prévios no nosso laboratório observou-se que o VIP inibe a LTP através da activação dos receptores VPAC₁. Sabendo que as proteínas PKA e PKC são de grande importância na conversão da memória de curta duração em memórias de longa duração, e que as acções via VPAC₁ no hipocampo foram associadas à activação da PKC ou de proteínas Gi, o objectivo deste trabalho foi investigar: 1) o envolvimento da PKA e PKC na inibição da LTP, mediada pelos receptores VPAC₁ e ainda 2) o envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA na serina 845 pela PKA e na serina 831 pela PKC ou CaMKII nessa mesma inibição.

Para tal utilizaram-se fatias de hipocampo de ratos de 6 semanas e efectuaram-se registos extracelulares dos fEPSPs. Foi estimulada a área CA1 no *Stratum radiatum*, ou seja, sobre as fibras colaterais de Schaffer e registaram-se os fEPSPs também no *Stratum radiatum* na zona de contacto entre as fibras colaterais de Schaffer e as dendrites das células piramidais. Induziu-se a LTP por estimulação *theta-burst* (5x4 *bursts* de 100Hz separados por 200ms, durante 1 segundo) e utilizaram-se os inibidores da PKA (H-89, 1µM), PKC (GF109203X, 1µM) para avaliar o envolvimento destas cinases no efeito do antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269 (100 nM) na LTP. A fosforilação da subunidade GluR1 dos Rs AMPA nas serinas 845 (alvo da PKA) e 831 (alvo da PKC e CaMKII) foi avaliada por *Western-blot*, tendo primeiramente as fatias de hipocampo sido submetidas a uma estimulação de campo com um protocolo de estimulação *theta-burst* semelhante ao utilizado nos registos extracelulares.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que quer a presença do inibidor da PKA (H-89,1µM) quer do inibidor da PKC (GF109203X 1µM) não alterou significativamente o efeito do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269, 100 nM) na LTP induzida por *theta-burst*, que apresentou um valor aproximadamente, duas vezes superior ao do da respectiva situação controlo para cada grupo experimental. É

ainda de salientar que por si só, a presença quer do inibidor da PKA (H-89) quer do inibidor da PKC (GF109203X) não alterou significativamente a LTP obtida em situação controlo (vias controlo - 1º *theta-burst*). No estudo da fosforilação da subunidade GluR1 observou-se que o antagonista dos receptores VPAC₁ alterou significativamente a fosforilação unicamente na serina 845. No entanto não houve alterações na fosforilação da GluR1 em resposta à estimulação *theta-burst*.

Em conclusão, a inibição da LTP por acção do VIP endógeno não depende da actividade das proteínas PKA e PKC, nem da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA. No entanto, a inibição da fosforilação da GluR1 pelo VIP endógeno poderá ser importante na regulação da *late-LTP*.

Palavras-chave: VIP, LTP, *theta-burst*, VPAC₁, PKA, PKC, fEPSP, hipocampo, CA1.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1- Hipocampo

O hipocampo é um dos componentes do cérebro humano que se localiza na zona central, na base dos lobos temporais do córtex cerebral (Figura 1). O seu nome deriva do grego (*hippos* = cavalo, *kamos* = monstro marinho) devido à sua grande semelhança com o cavalo-marinho. É considerado a sede da memória, estando envolvido no armazenamento temporário da informação e das memórias recentes e em fenómenos da formação da chamada memória de longa duração. Desempenha também um importante papel na navegação espacial (Best *et al.*, 2001; Burgess *et al.*, 2002; Lopes da Silva *et al.*, 1990).

O sistema límbico é constituído por um conjunto de estruturas circunjacentes ao tronco cerebral que se interconectam. Ele constitui uma associação entre partes do cérebro e diencefalo que englobam: os lobos do córtex cerebral (especialmente o córtex de associação límbico), diversos núcleos da base, o hipocampo, a amígdala, o fórnix (conjunto de feixes que fazem a ligação entre o hipocampo e hipotálamo), o septo, o tálamo e o hipotálamo. Todas as estruturas deste complexo sistema encontram-se fortemente interligadas e estão envolvidas em mecanismos de sobrevivência básica, na motivação, na aprendizagem e nas emoções (Sherwood, 2007).

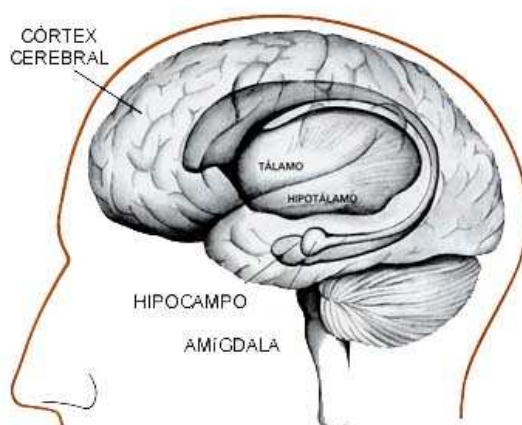


Figura 1. Localização do hipocampo no cérebro humano (<http://cienciahoje.uol.com>).

O hipocampo apresenta uma organização bastante regular ao longo do seu eixo septo-temporal, sendo assim ideal para investigações anatómicas e fisiológicas. Foi através dos estudos do médico espanhol Santiago Ramón y Cajal, prémio Nobel da Medicina em 1906, e do seu discípulo Rafael Lorente de Nó que se ficou a conhecer a maioria da informação existente sobre a sua organização estrutural, as suas redes de conectividade celular e os circuitos neuronais (Fairén, 2007; Figura 2). Danos severos no hipocampo resultam em profundas dificuldades na formação de novas memórias (amnésia anterógrada) e muitas vezes também afectam as memórias anteriores à lesão (amnésia retrógrada).

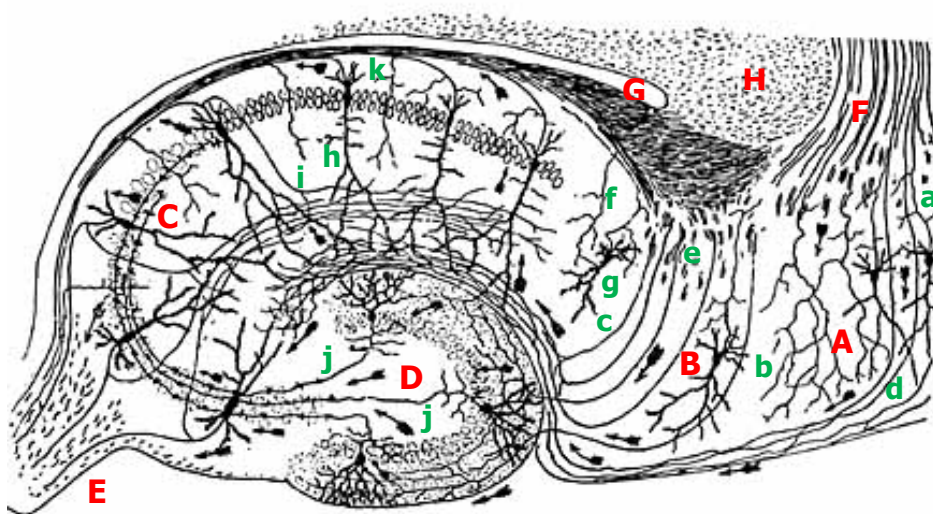


Figura 2. Organização neuronal do hipocampo de rato: **A**-cortex entorrinal, **B**,-*Subiculum*, **C**- *Cornu Ammonis*, **D**- *Gyrus dentatus*, **E**- Fornix, **F**- fibras aferentes ao cortex entorrinal, **G**- *Stratum Alveus*, **H**- matéria cinzenta periventricular; **a**- axónio da célula piramidal, **b**- terminais de axónios, **c**- fibras perforantes profundas, **d**- fibras perforantes superficiais, **e**- feixe perforante profundo, **f**- fibras da fímbria, **g**- neurónio piramidal, **h**- dendrite apical de um neurónio piramidal do hipocampo, **i**- fibra colateral de Schaffer, **j**- fibra musgosa com origem em célula granulosa do *Gyrus dentatus*, **k**- axónio colateral recorrente de um neurónio piramidal (Adaptado de Shepherd, 2003; inicialmente descrito em Ramón y Cajal, 1911).

1.1.1- Organização anatómica do hipocampo

A estrutura do hipocampo engloba duas camadas de tecido cortical interligadas entre si, organizadas à volta de dois diferentes tipos de células, a camada de células granulares do *Gyrus dentatus* e a camada de células piramidais do *Cornu Ammonis*. O *Gyrus dentatus* é constituído por três camadas: o *Stratum Moleculare*, que contém dendrites dos neurónios granulosos; o *Stratum Granulosum*, que contém os corpos celulares das células granulosas; o *Stratum Polymorfum*, também conhecido como região hilar, constituído pelos neurónios polimórficos (interneurónios) e axónios dos neurónios granulares.

O *Cornu Ammonis* é ainda dividido em quatro áreas, designadas CA1, CA2, CA3 e CA4, onde CA abrevia o seu nome *Cornu Ammonis*. A área CA1 encontra-se perto do *Subiculum* adjacente ao córtex entorrinal e a região CA4 contacta directamente com o *Gyrus dentatus* (Figura 3.A e B). O *Cornu Ammonis* encontra-se também estratificado em cinco diferentes camadas (Lopes da Silva *et al*, 1990; Cunha-Reis, 2006): o *Stratum Lacunosum-moleculare* que contém as dendrites apicais das células piramidais; o *Stratum Radiatum*, que contém (na área CA1) as fibras colaterais de Schaffer, os axónios das células da região CA3, que aqui formam sinapses com as dendrites das células piramidais da região CA1; o *Stratum Pyramidale*, que contém os corpos celulares das células piramidais. Estas células correspondem a cerca de 90% dos neurónios do hipocampo; o *Stratum Oriens*, que contém as dendrites basais das células piramidais e os corpos celulares dos interneurónios GABAérgicos e o *Stratum Alveus*, que contém os axónios das células piramidais.

As vias excitatórias do hipocampo constituem um circuito tri-sináptico lamelar em série. No hipocampo do rato este circuito é perpendicular ao eixo longitudinal do hipocampo. Neste circuito, em condições normais, as células granulares do *Gyrus dentatus* recebem sinais excitatórios glutamatérgicos, provenientes do córtex entorrinal (camada II), através da via perforante (Figura 3.D). As células entorrinais da camada II projectam também os seus axónios às regiões CA2 e CA3. Das células granulares do *Gyrus dentatus* partem fibras axonais que formam a via das fibras musgosas que se projectam sobre a região CA3 e CA2. Por sua vez os neurónios piramidais da região CA3 enervam a região CA1 através das vias das fibras colaterais de Schaffer, que formam sinapses excitatórias glutamatérgicas (Shepherd, 2003, Figura 3.D). Os axónios das células piramidais da região CA1 estão organizados no *Stratum Alveus* e projectam-

se lateralmente para o *Subiculum* e outras áreas constituindo a principal via de saída de informação (*output*) do hipocampo.

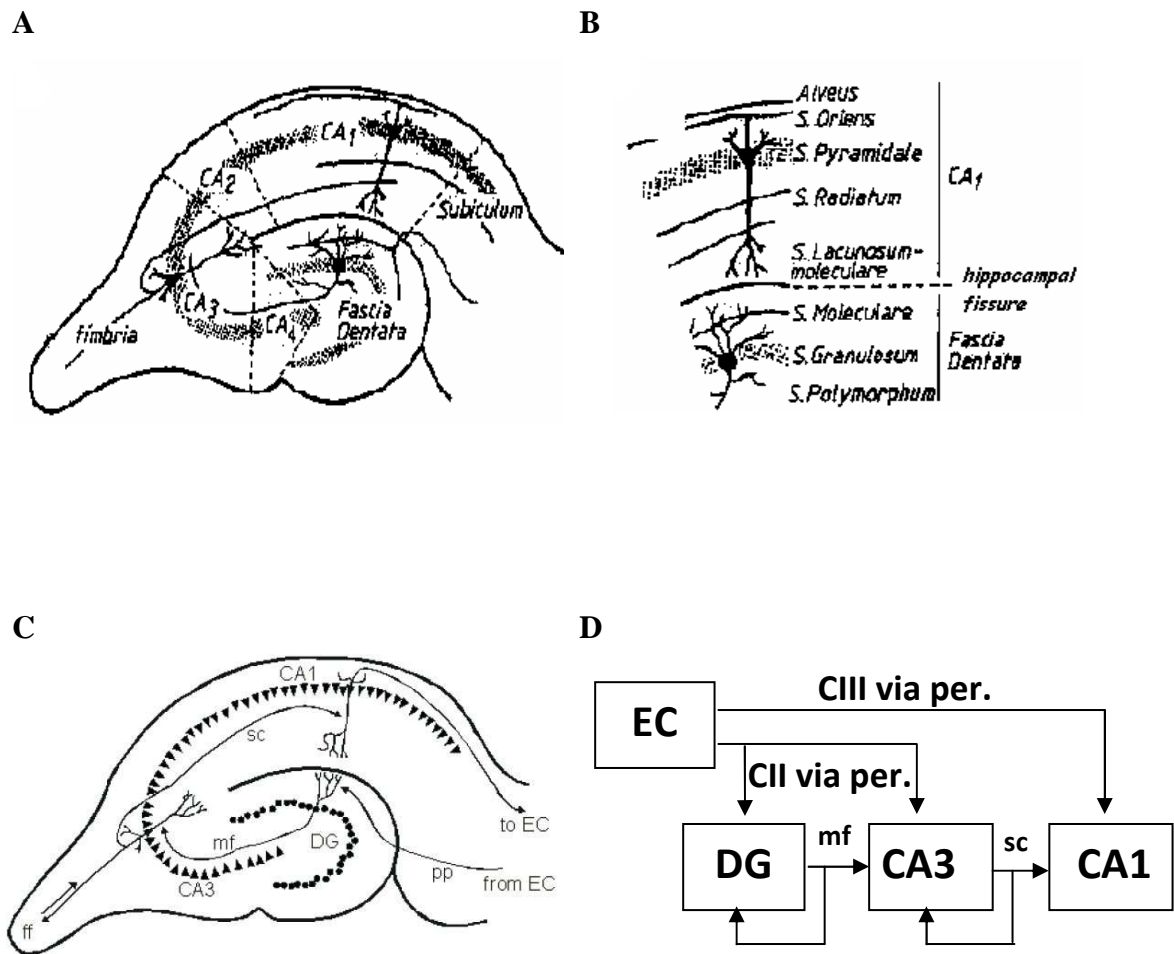


Figura 3. Anatomia do hipocampo. (A) Representação transversal de uma fatia de hipocampo com indicação da localização de diferentes áreas e indicação do circuito excitatório tri-sináptico, (B) Representação das camadas constituintes do *Cornu Ammonis* e do *Gyrus dentatus*, (C) Indicação do circuito excitatório tri-sináptico numa fatia de hipocampo. (D) Esquema representativo do circuito excitatório tri-sináptico do hipocampo *DG*- *Gyrus dentatus*, *EC*- córtex entorrinal, *ff*- fibras da *fímbria*, *mf*- fibras musgosas, *sc*- fibras colaterais de Schaffer, CIII via perf.- camada III da via perforante, CII via perf.- camada II da via perforante, (A. e B. Cunha-Reis, 2006; inicialmente descrito em Andersen *et al.*, 1971 e Amaral e Witter, 1989; C. <http://www.uku.fi/neuro>).

1.1.2-Interneurónios GABAérgicos

O hipocampo contém, em todas as suas áreas, interneurónios que correspondem a cerca de 10% da sua constituição neuronal (Lopes da Silva *et al.*, 1990). Estes usam o neurotransmissor inibitório GABA e desempenham importantes funções tais como a inibição perisomática das células excitatórias e a inibição retrógrada.

Devido à sua grande heterogeneidade quer a nível da sua morfologia, características electrofisiológicas e marcadores moleculares existem vários critérios para a sua classificação. Segundo Sik *et al.* (1994) podem ser considerados dois grandes grupos de interneurónios na área CA1 tendo em conta a morfologia das suas projecções axonais. Um dos grupos é caracterizado por possuir pequenas arborizações axonais que são restritas relativamente a outros interneurónios. Deste grupo fazem parte as chamadas células “basket”, as células axoaxónicas e os interneurónios da camada *Stratum Oriens* e *Alveus*, que concentram colaterais axonais no *Stratum Lacunosum-moleculare*. Os interneurónios do segundo grupo apresentam ramificações axonais muito mais elaboradas interagindo com outros interneurónios e células de várias zonas do hipocampo. Deste grupo fazem parte os interneurónios biestratificados, trilaminares e ainda os interneurónios que se projectam para trás, da área CA1 para a área CA3, e para o *Gyrus dentatus* (Somogyi e Klausberger, 2005).

Vários estudos tornaram evidente que os interneurónios do hipocampo se encontram organizados em redes, sendo responsáveis pela coordenação da actividade oscilatória (Buzsáki, 2001). Vários marcadores químicos evidenciaram a natureza inibitória dos interneurónios como o GABA, GAD65 e GAD67 e verificou-se a existência de diferentes tipos de péptidos e proteínas de ligação ao Ca^{2+} na sua constituição, tais como o péptido vasoactivo intestinal (VIP), o neuropeptídeo Y, a parvalbumina, a calbindina, a substância P, a somatostatina, a calretinina e a colecistocinina, o que permite uma classificação de subpopulações nos interneurónios. De acordo com a sua morfologia podemos distinguir cerca de vinte tipos diferentes de interneurónios, com uma grande variedade na forma, na extensão das ramificações e na distribuição dos diferentes componentes celulares (dendrites, soma e projecções axonais) pelas diferentes camadas do hipocampo.

Segundo a classificação usada por Somogyi e Klausberger (2005) as células “basket” são responsáveis pela inibição perisomática. Estas células podem ainda ser subdivididas em três grupos, de acordo com o seu conteúdo neuroquímico, sendo que

um deles contém VIP. Os interneurónios que selectivamente têm como alvo outros interneurónios podem ser subdivididos em três grupos (I, II e III), de acordo com as camadas em que se projectam e com o seu conteúdo neuroquímico. Os grupo II e III são interneurónios que contêm VIP (Figura 4). Os interneurónios do *Stratum Lacunosum-moleculare* recebem a maioria dos seus *inputs* excitatórios (cerca de 70%) das projecções retrógradas das células piramidais da área CA1 e parecem ser responsáveis pela inibição *feedback* das dendrites das células piramidais e pela enervação de outros interneurónios nesta camada. Estas células são também alvo dos interneurónios do grupo III que contêm VIP.

Um estudo bastante importante identificou o número total de sinapses (inibitórias e excitatórias) que servem de *input* aos diferentes tipos de interneurónios da área CA1 do hipocampo (Gulýas *et al*, 1999). Embora o número total de sinapses seja maior nos interneurónios que contêm parvalbumina (~16.000) do que nos que contêm calbindina (~4.000) ou calretinina (~2.200), os *inputs* GABAérgicos são em maior número nos interneurónios que contêm calbindina (~30%) em relação aos que contêm calretinina (~20%) ou parvalbumina (~6%). O padrão de inervação glutamatérgica é também distinto já que os interneurónios que contêm parvalbumina e calretinina recebem sinapses de todas as camadas do hipocampo, enquanto os que contêm calbindina recebem fundamentalmente sinapses das fibras colaterais de Schaffer do *Stratum radiatum*. Os interneurónios que contêm parvalbumina e calretinina, por sua vez, são activados de maneira anterógrada tanto pelas fibras colaterais de Schaffer como pelas fibras entorrinais e por aferentes talámicos e ainda de uma maneira retrógrada por colaterais recorrentes da região CA1.

Os interneurónios do hipocampo têm várias características eléctricas e de disparo que são fundamentalmente distintas das que caracterizam as células piramidais. Entre as características que mais se destacam estão: a elevada frequência de disparo, potenciais de acção mais rápidos, assim como os seus EPSPs, elevada hiperpolarização após o disparo, acomodação de disparo quase ausente e, por último, têm um potencial de repouso cerca de 10-15mV mais despolarizado, o que faz com que os interneurónios sejam mais facilmente excitáveis do que as células piramidais (ver Jonas *et al.*, 2004; McBain e Fisahan, 2001 para revisão).

Outra importante característica dos interneurónios do hipocampo é a existência de sinapses eléctricas entre interneurónios com as mesmas propriedades de disparo, o

que proporciona uma sincronização em populações definidas de interneurónios e forma a base dos ritmos oscilatórios de populações neuronais do hipocampo (Buzsáki, 2001).

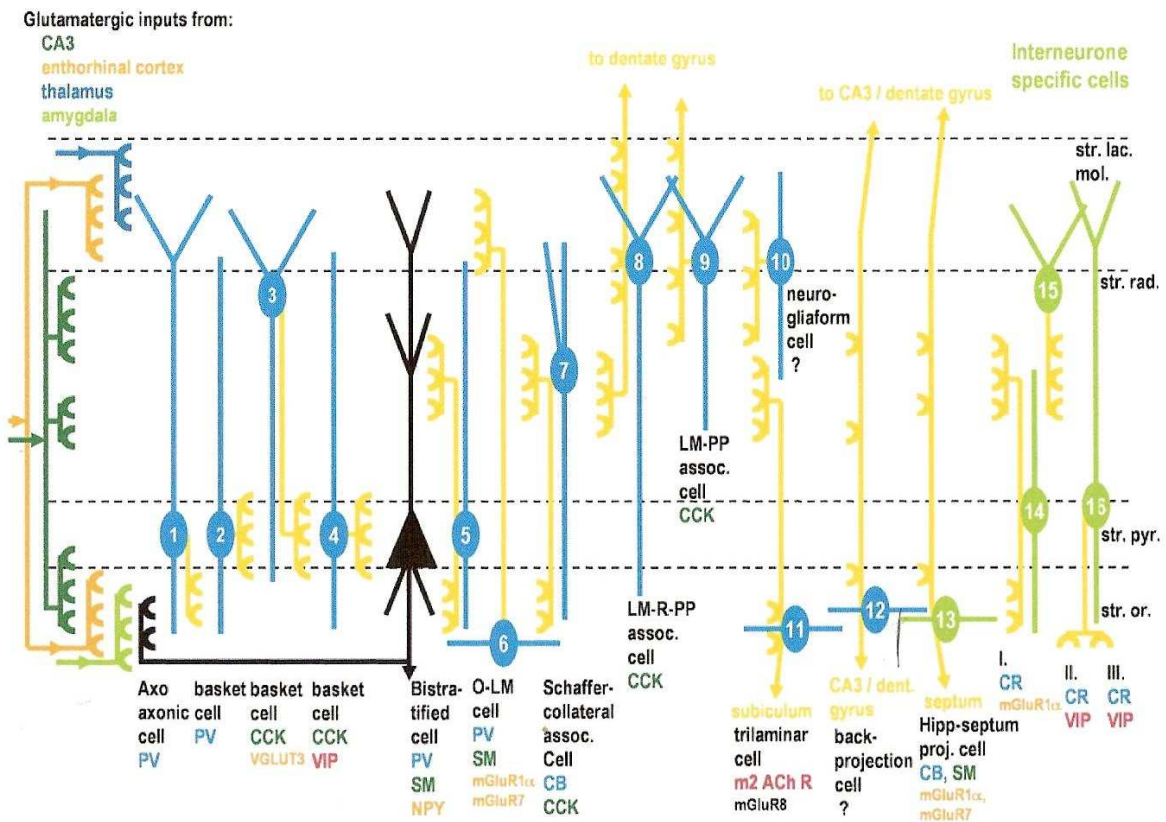


Figura 4. Subtipos de interneurónios na área CA1 do hipocampo. Os interneurónios 1-12 enviam as células piramidais e 13-16 têm como alvo outros interneurónios. O corpo celular e dendrites dos interneurónios encontram-se a azul ou verde e as projecções dos axónios estão a amarelo. Os *inputs* glutamatergicos da área CA3 apresentam-se de cor verde escura, do córtex entorrinal a amarelo, do tálamo a azul e da amígdala a verde claro. A preto encontram-se as enervações de uma célula piramidal. O nome e os marcadores neuroquímicos de cada interneurónio encontram-se assinalados por baixo de cada célula: CB- calbindina, CCK, colecistocinina; CR, calretinina; LM-PP, via perforante *lacunosum-moleculare*; LM-R-PP, via perforante *lacunosum-moleculare radiatum*; m2, receptor tipo 2 muscarínico; mGluR7,8, receptores metabotrópicos de glutamato 7 e 8; NPY, neuropeptídeo Y; PV, parvalbumina; SM, somatostatina; VIP, péptido vasoactivo intestinal; VGLUT3, transportador vesicular de glutamato; *str.lac mol*, *Stratum lacunosum-moleculare*; *str.rad*, *Stratum radiatum*; *str. pyr*, *Stratum pyramidale*; *str.or*, *Stratum Oriens* (Adaptado de Cunha-Reis, 2006, inicialmente descrito em Somogyi e Klausberger, 2005).

1.1.3-Ritmo *theta* no hipocampo

O ritmo *theta* (5-12Hz) é um dos ritmos cerebrais mais estudados, e é observado no eletroencefalograma dos mamíferos durante a exploração/locomoção e durante o sono REM (Figura 5). Este ritmo atraiu especial atenção devido ao seu envolvimento em funções mnemónicas no hipocampo (Buzsáki, 2002), nomeadamente a formação de memórias de curta duração, e é em grande parte dependente da regulação do hipocampo por *inputs* colinérgicos do septo médio (Buzsáki, 2002; Mackay, 2006).

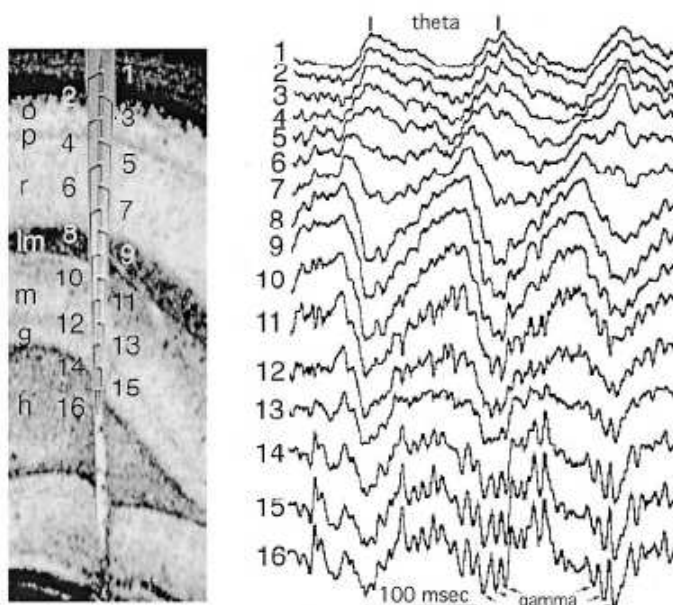


Figura 5. O ritmo *theta* medido em vários pontos de profundidade na região CA1 do hipocampo, com o auxílio de uma sonda de silicone. Ondas gama encontram-se assinaladas com setas, *o- stratum Oriens*, *p-* camada de células piramidais, *r- stratum Radiatum*, *lm- stratum Lacunosum-moleculare*, *g-* camada de células granulosas, *h-* região hiliar (Buzsaki, 2002, inicialmente descrito em Bragin *et al.*, 1995).

O mecanismo através do qual o ritmo *theta* influencia a formação de memórias no hipocampo parece residir na sua capacidade de potenciar a força de *inputs* que chegam simultaneamente com a fase positiva deste ritmo. Assim, a combinação de *inputs* de fracos de alta frequência (portadores de informação) com um ritmo forte de baixa frequência (*theta*) na sua fase positiva (despolarizante), permitem a activação dos receptores NMDA e conseqüentemente alterações de longo termo nestas sinapses (ver secções seguintes para mecanismos), que se pensa estarem na base das alterações de

processamento necessárias ao armazenamento de memórias (ver Malenka e Nicoll, 1999; Vertes *et al*, 2004; Vertes, 2005 para revisão). Este fenómeno parece estar relacionado com a coexistência temporal da libertação de glutamato pelas fibras portadoras de informação e a despolarização dos seus alvos celulares pelo ritmo *theta*.

1.2- Plasticidade sináptica

Uma das mais importantes propriedades do cérebro é a plasticidade, uma vez que é neste fenómeno celular que se baseia a constante mudança do cérebro ao longo da vida do indivíduo. A capacidade para aprender e formar memórias é possível, devido à constante mudança neuronal (plasticidade), pois as sinapses têm um aspecto dinâmico, permitindo assim uma grande comunicação entre neurónios, com formação de novas e maiores redes de ligação neuronal (Lee, 2006). Os princípios celulares para a aprendizagem e memória residem assim em modulações sinápticas de curta e longa duração desencadeadas por mecanismos de plasticidade sináptica.

A plasticidade sináptica pode assumir muitas formas e ter diferentes janelas temporais. Várias formas de **plasticidade sináptica de curta duração** (de milisegundos a vários minutos) foram observadas nas sinapses de vários organismos, desde invertebrados a mamíferos (Zucker e Regehr, 2002). Este tipo de plasticidade tem um importante papel em adaptações de curta duração, devido a inputs sensoriais, mudanças transitórias de estados de comportamento e formas de memória de curta duração. A maioria das formas de plasticidade sináptica de curta duração é desencadeada por pequenos estímulos que causam uma acumulação transitória de Ca^{2+} nos terminais nervosos pré-sinápticos, o que desencadeia alterações na libertação dos neurotransmissores, modificando os processos bioquímicos de exocitose das vesículas sinápticas (ver Citri e Malenka, 2007 para revisão).

As formas de plasticidade sináptica mais estudadas no sistema nervoso central, na transmissão sináptica excitatória, são as de **plasticidade de longa duração**: potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD). Ambos estes fenómenos foram observados na região CA1 do hipocampo e são desencadeados pela activação dos receptores NMDA e subsequente aumento da concentração do Ca^{2+} pós-sináptico, que constituem elementos moleculares essenciais na aprendizagem.

Para desencadear um fenómeno de LTP, é necessário um estímulo de alta frequência (ex.100 Hz) de curta duração, que desencadeia uma despolarização permitindo a activação dos receptores NMDA. Em estudos de aprendizagem em ratos, observou-se que ao bloquear os receptores NMDA com o antagonista AP5, que também é um inibidor da LTP, verificavam-se deficiências na formação de memórias, o que prova que há uma relação funcional entre eles (Morris *et al.*, 1986). Embora os processos de transdução de sinal da LTP estejam longe de serem totalmente compreendidos, uma das proteínas que se pensa desempenhar um papel determinante é a cinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), já que em experiências de inibição pós-sináptica desta proteína, a LTP não foi induzida (ver Citri e Malenka, 2007; Lynch, 2004 para revisão).

A indução de LTD observa-se *in vitro* quando se utilizam estímulos de baixa frequência (0.5- 3Hz) e requer uma concentração de Ca^{2+} intracelular pós-sináptico inferior à necessária na LTP. Envolve a activação de proteínas tais como a PP1 que se acredita desempenhar as mesmas funções que a CaMKII na LTP (Citri e Malenka, 2007; Malenka e Bear, 2004).

Nesta dissertação vai ser abordado, mais detalhadamente, o fenómeno de plasticidade sináptica da potenciação de longa duração na área CA1 do hipocampo.

1.3- Potenciação de longa duração no hipocampo

A potenciação de longa duração (LTP) foi primeiramente observada *in vivo* por Terje Lømo e colaboradores em 1966 no *Gyrus dentatus* do hipocampo, que ao induzir uma estimulação eléctrica de alta frequência (100Hz) na via perforante durante alguns segundos produziu um aumento dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (fEPSPs, Figura 6). Este aumento pode durar várias horas, dias ou mesmo meses. Em 1975 a LTP foi observada na área CA1 do hipocampo após estimulação tetânica por Schwartzkroin e Wester. Estudos posteriores vieram demonstrar a sua dependência pelo Ca^{2+} (Dunwiddie e Lynch, 1979) e pelos receptores NMDA (Collingridge *et al.*, 1983).

Do ponto de vista funcional, a LTP corresponde a um processo de facilitação do sistema nervoso, que pode afectar tanto a transmissão sináptica como a excitabilidade neuronal, e cujo estabelecimento depende da duração e da frequência do estímulo repetitivo. Este fenómeno é proposto como o modelo experimental para as alterações

sinápticas que estão na base da aprendizagem e da memória (Lømo, 2003; Malenka e Nicoll, 1999). A LTP apresenta características comuns ao próprio processo de formação da memória tais como: a) ocorrer no hipocampo; b) ser induzida rapidamente, fortalecida, prolongada por repetições e entrar posteriormente em estabilização; c) o tipo de estimulação que a induz mimetiza o ritmo *theta* que é registado no hipocampo durante comportamentos de aprendizagem; d) inibidores da LTP também bloqueiam a aprendizagem e a retenção de tarefas, e e) há uma semelhança entre as alterações bioquímicas após a sua indução e as que ocorrem durante o processo de aquisição de memórias (Larson *et al.*, 1986; Rose e Dunwiddie, 1986).

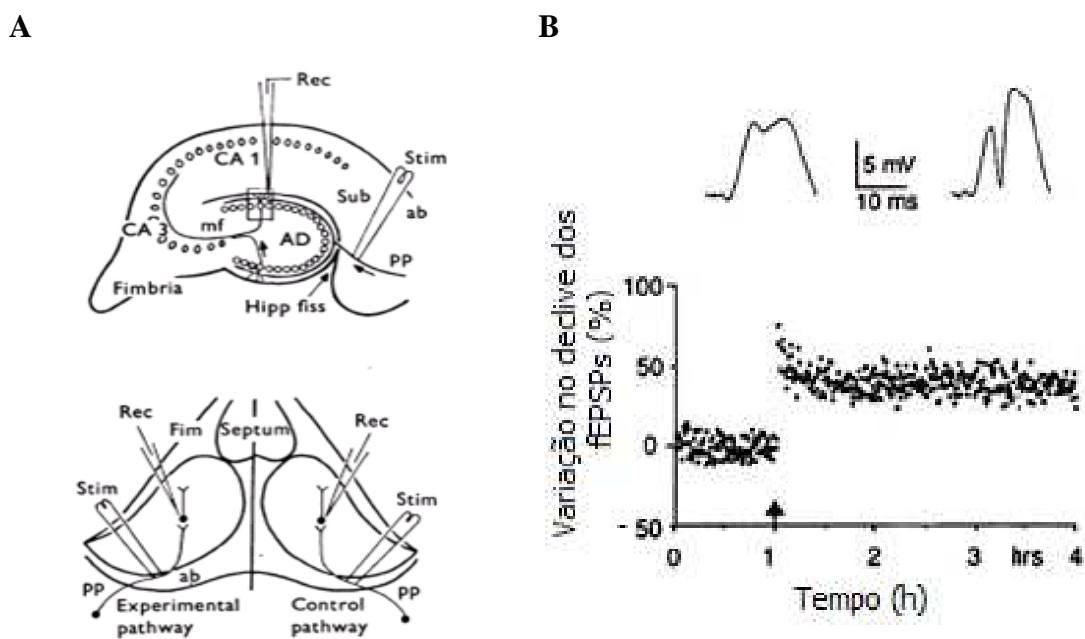


Figura 6. Descoberta da LTP *in vivo* no *Gyrus dentatus*. (A) Diagrama ilustrando a colocação dos eléctrodos na experiência original. (B) Aumento dos declives dos fEPSPs após um estímulo de alta frequência, 100Hz (400 pulsos), na via perforante (Bliss e Lømo, 1973).

Outro argumento que suporta a hipótese da LTP ser o substrato biológico de algumas formas de memórias, são as suas quatro propriedades básicas: a) persistência – o seu efeito pode durar de vários minutos a muitos meses; b) especificidade para o input – a eficiência de comunicação aumenta na sinapse estimulada sem afectar outras sinapses da célula; c) associatividade - quando uma estimulação fraca de uma só via não é suficiente para induzir a LTP, os estímulos fortes de outra via vizinha induzem a LTP

em ambas e d) cooperatividade – a LTP pode ser induzida através de um estímulo forte numa só via, ou então através de um estímulo fraco em várias vias por cooperatividade (Lynch, 2004; Malenka e Nicoll, 1999).

Também em analogia com a memória, a LTP é constituída por duas diferentes fases temporais, a *early-LTP* e a *late-LTP*. A *early-LTP* é geralmente induzida por estimulação fraca, muito rápida, como a estimulação *theta-burst* (ex: 5 *bursts* de 100Hz, 4 pulsos, separados por 200ms durante 1 segundo), ou de trem de alta frequência (HFS, ex. 100 pulsos/100 Hz durante 1 s) e é caracterizada por ser independente da transcrição genética e da síntese proteica, tendo a duração de aproximadamente 1 a 3 horas (Vertes, 2005). A *late-LTP* pode ser induzida por HFS repetida (3 a 5 trens, separados por 3 a 8 min) ou por estimulação *theta-burst* forte (ex: 15 *bursts* de 100Hz, 4 pulsos, separados por 200ms durante 3 s, em trem único ou múltiplos trens, separados por 3 a 10 min), que pode persistir durante largas horas, dias ou mesmo semanas e requer fenómenos de transcrição e tradução genética e por isso se relaciona mais com mecanismos de formação de memórias (Frey e Morris, 1997, 1998a,b; Vertes, 2005; Nguyen e Kandel, 1997).

O tipo de estimulação usado para induzir a LTP evoluiu ao longo do tempo. Aquando da sua descoberta no *Gyrus dentatus* por Lømo e seus colaboradores foi usada estimulação de alta frequência (Figura 6), padrão de estimulação que se utilizou também aquando da descoberta da LTP na área CA1 do hipocampo mas que desde cedo levantou questões relativamente à sua relevância fisiológica pois este tipo de actividade (100Hz, durante 1s) é pouco observada na área CA1 do hipocampo. Os inputs da área CA1 do hipocampo não disparam mais do que 3 a 4 potenciais de acção a esta frequência. Assim, desenvolveram-se novos protocolos, como por exemplo o *theta-burst* (Morgan e Teyler, 2001; Pavlides *et al.*, 1988) que permite uma indução da LTP eficiente com uma actividade dos colaterais de Schaffer fisiologicamente próxima do que ocorre durante episódios de formação de memórias e aprendizagem observados em animais (ver Ritmo *theta* no hipocampo). Vários estudos parecem evidenciar que os mecanismos de regulação do Ca^{2+} e outros mecanismos de transdução envolvidos na LTP gerados por estes dois tipos de estimulação poderão ser muito diferentes (ver Albensi *et al.*, 2007 para revisão).

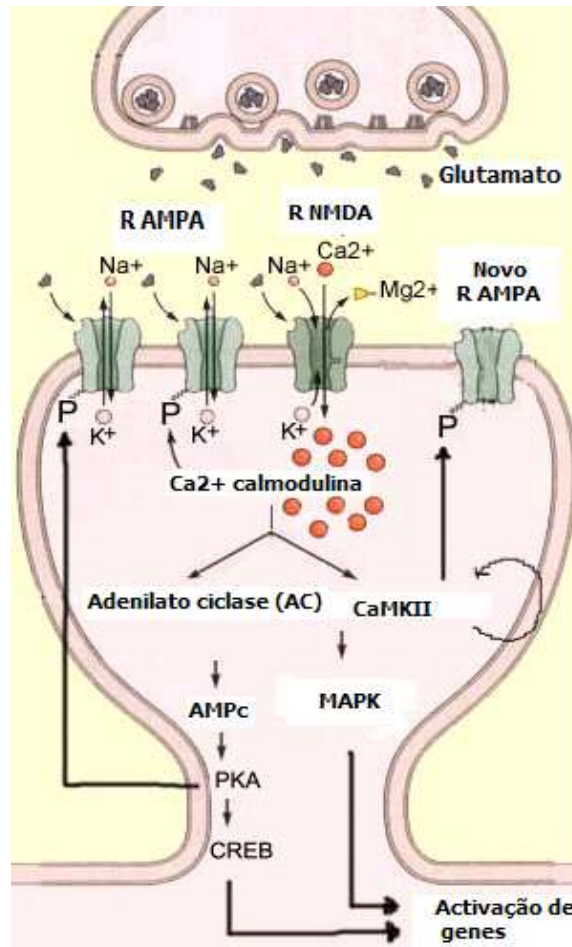


Figura 7. Esquema do mecanismo de indução de LTP, dependente da activação dos receptores NMDA e consequente aumento de $[Ca^{2+}]_i$ que conduz à activação de diferentes proteínas que desencadeiam mecanismos de transdução de sinal, essenciais neste fenómeno de plasticidade sináptica. (Adaptado <http://thebrain.mcgill.ca>).

Após a compreensão do tipo de estimulação usada na indução da LTP na região CA1 do hipocampo e das suas duas fases temporais, importa agora compreender o seu mecanismo. A sua indução requer uma estimulação nos terminais pós-sinápticos que desencadeia uma despolarização pós-sináptica, gerada pela activação prévia dos receptores AMPA através da libertação do glutamato, permitindo a activação dos receptores NMDA através da remoção do Mg^{2+} , e a entrada de Na^+ na célula. Seguidamente verifica-se a ligação da glicina e do glutamato para a activação do receptor. Após a saída do Mg^{2+} e com a mudança conformacional gerada pela ligação dos agonistas, há um elevado influxo de Ca^{2+} pelo receptor, para além da entrada de Na^+ e saída de K^+ em menores proporções. Este aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} desencadeia inúmeros eventos na célula, tais como a activação de várias proteínas como

por exemplo: as calmodulinas (CaM), a CaMKII, a adenilato ciclase, o AMP cíclico (cAMP), a PKA, a CREB (Figura 7), uma isoforma da PKC (PKM ζ) e a via MAPK-ERK. Estas proteínas desencadeiam vias de transdução de sinal que permitem a manutenção da LTP (mecanismos presentes na *late-LTP*, ver Lynch, 2004 para revisão). Estes fenómenos conduzem a um aumento do número de receptores AMPA na sinapse e um aumento da eficiência dos receptores já existentes, fornecendo assim uma maior sensibilidade ao neurónio pós-sináptico, relacionando deste modo a potenciação de longa duração com a aprendizagem e a plasticidade neuronal (Citri e Malenka, 2007; Kovács *et al.*, 2007; Kullmann e Lamsa, 2007; Lynch, 2004; Serrano *et al.*, 2005; Sherwood, 2007).

1.4- Receptores AMPA

Há três tipos de receptores ionotrópicos de glutamato, AMPA (Figura 8), NMDA e cainato, que devem a sua classificação ao agonista mais selectivo que os activa: AMPA (α -amino-3-hydroxilo-5-metilol-4-isoxazolo-propionato), NMDA (N-metil D-Aspartato) e cainato, respectivamente.

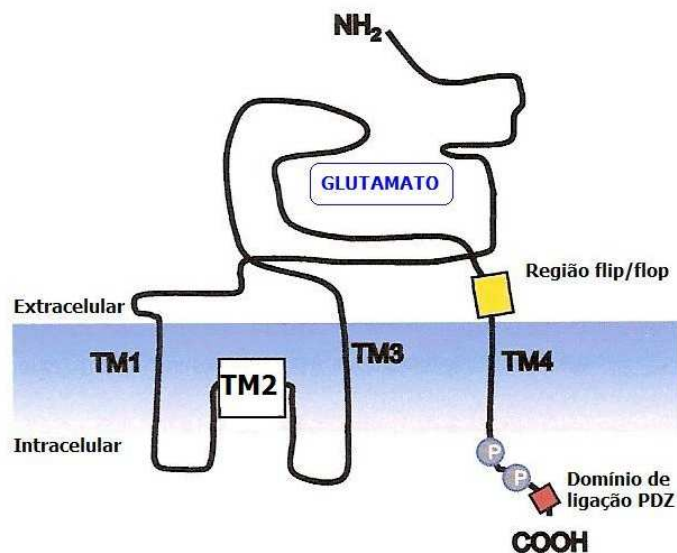


Figura 8. Representação esquemática da topografia das subunidades do receptor AMPA (Adaptado de Santos *et al.*, 2009).

Os receptores AMPA são canais de catiões não selectivos, permitindo a passagem de Na⁺ e K⁺ e em alguns casos pequenas quantidades de Ca²⁺ (Purves *et al.*, 2001). São constituídos por complexos de quatro diferentes subunidades: GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 que se combinam formando tetrâmeros. Encontram-se codificados em quatro genes com 70 % de homologia. Cada subunidade contém 900 aminoácidos, com um peso molecular de 105kDa, e quatro domínios hidrofóbicos: TM1, TM3, TM4 (transmembranares) e M2, sequência hidrofóba que faz parte da estrutura do poro de catiões, (Collingridge *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2003). Contém ainda uma zona N-terminal extracelular onde se encontra o local de ligação ao glutamato e uma zona C-terminal intracelular que engloba o domínio de ligação PDZ (Figura 8), responsável pela ancoragem dos receptores AMPA a proteínas específicas do complexo proteico que constitui a densidade pós-sináptica. Estas têm um papel fundamental no controlo do tráfego dos receptores AMPA e possibilitam a estabilização nas sinapses (Santos *et al.*, 2009). A sequência C-terminal, é também a que apresenta maiores diferenças entre as subunidades.

No sistema nervoso central a maioria dos receptores AMPA existem numa combinação de “dímeros de dímeros”, nomeadamente das subunidades GluR2 com GluR1, GluR3 ou GluR4 (Greger *et al.*, 2007; Madden, 2002). Encontram-se amplamente distribuídos no cérebro, uma vez que medeiam a maioria da transmissão sináptica excitatória rápida no SNC. As subunidades GluR1- GluR3 estão presentes nas camadas exteriores do córtex cerebral, do hipocampo, nas regiões olfactivas, no septo lateral e na amígdala (Keinanen *et al.*, 1990; Beneyto e Meador-Woodruff, 2004). A subunidade GluR4 encontra-se presente em concentrações baixas em todo o sistema nervoso central, excepto no núcleo talâmico reticular e no cerebelo (Petralia e Wenthold, 1992; Martin *et al.*, 1993; Spreafico *et al.*, 1994).

1.4.1- Fosforilação nos receptores AMPA

A actividade dos receptores AMPA é regulada por cinases proteicas e fosfatases, que contribuem para a regulação da localização dos receptores, determinam propriedades fisiológicas do canal (condutância e probabilidade de abertura) e conduzem ao desenvolvimento de formas de plasticidade sináptica (LTP e LTD) com impacto na memória (Roche *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2009).

A subunidade mais estudada e que vários estudos apontam com um papel central na LTP do hipocampo é a GluR1 (Lee, *et al.*, 2003), que tem quatro possíveis locais de fosforilação no terminal C: a serina 831 (Ser831, Figura 9), a serina 845 (Ser845, Figura 9), a serina 818 (Ser818) e a treonina 840 (Thr840). A Ser831 pode ser fosforilada pela PKC e pela CaMKII, o que conduz ao aumento da condutância do canal do receptor, e que tem um papel na incorporação sináptica dos receptores (Derkach *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2000). A Ser845 é fosforilada pela PKA o que conduz ao aumento da probabilidade de abertura do canal do receptor (Banke *et al.*, 2000), sendo um processo necessário para a incorporação sináptica dos receptores e essencial para a LTP (Esteban *et al.*, 2003b). No entanto a fosforilação da subunidade GluR1 não é suficiente para a indução de LTP. A fosforilação tanto da Ser831 como da Ser845 são necessárias para incorporar os receptores AMPA nas sinapses, mas para que tenham impacto na LTP é também requerida a activação de várias proteínas de transdução associadas com a regulação do citoesqueleto neuronal, via MAPK-CaMKII (Esteban, 2003a; Esteban *et al.*, 2003b; Santos *et al.*, 2009).

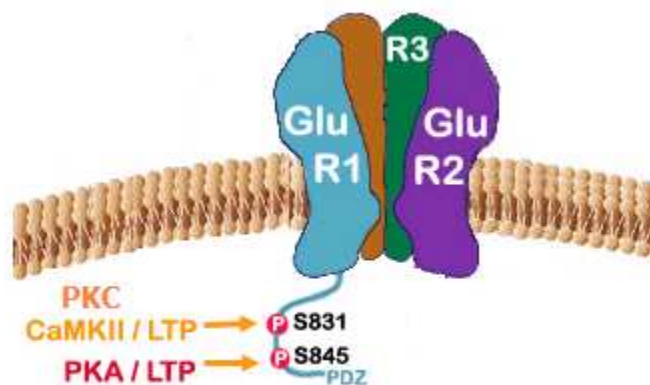


Figura 9. Diagrama dos locais de fosforilação no terminal C da subunidade GluR1 na S831 e S845, que têm implicações na LTP (Adaptado de <http://www.cellscience.com/Reviews5/>).

A subunidade GluR1 pode ainda ser fosforilada na Ser818 pela PKC, fenómeno que parece ter também um papel na incorporação dos receptores AMPA na membrana pós-sináptica que contribui para a LTP (Boehm *et al.*, 2006). *In vitro* no hipocampo, a fosforilação da GluR1 na Thr840 pela PKC mostra uma elevada taxa de conversão em condições basais (Lee *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009).

A PKC também fosforila a subunidade GluR3 na Ser880, regulando a interação desta subunidade com outras proteínas e permite a sua internalização (Chung *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2001). Desempenha também um papel na indução da LTD no cerebelo (Chung *et al.*, 2003). A subunidade GluR4 é expressa no hipocampo no início do período pós-natal inicial e é fosforilada na Ser842 pela PKA, sendo esta necessária e suficiente para a inserção de receptores homoméricos de GluR4 na sinapse (Esteban *et al.*, 2003b).

1.5- Péptido vasoactivo intestinal

O péptido vasoactivo intestinal (VIP) é um péptido neuromodulador constituído por 28 resíduos de aminoácidos e foi inicialmente isolado no intestino de porco (Said e Mutt, 1970). Pertence à família da secretina e glucagina que inclui o polipéptido da pituitária que activa a adenilato ciclase (PACAP) que é geneticamente próximo do VIP, com o qual apresenta 68% de homologia (Delgado e Ganea, 2001; Laburthe *et al.* 2002). O VIP encontra-se largamente distribuído no sistema nervoso central e periférico e tem um papel determinante em muitas acções biológicas em mamíferos. Os seus efeitos foram descritos nos sistemas digestivo, cardiovascular, imunitário, reprodutivo, nas vias respiratórias, nas glândulas supra-renais e no cérebro (Laburthe *et al.* 2002; Said, 1986).

Após o seu isolamento foi observado o seu elevado poder vasodilatador (Said e Mutt, 1970), sendo-lhe posteriormente atribuídas propriedades reguladoras no desenvolvimento fetal (Gressens *et al.*, 1993), nomeadamente no desenvolvimento embrionário do cérebro (Gozes *et al.*, 1999). Tem também funções na regulação da inflamação (Said e Dickman, 2000). O VIP tem também efeitos fisiológicos na dilatação do músculo liso e dos brônquios, na secreção hormonal, no aumento da mobilidade gástrica e na regulação da diferenciação e actividade de muitos tipos de células (Lerner e Persson, 2008).

1.5.1- Localização do VIP no hipocampo

O VIP é expresso exclusivamente em interneurónios no hipocampo, sugerindo que poderá estar envolvido na regulação da transmissão GABAérgica do hipocampo. Existem três diferentes subtipos de interneurónios que expressam VIP que por sua vez

têm diferentes alvos selectivos (Acsády *et al.*, 1996a,b; Cunha-Reis *et al.*, 2004, Figura 10). Um destes subtipos consiste em células “basket”, responsáveis pela inibição junto ao corpo celular das células piramidais, que expressam também colecistocinina (CCK) (Acsády *et al.*, 1996b; Cunha-Reis *et al.*, 2004). Os outros dois subtipos enervam selectivamente outros interneurónios tanto na fronteira do *Stratum Oriens/Alveus*, como na do *Stratum radiatum*. Estes neurónios alvo controlam a transmissão sináptica para as células piramidais nas dendrites distais no *Stratum lacunosum-moleculare* e dendrites proximais no *Stratum radiatum*, respectivamente. (Acsády *et al.*, 1996b; Cunha-Reis *et al.*, 2004, Figura 11).

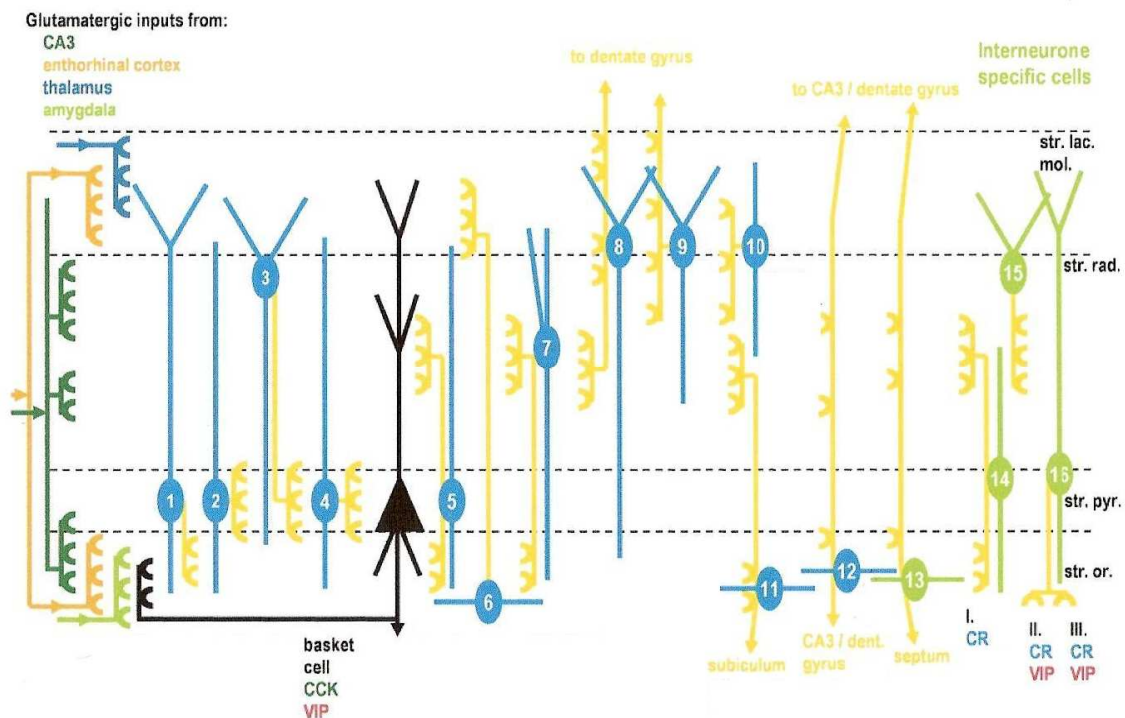


Figura 10. Subtipos de interneurónios na área CA1 do hipocampo com marcação para o VIP. Os interneurónios numerados de 1 a 12 enervam as células piramidais, interneurónios de 13 a 16 e têm como alvo outros interneurónios. O corpo celular e as dendrites dos interneurónios encontram-se a azul ou verde e as projecções dos axónios estão a amarelo. Os inputs glutamatergicos da área CA3 apresentam-se de cor verde escura, a amarelo os do córtex entorrinal, a azul os do tálamo e a verde claro os da amígdala. A preto encontram-se as enervações de uma célula piramidal. O nome e o marcador neuroquímico de cada interneurónio encontram-se assinalados por baixo de cada célula: CCK, colecistocinina; CR, calretinina; VIP, péptido vasoactivo intestinal; *str.lac mol*, *Stratum lacunosum-moleculare*; *str.rad*, *Stratum radiatum*; *str. pyr*, *Stratum pyramidale*; *str.or*, *Stratum Oriens* (Adaptado de Cunha-Reis, 2006, inicialmente descrito em Somogyi e Klausberger, 2005).

Todas as classes de interneurónios que expressam VIP são inervados por fibras serotoninérgicas dos núcleos de raphe médio e por aferentes GABAérgicos do septo como em todos os subtipos de interneurónios no hipocampo (Cunha-Reis *et al.*, 2004; Freund e Antal, 1988; Papp *et al.*, 1999).

As células “basket” com marcação VIP-CCK recebem aferentes das fibras colaterais de Schaffer da região CA3 (Acsády *et al.*, 1996a) e são evitadas por aferentes septais colinérgicos (Papp *et al.*, 1999), que inervam todas as restantes populações de células ‘basket’. Os interneurónios com marcação VIP que enervam selectivamente outros interneurónios na região CA1 e CA3 parecem receber *inputs* da projecção do córtex entorrinal para o *Stratum lacunosum-moleculare* (também denominada via temporoamónica), já que a maioria da sua arborização dendrítica se localiza nesta camada (Acsády *et al.*, 1996a; Cunha-Reis *et al.*, 2004).

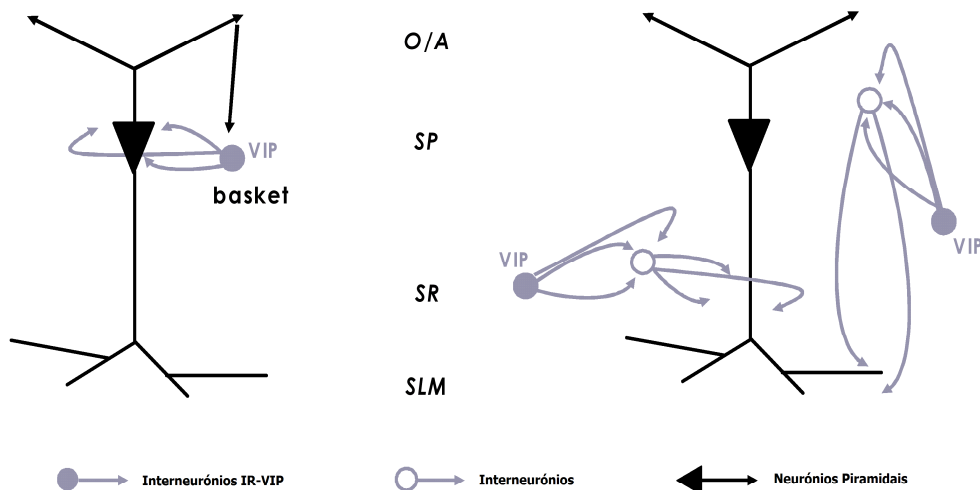


Figura 11. Diagrama mostrando as projecções axonais dos interneurónios com marcação VIP na região CA1 do hipocampo; O/A- *Stratum Oriens/Alveus*, SP- *Stratum pyramidale*; SLM - *Stratum lacunosum-moleculare* (Adaptado de Cunha-Reis *et al.*, 2007).

No hipocampo, o VIP aumenta a transmissão sináptica para as células piramidais na região CA1 (Haas e Gähwiler, 1992). Esta acção excitatória do VIP envolve a inibição dos interneurónios GABAérgicos que controlam as células piramidais, promovendo a desinibição destas que parece ser maioritariamente mediada pela activação dos receptores VPAC₁ (Cunha-Reis *et al.*, 2004, 2005). O VIP também aumenta a excitabilidade das células piramidais do hipocampo na ausência da

do bulbo olfactivo de rato e é constituído por 437 aminoácidos (Lutz *et al.*, 1993; Sherward *et al.*, 1995). A família dos receptores VIP também inclui um terceiro receptor, PAC₁, que se liga ao VIP com baixa afinidade (Figura 12). Estes três receptores têm também elevada afinidade para o polipéptido da pituitária que activa a adenilato ciclase (PACAP). Todos estes receptores estão acoplados via G_s à activação da adenilato ciclase, no entanto existem muitas excepções no que diz respeito ao acoplamento destes receptores em diversos tecidos. Em particular, foi demonstrado que o receptor VPAC₁ pode estar acoplado à proteína G_{i/o} no hipocampo (Shreeve, 2002). Estruturalmente os receptores VPAC₁ e VPAC₂ exibem ainda múltiplos sítios de *consensus* para fosforilação pela PKA, PKC e cinases dos receptores acoplados a proteínas G (GRKs). Os receptores VIP exibem múltiplos sítios de N-glicosilação e existem evidências de diferenças na N-glicosilação dos receptores VIP, de acordo com o tecido e/ou a espécie (Cunha-Reis, 2006; Laburthe *et al.*, 2002). Na tabela I mostram-se os agonistas e antagonistas mais utilizados dos receptores do VIP e PACAP.

Tabela I. Agonistas e antagonistas dos receptores VPAC₁, VPAC₂ e PAC₁ (Laburthe *et al.*, 2007).

	Agonista	Antagonista
VPAC₁	[Ala ^{11,22,28}] VIP	PG 97-269
VPAC₂	Ro 25-1392	–
PAC₁	Maxadilan	Maxadilan Δ24-42 Maxadilan Δ24-43

Os receptores VPAC₁ e VPAC₂ foram identificados no hipocampo por hibridação *in situ*, autoradiografia e imunocitoquímica (Joo *et al.*, 2004; Vaudry *et al.*, 2000). O receptor VPAC₁ está preferencialmente localizado no *Stratum Oriens* e *Stratum Radiatum* do *Cornu Ammonis* e co-localiza com marcadores gliais (Cunha-Reis, 2006; Joo *et al.*, 2004). O receptor VPAC₂ foi detectado maioritariamente no *Stratum pyramidale* do *Cornu Ammonis* sugerindo um importante papel na modulação da actividade das células piramidais no hipocampo.

Foi previamente demonstrado que as acções excitatórias pós-sinápticas do VIP nas células piramidais do hipocampo envolvem o mensageiro secundário AMP cíclico (cAMP, Hass *et al.*, 1992; Haug *et al.*, 2000; Ciranna e Cavallaro, 2003). Para além de

estimular a produção de cAMP, a activação dos receptores VPAC/PAC também pode estimular a mobilização de Ca^{2+} intracelular que é dependente de inositol trifosfato (IP_3 ; Fatatis *et al.*, 1994; Dickson *et al.*, 2006; Figura 13), e modula a actividade de algumas proteínas e estruturas moleculares, como por exemplo: a fosfolipase D (PLD, McCulloch *et al.*, 2000), canais de Ca^{2+} (Chatterjee *et al.*, 1996), a MAPK (Moroo *et al.*, 1998), embora estes mecanismos não estejam ainda totalmente esclarecidos, assim como a sua relevância para a sinalização no hipocampo.

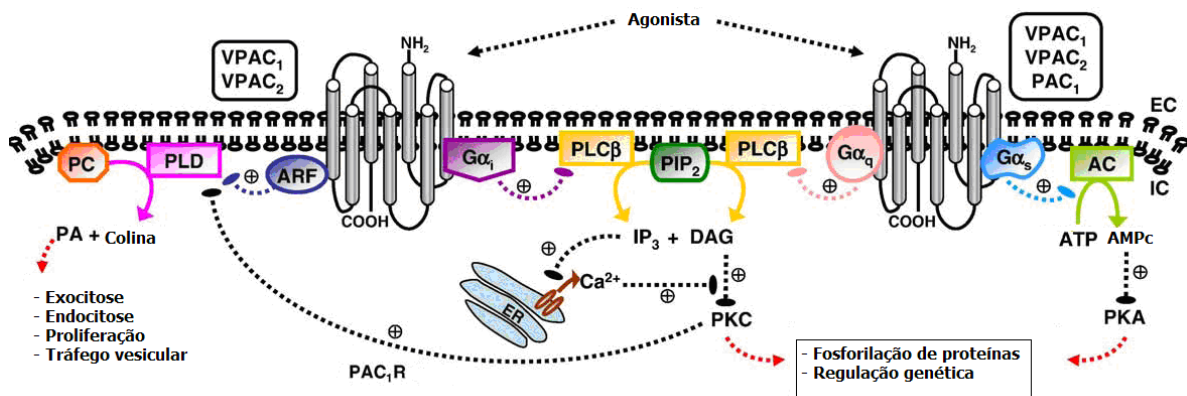


Figura 13. Vias de sinalização intracelulares estimuladas pela activação dos receptores VPAC₁, VPAC₂ e PAC₁. Principais vias de transdução activadas pelos receptores VPAC₁, VPAC₂ e PAC₁ acoplados a proteínas G heterotrímicas. Após a activação, todos os receptores são capazes de acoplar G α_s , conduzindo à produção de cAMP. Os três receptores podem também activar a PLC, o que leva ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pela via da G α_q e G α_i (a contribuição G α_i é de cerca de 40% do total da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos receptores VPAC em linhas celulares). A actividade da PLD pode também ser estimulada pelas vias sensíveis à PKC (PAC₁R, Adaptado de Dickson e Finlayson, 2009).

Segundo Cunha-Reis *et al.*, 2005, o VIP aumenta a transmissão sináptica das dendrites das células piramidais da região CA1 através da activação dos receptores VPAC₁ e VPAC₂. As acções mediadas pelo receptor VPAC₁ são dependentes da actividade da PKC e as acções mediadas pelo VPAC₂ são responsáveis pelas acções do VIP dependentes de PKA na transmissão da área CA1 do hipocampo.

Segundo Yang *et al.* (2009) o VIP pode regular os receptores NMDA através de diferentes receptores e vias de sinalização. Em neurónios piramidais da área CA1 do hipocampo observaram que a aplicação do VIP (1nM) aumenta as correntes dos receptores NMDA através dos receptores VPAC₁ e VPAC₂, efeito que é bloqueado através da utilização de um antagonista dos receptores VIP ([Ac-Tyr¹, D-Phe²]GRF (1–29)). Este aumento da corrente dos receptores NMDA pelo VIP necessita da activação da PKA mas não envolve a PKC. Estas observações sugerem que o VIP pode ter um papel regulador da plasticidade sináptica no hipocampo.

1.5.3- VIP e LTP (resultados prévios)

Em estudos recentes realizados no nosso laboratório (Cunha-Reis *et al.*, 2008) foi demonstrado que o VIP é um inibidor endógeno da LTP induzida por estimulação *theta-burst*, na área CA1 do hipocampo, uma vez que o bloqueio dos receptores do VIP com o antagonista não selectivo [Ac-Ty¹ D-Phe² GRF(1-29)] provocou um aumento da LTP induzida por este padrão de estimulação. Procurou-se descobrir através de que receptor (VPAC₁ ou VPAC₂) o VIP inibia a LTP, tendo para isso sido utilizados os fármacos PG 97-269 (100nM) antagonista selectivo dos receptores VPAC₁ e PG 99-465 (100nM) antagonista selectivo dos receptores VPAC₂. O aumento da LTP só se observou quando se bloqueava o receptor VPAC₁, permitindo assim concluir que o VIP é um inibidor endógeno da LTP por activação dos receptores VPAC₁ (Figura 14.A). Observou-se ainda que este efeito do antagonista dos receptores VPAC₁ era abolido na presença do antagonista selectivo dos receptores GABA_A bicuculina, sugerindo assim que estes receptores ou a transmissão GABAérgica estão envolvidos nesta acção do VIP. A acção do VIP na modulação da LTP na área CA1 do hipocampo poderá assim ser indirecta, não actuando o VIP directamente nas sinapses glutamatérgicas (cf. Cunha-Reis *et al.*, 2004).

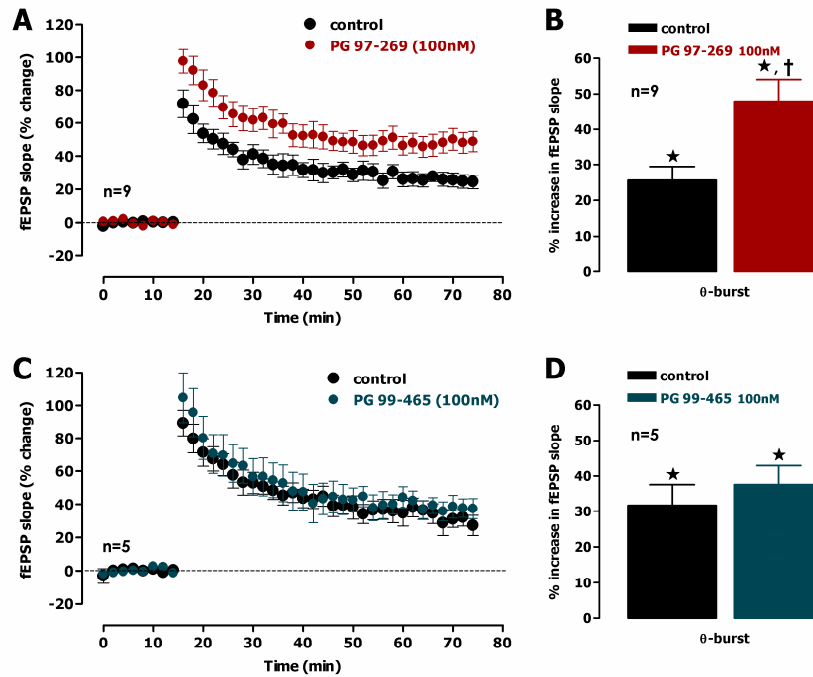


Figura 14. Inibição pelo VIP endógeno, através dos receptores VPAC₁, da LTP induzida por estimulação *theta-burst*. Evolução temporal dos valores dos declives dos fEPSPs antes e após a estimulação *theta-burst* na presença do antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269,100nM (A) e do antagonista dos receptores VPAC₂, PG 99-465,100nM (C) Valores de potenciação obtidos 50-60 min após estimulação *theta-burst* na ausência e na presença de antagonista do VPAC₁, PG 97-269, 100nM (B) e do antagonista do VPAC₂, PG 99-465,100nM (D), (Cunha-Reis *et al.*, 2008).

1.6- Objectivos

Sabendo que as proteínas PKA e PKC são de grande importância na expressão da *late-LTP* e na conversão da memória de curta duração em memórias de longa duração, e sabendo também que as acções via VPAC₁ no hipocampo foram associadas à activação da PKC ou de proteínas Gi, o objectivo deste trabalho foi investigar: 1) o envolvimento da PKA e PKC na inibição da LTP, mediada pelos receptores VPAC₁ e ainda 2) o envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA na serina 845 pela PKA e na serina 831 pela PKC ou CaMKII nessa mesma inibição.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados são das marcas Sigma ou Merck, salvo indicação em contrário.

2.1- Fármacos

As soluções “stock” de H-89 (inibidor da PKA, 5mM) e GF109203X (inibidor da PKC, 10mM) foram preparadas em DMSO. O antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269 (Phoenix Peptides, USA) foi preparado numa solução “stock” de 0.1mM em CH₃COOH 1%. Estes fármacos foram diluídos em Krebs para as concentrações finais utilizadas nas experiências.

2.2- Animais

Em todas as experiências realizadas foram utilizados ratos da estirpe Wistar de seis semanas (Harlan Interfauna Iberica, Espanha). Os animais foram anestesiados com isoflurano (30% em propilenoglicol) e eutanizados por decapitação. Todo o manuseamento animal respeitou as Normas Comunitárias e a Lei Portuguesa referentes ao tratamento de animais de laboratório.

2.3- Dissecção do cérebro de rato e isolamento do hipocampo

Após a decapitação procedeu-se à remoção do cérebro dos animais. Para tal expôs-se o crânio, cortando a pelagem do rato com a ajuda de uma tesoura. Seguidamente removeu-se a parte inicial da coluna vertebral, que permaneceu após a decapitação, permitindo assim cortar entre os ossos parietais e temporais do crânio. Com o auxílio de uma pinça removeram-se os ossos parietais e temporais, deixando exposto todo o cérebro do rato (Figura 15). Em seguida removeu-se o cérebro, com a ajuda de uma espátula de ponta curva, destacando-o pela sua face inferior e cortando os nervos ópticos. Colocou-se o cérebro numa placa de Petri com papel de filtro, mergulhando-o numa solução de Krebs gelada (10mM C₆H₁₂O₆.H₂O, 124mM NaCl, 26mM NaHCO₃, 3mM KCl, 1,25mM NaH₂PO₄.H₂O, 2mM CaCl₂ e 1mM MgSO₄) previamente oxigenada com 95% O₂/ 5% CO₂. À lupa (Olympus, Europe) separaram-se os dois hemisférios cerebrais, pelo corpo caloso, com o auxílio de uma lâmina. Seguidamente colocou-se um dos hemisférios com a face interna voltada para cima e introduziu-se uma espátula fina de ponta curva na fenda do ventrículo lateral entre o

hipocampo e o córtex cerebral, rebatendo-se ligeiramente sem tocar no hipocampo, até se conseguir visualizar os seus contornos. Com a espátula cortou-se o tecido cerebral excedentário até ter uma boa imagem do hipocampo (Figura 15.A). Com uma tesoura de microcirurgia libertou-se a ligação do hipocampo ao septo, cortando a extremidade da fímbria que o prende. Seguidamente com a espátula destacou-se o hipocampo pela parte interna, libertando-se definitivamente do encéfalo e removendo-se todos os vestígios de tecido cerebral. Com a ajuda de uma pinça de pontas finas removeram-se os vasos sanguíneos visíveis, com o intuito de evitar contaminações. Realizou-se o mesmo procedimento para o segundo hemisfério.

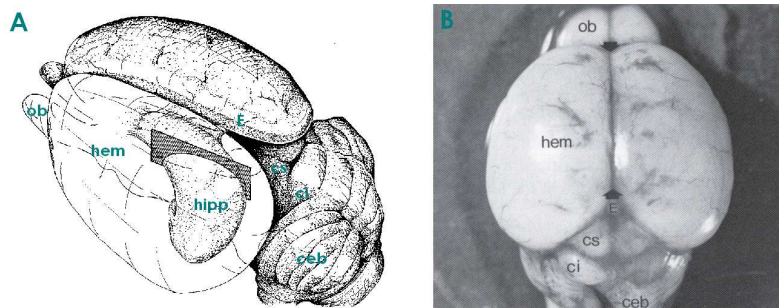


Figura 15. O cérebro do rato. (A) Representação esquemática das principais estruturas. (B) Fotografia após extracção do crânio, *hipp* - hipocampo, *hem* - hemisférios cerebrais, *ob* - bulbos olfactivos, *cs* - colicus superior, *ci* - colicus inferior, *ceb* – cerebelo, *E* – córtex entorrinal (Cunha-Reis, 2006; adaptado de Robertson *et al.*, 1989).

Após o seu isolamento colocaram-se os dois hipocampos com a face do *Alveus* voltada para cima num papel de filtro e cortaram-se em fatias de 400 μ m de espessura perpendiculares ao seu eixo longitudinal, utilizando uma lâmina associada a um “chopper” (McILwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Co. LTD). Colocou-se o papel de filtro com as fatias numa pequena caixa de Petri e encheu-se com solução de Krebs gelada e oxigenada. À lupa, destacaram-se as fatias de hipocampo procurando não tocar na região CA1 que pretendemos estudar. Seguidamente colocaram-se as fatias num copo com solução de Krebs, em constante oxigenação, à temperatura ambiente durante 1 hora, para permitir a recuperação do tecido dos danos infligidos pelo processo de dissecção.

2.4- Registos electrofisiológicos em fatias de hipocampo

Antes de dar início aos registos electrofisiológicos perfunde-se a câmara de registo (Harvard Apparatus Brain Slice Chamber System, Figura 16) com solução de Krebs mantida à temperatura de 30.5 ± 0.2 °C, por meio de um sistema de controlo de temperatura (Harvard Apparatus, TC-202A) ajustando-se a velocidade de fluxo a 3ml/min. Prepara-se um eléctrodo de registo (Ag/AgCl) pondo-o em contacto com uma micropipeta cheia com solução de NaCl 4M com valores de resistência entre 2 a 5 M Ω .

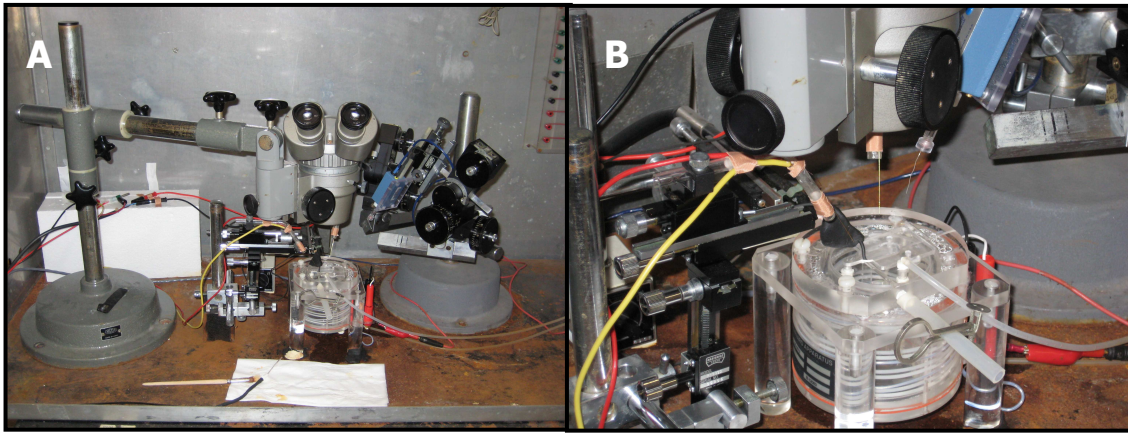


Figura 16. Montagem experimental utilizada para obtenção de registos electrofisiológicos em fatias de hipocampo (A). Vista geral da gaiola de Faraday com câmara de registo, micromanipuladores, estereomicroscópio. (B) Plano aproximado da câmara de registo, banho de aquecimento, eléctrodos de estimulação, S1 e S2, e eléctrodo de registo.

Colocou-se uma fatia de hipocampo na câmara de registo de 1ml de volume (Harvard Apparatus, BSC-ZT e BSC-BU, Figura 16.B) na posição representada na figura 17.A. Para efectuar registos extracelulares dos fEPSPs colocaram-se os eléctrodos de estimulação (S1 e S2) na área CA1 no *Stratum radiatum*, ou seja, sobre as fibras colaterais de Schaffer e o eléctrodo de registo também no *Stratum radiatum* na zona de contacto entre as fibras colaterais de Schaffer e as dendrites das células piramidais (Figura 17.A).

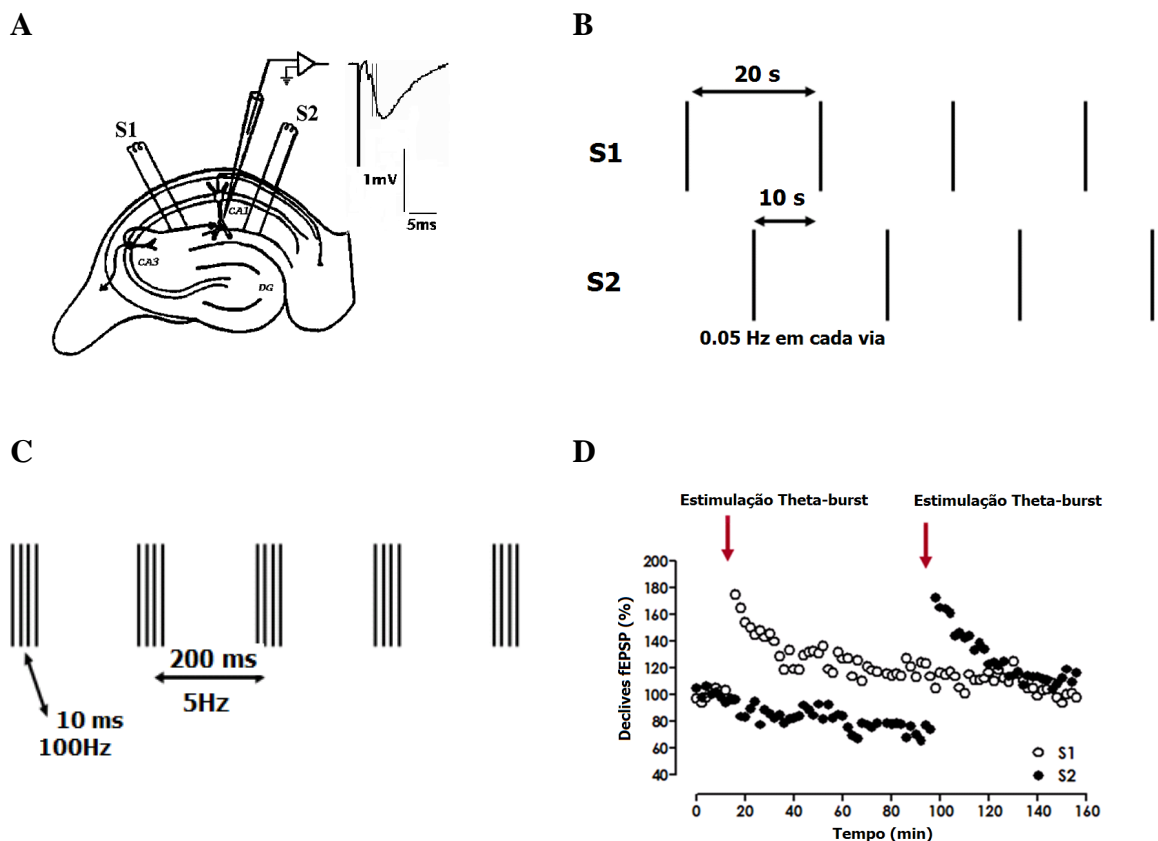


Figura 17. Esquema da colocação dos eléctrodos de estimulação, S1 e S2, e do eléctrodo de registo numa fatia de hipocampo (A). Estimulação de 20 em 20 segundos (0,05Hz) com um desfazamento de 10 segundos entre as vias S1 e S2 (B) Padrão de estimulação *theta-burst* utilizado neste trabalho (C) Experiência controlo representando o efeito da estimulação *theta-burst* no declive dos fEPSPs registados na zona CA1, no *Stratum radiatum* (D), (A. Adaptado de Costenla *et al.*, 1999).

Iniciou-se a estimulação das duas vias (S1 e S2) da fatia, com pulsos rectangulares de corrente de (0.1ms) de 20 em 20 segundos (0.05Hz) com um desfazamento de 10 segundos entre elas, durante 20 min. Ajustou-se os valores de intensidade inicial do estímulo (100 a 280 μ A) de forma a obter declives dos fEPSPs semelhantes nas duas vias com cerca de 50% do valor que se obtém com a estimulação supramáxima e com uma contaminação mínima com potenciais de acção. Os registos dos fEPSPs foram obtidos com o amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City, CA) e quantificados no programa *WinLTP 1.00* (Anderson e Collingridge, 2001). A evolução temporal da transmissão sináptica foi seguida em gráficos como o da figura

17.D, em que cada ponto corresponde à média do declive de seis fEPSPs consecutivos para cada via. Após a observação de valores de declive dos fEPSPs estáveis durante cerca de 20 minutos, inicia-se o protocolo experimental, pela adição de H-89 (inibidor da PKA, 1 μ M) e GF109203X (inibidor da PKC, 1 μ M) ao Krebs de superfusão. Após obtenção de declives dos fEPSPs estáveis durante 16 min e de pelo menos 20 min de superfusão com os inibidores, realizou-se uma estimulação *theta-burst*, 5x4 *bursts* de 100Hz separados por 200ms, durante 1 segundo na via escolhida como controlo (S1 ou S2, Figura 17.C e D). Após a estimulação *theta-burst* retomou-se o protocolo de estimulação alternada durante 1 hora (Figura 17.B). Após esta hora introduz-se o antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269 (100 nM), diluído em Krebs. Ao fim de 20 min, efectua-se um segundo *theta-burst*, agora na outra via (Figura 18). Mais uma vez, retoma-se o protocolo de estimulação alternada durante 1 hora.

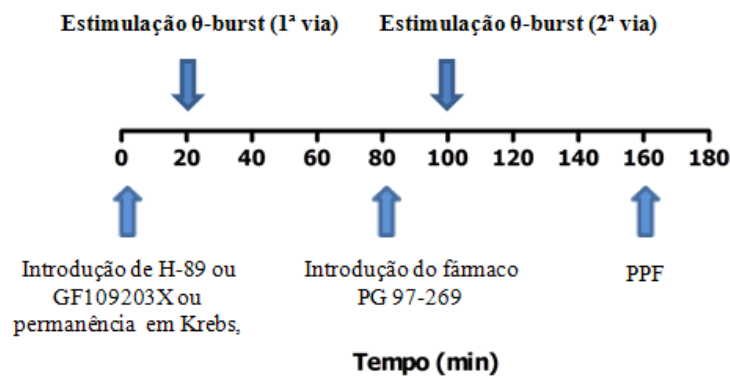


Figura 18. Esquema representativo dos passos experimentais efectuados aquando dos registos electrofisiológicos em fatias de hipocampo. Perfusão da fatia de hipocampo em Krebs, inibidor da PKA - H-89, ou inibidor da PKC - GF109203X (t = 0 min). Passado cerca de 20 min efectuou-se uma estimulação *theta-burst* durante 1 segundo numa das vias. Após uma hora introduziu-se o antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269 (100 nM). Ao fim de 20 min efectuou-se uma estimulação *theta-burst* durante 1 segundo na outra via. Passado uma hora avaliou-se a independência das vias através de um *Paired Pulse Facilitation* (PPF).

No final da experiência foi avaliada a independência das duas vias (S1 e S2) através de um *Paired Pulse Facilitation* (PPF) durante cerca de seis declives dos fEPSPs com 50ms de intervalo nas duas vias. Nas experiências consideradas e subsequentemente sujeitas a análise, o valor de PPF não excedeu os 14% de facilitação.

2.5- Estimulação das fatias para o estudo da fosforilação da subunidade GluR1 dos Rs AMPA por *Western-Blot*

Para estudar a fosforilação da subunidade GluR1 dos Rs AMPA utilizamos uma montagem experimental diferente para estimular fatias de hipocampo com *theta-burst* em diferentes condições experimentais. Este procedimento permitiu-nos obter um maior número de fatias tratadas, de forma a permitir obter em tempo útil a quantidade de proteína necessária aos estudos de *Western-Blot*. Utilizou-se então uma montagem experimental constituída por quatro câmaras de perfusão de *Perspex* (0.1ml de volume, Figura 19.D) que se perfundiram durante 15 min com solução de Krebs mantido a 30,5°C com oxigenação constante (com 95% O₂/ 5% CO₂). Seguidamente, parou-se a perfusão, abriram-se as câmaras e introduziram-se 4 fatias de hipocampo em cada. Fecham-se as câmaras de forma a não deixar bolhas que impedem a condução e o fluxo de líquido de perfusão.

De seguida ligaram-se os eléctrodos nas extremidades superior e inferior das câmaras (Figura 19.A) e iniciou-se a estimulação de campo das fatias com pulsos rectangulares de 8V (1ms) de 20 em 20 segundos (0.05Hz, S48K Square Pulse Stimulator, Grass Instruments). Monitorizou-se a eficácia da estimulação ao longo da experiência com o auxílio de um osciloscópio. Em duas das câmaras introduziu-se o antagonista VPAC₁ (PG 97-269, 100nM) no Krebs de superfusão. Passados 20 min de estimulação basal efectuou-se uma estimulação *theta-burst*, 5x4 *bursts* de 100Hz separados por 200ms durante 1 segundo, com o intuito de induzir uma potenciação de longa duração numa das câmaras perfundidas com Krebs (controlo) e numa das câmaras perfundidas com PG 97-269 (100nM). Manteve-se em seguida a estimulação basal durante mais 60 min tal como nas experiências de electrofisiologia. Geraram-se assim quatro condições experimentais (Controlo, controlo *theta-burst*, antagonista VPAC₁ e antagonista VPAC₁ *theta-burst*).

No final da experiência retiraram-se as fatias das câmaras e colocaram-se em *eppendorfs* com solução de Sucrose-BSA-HEPES (320mM Sucrose, 1mg/ml BSA, 10mM HEPES e 1mM EDTA, pH 7,4) suplementada com inibidores das proteases (complete, Mini, EDTA-free, Roche). As amostras foram congeladas em azoto líquido durante alguns segundos e conservadas a -80°C até à sua análise por *Western-Blot*. As experiências foram efectuadas em triplicado em cada dia, sendo que cada n representa o conjunto de duas ou três rondas de estimulação, nas condições acima descritas.

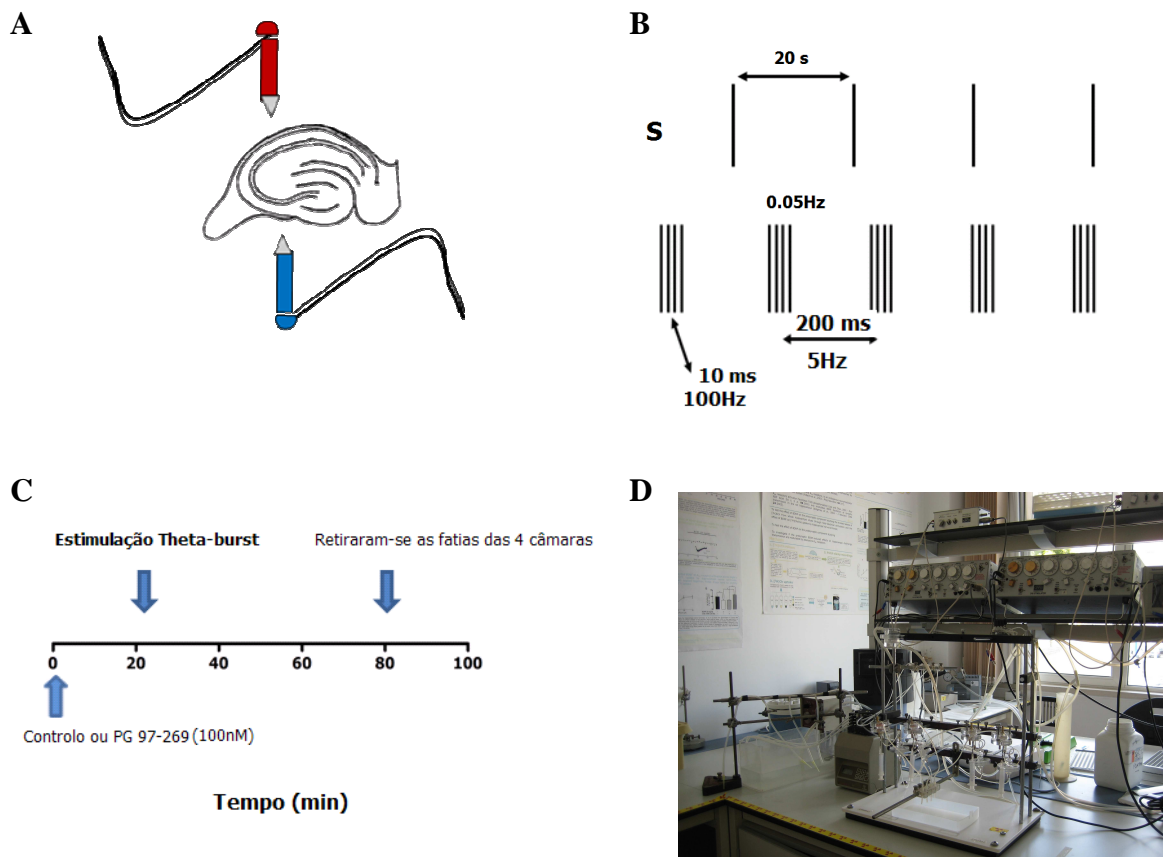


Figura 19. Procedimento para estimulação das fatias de hipocampo para estudo da fosforilação das subunidades GluR1 dos receptores AMPA. **(A)** Esquema da estimulação de campo usada em fatias de hipocampo. **(B)** Estimulação basal de 20 em 20 segundos (0.05Hz, em cima) e padrão de estimulação *theta-burst* de 5x4 *bursts* de 100Hz separados por 200ms, durante 1 segundo (em baixo). **(C)** Esquema representativo das etapas experimentais nas câmaras sujeitas a estimulação *theta-burst* (nas câmaras não sujeitas a estimulação *theta-burst* o procedimento foi em tudo semelhante excepto a estimulação aos 20 min). **(D)** Montagem experimental utilizada na estimulação das fatias de hipocampo.

2.5.1- Isolamento das membranas de hipocampo

As amostras foram descongeladas lentamente e homogeneizadas em solução Sucrose-BSA-HEPES suplementada com inibidores das proteases (complete, Mini, EDTA-free, Roche) usando um piston de Teflon e um homogenizador de Potter-Elvehjan. Utilizou-se aproximadamente 4ml de solução Sucrose-BSA-HEPES por cada

hipocampo (aproximadamente 12 fatias). A suspensão foi centrifugada a 1000g durante 10 min a 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 28 RS, Rotor HFA615 #3747). Posteriormente foi recolhido o sobrenadante e centrifugado a 1400g durante 12 min a 4°C. Seguidamente descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 2ml de solução de aCSF por hipocampo (20mM HEPES, 1mM MgCl₂, 1,2mM NaH₂PO₄ e 2,7mM NaCl; 3mM KCl, 1,2mM CaCl₂, 10mM C₆H₁₂O₆.H₂O, pH 7,4). Colocaram-se as amostras em tubos *ependorf* de 2ml e centrifugaram-se a 12700g durante 2min a 4°C (Heraeus Biofuge, Rotor 7500 3328). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 300µl de aCSF por hipocampo e fez-se nova centrifugação nas mesmas condições. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 100µl de aCSF por hipocampo e congelaram-se as amostras a -80°C após recolher uma alíquota para determinação da quantidade de proteína.

2.5.2- Determinação de concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína presente nas amostras em estudo foi realizada por espectrofotometria através do método de Bradford. Primeiramente foi estabelecida uma curva padrão com as concentrações de 0, 0.25, 0.5, 0.75 e 1 µg/ml de albumina de soro bovino (BSA) diluída em aCSF. As amostras em estudo foram diluídas nas proporções de 1:4 em aCSF. A cada *cuvette* adicionou-se 1ml de solução de Bradford (BioRad) diluída (1:4) em H₂O MiliQ (MiliQ Synthesis, ZMQS5VF01, Millipore). Colocaram-se 10 min no escuro antes de medir a absorvância a 595nm no espectrofotômetro (Thermo Spectronic Heλiosy, UNICAM).

2.5.3 – Quantificação dos níveis de fosforilação das subunidades GluR1 por Western - Blot

As amostras foram diluídas em H₂O MiliQ na proporção de 1:2 para as quatro condições experimentais: controlo, controlo *theta-burst*, antagonista VPAC₁ e antagonista VPAC₁ *theta-burst*. Seguidamente desnaturadas pela adição de tampão de amostra (STB 4X, 1:4) [STB 4X: 125mM Tris-BASE, SDS 4% (m/v), glicerol 50% (v/v), azul de bromofenol 0,02% (m/v) e β-mercaptoetanol 10% (v/v)]. Como controlo negativo utilizou-se a solução aCSF e para o controlo positivo da experiência foram utilizadas membranas de hipocampo diluídas em H₂O MiliQ na proporção de 1:5. Todas as amostras foram aquecidas num banho de água a 98°C durante 5 min.

As amostras foram aplicadas num gel de poliacrilamida, sendo o gel de concentração de 5% de poliacrilamida e o gel de resolução de 7,5% de poliacrilamida. Usaram-se padrões de peso molecular (10-250 kDa) Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad, 5µl). Foram usadas diferentes concentrações de proteína, tendo em conta o anticorpo a utilizar, sendo separadas de acordo com o seu peso molecular no sistema de electroforese Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad), durante cerca de 30 min a 80 Volts no gel de concentração e 1h30m a 100 Volts no gel de resolução utilizando a solução de tampão de electroforese [25mM Tris-BASE, 192mM Glicina, SDS 0,1% (m/v)]. Posteriormente, com o intuito de tornar as proteínas acessíveis à detecção do anticorpo, estas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™-C, Amersham Biosciences) sendo aplicada uma corrente eléctrica de cerca de 370 mA durante 1h40min, utilizando a solução de tampão de transferência [25mM Tris-BASE, 192mM Glicina, Metanol 20% (v/v)]. Todo o sistema de transferência Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) ficou em gelo.

As membranas foram lavadas três vezes com tampão TBST (de *Tris-Buffered Saline Tween 20*: 20mM Tris-BASE, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20 (v/v)] durante 5min, em agitação orbital. De seguida incubaram-se as membranas (1 hora, temperatura ambiente, com agitação) numa solução de 3% de albumina de soro bovino (BSA), diluída em TBST com o intuito de bloquear os locais de ligação não específica dos anticorpos. Incubaram-se as membranas (durante a noite, a 4°C com agitação orbital) com anticorpos primários: Anti-GluR1 P_{Ser} 845 (1:2000, policlonal, Chemicon International), Anti-GluR1 P_{Ser} 831 (1:3000, policlonal, Chemicon International), Anti-GluR1, clone C3T (1:4000, monoclonal, Milipore), tendo sido diluídos em 3% BSA em TBST com 0,02% NaN₃. A parte inferior das membranas foi destacada logo acima da banda de peso molecular 50 kDa e todas as membranas foram também incubadas com o anticorpo Anti-β-Actina (1:10.000, policlonal, Abcam). Os níveis desta proteína estrutural foram tomados como controlo de carregamento das amostras no gel de poliacrilamida em todas as experiências.

No dia seguinte as membranas foram lavadas três vezes com solução de TBST durante 10min com agitação orbital. Seguidamente procedeu-se à incubação das membranas durante 1 hora, com agitação orbital à temperatura ambiente, utilizando o anticorpo secundário *Goat anti-Rabbit IgG-HRP* (Santa Cruz Biotechnology, conjugado com a peroxidase do rábano) em solução de 5% de leite em TBST com diluição de 1:10.000, com excepção das membranas previamente incubadas com o anticorpo Anti-

β -Actina, para as quais se utilizou uma diluição do anticorpo secundário de 1:20.000. Seguidamente as membranas foram novamente lavadas três vezes com solução de TBST durante 10 min e uma vez em solução TBS (de *Tris-Buffered Saline*: 20mM Tris-BASE, 150mM NaCl) com agitação. Posteriormente procedeu-se à detecção de proteínas pela adição de um substrato da peroxidase do rábano que gera um produto quimioluminescente. Esta reacção é levada a cabo no escuro, pela adição do reagente *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents System* (GE Healthcare) durante 4 min. De seguida colocaram-se as membranas numa cassete de revelação, expondo-as a um filme fotográfico (Fuji Medical X-Ray Film, FujiFilm Europe GmbH) durante o tempo suficiente para se conseguir visualizar as bandas pretendidas. O filme foi revelado num processador automático (Curix 60 AGFA, Gevaert N.V.) As bandas das proteínas em estudo são quantificadas através do software *ImageJ* 1.42 e normalizados por um factor pelos níveis de β -actina. Os valores de expressão de GluR1, GluR1-PSer831 e GluR1-PSer845 na situação controlo foram tomados como 100% e todos os outros valores expressos relativamente a este.

2.6- Métodos estatísticos

Os valores experimentais apresentam-se como valores de médias \pm erro-padrão de n experiências. A significância das diferenças entre as médias dos valores dos fEPSPs antes e depois do *theta-burst* foi calculada utilizando o teste t de Student. A significância das diferenças entre as médias das LTPs obtidas na presença e na ausência de PG 97-269 para cada grupo experimental foi calculada pelo teste t de Student emparelhado, usando o software *GraphPad Prism 5.0*. As diferenças entre as médias dos níveis de expressão da subunidade GluR1 e nos níveis da sua fosforilação na Ser831 e Ser845 (experiências de *western-blot*), foram calculadas por análise de variância simples (One-way ANOVA) pelo método de Tukey, utilizando também o software *GraphPad Prism 5.0*. Valores de $p < 0.05$, foram considerados como representando diferenças significativas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

RESULTADOS

3.1- Envolvimento da PKA e da PKC no aumento da LTP causado pelo bloqueio dos receptores VPAC₁.

Quando estimulamos alternadamente de 20 em 20 segundos uma fatia de hipocampo em duas vias independentes e na ausência de fármacos (Krebs) obtivemos registros de fEPSPs com valores de declive de cerca de -0.61 ± 0.05 mV/ms (Figura 20.A).

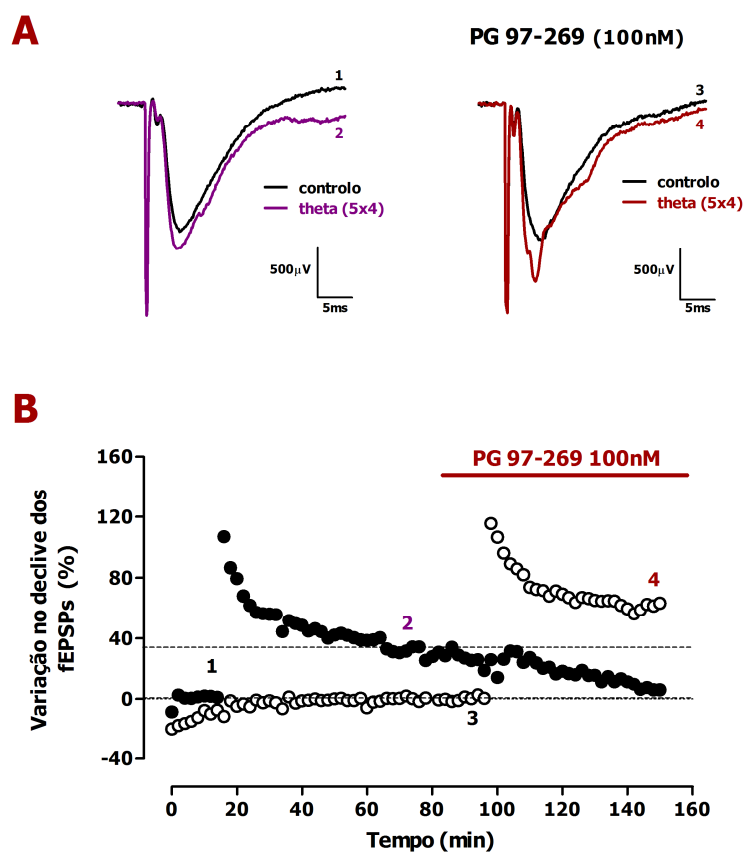


Figura 20. Influência do bloqueio dos receptores VPAC₁ na LTP induzida por estimulação *theta-burst*. (A) Registos de fEPSPs antes e depois da estimulação *theta-burst*, na ausência (lado esquerdo) e na presença do antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269, 100 nM (lado direito). (B) Evolução temporal dos declives dos fEPSPs obtidos de uma experiência representativa em que se avaliou a LTP induzida por estimulação *theta-burst* na ausência e na presença do fármaco PG 97-269 (barra a vermelho). Todas as experiências foram realizadas em fatias com duas vias (S1 e S2) independentes (PPF < 14% de facilitação).

Após obtenção de um declive estável durante pelo menos 20 minutos (Figura 20.B) aplicamos uma estimulação *theta-burst* e observamos uma potenciação da transmissão sináptica que se mantém até cerca de 2 horas após o *theta-burst*. O grau de potenciação que é avaliado 50 a 60 minutos, após a estimulação *theta-burst*, é de $29.2 \pm 1.8\%$ ($n = 5, p < 0.05$, Figura 21.A e B). Nas mesmas experiências, mas agora quando o antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269, 100 nM) está presente na estimulação da segunda via, observamos uma LTP induzida por *theta-burst* muito superior ($p < 0.05, \dagger$), sendo a potenciação induzida de $48.3 \pm 4.8\%$ ($n = 5, p < 0.05$, Figura 21.B). A introdução do antagonista VPAC₁, (PG 97-269, 100nM), uma hora após a indução da LTP na primeira via, não alterou significativamente a transmissão sináptica (declive dos fEPSPs). Estes resultados são consistentes com os previamente observados no laboratório (Cunha-Reis *et al.*, 2008) e evidenciam que o VIP é um inibidor endógeno da LTP por activação dos receptores VPAC₁.

Para tentar avaliar o envolvimento da PKA e da PKC nos efeitos mediados pelo receptor VPAC₁ na LTP induzida por *theta-burst*, foram também realizadas experiências em que o efeito do antagonista VPAC₁, PG 97-269 (100nM), na LTP foi testado na presença de H-89 (1 μ M), inibidor da PKA, e GF109203X (1 μ M), inibidor da PKC, em vez de Krebs. Quando o H-89 (1 μ M) está presente desde o início da experiência a potenciação, após a estimulação com o primeiro *theta-burst*, é de $22.4 \pm 2.4\%$ ($n = 7, p < 0.05$, Figura 21.C e D). A presença do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269, 100 nM) durante o 2º *theta-burst* causa também um aumento ($p < 0.05, \dagger$) da LTP, induzida por *theta-burst* para $44.9 \pm 5.8\%$ ($n = 7, p < 0.05$, Figura 21.D). Quando o GF109203X (1 μ M) está presente desde o início da experiência a potenciação, após a estimulação com o primeiro *theta-burst*, é de $23.6 \pm 7.4\%$ ($n = 7, p < 0.05$, Figura 21.E e F). A presença do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269, 100 nM) durante o 2º *theta-burst* provoca, mais uma vez, um aumento da LTP para $48.4 \pm 9.1\%$ ($n = 7, p < 0.05$, Figura 21.F). Tal como na situação controlo (Krebs), observa-se que a introdução destes dois fármacos, H-89 e GF109203X, não alterou a transmissão sináptica. Os declives dos fEPSP são similares aos da situação controlo na presença do antagonista dos receptores VPAC₁.

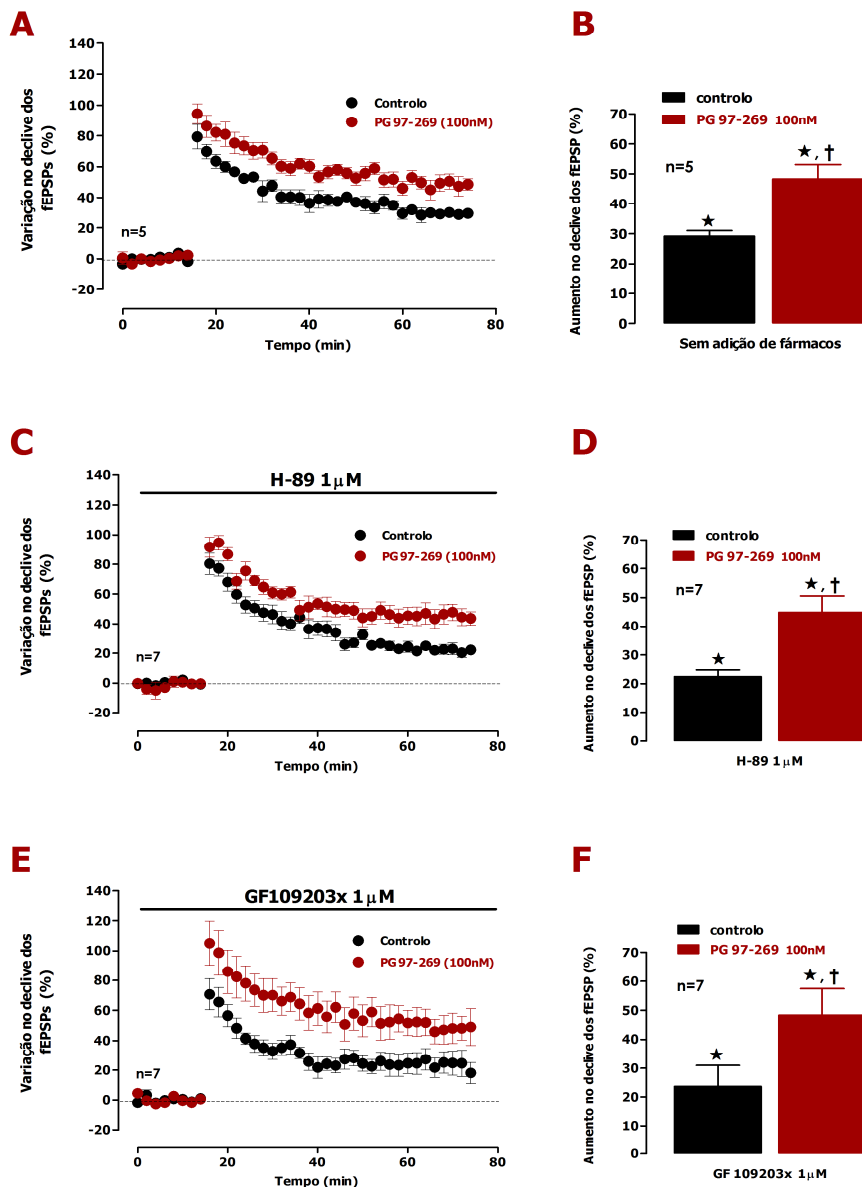


Figura 21. Efeito do antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269, 100 nM, na LTP induzida por estimulação *theta-burst*. Evolução temporal dos valores dos declives dos fEPSPs antes e após estimulação *theta-burst* (A, C e E) na ausência (●) e na presença (●) do antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269, 100 nM. Valores de potenciação obtidos 50-60 min após o *theta-burst* na ausência de fármacos, (Krebs, A e B), na presença do inibidor da PKA, H-89, 1 μM (C e D) e na presença do inibidor da PKC, GF109203X, 1 μM (E e F). Os valores representam a média ± erro padrão de 5-7 experiências. * - P < 0.05 Teste t de Student. † - P < 0.05 Teste t de Student emparelhado.

Estes resultados demonstram que nem a PKA nem a PKC estão envolvidos na acção dos receptores VPAC₁ na LTP uma vez que a presença do antagonista VPAC₁ (PG 97-269,100 nM) durante a estimulação *theta-burst* da segunda via provocou sempre um aumento da LTP para cerca do dobro do que é observado na primeira via em qualquer das situações experimentais testadas.

3.2- Envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos Rs AMPA no aumento da LTP causado pelo bloqueio dos receptores VPAC₁.

Para estudar o envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA, nas serinas 845 (alvo da PKA) e 831 (alvo da CaMKII e PKC), nas alterações da LTP provocadas pelo VIP, submetem-se as fatias de hipocampo a um protocolo de estimulação semelhante ao efectuado para as experiências de electrofisiologia, isto é, submetemos as fatias a um protocolo de estimulação *theta-burst* na presença e na ausência do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269,100 nM). Avaliou-se também o efeito do PG 97-269 (100 nM) nos níveis da subunidade GluR1 dos receptores AMPA, e na de fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845 e na serina 831 na ausência de estimulação *theta-burst*. As quatro condições experimentais (controlo e controlo *theta-burst*, antagonista VPAC₁ e antagonista VPAC₁ *theta-burst*) foram testadas em fatias independentes.

A presença do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269,100 nM) não causou alterações significativas ($p > 0.05$) nos níveis da subunidade GluR1 (% variação: $13,6 \pm 16.5$ %, $n = 4$, Figura 22.F), nem alterou a fosforilação desta subunidade na serina 831 (% variação: 11.5 ± 18.6 %, $n = 4$, Figura 22.D). No entanto, observou-se um aumento de 80.6 ± 23.2 % ($n = 4$, $p < 0.05$) na fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845 (Figura 22.B).

Com estimulação *theta-burst*, observa-se que na ausência de PG 97-269 (100 nM), não houve alterações significativas ($p > 0.05$) na fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845 (% variação: 12.0 ± 10.2 %, $n = 4$, Figura 22.B), na serina 831 (% variação: -1.5 ± 4.8 %, $n = 4$, Figura 22.D), nem nos níveis da subunidade GluR1 (% variação: -6.1 ± 6.7 %, $n = 4$, Figura 22.F).

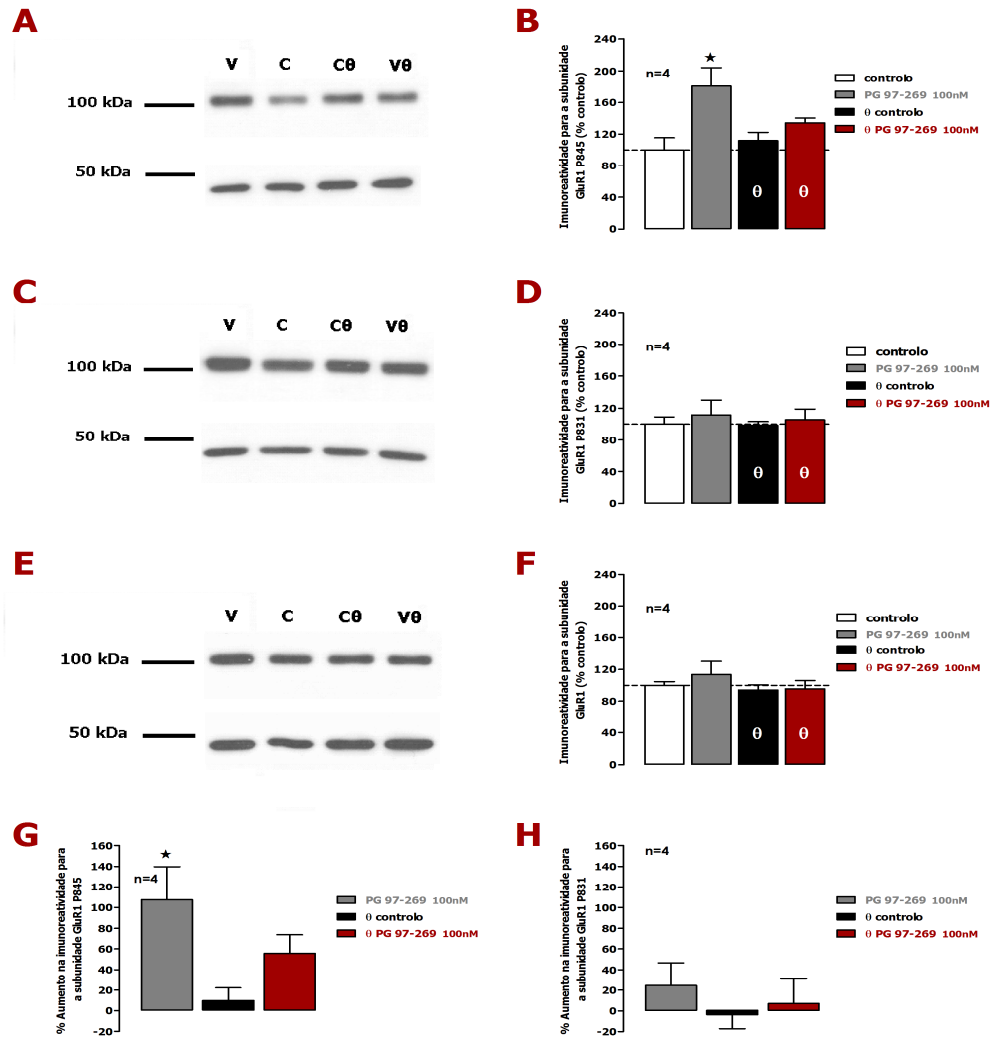


Figura 22. Influência do antagonista VPAC₁ e da estimulação *theta-burst* na fosforilação da subunidade GluR1. *Western-blots* representativos das variações observadas na fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845 (A), na serina 831 (C) e nos níveis da subunidade GluR1 (E). Efeito da estimulação *theta-burst* (■), do antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269,100 nM, (■) e de ambos os tratamentos (■) nos níveis de fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845 (B), na serina 831 (D) e nos níveis da subunidade GluR1 (F). Avaliação dos efeitos do antagonista dos receptores VPAC₁, PG 97-269,100 nM, nas mesmas condições experimentais, nos níveis de fosforilação das subunidades GluR1 na serina 845 (G) e GluR1 na serina 831 (H) corrigidos em relação ao efeito nos níveis da subunidade GluR1. Os níveis de β -Actina foram utilizados como controle de carregamento. ★ - P < 0.05 Análise de variância simples (One-way ANOVA) pelo método de Tukey.

Quando se testou o efeito do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269, 100nM) com estimulação *theta-burst*, observou-se também que não houve alterações significativas ($p > 0.05$) para os níveis da subunidade GluR1 (% variação: $-4,8 \pm 10.7$ %, $n = 4$, Figura 22.F) , nem na fosforilação das subunidade GluR1 na serina 831 (% variação: 5.7 ± 13.3 %, $n = 4$, Figura 22.D). Houve um aumento de $34,3 \pm 6.1$ % ($n = 4$, Figura 22.B) na fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845, embora seja não significativo ($p > 0.05$).

Avaliaram-se também estes efeitos nos níveis de fosforilação da subunidade GluR1 corrigindo os valores em relação às variações nos níveis da subunidade GluR1. Em conformidade com o descrito acima a única alteração que atingiu significado estatístico foi a fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845 causada pelo tratamento das fatias com o antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269,100 nM), que causou um aumento de 107.4 ± 32.3 % ($n = 4$, $p < 0.05$, Figura 22.G) nos níveis de fosforilação desta subunidade. Observa-se também um aumento de 55.5 ± 18.2 % ($n = 4$, $p > 0.05$, Figura 22.G) na fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845 pelo tratamento com o antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269,100 nM) e estimulação *theta-burst*, mas mais uma vez não atingiu significado estatístico devido à grande variabilidade na amostra.

Os resultados presentes nas figuras - Figura 22.B e 22.G, onde se observa um claro aumento da fosforilação da subunidade GluR1 P845 na presença do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269,100 nM), evidenciam que a inibição do receptor VPAC₁ aumenta a fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Neste trabalho pretendeu-se estudar 1) o envolvimento da PKA e da PKC no efeito do bloqueio dos receptores VPAC₁ na LTP induzida por estimulação *theta-burst*; 2) o envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA, nas serinas 845 (alvo da PKA) e 831 (alvo da PKC e da CaMKII), nesse mesmo efeito.

Observou-se que a presença quer do inibidor da PKA (H-89) quer do inibidor da PKC (GF109203X) não alterou significativamente o efeito do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269,100 nM) na LTP induzida por *theta-burst*, que apresentou um valor (potenciação 44.9-48.4%) aproximadamente, duas vezes superior ao do da respectiva situação controlo (potenciação 22.4-29.2%), para cada grupo experimental. Assim conclui-se que o efeito inibitório do VIP endógeno na LTP não é dependente da actividade da PKA ou da PKC. É ainda de salientar que por si só, a presença quer do inibidor da PKA (H-89) quer do inibidor da PKC (GF109203X) não alterou significativamente a LTP obtida em situação controlo (vias controlo - 1º *theta-burst*) o que permite concluir que para este padrão de estimulação a PKA e a PKC não são fundamentais para expressão da LTP.

No hipocampo, o VIP está fundamentalmente envolvido na modulação da transmissão GABAérgica, sendo esta modulação fundamentalmente dependente da activação dos receptores VPAC₁ e de uma via de transdução dependente da PKC e não da PKA. Os receptores VPAC₁ encontram-se principalmente no *stratum oriens* e *stratum radiatum* (Cunha-Reis, 2006; Cunha-Reis *et al.*, 2008). O facto da acção do antagonista VPAC₁ na LTP não se alterar na presença dos inibidores da PKA (H-89) e da PKC (GF109203X), evidenciam que o VIP não estará a utilizar os mesmos mecanismos de transdução na regulação da transmissão basal e na regulação da LTP. No entanto, uma vez que a actividade da PKA e a PKC não influenciam a indução da LTP nestas condições experimentais, não é surpreendente que o VIP, mesmo que possa influenciar a transmissão sináptica nesta área do hipocampo via PKC, não influencie a LTP por este mecanismo. O mecanismo pelo qual o VIP pode influenciar a LTP induzida por este *theta-burst* fraco fica ainda por esclarecer. Recentemente, Yang *et al.* (2009) reportaram que o VIP pode modular a activação de receptores NMDA no hipocampo através da activação de receptores VPAC₁ e VPAC₂. No entanto, os

agonistas VPAC₁ aumentam as correntes NMDA, não sendo possível assim que este mecanismo esteja a contribuir para os resultados descritos neste trabalho.

No segundo ponto em estudo, isto é, o envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA, nas serinas 845 (alvo da PKA) e 831 (alvo da PKC e CaMKII), no efeito do bloqueio dos receptores VPAC₁ na LTP induzida por estimulação *theta-burst*, optou-se por uma estratégia experimental semelhante, estando agora as fatias de hipocampo submetidas a uma estimulação de campo, mediante os mesmos protocolos utilizados em todas as experiências. Nestas experiências observou-se que a presença do antagonista dos receptores VPAC₁ (PG 97-269,100 nM) causou um aumento marcado nos níveis de fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845, não causando alterações significativas quer na fosforilação nas subunidades GluR1 na serina 831, quer nos níveis da subunidade GluR1. Com estimulação *theta-burst* não se observaram quaisquer alterações na fosforilação nas subunidades GluR1 na serina 845, na serina 831, nem nos níveis da subunidade GluR1, tanto na presença como na ausência de antagonista dos receptores VPAC₁. É no entanto de salientar que embora não seja estatisticamente significativo, observou-se um aumento de 34,3% na fosforilação da subunidade na serina 845, na presença do antagonista dos receptores VPAC₁ com estimulação *theta-burst*.

Estes resultados sugerem uma quase total concordância entre estes valores e os observados nos registos electrofisiológicos, não existindo alterações significativas entre as quatro situações experimentais (controlo, controlo *theta-burst*, antagonista VPAC₁ e antagonista VPAC₁ *theta-burst*) nos níveis de fosforilação da subunidade GluR1 na serina 831, nem nos níveis da subunidade GluR1. No entanto, verificou-se que o antagonista dos receptores VPAC₁ aumentou os níveis de fosforilação da subunidade GluR1 na serina 845. Este aumento, também se verificou quando este antagonista foi administrado juntamente com estimulação *theta-burst* e embora não tenha atingido significado estatístico poderá ser também relevante. Um aumento do número de experiências poderá permitir uma conclusão mais clara relativamente a este último efeito.

Uma possibilidade para a ausência de aumento na fosforilação da subunidade GluR1 em resposta ao *theta-burst*, é que o tipo de estimulação usada (estimulação de campo) não tenha sido tão eficiente na indução da LTP, uma vez que os níveis de fosforilação das subunidades GluR1 na serina 831, na serina 845 e nos níveis da subunidade GluR1 são muito similares entre as duas situações experimentais (controlo,

controlo *theta-burst*). Parece-nos no entanto que a explicação mais provável é a que já avançamos anteriormente, de que a resposta a este *theta-burst* fraco não envolve a activação de PKA e PKC e por isso não vemos aumento da fosforilação da GluR1.

Os mecanismos moleculares exclusivos que resultam na indução e manutenção de uma *early-LTP* são algo controversos, no entanto o papel fundamental da presença da CaMKII é comum em toda a literatura (Lee *et al.*, 2000; Malenka *et al.*, 1989; Malinow *et al.*, 1989; Otmakhov *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1992). Embora não tenha ainda sido testado o bloqueio da CaMKII, e mediante a literatura, acredita-se que esta proteína seja a única proteína fundamental para induzir a LTP nestas condições. Ainda assim não se observou nenhuma alteração na fosforilação da Ser831 da GluR1, alvo desta cinase.

Relativamente ao papel das proteínas PKA e PKC na LTP, é inequívoco que tanto a PKA como a PKC são fundamentais para a *late-LTP* (Abel *et al.*, 1997; Huang e Kandel, 1994; Huang *et al.*, 1992; Kauer *et al.*, 1988; Lovinger *et al.*, 1987; Matthies e Reymann, 1993; Reymann, Frey *et al.*, 1988; Reymann *et al.*, 1988; Qi *et al.*, 1996), e também na *early-LTP* (Lee *et al.*, 2000; Otmakhova *et al.*, 2000; Skeberdis *et al.*, 2006). Relativamente à *early-LTP* induzida por HFS foi desde cedo demonstrado depender tanto da actividade da CaMKII como da PKC (ver Reymann e Frey, 2007 para revisão).

Durante as experiências realizadas, estimulamos as fibras colaterais de Schaffer com *theta-burst*, que mimetiza o disparo dos colaterais de Schaffer em situações fisiológicas de aprendizagem (exº espacial), situações em que o disparo destas células é condicionado pelo ritmo *theta* (lento e de grande amplitude) que faz com que só disparem cerca da 3-4 potenciais de acção com cerca de 100-220ms de intervalo (aprox. 4.5-10Hz). A estimulação *theta-burst* utilizada foi de 5x4 *bursts* de 100Hz separados por 200ms, durante 1 segundo, o que permite a indução de uma *early-LTP*.

Nguyen e Kandel (1997) observaram também que uma estimulação *theta-burst* (15 burst de 4 pulsos a 100Hz, separados por 200ms, durante 3s) na área CA1 do hipocampo em rato requer fenómenos de transcrição e síntese proteica, sendo bloqueada na presença de inibidores da PKA (KT-5720 e Rp-cAMPS). No entanto ao fim da primeira hora após a indução ainda se observa uma potenciação de cerca de 50% na transmissão sináptica. Em estudos anteriores realizados no nosso laboratório (Fontinha *et al.*, 2008) utilizando o mesmo padrão de estimulação *theta-burst*, não só a potenciação final obtida após uma hora da indução não foi tão pronunciada, como a utilização de um inibidor diferente desta cinase (H-89) não alterou grandemente a LTP

obtida. É de notar no entanto que este inibidor foi administrado na presença de outros fármacos.

Lee *et al.*, (2003) observaram deficiências na LTP induzida por *theta-burst* forte (10 estimulações *theta-burst* 10 *bursts* de 4 pulsos a 100Hz, separados por 200ms) e defeitos de memória em tarefas de aprendizagem em ratos com mutações na serina 831 (alvo PKC) e serina 845 (alvo PKA) da subunidade GluR1. Foi também demonstrado que a estimulação *theta-burst* (10 *bursts* de 4 pulsos a 100Hz, separados por 200ms) directamente efectuada nos colaterais de Schaffer aumenta fortemente a fosforilação da subunidade GluR1 nas serinas 818 e 831 (Boehm *et al.*, 2006). A fosforilação em todas estas serinas parece ser crucial para a incorporação na sinapse dos receptores AMPA (Gomes *et al.*, 2003).

O padrão de estimulação utilizado nas nossas experiências (5 *bursts* de 4 pulsos a 100Hz, separados por 200ms) é mais fraco do que os mencionados acima, sendo possível que envolva mecanismos diferentes no que respeita ao envolvimento da PKA e PKC. Em experiências futuras propõe-se induzir um padrão de estimulação mais forte (*theta-burst* forte), de maneira a desencadear *late-LTP* ou uma LTP mais robusta, que se sabe ser dependente de PKA, PKC e CaMKII assim como da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA pelas proteínas cinases CaMKII (Ser831, Barria *et al.*, 1997) e PKC (Ser831 e Ser818, Boehm *et al.*, 2006). Espera-se que esta estratégia permita esclarecer melhor a influência da PKA e da PKC no efeito do bloqueio dos receptores VPAC₁, em condições talvez mais próximas das que levam a formação de memória de longo termo. Em particular, o facto da presença do antagonista dos receptores VPAC₁ ter um tão grande impacto na fosforilação da subunidade GluR1 pela PKA, parece sugerir um efeito crucial do VIP na inibição da formação de memórias a longo termo.

Uma outra possibilidade será testar diferentes inibidores da PKA (KT-5720 e Rp-cAMPS) com o actual padrão de estimulação para confirmar a ausência de envolvimento da PKA quer na indução da LTP como no efeito do antagonista do receptor VPAC₁ na LTP.

Pretende-se ainda, agora optimizado todo o processo de estudo da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA, tentar a estimulação das fatias unicamente na área CA1, em condições mais próximas das dos registos electrofisiológicos realizados neste trabalho, isto é, com estimulação directa dos colaterais de Schaffer.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Neste trabalho propusemo-nos avaliar o envolvimento da PKA e da PKC na inibição pelo VIP endógeno da LTP induzida na área CA1 do hipocampo por um *theta-burst* curto (5x4 *bursts* de 100Hz separados por 200ms, durante 1 segundo). Os resultados descritos neste trabalho permitiram-nos concluir que: 1) o efeito inibitório do VIP endógeno na LTP na área CA1 do hipocampo não depende da actividade da PKA ou da PKC; 2) a actividade quer da PKA quer da PKC não são necessárias na expressão da LTP induzida por este padrão de estimulação.

Estes resultados sugerem que os mecanismos envolvidos na expressão da LTP nestas condições experimentais precisam de ser mais bem estudados, nomeadamente, o envolvimento da CaMKII. De igual modo, será necessário esclarecer melhor os mecanismos desencadeados pela activação do receptor VPAC₁ pelo VIP endógeno para inibir a LTP nestas condições.

Por outro lado, propusemo-nos investigar o envolvimento da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA, nas serinas 845 (alvo da PKA) e 831 (alvo da PKC e da CaMKII), no efeito inibitório do VIP na LTP. Observou-se que a presença do antagonista dos receptores VPAC₁ causou um aumento nos níveis de fosforilação na subunidade GluR1 unicamente na serina 845. Não se observaram alterações nos níveis de fosforilação da GluR1 quer na Ser845 quer na Ser831 em resposta ao *theta-burst*.

Estas observações sugerem que embora a inibição da fosforilação da subunidade GluR1 pelo VIP endógeno (via VPAC₁) possa ser relevante para a *late-LTP* e a formação de memórias dependentes do hipocampo, não é provavelmente relevante para a expressão da LTP nas condições experimentais utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel T., Nguyen P. V., Barad M., Deuel T. A., Kandel E. R., Bourtchouladze R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 88: 615-626.
- Acsády L., Arabadzisz D., Freund T.F. (1996a). Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 73: 299-315.
- Acsády L., Görcs T.J., Freund T.F. (1996b). Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialised to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience*. 73: 317-334.
- Albensi B.C., Oliver D.R., Toupin J., Odero G. (2007). Electrical stimulation protocols for hippocampal synaptic plasticity and neuronal hyper-excitability: are they effective or relevant? *Exp Neurol*. 204: 1-13.
- Amaral D.G., Witter M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31: 571-591.
- Andersen P., Bliss T.V.P, Skrede K.K. (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Br. Res*. 13: 222-238.
- Anderson W.W., Collingridge G.L. (2001). The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *J Neurosci. Meth.* 108: 71-83.
- Banke T.G., Bowie D., Lee H., Huganir R.L., Schousboe A., Traynelis S.F. (2000). Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci*. 20: 89–102.
- Barria A., Muller D., Derkach V., Griffith L.C., Soderling T.R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*. 276: 2042-2045.
- Bataille D., Freychet P., Rosselin G. (1974). Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase. *Endocrinology*. 95: 713-21.

- Beneyto M., Meador-Woodruff J.H. (2004). Expression of transcripts encoding AMPA receptor subunits and associated postsynaptic proteins in the macaque brain. *J Comp Neurol.* 468: 530-554.
- Best P.J., White A.M., Minai A. (2001). Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 459-486.
- Bliss T.V., Lømo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331-356.
- Boehm J., Kang M.G., Johnson R.C., Esteban J., Huganir R.L., Malinow R.(2006) Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron.* 51: 213-225.
- Bragin A., Jandó G., Nádasdy Z., van Landeghem M., Buzsáki G.(1995). Dentate EEG spikes and associated interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the rat. *J Neurophysiol.*73:1691-1705.
- Burgess N., Maguire E.A., O'Keefe J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron.* 35: 625-641.
- Buzsáki G. (2001). Hippocampal GABAergic interneurons: a physiological perspective. *Neurochem. Res.* 26: 899-905.
- Buzsaki G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 33: 325–340.
- Chatterjee T. K., Sharma R. V., Fisher R. A. (1996). Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium flux by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem.* 271: 32226–32232.
- Chung H.J., Steinberg J.P., Huganir R.L., Linden D.J. (2003). Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science.* 300: 1751-1755.
- Chung H.J., Xia J., Scannevin R.H., Zhang X., Huganir R.L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci.* 20: 7258-7267.
- Ciranna L., Cavallaro S. (2003). Opposing effects by pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide and vasoactive intestinal peptide on hippocampal synaptic transmission. *Exp. Neurol.*184: 778-784.
- Citri A., Malenka R.C. (2007). Synaptic plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology.*33: 18-41.

- Collingridge G.L., Isaac J.T., Wang Y.T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*.5: 952-962.
- Collingridge G.L., Kehl S.J., McLennan H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*.334: 33-46.
- Costenla A.R., de Mendonça A., Ribeiro J.A. (1999). Adenosine modulates synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Brain Res*. 851: 228-234.
- Cunha-Reis D. (2006). Vasoactive intestinal peptide (VIP). increases GABAergic transmission to interneurons and pyramidal cells in the hippocampus: consequences for pyramidal cell activity and modulation by endogenous adenosine. Tese de Doutorado, FCM, UNL.
- Cunha-Reis D., Dias R.A., Sebastião A. M., Ribeiro J. A. (2008) Endogenous VIP impairs synaptic plasticity in the rat hippocampus through VPAC1 receptor activation. Communication to the FENS 2008 Meeting. Geneva, Switzerland.
- Cunha-Reis D., Fontinha B.M., Ribeiro J.A., Sebastião A.M. (2007). Tonic adenosine A1 and A2A receptor activation is required for the excitatory action of VIP on synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus. *Neuropharmacology*. 52: 313-320.
- Cunha-Reis D., Ribeiro J.A., Sebastião, A.M. (2005). VIP enhances synaptic transmission to hippocampal CA1 pyramidal cells through activation of both VPAC₁ and VPAC₂ receptors. *Brain Res*. 1049: 52-60.
- Cunha-Reis D., Sebastião A.M., Wirkner K., Illes P., Ribeiro, J.A. (2004). VIP enhances both pre- and post-synaptic GABAergic transmission to hippocampal interneurons leading to increased excitatory synaptic transmission to CA1 pyramidal cells. *Br. J Pharmacol*.143: 733-744.
- Delgado M., Ganea D. (2001). Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? *J Immunol*. 166: 2907-2912.
- Derkach V., Barria A., Soderling T.R. (1999). Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 3269-3274.
- Desbuquois B. (1974). The interaction of vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver-cell membranes. *Eur. J. Biochem*. 46: 439-450.

- Dickson L., Aramori I., Sharkey J., Finlayson K. (2006). VIP and PACAP receptor pharmacology: A comparison of intracellular signaling pathways. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1070: 239-242.
- Dickson L., Finlayson K. (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther.* 121: 294-316.
- Dunwiddie T.V., Lynch G. (1979). The relationship between extracellular calcium concentrations and the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 169: 103-110.
- Esteban J.A. (2003a). AMPA receptor trafficking: a road map for synaptic plasticity. *Mol Interv.* 3: 375-385.
- Esteban J.A., Shi S.H., Wilson C., Nuriya M., Huganir R.L., Malinow R. (2003b). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci.* 6: 136-143.
- Fairén A. (2007). Cajal and Lorente de Nó on cortical interneurons: Coincidences and progress. *Brain Res. Rev.* 5: 430-444.
- Fatatis A., Holtzclaw L.A., Avidor R., Brenneman D.E., Russel J.T. (1994). Vasoactive intestinal peptide increases intracellular calcium in astroglia: Synergism with alpha- adrenergic receptors, *Proc Natl Acad Sci.* 91: 2036-2040.
- Fontinha B.M., Diógenes M.J., Ribeiro J.A., Sebastião A.M. (2008). Enhancement of long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor requires adenosine A2A receptor activation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology.* 54: 924-933.
- Freund T.F., Antal M. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature.* 336:170-173.
- Frey U., Morris R.G.M. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature.* 385: 533-536.
- Frey U., Morris R.G.M. (1998a). Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 21: 181-188.
- Frey U., Morris R.G.M. (1998b). Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology.* 37: 545-552.
- Gomes A.R., Correia S.S., Carvalho A.L., Duarte C.B. (2003). Regulation of AMPA receptor activity, synaptic targeting and recycling: role in synaptic plasticity. *Neurochem Res.* 28: 1459-1473.

- Gozes I., Fridkin M., Hill J.M., Brenneman D.E. (1999). Pharmaceutical VIP: prospects and problems. *Curr. Med. Chem.* 6: 1019-1034.
- Greger I.H., Ziff E.B., Penn A.C. (2007). "Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly". *Trends Neurosci.* 30: 407-416.
- Gressens P., Hill J.M., Gozes I., Fridkin M., Brenneman D.E. (1993). Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature.* 362: 155-158.
- Gulyás A.I., Megias M., Emri Z., Freund T.F. (1999). Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 19: 10082-10097.
- Haas H.L., Gahwiler B.H. (1992). Vasoactive intestinal polypeptide modulates neuronal excitability in hippocampal slices of the rat. *Neuroscience.* 47: 273-277.
- Haug T., Storm J.F. (2000). Protein kinase A mediates the modulation of the slow Ca(2+)-dependent K(+) current, I(sAHP), by the neuropeptides CRF, VIP, and CGRP in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 83: 2071-2079.
- Hayashi Y., Shi S.H., Esteban J.A., Piccini A., Poncer J.C., Malinow R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science.* 287: 2262-2267.
- Huang Y. Y., Colley P. A., Routtenberg A. (1992). Postsynaptic then presynaptic protein kinase C activity may be necessary for long-term potentiation. *Neuroscience.* 49: 819-827.
- Huang Y. Y., Kandel E. R. (1994). Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem.* 1: 74-82.
- Jonas P., Bischofberger J., Fricker D., Miles R. (2004). Interneurone diversity series: Fast in, fast out – temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends Neurosci.* 27: 30-40.
- Joo K.M., Chung Y.H., Kim M.K., Nam R.H., Lee B.L., Lee K.H., Cha C.I. (2004). Distribution of Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide Receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor). in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 476: 388-413.
- Kauer J. A., Malenka R. C., Nicoll R. A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron.* 1: 911-917.

- Keinanen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T.A., Sakmann B., Seeburg P.H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*. 249: 556-560.
- Kovács K.A., Steullet P., Steinmann M., Do K.Q., Magistretti P.J., Halfon O., Cardinaux J.R. (2007). TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 4700–4705.
- Kullmann D.M, Lamsa K.P. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat. Rev. Neurosci*. 8: 687-699.
- Laburthe M., Couvineau A., Marie J.C. (2002). VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels*. 8: 137-153.
- Laburthe M., Couvineau A., Tan V. (2007). Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. 28:1631-1639.
- Laburthe M., Prieto J.C., Amiranoff B., Dupont C., Hui Bon Hoa D., Rosselin G. (1979). Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 2. Characterization and structural requirements of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3':5'-monophosphate. *Eur J Biochem*. 96: 239-248.
- Larson J., Wong D., Lynch G. (1986). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal longterm potentiation. *Brain Res*. 368: 347-350.
- Lee H.K.(2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacol Ther*. 112: 810-832.
- Lee H. K., Barbarosie M., Kameyama K., Bear M. F., Huganir R. L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*.405: 955-959.
- Lee H.K., Takamiya K., Han J.S., Man H., Kim C.H., Rumbaugh G., Yu S., Ding L., He C., Petralia R.S., Wenthold R.J., Gallagher M., Huganir R.L. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*. 112: 631-643.
- Lee H.K., Takamiya K., Kameyama K., He K., Yu S., Rossetti L., Wilen D., Huganir R.L. (2007). Identification and characterization of a novel phosphorylation site on the GluR1 subunit of AMPA receptors. *Mol Cell Neurosci*.36: 86-94.

- Lerner U.H., Persson E. (2008). Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*8:154-165.
- Lømo, T. (2003). "The discovery of long-term potentiation". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358: 617-620.
- Lopes da Silva F.H., Witter M.P., Boeijinga P.H., Lohman A.H. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.*70: 453-511.
- Lovinger D. M., Wong K. L., Murakami K., Routtenberg A. (1987). Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 436: 177-183.
- Lutz E. M., Sheward W. J., West K. M., Morrow J. A., Fink G., Harmar A. J. (1993). The VIP2 receptor: Molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* 334: 3-8.
- Lynch, M.A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev.* 84: 87-136.
- Mackay W.A. (2006). *Neurofisiologia sem lágrimas. 3ª Edição.* Fundação Calouste Gulbenkian. Cap. 35.
- Madden D.R. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci.*3: 91-101.
- Malenka R.C., Bear M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 44: 5-21.
- Malenka R. C., Kauer J. A., Perkel D. J., Mauk M. D., Kelly P. T., Nicoll R. A., Waxham M.N. (1989). An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature.* 340: 554-557.
- Malenka R.C., Nicoll R.A. (1999). Long-term potentiation-a decade of progress? *Science.* 285: 1870-1874.
- Malinow R., Schulman H., Tsien R. W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science.* 245: 862-866.
- Martin L.J., Blackstone C.D., Levey A.I., Huganir R.L., Price D.L. (1993). AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience.* 53: 327-358.
- Matsuda S., Mikawa S., Hirai H. (1999). Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *J Neurochem.*73: 1765-1768.
- Matthies H., Reymann K. G. (1993). Protein kinase A inhibitors prevent the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *NeuroReport.* 4: 712-714.

- McBain C.J, Fisahan A. (2001). Interneurons unbound. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 11-23.
- McCulloch D. A., Lutz E. M., Johnson M. S., MacKenzie C. J., Mitchell, R. (2000). Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad. Sci.* 921: 175-185.
- Morgan S.L., Teyler T.J. (2001). Electrical stimuli patterned after the theta-rhythm induce multiple forms of LTP. *J. Neurophysiol.*86: 1289-1296.
- Moroo I., Tatsuno I., Uchida D., Tanaka T., Saito J., Saito Y., Hirai A. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK). in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 795: 191-196.
- Morris R.G., Anderson E., Lynch G.S., Baudry M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl- D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 319: 774-776.
- Nguyen P.V., Kandel E.R. (1997). Brief theta-burst stimulation induces a transcription-dependent late phase of LTP requiring cAMP in area CA1 of the mouse hippocampus. *Learn Mem.* 4: 230-243.
- Otmakhov N., Griffith L. C., Lisman J. E. (1997). Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J Neurosci.*17: 5357-5365.
- Otmakhova N. A., Otmakhov N., Mortenson L. H., Lisman J. E. (2000). Inhibition of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci.* 20: 4446-4451.
- Papp E.C., Hájos N., Acsády L., Freund T.F. (1999). Medial septal and median raphe innervation of Vasoactive Intestinal Polypeptide-containing interneurons in the hippocampus. *Neuroscience.* 90: 369-382.
- Pavrides C., Greenstein Y.J., Grudman M., Winson J. (1988). Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm. *Brain Res.* 439: 383–387.
- Perez J.L., Khatri L., Chang C., Srivastava S., Osten P., Ziff E.B. (2001). PICK1 targets activated protein kinase C α to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *J Neurosci.* 21: 5417-5428.
- Petralia R.S., Wenthold R.J. (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol.* 318: 329–354.

- Prieto J.C., Laburthe M., Rosselin G. (1979). Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 1. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites. *Eur. J. Biochem.* 96: 229-237.
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., LaMantia A-S., McNmara J.O., Williams S.M. (2001). *Neuroscience*. 2ª Edição. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Cap 7.
- Qi M., Zhuo M., Skålhegg B.S., Brandon E.P., Kandel E.R., McKnight G.S., Idzerda R.L.(1996). Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 1571–1576.
- Ramón y Cajal S. (1911). *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertbres*. Paris. Maloine.
- Reymann K. G., Brodemann R., Kase H., Matthies H. (1988). Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 461: 388-392.
- Reymann K.G., Frey J.U. (2007). The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology*.52: 24-40.
- Reymann K. G., Frey U., Jork R., Matthies H. (1988). Polymyxin B, an inhibitor of protein kinase C, prevents the maintenance of synaptic longterm potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 440: 305-314.
- Robertson R.T., Zimmer J., Gähwiller B.H. (1989). Dissection procedures for preparation of slice cultures. In: *A dissection and tissue culture manual of the nervous system*. New York: Alan R Liss Inc. 1-15.
- Roche K.W., O'Brien R.J., Mammen A.L., Bernhardt J., Huganir R.L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron.* 16: 1179-1188.
- Rose G.M. e Dunwiddie T.V. (1986). Induction of hippocampal longterm potentiation using physiologically patterned stimulation. *Neurosci Lett.* 69: 244-248.
- Said S.I.(1986). Vasoactive intestinal peptide. *J Endocrinol Invest.* 9: 191-200.
- Said S.I., Dickman K.G.(2000). Pathways of inflammation and cell death in the lung: modulation by vasoactive intestinal peptide. *Regul Pept.* 93: 21-29.
- Said S.I., Mutt V. (1970). Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science.* 169: 1217-1218.

- Santos S.D., Carvalho A.L., Caldeira M.V., Duarte C.B. (2009). Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience*.158: 105-125.
- Schwartzkroin P.A., Wester K. (1975). Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. *Brain Res*.89:107-119.
- Serrano P., Yao Y., Sacktor T.C. (2005). Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation. *J. Neurosci*. 25: 1979-1984.
- Shepherd G.M. (2003). *The Synaptic Organization of the Brain*. 5ª Edição. Oxford Univ. Pr. Cap. 11.
- Sherwood L. (2007). *Human Physiology*. 6th Edition. Brooks/Cole – Thomson Learning: 84-179.
- Sheward W. J., Lutz E. M., Harmar A. J. (1995). The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. *Neuroscience*. 67: 409-418.
- Shreeve M.S. (2002). Identification of G-Proteins Coupling to the Vasoactive Intestinal Peptide Receptor VPAC1 Using Immunoaffinity Chromatography: Evidence for Precoupling. *Biochem. Biophys Res. Commun*. 290: 1300-1307.
- Sik A., Ylinen A., Penttonen M., Buzsaki G. (1994). Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. *Science*. 265: 1722-1724.
- Silva A. J., Stevens C. F., Tonegawa S., Wang Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 257: 201-206.
- Skeberdis V.A., Chevalleyre V., Lau C.G., Goldberg J.H., Pettit D.L., Suadicani S.O., Lin Y., Bennett M.V., Yuste R., Castillo P.E., Zukin R.S. (2006). Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci*. 9: 501-510.
- Somogyi P., Klausberger T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol*. 562: 9-26.
- Spreafico R., Frassoni C., Arcelli P., Battaglia G., Wenthold R.J., De Biasi S. (1994). Distribution of AMPA selective glutamate receptors in the thalamus of adult rats and during postnatal development. A light and ultrastructural immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res*. 82: 231-244.
- Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to function. *Pharmacol. Rev*. 52: 269-324.

- Vertes R.P. (2005). Hippocampal theta rhythm: A tag for short-term memory. *Hippocampus*.15: 923-935.
- Vertes R.P., Hoover W.B., Viana Di Prisco G. (2004). Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* 3: 173-200.
- Yang K., Trepanier C.H., Li H., Beazely M.A., Lerner E.A., Jackson M.F., MacDonald J.F. (2009) Vasoactive intestinal peptide acts via multiple signal pathways to regulate hippocampal NMDA receptors and synaptic transmission. *Hippocampus*. 19: 779-789.
- Zucker R.S., Regehr W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 355-405.

