



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

TANIA SOUZA DE LIZ

**QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS mGluR1 e FMRP EM
CÓRTEX E HIPOCAMPO DE RATOS APÓS ADMINISTRAÇÃO
DE UMA MISTURA DE AMINOÁCIDOS**

**Florianópolis/SC
2009**

TANIA SOUZA DE LIZ

**QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS mGluR1 e FMRP EM
CÓRTEX E HIPOCAMPO DE RATOS APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE UMA MISTURA DE AMINOÁCIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Carla Inês Tasca (BQA/UFSC)

**Florianópolis/SC
2009**

L769q Liz, Tania S.

Quantificação do receptor metabotrópico de glutamato mGluR1 e da proteína FMRP em córtex e hipocampo de rato após administração de uma mistura de aminoácidos.

72 f., il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1.Receptores metabotrópicos de glutamato – 2. FMRP – 3. Western Blotting – 4. Plasticidade sináptica.

TANIA SOUZA DE LIZ

**QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS mGluR1 e FMRP EM
CÓRTEX E HIPOCAMPO DE RATOS APÓS ADMINISTRAÇÃO
DE UMA MISTURA DE AMINOÁCIDOS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, __ Novembro 2009.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Profa. Dra. Carla Inês Tasca
Co-orientadora

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto - Presidente (UFSC/CTC/EQA)

Profa. Dra. Carla Inês Tasca (UFSC/CCB/BQA)

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto (UFSC/CTC/EQA)

Profa. Dra. Gisele Serpa (IFSC)

Prof. Dr. Paulo Fernando Dias (UFSC/BEG)

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica 4 do Departamento de Bioquímica (BQA), da Universidade Federal de Santa Catarina.

*Dedico este trabalho a Deus, por me dar
saúde, aos meus pais Joaquim Célio de Liz e
Jalbanira Aparecida de Liz, pelo amor, pelo
incentivo e pelas oportunidades que me
deram.*

*Dedico ao meu marido Ricardo pela ajuda,
companheirismo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luismar Marques Porto, pela oportunidade em ingressar em um grupo de trabalho tão competente, e poder desenvolver um trabalho tão valioso para a área científica. Ao grupo da Engenharia Química, que sempre me recebeu de portas abertas.

Agradeço à Prof^a. Dra. Carla Tasca pelo apoio dado, por toda experiência que adquiri, e pela estrutura de laboratório cedida, sem a qual meus experimentos não poderiam ter sido concluídos.

Agradeço de um modo especial à grande companheira, chefe, mãe e conselheira Ingrid Barbato por todo o apoio e incentivo pela realização deste trabalho. São pessoas como você que fazem acontecer, e se para mim aconteceram várias coisas boas, grande parte delas eu devo à sua valiosa amizade. Obrigada de coração!

À Tharine, que foi minha professora, e também por que não dizer, minha orientadora, que com sua paciência e atenção para com todos, permitiu com que meus experimentos acontecessem. Você Tharine, pelo seu companheirismo e esforço, tornou-se muito especial para mim, principalmente depois que descobri sua capacidade extraordinária de “pipetar” no escuro!!!! Não sei como te agradecer!!!! Valeu mesmo!!!

Às meninas do Laboratório Neurogene: Kátia, Maria João, Pricila, Renata, Raquel, Michele e D. Célia, pelo apoio dado!!! Obrigada pela compreensão; desculpem pelas ausências! Renata, obrigada pelo anticorpo!!!!

A todo o pessoal do Laboratório de Neuroquímica 4 que de uma forma ou de outra me ajudaram e torceram por meus resultados! Foi muito bom fazer parte da equipe de vocês, mesmo que por períodos curtos e atribulados!!

À Cristininha pelo companheirismo, pelo apoio, por sempre me lembrar quando eram as datas de matrícula!!!! Boa sorte para você também!

À Gisele Serpa, pelas valiosas contribuições de artigos, do

anticorpo e do marcador de peso molecular!

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio; à toda minha família, pelos votos de sucesso: Amo vocês! Ao meu marido, pelas ajudas, pelo companheirismo, pelo amor!!! À Emanuelle pelo carinho de filha do coração!!!!

A Deus, principalmente, por ter me dado tudo o que tenho, material e espiritual, saúde, amigos, família e oportunidades! Graças a Ele, estou podendo agradecer a todos vocês!

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo principal a avaliação quantitativa da proteína associada à Síndrome do X-frágil (Fragile Mental Retardation Protein, FMRP) e do receptor de glutamato metabotrópico do tipo 1 (mGluR1), realizada em amostras de córtex e de hipocampo de ratos tratados com um pool de aminoácidos denominado Face® (PAF). Um grupo de ratos foi tratado com o PAF enquanto o outro foi utilizado como grupo controle e foi tratado com solução salina durante 45 dias. Os animais foram sacrificados aos 30 e 45 dias de tratamento. Através da técnica de imunoidentificação (Western Blotting), foi possível identificar diferenças significativas nas densidades óticas (D.O.) para cada proteína avaliada em função dos dias de tratamento, assim como em relação ao tipo de amostra (córtex ou hipocampo). Aos 45 dias de tratamento, foi observado um aumento na expressão da proteína FMRP em cerca de 50% nos animais tratados com PAF comparado ao grupo controle, levando a uma diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0,048$). Por outro lado houve uma visível redução na expressão de mGluR1 aos 45 dias de tratamento, tanto no hipocampo quanto no córtex cerebral. Estes dados, acrescidos de dados clínicos de pacientes afetados pela Síndrome do X-Frágil tratados com Face®, sugerem uma forte relação entre as melhoras nos aspectos clínicos destes pacientes (emocional, motor, comportamental) e o aumento da FMRP e diminuição do mGluR1. Estudos têm demonstrado o papel da FMRP como proteína repressora da tradução de mRNAs próximo aos dendritos, sugerindo um controle equilibrado entre as concentrações destas e de outras proteínas.

Palavras-chave: Receptores metabotrópicos de glutamato, FMRP. Síndrome do X-Frágil. Plasticidade sináptica.

ABSTRACT

This work focuses mainly on the quantitative evaluation of Fragile Mental Retardation Protein (FMRP) and Metabotropic Glutamate Receptor type 1 (mGluR1) in cortex and hippocampus samples from rats treated with an amino acid pool called Face® (AAP). One group of rats was treated with AAP solution while another group was taken as a control group and was treated with saline solution during 45 days. The animals were sacrificed at 30 and 45 days of treatment. By Western Blotting technique it was possible to identify significant differences, measure as optical density (O.D.) for each evaluated protein for the two treatment periods analyzed, on both sample types (cortex or hippocampus). Differences were more accentuated at 45 days of treatment. The FMRP protein O.D. increased almost 50% for AAP samples compared with the control group. Results were statistically significant between the samples ($p=0,048$). On the other hand, the mGluR1 O.D. decreased at 45 days of treatment in hippocampus as well as in cortex. Our findings, added to clinical data from Fragile X syndrome patients treated with Face®, suggest a strong relation between the observed clinical improves (emotion, motor, behavior) and the FMRP and mGluR1 levels (increase and decrease, respectively). Those come in support of the repression function that implicates FMRP in mRNA translation next to dendrites, suggesting an equilibrated control for these and others proteins.

Key words: Metabotropic glutamate receptor. FMRP. Fragile X Syndrome. Synaptic plasticity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropião
APP	Proteína precursora amilóide
Arc	<i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CGG	Repetições dos nucleotídeos: citosina, guanina e guanina
D.O.	Densidade ótica
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FC	Fator de calibração
FMR1	Gene Fragile mental retardation 1
FMRP	Fragile mental retardation protein
FMRP-mRNPs	Complexo de associação entre FMRP e polinucleoribossomos mensageiros
FXR1 e 2	Genes homólogos autossômicos 1 e 2
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLU	L-glutamato
GLURs	Receptores de glutamato
GTP	Guanosina trifosfato
G $\beta\gamma$	Subunidades β e γ da proteína G associadas
G α	Subunidades α da proteína G
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
iGLUR	Receptor de glutamato ionotrópico
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
KA	Receptor kainato

KH	<i>K Homology</i>
KO	<i>Knockout</i>
LBE	Laboratório de Biotecnologia para a Vida
LTD	<i>Long term depression</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
MAP1b	Proteína associada a microtúbulo 1b
mGluR1	Receptor metabotrópico de glutamato tipo 1
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , RNA mensageiro
mRNP	<i>Messenger Ribonucleoprotein</i> , Ribonucleoproteína mensageira
NES	Sinal de exportação nuclear
NLS	Sinal de localização nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAF	Mistura (<i>Pool</i>) de aminoácidos Face®
PI	Fosfatidilinositol
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PSD-95	Proteína de densidade pós-sináptica -95
RGG Box	Sequência arginina-glicina-glicina
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
S1,S2,S3	Triplicata das amostras de solução salina
SNARE	<i>SolubleNSF attachment receptor</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SXF	Síndrome do X-Frágil
TBS-T	<i>Tris Buffered saline/Tween 0,05%</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática da estrutura de uma sinapse. .. 29
- Figura 2** – Imagem obtida por microscopia eletrônica de uma junção sináptica localizada na extremidade (S) do dendrito (D).. 30
- Figura 3** – Representação do gene FMR1 com os domínios KH, RGG box e os sinais de exportação nuclear (NES) e de entrada no núcleo (NLS). Na região 5' é mostrado o número de repetições de CGG para indivíduo normal (N), premutado (P) e afetado (A). 33
- Figura 4** – Representação da cascata de eventos envolvendo mGluR/FMRP. Fonte: Adaptado (Miyashiro e Eberwine, 2004). 34
- Figura 5** – Receptores ionotrópicos (iGLUR) e metabotrópicos (mGLUR) de glutamato. 36
- Figura 6** – Estrutura de um receptor metabotrópico. M1-M7 representam as alfa-hélices que atravessam a membrana. 37
- Figura 7** – Formação de segundos mensageiros (DAG e IP3) a partir da quebra do PIP2 em resposta a ativação do receptor acoplado a proteína G. 38
- Figura 8** – Conversão de glutamato em glutamina. 44
- Figura 9** – Representação Conversão de glutamato em α -cetogluturato. 44
- Figura 10** – Ilustração do “sanduíche” para a eletrotransferência. 49
- Figura 11** – Representação das interações químicas que ocorrem na revelação da membrana. 50
- Figura 12** – Expressão da FMRP em córtex em 30 dias de administração com PAF (F1, F2, F3) e solução salina (S1, S2, S3), utilizada como controle. 51
- Figura 13** – Gráfico de quantificações da proteína FMRP em córtex com 30 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados. 52
- Figura 14** – Expressão da FMRP no hipocampo em 30 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3). 52
- Figura 15** – Gráfico de quantificações da proteína FMRP em córtex com 30 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os

	valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados.	53
Figura 16	– Expressão da FMRP no hipocampo em 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3).	54
Figura 17	– Nível de expressão de FMRP em hipocampo com 45 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados. O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ (Teste t-Student não pareado).	54
Figura 18	– Expressão do mGluR1 no hipocampo em 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3).	55
Figura 19	– Nível de expressão do receptor de glutamato metabotrópico tipo 1 (mGluR1) em hipocampo com 45 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados.....	56
Figura 20	– Expressão do mGluR1 em córtex com 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3).	56
Figura 21	– Nível de expressão do receptor de glutamato metabotrópico tipo 1 (mGluR1) em córtex com 45 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados. O asterisco indica médias diferentes do controle; $p < 0,10$ (Teste t-Student não pareado).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da mistura de aminoácidos Face®, determinado por HPLC (Obs.: Cisteína não foi analisada) (Barbato, 2006).....	46
Tabela 2 – Valores de densidade óptica (D.O.) para FMRP em córtex em 30 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).....	51
Tabela 3 – Valores de D.O. para FMRP em hipocampo 30 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).....	53
Tabela 4 – Valores de D.O. referentes à quantificação da FMRP nas amostras de hipocampo com 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3)....	54
Tabela 5 – Valores de D.O. referentes ao mGluR1 em amostras hipocampo aos 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).....	55
Tabela 6 – Valores de D.O. referentes ao mGluR1 em amostras córtex aos 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 ABORDAGEM DA PESQUISA	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 JUSTIFICATIVA	27
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
4.1 JUNÇÕES SINÁPTICAS	29
4.2 A SÍNDROME DO X-FRÁGIL	32
4.3 A PROTEÍNA FMRP	32
4.4 RECEPTORES DE GLUTAMATO	35
4.5 mGluR1	39
4.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES MGLURS E A FMRP	40
4.7 GLUTAMATO	42
4.8 METABOLISMO DO GLUTAMATO	43
5 MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1 REAGENTES	45
5.2 EQUIPAMENTOS	45
5.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS:	45
5.3.1 Modelo Animal	45
5.3.2 Composição Química do PAF	46
5.3.3 Administração dos Aminoácidos	47
5.3.4 Dosagem de Proteína	47
5.4 WESTERN BLOTTING	48
5.4.1 Eletrotransferência	48
5.4.2 Bloqueio da Membrana e Incubação com os Anticorpos	49
5.4.3 Revelação	49
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6 RESULTADOS	51
6.1 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA FMRP	51
6.1.1 Expressão de FMRP em córtex de <i>Rattus norvegicus</i> , em 30 dias	51
6.1.2 Expressão de FMRP em hipocampo de <i>Rattus norvegicus</i> , em 30 dias	52

6.1.3	Expressão de FMRP em hipocampo de <i>Rattus norvegicus</i> , em 45 dias	53
6.2	NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO mGluR1	55
6.2.1	Expressão de mGluR1 em hipocampo de <i>Rattus norvegicus</i> , em 45 dias	55
6.2.2	Expressão de mGluR1 em córtex de <i>Rattus norvegicus</i> , em 45 dias	56
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 ABORDAGEM DA PESQUISA

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos durante os últimos anos com o objetivo de auxiliar no entendimento da transmissão de informações em nossas células neuronais. O que se tem observado é que são muitos os fatores envolvidos neste processo e que a regulação destes é intrinsecamente interligada e altamente complexa. Diversas proteínas têm sido reveladas como fatores importantes nos processos de transmissão e maturação sináptica. A proteína associada à Síndrome do X-frágil (Fragile-X Mental Retardation Protein, ou FMRP) é importante no desenvolvimento e maturação dos dendritos e conexões sinápticas (Willemsen *et al.*, 2004). Sua ausência é responsável pelas deficiências cognitivas, físicas e comportamentais características, por exemplo, da Síndrome do X-Frágil (SXF) (Tassone *et al.*, 1999).

A Síndrome do X-Frágil é a forma mais comum de retardo mental herdado (Tamanini *et al.*, 1996), sendo considerada uma síndrome relacionada diretamente ao neurodesenvolvimento. Em homens afetados pela SXF, além das funções cognitivas alteradas, várias características físicas podem ser observadas, incluindo macroorquidismo, anomalias crânio-faciais distintas como: face alongada, mandíbula proeminente, orelhas em abano, hipotelorismo e pés planos. Além de retardo mental, as habilidades de linguagem e de fala são severamente afetadas em homens com a síndrome, os quais exibem frequentemente comportamento autista, incluindo contato visual pobre, timidez, ansiedade e inquietação (Hagerman, 1997).

O fenótipo X-Frágil inclui também defeitos na estrutura e plasticidade sináptica. Indivíduos afetados e ratos *knockout* (KO) para o gene FMR1 (*Fragile Mental Retardation 1*) apresentam defeitos na morfologia das espinhas dendríticas, caracterizadas por serem longas, finas e abundantes, sugerindo que a regulação defeituosa na localização e tradução de mRNAs nos pacientes com SXF pode afetar a maturação das espinhas dendríticas (Antar *et al.*, 2004).

Tanto em estudos animais quanto em humanos sugerem dois papéis importantes para a FMRP nos neurônios (Feng, 2002): na formação e maturação das sinapses através do controle de sinais durante seu desenvolvimento, e na resposta da liberação dos neurotransmissores, controlando a localização e/ou a tradução dos mRNAs associados nos locais pós-sinápticos. Foi sugerido que o papel da FMRP na plasticidade

sináptica tem relação com o fato de que a FMRP é uma das proteínas sintetizadas em resposta à ativação do mGluR (Weiler e Greenough, 1999).

Os receptores do grupo mGluR participam dos processos cognitivos, sensoriais, motores e na percepção olfatória e estão presentes no córtex cerebral (Lopez-Bendito *et al.*, 2002), neurônios cerebelares (Berthele *et al.*, 1999) e medula espinhal (Aronica *et al.*, 2001). No hipocampo foi demonstrado uma expressão mais restrita dos subtipos de receptores mGluR1b, mGluR2/3, mGluR4a e mGluR5 (Blumcke *et al.*, 1996). Com exceção ao mGluR6, cuja localização é confinada à retina, os demais membros da família são expressos no sistema nervoso central de mamíferos tanto em células neuronais quanto em células da glia com distintos perfis de expressão temporal e espacial (Kew e Kemp, 2005). Embora os membros da família mGluR possam mediar a transmissão sináptica via ativação de potenciais pós-sinápticos excitatórios lentos, eles geralmente exercem um papel modulatório regulando a excitabilidade neuronal, transmissão e plasticidade sináptica (Kew e Kemp, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal realizar uma avaliação quantitativa do receptor de glutamato metabotrópico tipo I (mGluR1), um dos principais receptores de glutamato presente na membrana pós-sináptica das células neurais, e da proteína associada à Síndrome do X-Frágil e ao retardo mental (FMRP). Através desta avaliação, objetivamos associar as variações na concentração destas duas proteínas em função da ingestão de um *pool* de aminoácidos denominado Face® (PAF), utilizando o Rato (*Rattus norvegicus*) como modelo animal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o mGluR1 e a FMRP em homogenatos de hipocampo e córtex cerebral;
- Avaliar a relação entre FMRP e mGluR1 através da comparação entre os valores das quantificações de cada proteína nas duas estruturas cerebrais;
- Avaliar o aumento ou diminuição destas proteínas em função do tempo de tratamento com o PAF, aos 30 e aos 45 dias.

3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho tem como motivação resultados obtidos em estudo prévio realizado em 2006 (Barbato, 2006) o qual desenvolveu um estudo clínico em pacientes portadores e afetados pela Síndrome do X-Frágil e também um estudo experimental com ratos. No estudo clínico avaliou-se a evolução comportamental desses pacientes em função da ingestão de um *pool* de aminoácidos comercial denominado Face®, o qual foi administrado diariamente. O *pool* de aminoácidos Face® (PAF) é uma mistura de aminoácidos livres produzido pelo laboratório LBE de São José, Santa Catarina, por processo industrial de propriedade reservada, e foi utilizado como fornecido pelo fabricante. Trata-se de um produto de natureza orgânica, obtido através de elevadas temperaturas e pressão controlada, com repasse de descarga elétrica. Da reação é sintetizada uma gama de aminoácidos solúveis em água conforme dados fornecidos pelo laboratório LBE. Detalhes do processo de produção são mantidos em sigilo industrial. Na amostra de indivíduos tratados com PAF foi possível afirmar que houve melhora na memorização, na cognição, no aprendizado, no comportamento e no aspecto emocional, principalmente nos pacientes afetados e pacientes conhecidos como *zona gray* (Barbato, 2006). Através do acompanhamento e avaliação rigorosa com neuropsicóloga e pelo uso de testes psicométricos foi observada uma melhora significativa em alguns aspectos clínicos nesses pacientes. Em função desses resultados foi realizado um segundo estudo baseado em um modelo animal. Com base nesses resultados foram sugeridos estudos para avaliação de alguns receptores de glutamato, os quais estão presentes nas células neurais e são de fundamental importância nas conexões sinápticas. O sistema glutamatérgico está envolvido em diversos processos no sistema nervoso, incluindo cognição, memória e aprendizado (Ottersen e Storm-Mathisen, 1984), e poderia ser influenciado por algum(s) do(s) componente(s) do PAF.

A tradução de proteínas em regiões distais dos dendritos tem sido mostrada como um evento intimamente ligado à plasticidade sináptica. Weiler (1997) e colaboradores têm mostrado que a ativação do receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) dá início a uma cascata de fosforilação de proteínas, levando como consequência a uma rápida associação entre alguns mRNAs e a maquinaria protéica de tradução próximo às sinapses, resultando na síntese protéica. Dentre os mRNAs identificados encontra-se o da proteína FMRP (Fragile Mental Retardation Protein), uma proteína ligante de vários mRNAs, a qual apresenta um papel importante na regulação da síntese protéica e,

possivelmente, na localização de mRNAs nos dendritos (Antar *et al.*, 2004). Utilizando sinaptoneurossomos como ferramenta de estudo, foi evidenciado que esta associação dos mRNAs com o complexo protéico de tradução ocorre dentro de 1 a 2 minutos após a estimulação do mGluR1, e que a expressão da FMRP é aumentada após o estímulo do mGluR1 (Weiler *et al.*, 1997). Estes dados sugerem um papel importante da FMRP e do mGluR1 para a maturação normal das conexões sinápticas.

Sabe-se que alguns aminoácidos são considerados tratamento de suporte e alternativa terapêutica nutricional, sendo também importantes para o abastecimento metabólico dos astrócitos e neurônios no nível do SNC (Smith, 2000). Portanto, pesquisas envolvendo a FMRP e o mGluR1 e seus níveis de expressão em um modelo animal, tal como o rato, podem auxiliar no entendimento das melhoras observadas em pacientes afetados, e tratados com o PAF. Isso pode abrir caminhos para uma nova opção terapêutica para esta síndrome.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 JUNÇÕES SINÁPTICAS

O processo químico de interação entre os neurônios acontece no terminal axonal, mais especificamente em uma estrutura chamada sinapse. Uma sinapse química é composta estruturalmente por uma membrana pré e uma pós-sináptica as quais são separadas por uma fenda sináptica com largura de ~20–50 nm (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A fenda é preenchida com uma matriz extracelular de proteínas fibrosas e tem como função manter a adesão entre as membranas (Bear *et al.*, 2002). A transmissão sináptica no sistema nervoso humano maduro é feita através da liberação de substâncias químicas chamadas neurotransmissores, que se ligam aos receptores químicos do neurônio seguinte e promovem mudanças excitatórias ou inibitórias em sua membrana (Bear *et al.*, 2002).

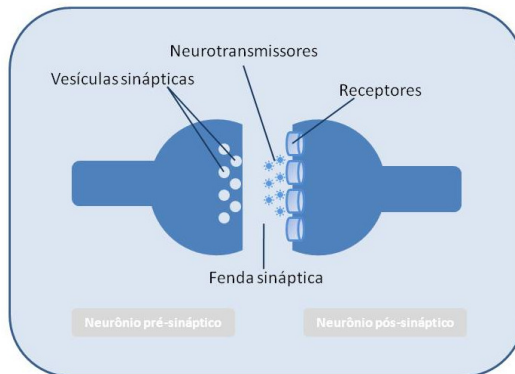


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de uma sinapse.

Fonte: A autora.

O lado pré-sináptico, também chamado de elemento pré-sináptico é na maioria das vezes um terminal axonal. Esta região tipicamente contém várias vesículas membranosas pequenas com um diâmetro aproximado de 50 nm, chamadas de vesículas sinápticas. Estas organelas armazenam neurotransmissores utilizados na comunicação com neurônios pós-sinápticos (Bear *et al.*, 2002). A transmissão sináptica requer que neurotransmissores sejam sintetizados e estejam prontos para liberação. Em sua maioria, os neurotransmissores

classificam-se como aminoácidos, aminas e peptídeos. Os neurotransmissores do tipo aminoácidos e aminas são pequenas moléculas orgânicas com pelo menos um átomo de nitrogênio, armazenadas e liberadas em vesículas sinápticas. Já os peptídicos são grandes moléculas armazenadas e liberadas em grânulos secretores maiores (~100 nm).

A síntese e o armazenamento dos neurotransmissores são realizados de maneiras diferentes. O glutamato e a glicina, por exemplo, estão entre os 20 aminoácidos necessários para a síntese protéica em geral sendo, portanto, moléculas abundantes na célula. O ácido gama-aminobutírico (GABA) e as aminas são produzidos apenas pelos neurônios que os liberam. Enzimas específicas convertem moléculas precursoras em neurotransmissores maduros, os quais são carregados por enzimas transportadoras para dentro das vesículas sinápticas no terminal axonal. Os neurotransmissores peptídicos são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso, mas só tornam-se ativos depois de passarem pelo aparelho de Golgi, onde são clivados e depois transportados para o terminal axonal.

A liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica ocorre em resposta a uma despolarização da membrana do terminal axonal, onde se localizam as vesículas e os grânulos secretores (Figura 2) (Bear *et al.*, 2002).



Figura 2 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de uma junção sináptica localizada na extremidade (S) do dendrito (D).

Fonte: http://synapses.clm.utexas.edu/atlas/1_4_1_2.stm.

A despolarização de um terminal nervoso causado por um potencial de ação provoca a abertura dos canais de cálcio, e esta elevação no nível de Ca^{2+} juntamente com a fusão da membrana

vesicular com a membrana pré-sináptica causam a liberação dos neurotransmissores. Esta fusão envolve a junção de proteínas intrínsecas das membranas plasmáticas (vesicular e pré-sináptica) mediante proteínas específicas de ancoragem pertencentes a um complexo protéico chamado de SNARE. Os neurotransmissores liberados difundem-se na fenda sináptica e interagem com receptores localizados na membrana pós-sináptica, levando a mudanças funcionais na célula-alvo (Lopes *et al.*, 1999).

Apesar da gama de alterações observadas no nível dos neurotransmissores e da interação desses com seus receptores, tem-se demonstrado que anormalidades em rotas de sinalização intracelular estão diretamente relacionadas a uma série de alterações nos sistemas de neurotransmissão. De fato, funções cerebrais de maior complexidade como o comportamento, o humor e a cognição são criticamente dependentes dos processos de transdução de sinal para o seu funcionamento adequado (Kapczinski *et al.*, 2004). Diversos receptores são considerados fatores importantes no processo de transmissão e maturação sináptica. Proteínas G (proteínas ligantes de GTP) são moléculas que traduzem o sinal de um receptor transmembrana a ela acoplado para os segundos mensageiros intracelulares. A especificidade da interação do receptor com uma proteína G em particular determina a natureza do mecanismo efetor ao qual o receptor ativado estará acoplado. As proteínas G realizam a transdução de sinal de mais de 80% das moléculas extracelulares de sinalização, incluindo hormônios, neurotransmissores e neuromoduladores. Logo, são interessantes candidatas para anormalidades envolvendo a comunicação entre múltiplos sistemas neurais (Kapczinski *et al.*, 2004). A regulação das diversas cascatas de sinalização intracelular modula os fatores de transcrição gênica e as proteínas que se ligam a genes específicos no DNA, induzindo a formação de novas proteínas envolvidas na plasticidade celular. Desta forma, alterações em qualquer nível da cascata podem provocar a morte celular através da formação de proteínas pró-apoptóticas ou da diminuição dos fatores de proteção/sobrevivência celular, como as neurotrofinas e proteínas estabilizadoras do citoesqueleto (Kapczinski *et al.*, 2004).

O estudo sobre a atuação dessas proteínas nos casos patológicos é de grande valor na busca por possíveis tratamentos para estas deficiências. Um exemplo importante é a proteína associada à Síndrome do X-frágil (Fragile-X Mental Retardation Protein, ou FMRP). A ausência da FMRP é responsável pelas deficiências físicas, cognitivas e comportamentais características da SXF (Tassone *et al.*, 1999).

4.2 A SÍNDROME DO X-FRÁGIL

A Síndrome do X-Frágil é a forma mais comum de retardo mental herdado (Tamanini *et al.*, 1996), sendo considerada uma síndrome relacionada diretamente ao neurodesenvolvimento. Sua incidência é estimada em 1:4000 homens e 1:8000 mulheres (Jin *et al.*, 2004). Esta condição é caracterizada por uma expansão atípica de 200 ou mais repetições do trinucleotídeo CGG (citosina–guanina–guanina) na região promotora do gene FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) localizado no braço longo do cromossomo X, *locus* Xq27.3 (Verkerk *et al.*, 1991; Bardoni *et al.*, 2006). Esta mutação leva a não transcrição do correspondente mRNA e à perda da expressão da proteína FMRP, a qual atua como reguladora da tradução e transporte de mRNAs, sendo importante no desenvolvimento e maturação sináptica. A FMRP é uma proteína ligante de RNA, formando complexos mensageiros de ribonucleoproteínas (mRNP) que estão associados com a tradução de polirribossomos (Jin e Warren, 2003).

A variação no número de repetições de CGG irá diferenciar os portadores em categorias: de 6 até 44 repetições são classificados como indivíduos normais; de 45 até 54 repetições, zona gray (zona limítrofe); de 55 até 200 repetições, indivíduos pré-mutados; e com 200 até milhares de repetições são chamados de afetados para a SXF (Hagerman e Hagerman, 2004).

Em indivíduos afetados, a metilação do DNA pode inibir diretamente a ligação de alguns fatores de transcrição à região promotora do gene FMR1 levando ao seu silenciamento (Farzin *et al.*, 2006). Indivíduos pré-mutados não exibem manifestações clínicas óbvias, porém apresentam risco de transmitirem a mutação completa aos seus descendentes, já que a transição de pré-mutação para mutação completa ocorre apenas por transmissão materna (Bardoni e Mandel, 2002).

O fenótipo cognitivo e comportamental em homens SXF é manifestado desde a infância com hiperatividade, problemas com atenção, atrasos na linguagem, contato visual pobre, hábito de bater palmas e irritabilidade. Alguns destes problemas são relacionados a uma sensibilidade aumentada a estímulos auditivos ou visuais.

4.3 A PROTEÍNA FMRP

A FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) é expressa com

maior abundância no cérebro e testículo desde a fase fetal até a fase adulta (Devys *et al.*, 1993); entretanto, os sintomas clínicos mais severos observados em pacientes com ausência desta proteína associam-se principalmente ao cérebro (Tamanini *et al.*, 1996). Embora a FMRP esteja localizada predominantemente no citoplasma, foi demonstrado por microscopia eletrônica que a FMRP também está presente no núcleo. A proteína apresenta um domínio de localização nuclear (NLS) e um domínio de saída nuclear (NES), as quais a permitem transitar entre o núcleo e o citoplasma. Ela já foi também observada através de microscopia eletrônica dentro do poro nuclear (Jin e Warren, 2000). Portanto, ela pode atuar como um promotor da circulação de mRNAs específicos entre o núcleo e o citoplasma (Laggerbauer *et al.*, 2001).

Várias isoformas da FMRP foram descritas provenientes do “splicing” alternativo dos 17 éxons presentes no mRNA do gene FMR1. Este processo gera diferentes variantes de mRNAs codificando para várias proteínas FMRPs com massa molecular de 70 a 80 kDa (Tamanini *et al.*, 1996). A isoforma mais abundante tem massa molecular de 78 kDa e apresenta ao longo de sua cadeia aminoacídica dois domínios KH e um domínio RGG box (Figura 3) (Laggerbauer *et al.*, 2001). Estes domínios são regiões características de ligação com mRNAs. A importância destes domínios KH é ilustrada pelo exemplo de um paciente X-Frágil apresentando fenótipo clínico característico e que, no entanto, não possuía expansão de trinucleotídeos e ausência de FMRP, mas sim apresentava uma mutação de ponto (Ile304Asn) no segundo domínio KH, demonstrando que a proteína contendo esta mutação apresentava capacidade reduzida para ligação a mRNAs (Tamanini *et al.*, 1996).

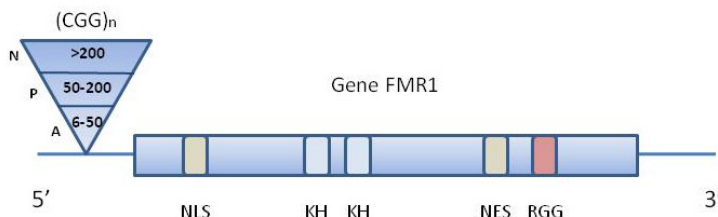


Figura 3 – Representação do gene FMR1 com os domínios KH, RGG box e os sinais de exportação nuclear (NES) e de entrada no núcleo (NLS). Na região 5' é mostrado o número de repetições de CGG para indivíduo normal (N), premutado (P) e afetado (A).

Fonte: Adaptado de <http://www.biomedicalgenetics.nl/Members/Oostra/oostra.html>.

Estudos identificaram e caracterizaram um sítio específico de ligação de alta afinidade para FMRP na região RGG box de seu próprio mRNA. Esta região contém um domínio rico em purina, essencial para a ligação com a FMRP (Schaeffer *et al.*, 2001).

A FMRP é expressa de modo mais abundante nos dendritos, mais especificamente dentro de estruturas periféricas chamadas espinhas dendríticas (*spines*). A proteína é primariamente encontrada associada com ribossomos citoplasmáticos e também com ribossomos ligados ao retículo endoplasmático. A associação ribossomal com FMRP é dependente de mRNA e requer várias outras proteínas, formando um grande complexo ribonucléico (mRNP). Estes dados sugerem que a FMRP está relacionada ao transporte de mRNA desde o núcleo até os dendritos e pode cumprir um papel importante associado à síntese protéica nos dendritos e nas sinapses (Wilson e Cox, 2007). Alguns componentes protéicos do complexo chamado FMRP-mRNP foram determinados recentemente: FXR1P, FXR2P, nucleolina, YB1/p50, Puralfa e mStaufen (Ohashi *et al.*, 2002).

O modo de atuação da FMRP tem sido estabelecido com base em observações feitas nas extremidades dendríticas anormais tanto no cérebro de indivíduos afetados pela Síndrome do X-Frágil quanto no de ratos *knockout* para o gene FMR1. Um modelo proposto para a função da FMRP no cérebro é mostrado na Figura 4.

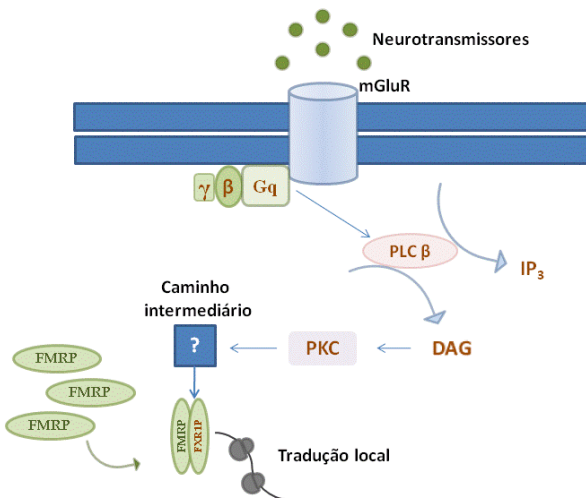


Figura 4 – Representação da cascata de eventos envolvendo mGluR/FMRP.

Fonte: Adaptado (Miyashiro e Eberwine, 2004).

A FMRP presente no citoplasma se dimeriza e entra no núcleo do neurônio através de seu sinal de localização nuclear. No núcleo ela se associa a outras proteínas e mRNAs formando um complexo FMRP-mRNPs. Este complexo sai do núcleo através de seu sinal de exportação nuclear e no citoplasma poderá seguir dois caminhos: Associar-se diretamente aos ribossomos ou juntar-se a outro complexo protéico chamado RISC, antes da associação aos ribossomos. Em ambas as situações existe a regulação da síntese protéica no corpo neuronal. Por outro lado, estes complexos podem ser transportados para os dendritos e regular a tradução de mRNAs específicos através de sinais provenientes da ativação de receptores de glutamato metabotrópicos (Jin *et al.*, 2004).

Tem sido proposto que uma das funções da FMRP é regular a tradução de mRNAs alvos, incluindo o seu próprio transcrito (Todd *et al.*, 2003), podendo ainda inibir a tradução de proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* a nível pós-transcricional (Laggerbauer *et al.*, 2001). Este efeito é específico para FMRP, já que outras proteínas com domínios similares de ligação a mRNAs, incluindo os dois homólogos autossômicos da FMRP (FXR1 e FXR2) falham para suprimir a tradução. Estudos sugerem que a FMRP inibe a associação entre a subunidade 80S ribossomal e os mRNA alvos (Laggerbauer *et al.*, 2001). Pesquisas recentes sugerem que algumas proteínas, como por exemplo a Arc e a MAP1b, aumentam sua expressão na ausência da FMRP, e que a mesma atua como um repressor da tradução em nível de sinapse. Quando a FMRP está ausente, a perda da repressão da tradução nas sinapses poderia resultar em disfunção sináptica em pacientes com fenótipo para X-Frágil (Zalfa *et al.*, 2003).

Na ausência da FMRP os mRNAs que se associam ao complexo FMRP-mRNP terão sua tradução desregulada, podendo assim induzir um enfraquecimento na plasticidade sináptica e do déficit cognitivo (Jin *et al.*, 2004).

4.4 RECEPTORES DE GLUTAMATO

Os receptores de glutamato podem ser classificados genericamente como ionotrópicos (iGLU) ligados a um canal iônico e metabotrópicos (mGluR) ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, via proteína G (Figura 5) (Carobrez, 2003). Os receptores ionotrópicos possuem sítios de ligação para os neurotransmissores localizados em um canal iônico com comporta. Quando o neurotransmissor se liga ao sítio receptor ocorre uma

mudança de conformação espacial no receptor resultando na abertura (ou fechamento) do poro iônico.

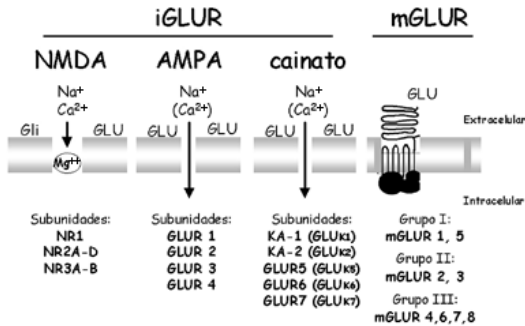


Figura 5 – Receptores ionotrópicos (iGLUR) e metabotrópicos (mGLUR) de glutamato.

Fonte: (Carobrez, 2003).

Um neurotransmissor pode ligar-se a vários tipos diferentes de receptores. Cada receptor ao qual um mesmo neurotransmissor se liga é um subtipo de um receptor. Os iGLU foram classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em: receptor AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato), o receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) e os receptores cainato (KA). O glutamato ativa os três subtipos, mas AMPA só ativa o receptor AMPA, NMDA só ativa receptor NMDA, e o cainato atua da mesma forma. Os sinais dos receptores mGluR e NMDA podem regular a localização e tradução de mRNAs distintos (Antar *et al.*, 2004).

Na família de receptores metabotrópicos de glutamato acoplados à proteína G são identificados oito membros (mGluR1-8) os quais foram divididos em três grupos, com base na homologia de suas sequências e no seu potencial farmacológico: Grupo I: representado pelos receptores mGluR1 e mGluR5, Grupo II: mGluR2 e mGluR3 e Grupo III: mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (Kew e Kemp, 2005).

Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) apresentam aspectos comuns na estrutura molecular com outros receptores ligados à proteína G, mas a sua expressão no sistema nervoso central de mamíferos elege estes receptores como mediadores essenciais, não apenas no desenvolvimento inicial do organismo, mas também na determinação do destino das células em casos de doenças do sistema nervoso como Doença de Parkinson, de Alzheimer e de Huntington

(Maiese *et al.*, 2005). Dada a larga distribuição destes receptores, os mGluRs têm impacto sobre as funções neuronais, vasculares e de células da glia e são ativados por uma grande variedade de estímulos que incluem neurotransmissores, peptídeos, hormônios, fatores de crescimento, íons, lipídeos e até mesmo a luz. A respeito dos caminhos de transdução de sinal que podem modular tanto respostas excitatórias quanto inibitórias, o sistema mGluR dirige um espectro de caminhos celulares que envolvem proteínas kinases, endonucleases, metabolismo energético, caspases e até mesmo a regulação da degradação de DNA genômico (Maiese *et al.*, 2005). A ativação do receptor metabotrópico de glutamato leva a um aumento na hidrólise do fosfatidilinositol (PI), resultando na formação de diacilglicerol (DAG) e IP₃ e na liberação de cálcio a partir das reservas intracelulares (Furuya *et al.*, 1989). Estes segundos mensageiros modulam uma grande variedade de caminhos metabólicos, além de controlar a expressão de alguns genes e o crescimento e diferenciação celular (Mayer e Miller, 1990). A maioria dos receptores acoplados a proteína G apresentam semelhanças em sua estrutura e são compostos por um polipeptídeo com sete alfa-hélices atravessando a membrana (Figura 6). Duas alças são extracelulares e formam o sítio de ligação do receptor. As pequenas variações estruturais nestas alças definirão os neurotransmissores agonistas e/ou antagonistas que se ligarão ao receptor. As duas alças intracelulares, da mesma forma também se ligam a proteínas G diferentes, dependendo de variações estruturais presentes nela e desencadeiam a ativação de sistemas efetores diferentes em resposta a ativação do neurotransmissor.

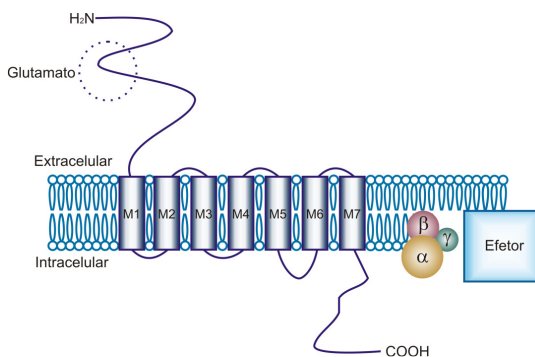


Figura 6 – Estrutura de um receptor metabotrópico. M1-M7 representam as alfa-hélices que atravessam a membrana.

Fonte: Adaptado (Fouilloux et al., 2004).

A transmissão sináptica nesses receptores envolve três etapas: 1)

interação do neurotransmissor com a proteína receptora; 2) Ativação de proteínas G e 3) Ativação de sistemas efetores. Todas as proteínas G possuem o mesmo modo básico de operação. No estado de repouso, o complexo protéico inteiro “flutua” ligado à superfície interna da membrana, com uma molécula de guanosina difosfato (GDP) ligada a subunidade α da proteína G ($G\alpha$). Quando este complexo ligado a um GDP se choca com um receptor ativado (ligado a um transmissor), a subunidade $G\alpha$ troca seu GDP por uma molécula de trifosfato de guanosina (GTP) captado do citosol. A proteína G, agora ativada, divide-se em duas partes: a subunidade $G\alpha$ ligada ao GTP e o complexo $G\beta\gamma$. Ambos, livres podem ativar diferentes efetores protéicos, que podem ser canais iônicos ou enzimas que geram segundos mensageiros (Bear et al., 2002). A ativação de enzimas pela proteína G pode disparar reações bioquímicas em cascata as quais envolvem outras enzimas, chamadas de segundos mensageiros (Figura 7). Algumas cascatas de segundos mensageiros podem se ramificar dentro da célula. A proteína G ativada pode estimular a fosfolipase C (PLC), a qual atua sobre um fosfolípido da própria membrana (PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) quebrando-o para formar duas moléculas de segundos mensageiros: Diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). O DAG que é solúvel em lipídios permanece no plano da membrana onde ativa uma enzima situada à frente na cascata, a proteína quinase C (PKC). Ao mesmo tempo o IP₃ que é solúvel em água difunde-se no citosol e liga-se a receptores específicos no retículo endoplasmático liso e em outras organelas membranosas da célula. Estes receptores são canais de Ca²⁺ ativados por IP₃ o qual causa descarga dos estoques de Ca²⁺ destas organelas. O aumento de Ca²⁺ pode disparar efeitos amplos e duradouros (Bear et al., 2002).

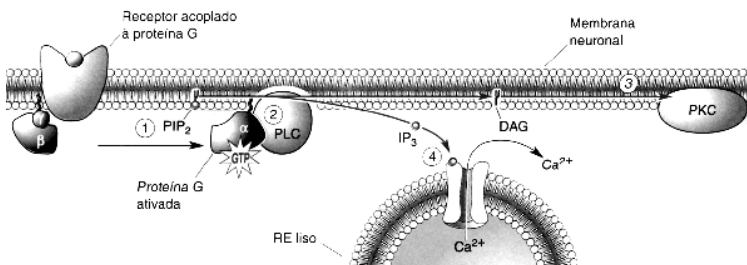


Figura 7 – Formação de segundos mensageiros (DAG e IP₃) a partir da quebra do PIP₂ em resposta a ativação do receptor acoplado a proteína G.

Fonte: Adaptado (Bear et al., 2002)

A formação do complexo neurotransmissor-receptor pode dar

início a outras cadeias de reações bioquímicas que culminam com a abertura indireta dos canais iônicos. Neste caso o receptor pós-sináptico ativa a proteína G que por sua vez, aciona outra proteína chamada efetadora. Esta poderá mudar a conformação de um canal iônico ou então, ativar uma enzima chave que poderá modificar o metabolismo do neurônio pós-sináptico. A vantagem no uso de 2º mensageiros é que intracelularmente são produzidos muitos mediadores, isto é, existe uma amplificação do sinal inicial. Os receptores ionotrópicos possuem uma relação de 1 neurotransmissor : 1 canal iônico (Bear *et al.*, 2002). No sistema acoplado à proteína G a relação é de 1 neurotransmissor : muitos canais. Além disso, possui um efeito mais prolongado e os 2º mensageiros podem enviar sinais para dentro da célula (Bear *et al.*, 2002). Os receptores de glutamato são distribuídos em regiões subcelulares específicas e alteram a sua expressão durante o desenvolvimento do sistema (Maiese *et al.*, 2005). Os mGluRs do grupo I, incluindo mGluR1 e mGluR5 aparecem de modo predominante na membrana pós-sináptica de junções sinápticas glutamatérgicas (Lujan *et al.*, 1997). Contudo, no período pós-natal inicial o mGluR1 e mGluR5 podem ser encontrados nos dendritos proximais e no corpo do neurônio. Com o tempo estes receptores se tornam densamente distribuídos nas regiões distais dos dendritos para participar das funções sinápticas (Liu *et al.*, 1998).

4.5 mGluR1

A localização do mGluR1 e mGluR5 na membrana pós sináptica é altamente específica. Eles são encontrados aos arredores e não dentro da região de densidade pós-sináptica. Esta especificidade na localização é devida a proteínas regulatórias as quais se ligam a porção intracelular dos receptores (Anjaneyulu *et al.*, 2008).

Os receptores de Glutamato Metabotrópicos do grupo I, mGluR1 e mGluR5, são funcionalmente acoplados a ativação da enzima fosfolipase C (Pin e Duvoisin, 1995; Conn e Pin, 1997; Cartmell e Schoepp, 2000). Eles têm sido associados a diferentes respostas ao glutamato, incluindo a modulação da excitabilidade de células piramidais e não piramidais e na plasticidade sináptica (Ferraguti e Shigemoto, 2006), e são intensamente expressos no hipocampo (Gil-Sanz *et al.*, 2008). O estímulo do mGluR1 tem sido observado induzir a formação de cAMP e a liberação de ácido araquidônico (van den Pol *et al.*, 1994).

Estudos indicaram que a distribuição de mRNA do mGluR1 no cérebro humano parece ser similar a observada em ratos (Shigemoto et al., 1992) com os níveis mais altos encontrados no cerebelo, seguido pelo gânglio basal e córtex cerebral, enquanto o hipocampo apresentou níveis mais baixos deste mRNA. As diferentes formas de mRNAs provenientes do processo de splicing também parecem ser similares aquelas vistas em ratos, onde a variante β é mais comumente encontrada no hipocampo, enquanto a forma α é predominante em outras regiões do cérebro (Hampson et al., 1994). A partir deste modelo de distribuição, é possível “predizer” que o mGluR1 apresenta um papel funcional similar no humano e no rato (Stephan et al., 1996).

4.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES MGLURS E A FMRP

Estudos envolvendo a plasticidade sináptica no hipocampo do camundongo Knockout-Fmr1 sugerem uma conexão entre receptores de glutamato metabotrópico (mGluR) em relação ao fenótipo da SXF. O papel da FMRP associado à plasticidade sináptica foi sugerido devido ao fato da FMRP ser uma das proteínas sintetizadas em resposta à ativação do mGluR (Weiler e Greenough, 1999). Pfeiffer e Huber (2006) demonstraram que o mGluR dependente de LTD (*Long Term Depression*) está significativamente aumentado em animais com ausência da proteína FMRP, sugerindo que a FMRP regula a LTD através da diminuição na expressão do mGluR, bem como no nível da tradução do mRNA. O LTD está associado a uma diminuição na eficácia sináptica que ocorre após alguns tipos de estímulos elétricos no hipocampo.

Uma melhor investigação do papel de controle da tradução, mediada pela FMRP através da atividade neuronal, foi possível através do monitoramento do camundongo Knockout-Fmr1. Os experimentos realizados com este modelo animal mostraram que o mGluR-LTD está aumentado no hipocampo desses camundongos (Huber *et al.*, 2002). Portanto a hipótese é que o mGluR5 estimule a síntese de proteína local, e a FMRP parece inibir esta síntese. Quando na ausência da proteína FMRP, as mensagens serão estimuladas via mGluR5 e poderão ser mais traduzidas do que geralmente o são a níveis normais (Bear, 2005). É proposto que o LTD assim como a função do mGluR aumentados são responsáveis pelos aspectos do fenótipo comportamental na Síndrome do X-Frágil e que antagonistas do mGluR1 deveriam ser considerados como possíveis agentes terapêuticos (Huber *et al.*, 2002).

A FMRP ausente em indivíduos com a SXF é sintetizada *in vitro* em preparações de sinaptoneurosomas em resposta a estimulações glutamatérgicas (Weiler *et al.*, 1997). Estudos neuroanatômicos também propuseram que pacientes com SXF apresentam dendritos com morfologia e número de ramificações anormais, sugerindo assim que nestes indivíduos a FMRP não é produzida nas sinapses em resposta à uma ativação aferente aos receptores de glutamato metabotrópicos, levando a um déficit no processo de plasticidade sináptica (Irwin *et al.*, 2000). Em outros experimentos, através de técnicas imunorreativas utilizando animais expostos a luz após permanência no escuro profundo, o nível de FMRP foi elevado. A síntese de FMRP foi ativada através das regiões envolvidas com atividade sinaptogênica, evidenciando estimulações somatossensoriais, motoras e de aprendizado (Irwin *et al.*, 2000; Gabel *et al.*, 2004).

Tanto estudos em animais como em humanos, Feng (2002) sugeriu dois papéis importantes para a FMRP nos neurônios: na formação e maturação das sinapses através do controle de sinais durante seu desenvolvimento, e na resposta pela liberação dos neurotransmissores, responsáveis pelo controle da localização e ou da tradução dos mRNAs associados nos locais pós-sinápticos (Feng, 2002). É importante entender como a FMRP regula a síntese de muitas proteínas cerebrais, tornando-as fundamentais na transmissão sináptica, e que esta é somente uma das muitas proteínas que devem participar da regulação da síntese de proteínas nas regiões sinápticas. A ausência da FMRP leva a uma desregulação na síntese de muitas proteínas e de suas vias. A tradução de proteínas em regiões distais dos dendritos tem sido mostrada como um evento intimamente ligado a plasticidade sináptica. Estudos têm mostrado que a ativação do receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) dá início a uma cascata de reações químicas, levando a uma rápida associação entre alguns mRNAs e o complexo protéico de tradução nas sinapses, resultando na síntese protéica. Um destes mRNAs identificados, o da proteína FMRP, apresenta um papel importante na regulação da síntese protéica e possivelmente na localização de mRNAs nos dendritos (Antar *et al.*, 2004). Estes dados sugerem um papel importante da FMRP e do mGluR1 para a maturação normal das conexões sinápticas (Weiler *et al.*, 1997).

Os receptores de glutamato (GluRs) estão fortemente envolvidos na plasticidade sináptica a qual está envolvida nos mecanismos aprendizagem e memória (Malenka e Nicoll, 1999; Ren e Dubner, 1999; Woolf e Salter, 2000; Ji e Woolf, 2001; Guo *et al.*, 2004).

4.7 GLUTAMATO

O aminoácido L-glutamato (GLU) é o principal transmissor excitatório do sistema nervoso de vertebrados (Meldrum, 2000) e está envolvido em processos cognitivos, de memória e de aprendizado. O glutamato e a glicina são neurotransmissores sintetizados a partir da glicose e de outros precursores. O glutamato tem um papel central nas transmissões sinápticas excitatórias rápidas e é um neurotransmissor chave envolvido em vários processos neurofisiológicos (Danbolt, 2001). Por volta da década de 40, o papel do glutamato no cérebro, além de existir como constituinte protéico foi relacionado mais em termos de metabolismo energético, dada a associação íntima do aminoácido ao Ciclo de Krebs (Watkins e Jane, 2006). O glutamato desenvolve um papel no desenvolvimento do sistema nervoso central incluindo indução e eliminação de sinapses, diferenciação, migração e morte celular (Danbolt, 2001).

O cérebro contém grandes quantidades de glutamato, aproximadamente 5 a 15 mmol por kg de peso seco, dependendo da região, mas apenas uma pequena fração está presente normalmente no meio extracelular, sendo sua concentração de 3 a 4 μM . As mais altas concentrações são encontradas dentro dos terminais neurais. A concentração média de glutamato no citosol do terminal axonal glutamatérgico foi estimada em 20 mM, duas a três vezes maior ao valor encontrado em células não-glutamatérgicas. A concentração do glutamato dentro das vesículas é ainda maior, em torno de 100 mM (Meldrum, 2000). É importante saber que existe um equilíbrio dinâmico nas concentrações de glutamato, já que o mesmo é continuamente liberado para o meio extracelular e também continuamente removido deste fluido. É importante que a concentração extracelular de glutamato mantenha-se baixa, já que a ativação excessiva dos receptores é prejudicial e o glutamato torna-se tóxico em altas concentrações. A maneira mais rápida para remover o glutamato do fluido extracelular é através da captação celular, a qual é feita por meio de proteínas transportadoras específicas no neurônio pré-sináptico que usam o gradiente eletroquímico através da membrana plasmática como força de impulso para a captação (Danbolt, 2001). A remoção de glutamato da fenda também pode acontecer através da conversão enzimática do neurotransmissor ativo em uma substância inativa ou ainda, pela captação e acúmulo de glutamato por astrócitos, por exemplo.

4.8 METABOLISMO DO GLUTAMATO

O glutamato obtido pelas células pode ser usado no próprio metabolismo celular como na síntese de proteínas, metabolismo energético, fixação de amônia ou ainda ser reutilizado como um neurotransmissor. As vesículas sinápticas são carregadas com neurotransmissores por meio de transportadores específicos (Takamori *et al.*, 2000). Em astrócitos, que são células que desempenham funções relacionadas com a sustentação e nutrição dos neurônios, o glutamato captado a partir do meio extracelular pode ser convertido a glutamina através da enzima glutamina sintetase (Figura 3). A glutamina por sua vez é liberada no fluido extracelular, captada pelos neurônios e novamente convertida a glutamato dentro do neurônio. Este tráfego de glutamato-glutamina entre neurônios e astrócitos é conhecido como Ciclo Glutamina-Glutamato e tem sido proposto como um ótimo modelo de “reciclagem” de glutamato. A glutamina está presente no meio extracelular em concentrações muito mais altas do que o glutamato (200-500 μ M) e mesmo assim não compromete o sistema neurotransmissor pois diferente do glutamato, ela não é tóxica e nem ativa receptores de glutamato (Danbolt, 2001).

O glutamato, entretanto, não é necessariamente derivado da glutamina, nem é obrigatoriamente convertido em glutamina depois da captação pelos astrócitos e a glutamina também não atua apenas como precursora de glutamato, mas também pode servir como nutriente para os neurônios. Depois de captado pelos astrócitos, o glutamato pode ser metabolizado de duas maneiras diferentes: a) Através da converção do glutamato em glutamina por uma enzima dependente de ATP e específica de astrócitos chamada glutamina sintetase (Figura 8), ou ainda, b) ele pode ser convertido a α -cetoglutarato, através da deaminação pela glutamato desidrogenase ou por uma transaminase (Figura 9). Alfa-cetoglutarato pode ser metabolizado no ciclo do ácido tricarbóxico para succinato, fumarato e malato sucessivamente.

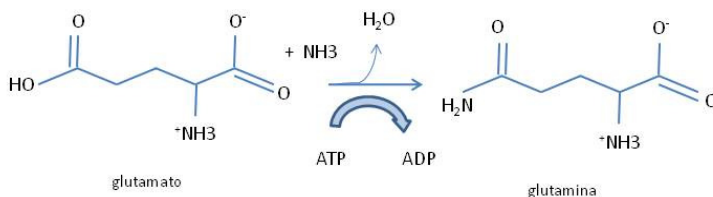
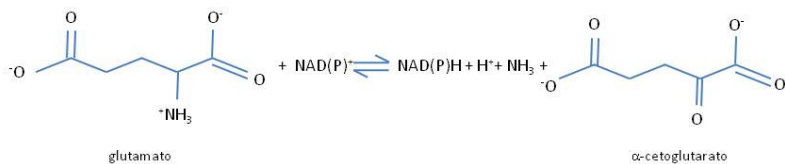


Figura 8 – Conversão de glutamato em glutamina.Fonte: Adaptado de GenomeNet (<http://www.genome.jp/>).**Figura 9** – Representação Conversão de glutamato em α -cetogluturato.Fonte: Adaptado de GenomeNet (<http://www.genome.ad.jp/>).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

- Ácido clorídrico, hidróxido de sódio (Reagen)
- Ácido acético, glicerol, metanol (Vetec)
- Anticorpo secundário anti IgG de coelho (Cell Signaling)
- Anticorpo secundário anti IgG de rato (Sigma)
- Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma)
- Ponceau, Tris e Tween-20 (USB)
- Duodecil sulfato de sódio, SDS, glicina, kit para quimioluminescência, ECL, padrão de peso molecular e película Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech)
- Membrana de nitrocelulose (BioAgency)
- Soluções reveladora e fixadora (Kodak)

5.2 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético, Q-221-2 (Quimis)
- Centrífuga, 5415 D (Eppendorf)
- Cuba de eletroforese (Amersham Pharmacia Biotech)
- Cuba de eletrotransferência (Amersham Pharmacia Biotech)
- Espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech)

5.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS:

5.3.1 Modelo Animal

A quantificação da proteína FMRP e do receptor de glutamato mGluR1 feita pela técnica de Western Blotting foi realizada a partir do Córtex cerebral e Hipocampo utilizando como modelo animal ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem WISTAR–EPM-1. As amostras utilizadas neste trabalho foram previamente preparadas (Barbato, 2006), para as quais utilizou 24 animais machos de mesma idade, separados em 2 grupos diferentes. Um grupo de animais foi tratado com o PAF e o outro grupo foi tratado com solução salina 9%. Os ratos foram obtidos do Biotério Central próprio da Universidade Federal de Santa Catarina. O guia NIH para cuidados e uso de animais de laboratório (NIH

Publications No. 85-23, revisado em 1985) foi seguido em todos os experimentos.

5.3.2 Composição Química do PAF

Os componentes presentes no PAF (Tabela1) foram previamente determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por separação em coluna de intercâmbio iônico e derivação pós coluna com OPA (ortophtaldialdeído). Tais procedimentos foram desenvolvidos pela Universidade Nacional da Colômbia – Santa Fé de Bogotá, no Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Toxicologia, em setembro de 1995.

Tabela 1 – Composição da mistura de aminoácidos Face®, determinado por HPLC (Obs.: Cisteína não foi analisada) (Barbato, 2006).

AMINOÁCIDO	Análise (mg/ml)
Ácido aspártico	10,2
Treonina	1,63
Hidroxiprolina	4,38
Prolina	7,73
Serina	2,46
Ácido glutâmico	2,22
Glicina	35,6
Alanina	14,3
Valina	0,79
Isoleucina	0,65
Leucina	2,26
Tirosina	0,6
Fenilalanina	3,48
Hidroxilisina	1,48
Ornitina	0,54
Etanolamina	0,3
Lisina	3,82
Histidina	0,24
Arginina	8
Metionina	0,1
TOTAL AMINOÁCIDOS:	100,78

5.3.3 Administração dos Aminoácidos

A dosagem do PAF para os ratos foi feita em relação à quantidade ingerida por humanos, já que este experimento realizado previamente também avaliou as evoluções clínicas após a ingestão do PAF em humanos. Considerando que nos humanos foram utilizados 30 gotas/dia em relação ao peso médio (30 kg) foi feita uma relação: volume por peso médio de ratos para aproximadamente 300 g. Desta forma foi administrada aproximadamente uma dosagem de $50 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ do animal. O tratamento foi administrado por via oral, através de gavagem durante 60 dias ininterruptos.

Doze animais foram alimentados uma vez ao dia com o PAF, com concentração de aproximadamente $50 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ e 12 animais controle foram alimentados com solução salina 9% uma vez ao dia com a mesma quantidade. Os ratos foram sacrificados aos 15, 30, 45 e 60 dias após a primeira ingestão do PAF. As regiões do cerebelo, do córtex e do hipocampo foram solubilizadas em tampão de extração de proteínas contendo 4 % SDS, 2 mM EDTA, 8% β -mercaptoetanol, e 50 mM Tris (pH 6,8) (para mais detalhes, ver Barbato, 2006). O controle do peso foi feito em quatro animais tratados com PAF e quatro com salina no 8º, 21º, 40º e 60º dia.

5.3.4 Dosagem de Proteína

Neste trabalho foram utilizadas amostras de córtex cerebral e hipocampo com 30 e 45 dias de tratamento com PAF e com solução salina, todas elas em triplicata (F1, F2 e F3 para PAF e S1, S2 e S3 para solução salina). Para cada uma destas amostras foi feito uma nova triplicata (Ex.: F1', F1'' e F1''', S1', S1'', S1''',...) para a realização da dosagem de proteína, através do Método de Peterson (Peterson, 1977). A leitura foi feita no espectrofotômetro a 750nm. A média dos valores obtidos na leitura foi multiplicada a um valor de fator de calibração (FC), obtido através de uma curva de calibração, e a partir do valor resultante foi possível calcular a quantidade em μL de amostra pronta necessária para se obter 60 μg de proteína aplicada no gel. As amostras prontas foram conservadas em glicerol 40% e β -mercaptoetanol, em freezer a -20°C .

5.4 WESTERN BLOTTING

A técnica do Western Blotting consiste na separação de proteínas por eletroforese e na transferência destas a partir do gel para uma membrana de nitrocelulose. Esta membrana é então incubada com um anticorpo primário específico para determinada proteína de interesse e posteriormente exposto a um anticorpo secundário, o qual é ligado a uma enzima reveladora. O sinal quimioluminescente produzido pela reação enzima/substrato é revelado num filme fotográfico.

Para a realização da técnica foram preparados dois géis de poliacrilamida: O gel de entrada (4%) e o gel de separação (12% para FMRP e 10% para mGluR1). As proteínas (60µg/poço) foram separadas por SDS-Page (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio), assim como o marcador molecular (Amersham Full-Range Rainbow), utilizando gel de separação de acrilamida (12% para a FMRP e 10% para o mGluR1) e o gel de entrada 4% (Bunn *et al.*, 1995). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para dois géis) durante aproximadamente duas horas. Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

5.4.1 Eletrotransferência

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose (poro 0,45 µm) foi feita por eletrotransferência utilizando tampão Tris-glicina (Tris/HCl 25 mM pH 7,0; glicina 192 mM) contendo 20% de metanol, com corrente fixa de 350 mA, 4°C, por 1 hora e 15 minutos sob agitação. Na eletrotransferência, o gel contendo as proteínas, a membrana de nitrocelulose, as esponjas e os papéis filtro foram dispostos de maneira a formarem uma estrutura semelhante a um “sanduíche” (Figura 10).

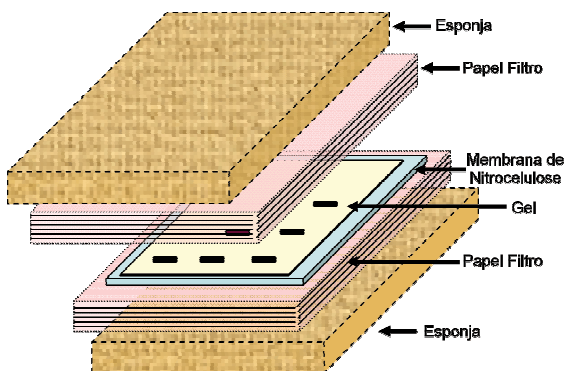


Figura 10 – Ilustração do “sanduíche” para a eletrotransferência.

Fonte: A autora

5.4.2 Bloqueio da Membrana e Incubação com os Anticorpos

Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e a seguir lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Foi realizado um segundo bloqueio por 1 hora usando gelatina 1,5 % em TBS, seguido de lavagem em TBS-T (Baldo, 1994). Finalmente as membranas foram incubadas com o anticorpo específico anti-FMRP e anti-mGluR1 (1:500 e 1:2000, respectivamente). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário específico anti-mouse (ligado à peroxidase) na concentração de 1:4000 para a FMRP e o anticorpo secundário específico anti-rabbit na concentração de 1:10.000 para o mGluR1.

5.4.3 Revelação

Após lavagens com TBS-T, as imunodeteções foram realizadas pelo método de quimioluminescência (ECL). Os reagentes foram adicionados por 15 minutos sobre as membranas de nitrocelulose e esta foi revelada em filme autorradiográfico após a emissão de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante. As bandas protéicas imunorreativas foram analisadas por densitometria

óptica através da utilização do programa de computador Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD). O procedimento para a revelação foi feito em sala escura. A reação que acontece para que a membrana seja revelada no filme envolve a interação entre o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e o Luminol. A reação é catalisada pela enzima peroxidase, conjugada ao anticorpo secundário, e resulta na ativação do luminol e emissão de luz (Figura 11).

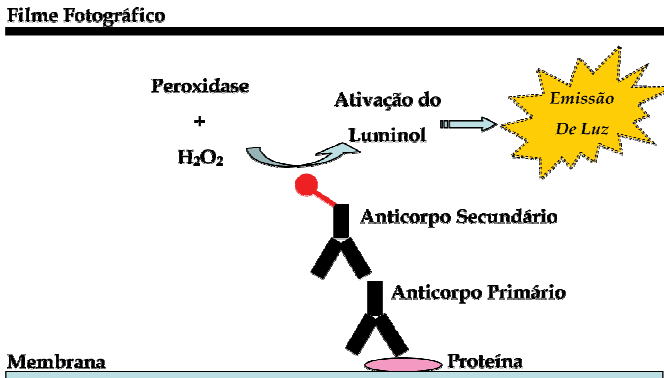


Figura 11 – Representação das interações químicas que ocorrem na revelação da membrana.

Fonte: Adaptado de <http://www.sigmaldrich.com>.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos e os testes estatísticos foram realizados através do GraphPad Prism 5. Foi utilizado o Teste *t*-Student (não paramétrico) com intervalos de confiança de 95% ($p < 0,05$) e de 90% ($p < 0,10$) para análise dos dados obtidos pela quantificação das amostras.

6 RESULTADOS

As proteínas transferidas do gel de eletroforese para a membrana de nitrocelulose e reveladas em filme fotográfico apresentaram padrões de bandas diferenciados tanto entre amostras de córtex quanto de hipocampo de *Rattus norvegicus* quando tratadas com um *pool* de aminoácidos (PAF) e com solução salina, utilizada como controle. Observou-se ainda que o tempo de tratamento com PAF influenciou nas intensidades das bandas.

6.1 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA FMRP

6.1.1 Expressão de FMRP em córtex de *Rattus norvegicus*, em 30 dias

A Figura 12 mostra o filme revelado referente à expressão da proteína da Síndrome do X Frágil (FMRP) em córtex de *Rattus norvegicus* aos 30 dias de tratamento com PAF.

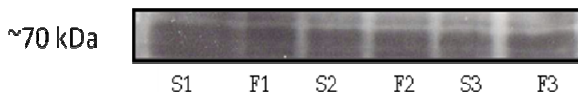


Figura 12 – Expressão da FMRP em córtex em 30 dias de administração com PAF (F1, F2, F3) e solução salina (S1, S2, S3), utilizada como controle.

A Tabela 2 apresenta os valores de densidade óptica (D.O.) para a FMRP em córtex após 30 dias de tratamento.

Tabela 2 – Valores de densidade óptica (D.O.) para FMRP em córtex em 30 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).

Amostra	Solução salina (controle)			Tratamento com PAF		
	S1	S2	S3	F1	F2	F3
D.O.	7,28	6,22	5,41	5,07	4,86	5,40

A Figura 13 mostra a diferença na quantificação (Tabela 2) entre a amostra de salina e de PAF.

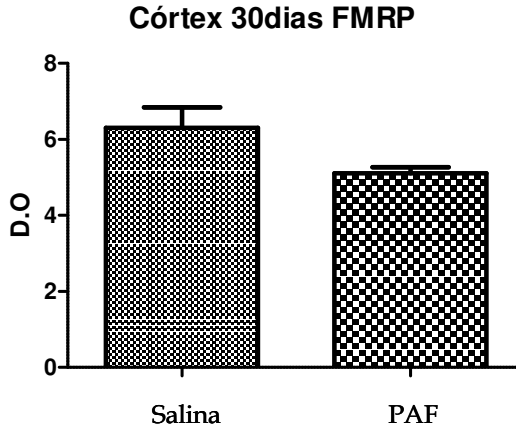


Figura 13 – Gráfico de quantificações da proteína FMRP em córtex com 30 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados.

As amostras de córtex com 30 dias de tratamento para a FMRP apresentaram a média de $6,30 \pm 0,54$, $N=3$, para salina. Para o PAF, a média foi de $5,11 \pm 0,16$, $N=3$. Houve uma tendência a diminuição de 19% da FMRP na amostra do PAF. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias avaliadas.

6.1.2 Expressão de FMRP em hipocampo de *Rattus norvegicus*, em 30 dias

A Figura 14 mostra o filme revelado referente à expressão da proteína FMRP em hipocampo com 30 dias de tratamento.

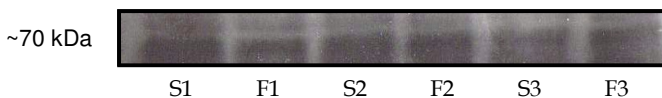


Figura 14 – Expressão da FMRP no hipocampo em 30 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3).

A Tabela 3 mostra os valores de D.O. para a FMRP em hipocampo aos 30 dias.

Tabela 3 – Valores de D.O. para FMRP em hipocampo 30 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).

Amostra	Solução salina (controle)			Tratamento com PAF		
	S1	S2	S3	F1	F2	F3
D.O.	79,30	29,48	33,67	42,26	46,81	21,02

As amostras de hipocampo com 30 dias de tratamento para FMRP apresentaram média de 47,48 ($47,48 \pm 15,95$, N=3) para solução salina e média de 36,70 ($36,70 \pm 7,95$, N=3) para as amostras do PAF. Houve uma diminuição de 22,70% na quantificação da FMRP nas amostras do PAF em relação a solução salina (Figura 15). As amostras de córtex e de hipocampo não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na quantificação da FMRP aos 30 dias ($p < 0,05$) ($p = 0,10$ para FMRP em córtex e $p = 0,58$ em hipocampo).

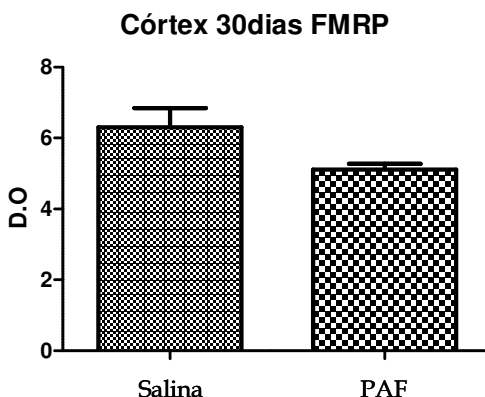


Figura 15 – Gráfico de quantificações da proteína FMRP em córtex com 30 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados.

6.1.3 Expressão de FMRP em hipocampo de *Rattus norvegicus*, em 45 dias

A Figura 16 mostra a expressão da FMRP no Hipocampo aos 45 dias de tratamento. É notável a diferença na intensidade das bandas correspondentes a triplicata de amostras de solução salina (S1, S2, S3) e nas amostras tratadas com o PAF (F1, F2, F3).

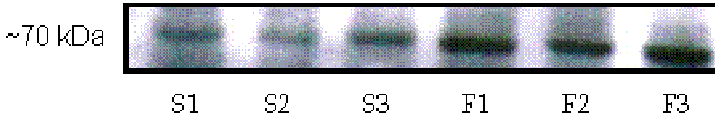


Figura 16 – Expressão da FMRP no hipocampo em 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3).

A Tabela 4 mostra os valores de D.O. obtidos para esta amostra:

Tabela 4 – Valores de D.O. referentes à quantificação da FMRP nas amostras de hipocampo com 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).

Amostr a	Solução salina (controle)			Tratamento com PAF		
	S1	S2	S3	F1	F2	F3
D.O.	10,67	15,38	15,65	20,53	24,21	17,78

Baseado nos valores de quantificação para solução salina (média = $13,90 \pm 1,62$ N=3) e para o PAF (média = $20,84 \pm 1,86$, N=3) foi feito o gráfico mostrando a diferença nas quantificações para FMRP com 45 dias de tratamento no hipocampo.

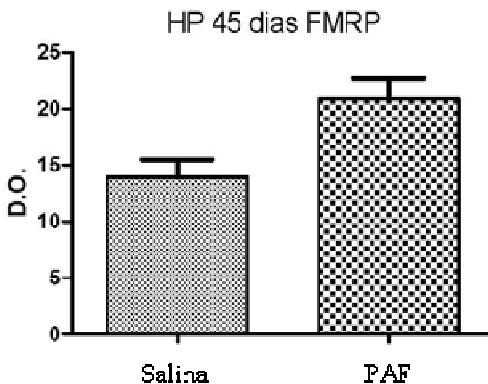


Figura 17 – Nível de expressão de FMRP em hipocampo com 45 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados. O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ (Teste t-Student não pareado).

O teste estatístico revelou uma diferença significativa entre as médias avaliadas ($p = 0,048$). Houve um aumento de 49,92% na quantificação da FMRP na amostra do PAF em relação à solução salina.

As amostras de córtex aos 45 dias não puderam ser quantificadas pelo fato da amostra estar comprometida.

6.2 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO mGluR1.

O receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) foi quantificado tanto em córtex quanto em hipocampo.

6.2.1 Expressão de mGluR1 em hipocampo de *Rattus norvegicus*, em 45 dias

A Figura 18, abaixo, representa o filme revelado com amostras de hipocampo (S1, S2, S3 e F1, F2, F3) com 45 dias de tratamento para quantificação do mGluR1.

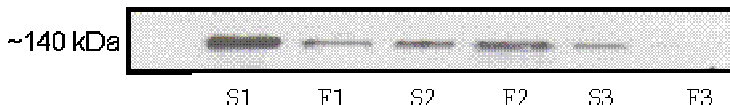


Figura 18 – Expressão do mGluR1 no hipocampo em 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3).

A Tabela 5 mostra os valores de D.O. para mGluR1 em amostras de hipocampo 45 dias.

Tabela 5 – Valores de D.O. referentes ao mGluR1 em amostras hipocampo aos 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).

Amostra	Solução salina (controle)			Tratamento com PAF		
	S1	S2	S3	F1	F2	F3
D.O.	21,10	10,46	7,29	7,82	10,56	1,71

Para o mGluR1 houve uma tendência a diminuição de 48,30% na quantificação (Figuras 18 e 19). No entanto estes valores não foram

estatisticamente significantes ($p = 0,27$). A média das amostras foi de 12,95 ($12,95 \pm 4,18$ N=3) para salina e 6,70 ($6,70 \pm 2,62$, N=3) para o PAF.

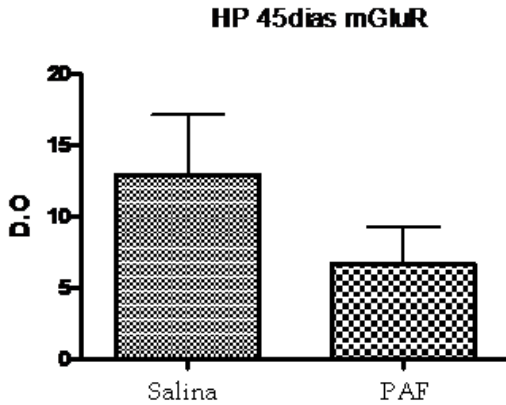


Figura 19 – Nível de expressão do receptor de glutamato metabotrópico tipo 1 (mGluR1) em hipocampo com 45 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados.

6.2.2 Expressão de mGluR1 em córtex de *Rattus norvegicus*, em 45 dias

O filme revelado com amostras de córtex (S1, S2, S3 e F1, F2, F3) com 45 dias de tratamento para quantificação do mGluR1 (Figura 20) apresentou 18,90% de diminuição desta proteína na amostra do PAF em relação à solução salina.

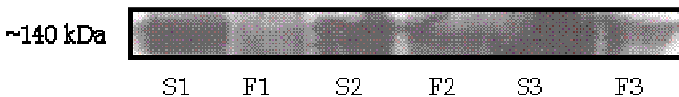


Figura 20 – Expressão do mGluR1 em córtex com 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2, S3) e com PAF (F1, F2, F3).

A Tabela 6 mostra os valores de D.O. para o mGluR1 em amostras de córtex 45 dias.

Tabela 6 – Valores de D.O. referentes ao mGluR1 em amostras córtex aos 45 dias de tratamento com solução salina (S1, S2 e S3) e com PAF (F1, F2 e F3).

Amostra	Solução salina (controle)			Tratamento com PAF		
	S1	S2	S3	F1	F2	F3
D.O.	122,70	130,83	142,59	102,28	121,99	97,03

A média nos grupos tratados com solução salina foi de 132,04 ($131,90 \pm 5,92$ N=3) e para as amostras do PAF foi de 107,10 ($107,10 \pm 7,60$, N=3). Os testes estatísticos (para $p < 0,05$) não revelaram diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p = 0,06$). No entanto para $p < 0,10$, o valor de $p = 0,06$ foi estatisticamente significativo.

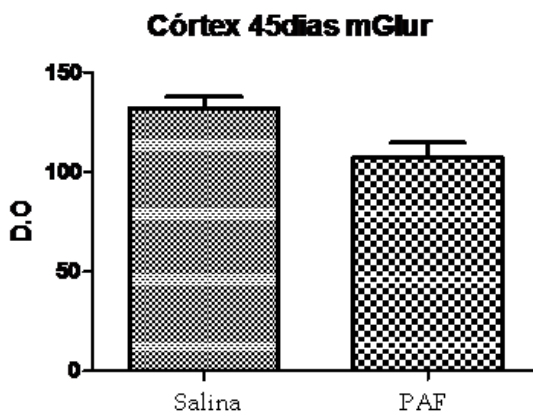


Figura 21 – Nível de expressão do receptor de glutamato metabotrópico tipo 1 (mGluR1) em córtex 45 dias de tratamento com solução salina e PAF. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados. O asterisco indica médias diferentes do controle; $p < 0,10$ (Teste t-Student não pareado).

7 DISCUSSÃO

A análise dos resultados apresentados no capítulo anterior nos permite observar diferenças significantes nas densidades ópticas (D.O.) entre as amostras de hipocampo e de córtex de *Rattus norvegicus*, tanto para FMRP (Fragile Mental Retardation Protein), quanto para mGluR1, aos 45 dias de tratamento. Isto mostra que os efeitos da administração do *pool* de aminoácidos sobre as vias neuronais envolvendo estas proteínas, embora não aparecem aos 30 dias de tratamento, são evidentes aos 45 dias. Observou-se um aumento de 49,92% na D.O. da FMRP na amostra do PAF comparado ao tratamento com solução salina aos 45 dias de tratamento em hipocampo. Em paralelo, observou-se uma diminuição na D.O. do mGluR1 tanto na amostra de hipocampo, quanto na amostra de córtex com 45 dias de tratamento. Esta diminuição foi proporcional ao aumento da FMRP. Estes dados são consistentes com as descobertas de que a FMRP normalmente funciona como um regulador negativo da tradução, sugerindo uma possível regulação negativa sobre a via de expressão desse receptor. A proteína FMRP tem sido sugerida como um potente regulador da síntese de proteínas nos dendritos (Laggerbauer *et al.*, 2001).

Os resultados deste trabalho corroboram o que foi encontrado anteriormente, através de estudos clínicos (Barbato, 2006), com pacientes afetados pela SXF tratados com o mesmo *pool* de aminoácidos, utilizando-se testes psicométricos, que demonstraram melhoras significativas em aspectos comportamentais nos pacientes.

A perda da expressão da FMRP afeta as funções sinápticas e leva a funções cognitivas anormais (Zalfa e Bagni, 2004). O desenvolvimento do cérebro na ausência da FMRP leva ao aparecimento de vários sintomas típicos da SXF em humanos. Estes incluem retardo mental, atraso no desenvolvimento, déficit de atenção e hiperatividade, ansiedade, comportamento autístico e comportamento compulsivo e obsessivo, além de pobre coordenação motora (Bear, 2005). De acordo com estes dados é possível relacionar o aumento na quantificação da FMRP em hipocampo aos 45 dias de tratamento com PAF, com as melhoras significativas encontradas nos pacientes afetados pela SXF também tratados com PAF, do estudo prévio realizado por Barbato (2006). De um total de 14 pacientes afetados estudados, todos apresentavam problemas de concentração antes do tratamento. Após o tratamento, 50% destes apresentaram melhora. Além disso, todos apresentavam problemas com abstração matemática, e depois do

tratamento com o PAF, doze apresentaram melhora. Sintomas como hiperatividade e isolamento social também apresentaram melhoras. Dos nove pacientes hiperativos, sete melhoraram, e dos seis pacientes com isolamento social, quatro apresentaram melhora.

A relação entre a FMRP e os mGluRs é apresentada em estudos que afirmam que existe uma regulação na tradução de mRNAs dendríticos pela FMRP em resposta à ação do glutamato sobre receptores metabotrópicos do tipo 1, ou seja, mGluR1 e mGluR5. Alguns mRNAs regulados pela FMRP e traduzidos em resposta à ativação do mGluR incluem o mRNA da proteína associada a microtúbulo (MAP1b), proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95), a proteína precursora amilóide (APP) e até mesmo o mRNA da própria FMRP. Já existem evidências tanto em ensaios *in vitro* quanto em estudos *in vivo* em camundongos *knockout* para *Fmr1* sugerindo uma função para a FMRP como repressora da tradução de alguns mRNAs. Entretanto, uma vez que os mRNAs alcancem seus destinos nos dendritos, a FMRP pode também atuar como uma proteína estimuladora da tradução. Os mGluRs causam uma rápida ubiquitinação e degradação da FMRP, diminuindo os seus níveis e, conseqüentemente, a sua atividade repressora, permitindo assim a tradução de mRNAs-alvos (Ronesi e Huber, 2008). Em ratos KO, a ausência da FMRP leva à ausência da atividade repressora da proteína, promovendo o aumento da LTD (Long Term Depression), que é um das formas de plasticidade sináptica. Estudos envolvendo plasticidade sináptica têm sido consistentes com a hipótese de que a FMRP normalmente reprime a síntese proteica requerida para a expressão estável de LTD dependente de mGluR (Laggerbauer *et al.*, 2001). O termo plasticidade sináptica está associado às modificações que ocorrem nas propriedades e padrões de atividades sinápticas ao longo do tempo, tanto em função de estímulos do ambiente quanto mediante a própria experiência adquirida. Tanto a LTD quanto a LTP (Long Term Potenciation) são exemplos de tipos de plasticidade sináptica. Ambos são fenômenos associados à diminuição e aumento, respectivamente, da eficiência na transmissão sináptica, sendo também considerados como principais correlatos moleculares dos processos de aprendizado e memória (Lopes *et al.*, 1999).

Esses resultados e observações demonstram a importância dos níveis de FMRP e sua correlação com os níveis de mGluR1. O aumento do nível de FMRP observado neste trabalho é, portanto, de fundamental importância para se tentar explicar uma possível recuperação da atividade repressora da proteína, em pacientes tratados com PAF.

Estudos têm demonstrado uma ativação exagerada do mGluR na ausência da proteína do X-Frágil. Isso provavelmente está relacionado à alteração da síntese protéica nos dendritos. Tanto pacientes humanos afetados quanto camundongos *knockout* para o gene *Fmr1*, apresentam neurônios do córtex cerebral com um número excessivo de espinhas dendríticas. Pelo fato destas espinhas serem um ponto chave para a transmissão sináptica destes neurônios, uma função sináptica alterada pode estar relacionada aos fenótipos da Síndrome do X-Frágil (Ronesi e Huber, 2008).

A sinalização anormal envolvendo o mGluR poderia ser responsável pelos diversos sintomas neurológicos na SXF, incluindo atraso no desenvolvimento cognitivo e motor e ansiedade. Estudos em camundongos KO para a FMRP mostraram uma atividade aumentada do mGluR na superfície do neurônio (Bear, 2005). Ronesi e Huber (2008), utilizando modelo animal, demonstraram que a redução da atividade dos receptores de glutamato tipo 1 está associada à redução de muitos sintomas da SXF, tais como epilepsia e déficit de aprendizado e memória, o que indica que o funcionamento aumentado dos mGluRs do grupo 1 contribui para a etiologia desta síndrome. O fato do mGluR1 ter apresentado uma diminuição na sua expressão, no mesmo período em que há um aumento na expressão de FMRP (após 45 dias de tratamento com o PAF), pode estar associado às melhoras significativas encontradas em pacientes afetados pela SXF tratados com PAF em alguns aspectos, tais como problemas na matemática, na compreensão, na concentração, déficit de memória e dificuldade para escrever (Barbato, 2006).

A diminuição na expressão de mGluR1 encontrada neste trabalho pode estar associada a uma diminuição da sinalização por estes receptores e, conseqüentemente, às melhoras encontradas nesses pacientes tratados com PAF. Logo, seria possível imaginar um tratamento com drogas que inibissem estes receptores e/ou regulassem de modo negativo os sinais iniciados por eles.

Estes dados sugerem que a diminuição da sinalização através do mGluR1 também poderia ser benéfica no tratamento dos sintomas do X-Frágil. No entanto, os caminhos terapêuticos para o mGluR1 têm se mostrado restritivos pelo fato da sua função ser essencial para o funcionamento normal do cerebelo.

8 CONCLUSÕES

Após a realização das quantificações das proteínas FMRP e mGluR1 foi possível concluir que:

O aumento da concentração da FMRP em hipocampo de ratos observado em função do tratamento com PAF sugere que efeitos clínicos positivos em pacientes submetidos a este tratamento podem estar associados ao *pool* de aminoácidos da formulação utilizada, assim como uma possível regulação positiva sobre as vias neuronais;

Embora não tenham sido observados aumentos significativos dos níveis de FMRP após 30 dias de tratamento, os aumentos foram significativos após 45 dias. Isso sugere que, em ratos, pode haver efeitos cumulativos, que só se manifestam após um período mais longo de tratamento, ou em maiores dosagens;

A diminuição da concentração do receptor mGluR1 em córtex e a tendência a diminuição no hipocampo, em função do tratamento com o PAF, após 45 dias, também está de acordo com o que é esperado para um quadro clínico favorável. Em animais modelos, tem sido observado que menores níveis ou menor atividade do mGluR1 melhora sintomas relacionados com a SXF.

REFERÊNCIAS

- Anjaneyulu, M., A. Berent-SpillsoneJ. W. Russell (2008). "Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and diabetic neuropathy." Curr Drug Targets 9(1): 85-93.
- Antar, L. N., R. Afroz, J. B. Dictenberg, R. C. CarrolleG. J. Bassell (2004). "Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses." J Neurosci 24(11): 2648-55.
- Aronica, E., M. V. Catania, J. Geurts, B. YankayaeD. Troost (2001). "Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes." Neuroscience 105(2): 509-20.
- Baldo, B. A. (1994). Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology. Advances in Electrophoresis. A. Chranbach, M. D. Dunn and B. J. Radola, VCH. 7: 407-478.
- Barbato, I. T. (2006). Avaliação de Estratégia Terapêutica pela Ingestão de um Conjunto de Aminoácidos em Portadores da Síndrome do X-Frágil: Estudo Clínico e Neuroquímico. Engenharia Química. Florianópolis, UFSC. Mestrado.
- Bardoni, B., L. Davidovic, M. BensaideE. W. Khandjian (2006). "The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment." Expert Rev Mol Med 8(8): 1-16.
- Bardoni, B.eJ. L. Mandel (2002). "Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes." Curr Opin Genet Dev 12(3): 284-93.
- Bear, M. F. (2005). "Therapeutic implications of the mGluR theory of fragile X mental retardation." Genes Brain Behav 4(6): 393-8.
- Bear, M. F., B. W. ConnorseM. A. Paradiso (2002). Neurociência: Desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre, Artmed.

Berthele, A., S. Platzer, D. J. Laurie, S. Weis, B. Sommer, W. Zieglgansberger, B. Conrade, T. R. Tolle (1999). "Expression of metabotropic glutamate receptor subtype mRNA (mGluR1-8) in human cerebellum." Neuroreport 10(18): 3861-7.

Blumcke, I., K. Behle, B. Malitschek, R. Kuhn, T. Knopfel, H. K. Wolfe, O. D. Wiestler (1996). "Immunohistochemical distribution of metabotropic glutamate receptor subtypes mGluR1b, mGluR2/3, mGluR4a and mGluR5 in human hippocampus." Brain Res 736(1-2): 217-26.

Bunn, S. J., A. T. Sim, L. M. Herd, L. M. Austine, P. R. Dunkley (1995). "Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular Ca²⁺ in the histamine H1 receptor-stimulated phosphorylation of Ser8, Ser19, Ser31, and Ser40." J Neurochem 64(3): 1370-8.

Carobrez, A. P. (2003). "[Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety]." Rev Bras Psiquiatr 25 Suppl 2: 52-8.

Cartmell, J. e. D. Schoepp (2000). "Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors." J Neurochem 75(3): 889-907.

Conn, P. J. e. J. P. Pin (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol 37: 205-37.

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

Devys, D., Y. Lutz, N. Rouyer, J. P. Bellocq, J. L. Mandel (1993). "The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation." Nat Genet 4(4): 335-40.

Farzin, F., H. Perry, D. Hessel, D. Loesch, J. Cohen, S. Bacalman, L. Gane, F. Tassone, P. Hagerman, R. Hagerman (2006). "Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation." J Dev Behav Pediatr 27(2 Suppl): S137-44.

Feng, Y. (2002). "Fragile X mental retardation: misregulation of protein

synthesis in the developing brain?" Microsc Res Tech 57(3): 145-7.

Ferraguti, F.eR. Shigemoto (2006). "Metabotropic glutamate receptors." Cell Tissue Res 326(2): 483-504.

Fouillioux, C., F. Contreras, M. Rivera, A. TeráneM. Velasco (2004). "Receptores de glutamato: Implicaciones terapéuticas." Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica 23(2): 10.

Furuya, S., H. Ohmori, T. ShigemotoeH. Sugiyama (1989). "Intracellular calcium mobilization triggered by a glutamate receptor in rat cultured hippocampal cells." J Physiol 414: 539-48.

Gabel, L. A., S. Won, H. Kawai, M. McKinney, A. M. TartakoffeJ. R. Fallon (2004). "Visual experience regulates transient expression and dendritic localization of fragile X mental retardation protein." J Neurosci 24(47): 10579-83.

Gil-Sanz, C., J. M. Delgado-Garcia, A. FaireneA. Gruart (2008). "Involvement of the mGluR1 receptor in hippocampal synaptic plasticity and associative learning in behaving mice." Cereb Cortex 18(7): 1653-63.

Guo, W., F. Wei, S. Zou, M. T. Robbins, S. Sugiyo, T. Ikeda, J. C. Tu, P. F. Worley, R. DubnereK. Ren (2004). "Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia." J Neurosci 24(41): 9161-73.

Hagerman, P. J.eR. J. Hagerman (2004). "Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)." Ment Retard Dev Disabil Res Rev 10(1): 25-30.

Hagerman, R. J. (1997). "Fragile X syndrome. Molecular and clinical insights and treatment issues." West J Med 166(2): 129-37.

Hampson, D. R., E. Theriault, X. P. Huang, P. Kristensen, D. S. Pickering, J. E. FranckeE. R. Mulvihill (1994). "Characterization of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor in the central nervous system of the rat." Neuroscience 60(2): 325-36.

- Huber, K. M., S. M. Gallagher, S. T. Warren, M. F. Bear (2002). "Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation." Proc Natl Acad Sci U S A 99(11): 7746-50.
- Irwin, S. A., R. Galvez, W. T. Greenough (2000). "Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome." Cereb Cortex 10(10): 1038-44.
- Ji, R. R., C. J. Woolf (2001). "Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain." Neurobiol Dis 8(1): 1-10.
- Jin, P., R. S. Alisch, S. T. Warren (2004). "RNA and microRNAs in fragile X mental retardation." Nat Cell Biol 6(11): 1048-53.
- Jin, P., S. T. Warren (2000). "Understanding the molecular basis of fragile X syndrome." Hum Mol Genet 9(6): 901-8.
- Jin, P., S. T. Warren (2003). "New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors." Trends Biochem Sci 28(3): 152-8.
- Kapczinski, F., B. N. Frey, V. Zannatto (2004). "[Physiopathology of bipolar disorders: what have changed in the last 10 years?]." Rev Bras Psiquiatr 26 Suppl 3: 17-21.
- Kew, J. N., J. A. Kemp (2005). "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology." Psychopharmacology (Berl) 179(1): 4-29.
- Laggerbauer, B., D. Ostareck, E. M. Keidel, A. Ostareck-Lederer, U. Fischer (2001). "Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation." Hum Mol Genet 10(4): 329-38.
- Liu, X. B., A. Munoz, E. G. Jones (1998). "Changes in subcellular localization of metabotropic glutamate receptor subtypes during postnatal development of mouse thalamus." J Comp Neurol 395(4): 450-65.
- Lopes, A. C. P., L. C. Rosa, R. O. Beleboni, R. N. R. Pereira, C. A. C. Vasconcelos, J. E. Moreira (1999). "Aspectos moleculares da transmissão sináptica." Biblioteca Virtual em Saúde 32, 167-188.

- Lopez-Bendito, G., R. Shigemoto, A. FaireneR. Lujan (2002). "Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development." Cereb Cortex 12(6): 625-38.
- Lujan, R., J. D. Roberts, R. Shigemoto, H. OhishieP. Somogyi (1997). "Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites." J Chem Neuroanat 13(4): 219-41.
- Maiese, K., Z. Z. ChongF. Li (2005). "Driving cellular plasticity and survival through the signal transduction pathways of metabotropic glutamate receptors." Curr Neurovasc Res 2(5): 425-46.
- Malenka, R. C.eR. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" Science 285(5435): 1870-4.
- Mayer, M. L.eR. J. Miller (1990). "Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca²⁺ in mammalian neurons." Trends Pharmacol Sci 11(6): 254-60.
- Meldrum, B. S. (2000). "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology." J Nutr 130(4S Suppl): 1007S-15S.
- Miyashiro, K.eJ. Eberwine (2004). "Fragile X syndrome: (What's) lost in translation?" Proc Natl Acad Sci U S A 101(50): 17329-30.
- Ohashi, S., K. Koike, A. Omori, S. Ichinose, S. Ohara, S. Kobayashi, T. A. SatoeK. Anzai (2002). "Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor." J Biol Chem 277(40): 37804-10.
- Ottersen, O. P.eJ. Storm-Mathisen (1984). "Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique." J Comp Neurol 229(3): 374-92.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem 83(2): 346-56.
- Pfeiffer, B. E.eK. M. Huber (2006). "Current advances in local protein

synthesis and synaptic plasticity." J Neurosci 26(27): 7147-50.

Pin, J. P.eR. Duvoisin (1995). "The metabotropic glutamate receptors: structure and functions." Neuropharmacology 34(1): 1-26.

Ren, K.eR. Dubner (1999). "Central nervous system plasticity and persistent pain." J Orofac Pain 13(3): 155-63; discussion 164-71.

Ronesi, J. A.eK. M. Huber (2008). "Metabotropic glutamate receptors and fragile x mental retardation protein: partners in translational regulation at the synapse." Sci Signal 1(5): pe6.

Schaeffer, C., B. Bardoni, J. L. Mandel, B. Ehresmann, C. EhresmanneH. Moine (2001). "The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif." Embo J 20(17): 4803-13.

Shigemoto, R., S. NakanishieN. Mizuno (1992). "Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat." J Comp Neurol 322(1): 121-35.

Smith, Q. R. (2000). "Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier." J Nutr 130(4S Suppl): 1016S-22S.

Stephan, D., C. Bon, J. A. Holzwarth, M. GalvaneR. M. Pruss (1996). "Human metabotropic glutamate receptor 1: mRNA distribution, chromosome localization and functional expression of two splice variants." Neuropharmacology 35(12): 1649-60.

Takamori, S., J. S. Rhee, C. RosenmundeR. Jahn (2000). "Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons." Nature 407(6801): 189-94.

Tamanini, F., N. Meijer, C. Verheij, P. J. Willems, H. Galjaard, B. A. OostraeA. T. Hoogeveen (1996). "FMRP is associated to the ribosomes via RNA." Hum Mol Genet 5(6): 809-13.

Tassone, F., R. J. Hagerman, D. N. Ikle, P. N. Dyer, M. Lampe, R. Willemsen, B. A. OostraeA. K. Taylor (1999). "FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome." Am J Med Genet

84(3): 250-61.

Todd, P. K., K. J. Macke, J. S. Malter (2003). "The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95." Proc Natl Acad Sci U S A 100(24): 14374-8.

van den Pol, A. N., L. Kogelman, P. Ghosh, P. Liljelunde, C. Blackstone (1994). "Developmental regulation of the hypothalamic metabotropic glutamate receptor mGluR1." J Neurosci 14(6): 3816-34.

Verkerk, A. J., M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y. H. Fu, D. P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria, F. P. Zhang *et al.*, (1991). "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome." Cell 65(5): 905-14.

Watkins, J. C. E. D. E. Jane (2006). "The glutamate story." Br J Pharmacol 147 Suppl 1: S100-8.

Weiler, I. J. E. W. T. Greenough (1999). "Synaptic synthesis of the Fragile X protein: possible involvement in synapse maturation and elimination." Am J Med Genet 83(4): 248-52.

Weiler, I. J., S. A. Irwin, A. Y. Klintsova, C. M. Spencer, A. D. Brazelton, K. Miyashiro, T. A. Comery, B. Patel, J. Eberwine, W. T. Greenough (1997). "Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation." Proc Natl Acad Sci U S A 94(10): 5395-400.

Willemsen, R., B. A. Oostra, G. J. Basselle, J. Dichtenberg (2004). "The fragile X syndrome: from molecular genetics to neurobiology." Ment Retard Dev Disabil Res Rev 10(1): 60-7.

Wilson, B. M. E. C. L. Cox (2007). "Absence of metabotropic glutamate receptor-mediated plasticity in the neocortex of fragile X mice." Proc Natl Acad Sci U S A 104(7): 2454-9.

Woolf, C. J. E. M. W. Salter (2000). "Neuronal plasticity: increasing the gain in pain." Science 288(5472): 1765-9.

Zalfa, F.eC. Bagni (2004). "Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the Fragile X mental retardation protein?" Curr Issues Mol Biol 6(2): 73-88.

Zalfa, F., M. Giorgi, B. Primerano, A. Moro, A. Di Penta, S. Reis, B. OostraeC. Bagni (2003). "The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses." Cell 112(3): 317-27.