

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF TUISKON DICK
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**DISFUNÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICO E DA BOMBA Na^+ , K^+ ATPASE EM
NEOCÓRTEX DE MODELO ANIMAL DE ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I**

Letícia Meier Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, fevereiro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF TUISKON DICK
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**DISFUNÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICO E DA BOMBA Na^+ , K^+ ATPASE EM
NEOCÓRTEX DE MODELO ANIMAL DE ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I**

Letícia Meier Pereira

Orientadora: Maria Elisa Calcagnotto

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre.

Banca examinadora:
Prof^a. Dra. Carmen Regla Vargas (UFRGS)
Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt (UFRGS)
Prof^a. Dra. Eloisa da Silveira Loss (UFRGS)
Suplente:
Prof. Dr. Daniel Pens Gelain (UFRGS)

Porto Alegre, fevereiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Meier Pereira, Leticia

DISFUNÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICO E DA BOMBA Na^+ , K^+
ATPASE EM NEOCÓRTEX DE MODELO ANIMAL DE ACIDEMIA
GLUTÁRICA TIPO I / Leticia Meier Pereira. -- 2016.
71 f.

Orientador: Maria Elisa Calcagnotto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Epilepsia. 2. Acidemia Glutárica Tipo I. 3.
Corrente inibitória pós-sináptica. I. Calcagnotto,
Maria Elisa, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jeferson e Nara, que fazem de seus filhos a prioridade de suas vidas. Amor, dedicação, paciência e o apoio recebido que são fundamentais na minha vida.

Ao meu irmão Luiz Felipe que sempre está presente apoiando e brigando, mas estamos sempre juntos.

Á minha querida professora Maria Elisa, que além de ser uma fonte de admiração profissional, por estar sempre presente passando e ensinando seus conhecimentos, é uma amiga para todos os momentos (Minha crise de cálculo renal). Obrigada pela paciência, experiência e por ter me aceitado mesmo me conhecendo há pouco tempo.

Á minha colega e amiga Mayara, importante não só pela ajuda nos trabalhos de laboratório como também pela receptividade em Porto Alegre, pelos conselhos, risadas, parceria de bons e maus momentos. Obrigada pela amizade.

Ás meninas do lab. da Prof^a Carla que sempre estão prontas pra ajudar e tornar o dia mais alegre com nossas conversas de fazer a barriga doer de tanto rir.

Ao professor Mauro e ao Vinícius que foram fundamentais na realização do western blot. Obrigada pela colaboração e dedicação.

Ao professor Moacir e ao Alexandre pelo fornecimento dos animais e conselhos sobre o projeto.

Aos professores Carmen Vargas, Jorge Quillfeldt e Eloisa Loss, por terem aceitado compor a banca examinadora deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por fornecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Para realizar grandes conquistas,
devemos não apenas agir, mas
também sonhar; não apenas planejar,
mas também acreditar”
Anatole France*

RESUMO

A epilepsia é uma desordem neurológica que afeta aproximadamente 65 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos erros inatos do metabolismo (EIM) não serem a causa frequente de epilepsia, o sintoma mais comum presente em desordens metabólicas são crises epiléticas. Dentro dos EIM, estão as acidemias orgânicas que podem levar a geração de crises epiléticas durante um episódio de descompensação metabólica aguda, como por exemplo a acidemia glutárica tipo I (AG I). A AG I é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH). Tal alteração leva ao acúmulo de ácidos orgânicos em fluidos e tecidos. Se não diagnosticada e tratada precocemente, a doença evolui com sinais clínicos de macrocefalia, déficits neurológicos e epilepsia. O aumento dos níveis de ácidos orgânicos no cérebro diminui a atividade da enzima Glutamato Descarboxilase (GAD) no parênquima cerebral e inibe a atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$. De acordo com estes achados, prévias análises bioquímicas de neocórtex e comportamentais de um modelo animal de AG I, camundongo nocaute para a enzima GCDH tratado com dieta com sobrecarga de lisina (4,7%) ($\text{Gcdh}^{-/-}\text{-Lis}$), mostram decréscimo do imunoconteúdo da GAD cortical, diminuição da liberação de ácido γ -aminobutírico (GABA) e diminuição da atividade $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ e presença de crises epiléticas espontâneas. Neste trabalho (aprovado pelo CEP-HCPA-140270) usamos este modelo animal de AG I para avaliar a função sináptica GABAérgica neocortical através de estudos eletrofisiológicos e bioquímicos, além de avaliar a expressão e o estado de fosforilação subunidade α da $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ no neocórtex. A atividade da enzima GAD neocortical foi medida pela técnica de HPLC; as correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas e miniaturas (CIPS) nos neurônios piramidais foram avaliadas através da técnica eletrofisiológica de *patch-clamp in vitro* e avaliação da expressão total e a fosforilação do resíduo de Ser943 da $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ neocortical foi feita através da técnica de Western Blot em camundongos $\text{Gcdh}^{-/-}\text{-Lis}$ (P30-P45). Os resultados foram comparados com animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ e $\text{Gcdh}^{+/+}$ tratados com dieta normal ($\text{Gcdh}^{-/-}\text{-N}$ e $\text{Gcdh}^{+/+}$, respectivamente). Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa da atividade da GAD neocortical nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}\text{-Lis}$ quando compara aos animais $\text{Gcdh}^{+/+}$ ($P < 0,05$). A frequência das CIPS espontâneas e miniaturas nas células piramidais da camada V do neocórtex dos animais $\text{Gcdh}^{-/-}\text{-Lis}$ foi significativamente menor quando comparada às células dos animais $\text{Gcdh}^{-/-}\text{-N}$ e $\text{Gcdh}^{+/+}$ ($P < 0,0003$). A curva de probabilidade cumulativa e a análise estatística de Kolmogorov-Smirnov confirmaram a diminuição na frequência das CIPS espontâneas e miniaturas ($P < 0,0001$). A expressão da subunidade α da bomba $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ mostrou-se aumentada no neocórtex dos animais $\text{Gcdh}^{-/-}\text{-Lis}$ quando comparada aos demais grupos ($P < 0,001$). A avaliação do estado de fosforilação do resíduo de Ser943 revelou que os animais $\text{Gcdh}^{-/-}\text{-Lis}$ apresentaram um aumento significativo da expressão do resíduo 943 no neocórtex quando comparada aos demais grupos ($P < 0,001$). Nossos dados sugerem que os animais $\text{Gcdh}^{-/-}\text{-Lis}$ apresentam uma redução na transmissão sináptica GABAérgica neocortical que pode estar associada à disfunção da enzima GAD; e uma diminuição da atividade da bomba $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ neocortical possivelmente causada pela diminuição da expressão da enzima e pelo aumento da fosforilação do resíduo Ser943 da subunidade α no neocortical. Estas alterações em conjunto podem estar contribuindo para os mecanismos de epileptogênese na AG I.

ABSTRACT

The epilepsy is a neurological disorder that affects approximately 65 million people throughout the world. Despite of inborn errors of metabolism (IEM) not being a frequent cause of epilepsy, the most common symptom in metabolic disorders are epileptic seizures. Within the IEM, are the organic acidemias, such as, glutaric acidemia type I (GAI), that are associated with epileptic seizures during acute metabolic decompensation. The GAI is an autosomal recessive disease caused by deficiency of the enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH). This deficiency leads to the accumulation of organic acids in body fluids and tissues. If not diagnosed and treated early, this disease evolves to neurological deficits, macrocephaly and epilepsy. The increased levels of organic acids in the brain, such as glutaric, glutaconic and 3-hydroxyglutaric acids, decreases the activity of the enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD) in the brain parenchyma and cause the inhibition of the enzyme activity Na^+, K^+ -ATPase. Interestingly, previous biochemical and behavioral analysis of an animal model of GAI, the GCDH knockout mice treated with lysine overload diet (4.7%) ($\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis), had shown decreased GAD immune content, reduced GABA release and decreased activity Na^+, K^+ -ATPase in the neocortex; and development of spontaneous seizures. In this work (approved by the CEP-HCPA-140270) we used this animal model to study the neocortical GABAergic synaptic function and the expression and the phosphorylation state of Na^+, K^+ -ATPase α subunit in the neocortex. The GAD activity was measured by HPLC technique; the spontaneous and miniature inhibitory post-synaptic currents (IPSC) were evaluated by in vitro patch-clamping recordings from pyramidal cells; and the expression and the phosphorylation of total residue to Ser943 of Na^+, K^+ -ATPase was performed by Western Blot in mice $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis (P30-P45). As controls we used $\text{Gcdh}^{-/-}$ -N and $\text{Gcdh}^{+/+}$ animals treated with normal diet. Our results showed a significant decrease in the neocortical GAD activity in $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis mice when compared to $\text{Gcdh}^{+/+}$ group ($P < 0.05$). The spontaneous and miniature IPSC frequencies onto layer V pyramidal cells from $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis mice were significantly lower when compared to $\text{Gcdh}^{-/-}$ -N and $\text{Gcdh}^{+/+}$ mice ($P < 0.0003$). The cumulative probability and the statistical analysis the Kolmogorov-Smirnov confirmed the decrease in the frequency of spontaneous and miniature IPSC ($P < 0.0001$). The expression of Na^+, K^+ -ATPase α subunit was higher in the neocortex from $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis when compared to the other groups ($P < 0.001$). Also, the $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis mice had a significant increased fosforilation of Na^+, K^+ -ATPase residual Ser943 in the neocortex when compared to the other groups ($P < 0.001$). Our data suggested that the neocortex of $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lys mice exhibited reduction in GABAergic inhibition that may be attributed to a GAD dysfunction level; and decreased Na^+, K^+ -ATPase activity that could be caused by decrease in its expression and increased phosphorylation of residue Ser943 α subunit. Taken altogether, these alterations could contribute to the mechanisms of epileptogenesis observed in GAI.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - ácido glutárico

AG I – acidemia glutárica tipo I

3-OHGA - 3-hidróxi-glutárico

CIPS - correntes inibitórias pós-sinápticas

CNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona, antagonista receptor AMPA

D-AP5 - 2-amino-5-fosfonopentanóico ácido, antagonista receptor NMDA

EIM – Erros inatos do metabolismo

GABA - ácido gama-aminobutírico

GAD - glutamato descarboxilase ou descarboxilase do ácido glutâmico

GCDH - enzima mitocondrial glutaril-CoA desidrogenase

GPi – Globo Pálido interno

GPe – Globo Pálido Externo

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

ICBS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde

ILAE - Liga Internacional contra a Epilepsia

LCRAc - líquido cefalorraquidiano artificial de corte

LCRAr - líquido cefalorraquidiano artificial de registro

NEM – Neurônios espinhos médios

NST – Núcleo Subtalâmico

PDBu – ativador da PKC

PKA - proteínas cinases dependentes de AMPc

PKC - proteínas cinase dependentes de cálcio e fosfolipídios

SNC- Sistema Nervoso Central

SNPr – *Substantia Nigra pars reticulada*

Ser943 - resíduo de serina (aminoácido)

Ser23 – resíduo de serina

TTX- tetrodotoxina

UFRGS – Universidade Federa do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da revisão terminológica para organização de crises e epilepsias de acordo com a Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE) de 2010.

Figura 2 – Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano. Adaptado de Scriver et al, 2001.

Figura 3 - Via de síntese e degradação do neurotransmissor GABA.

Figura 4 – Estrutura do receptor GABA_A.

Figura 5 – Inibição (hiperpolarização) em neurônios adultos mediada pela ativação de receptores GABA_A.

Figura 6 – Diminuição na atividade da enzima GAD no neocórtex, analisada por HPLC.

Figura 7 – Cromatograma representativo do pico de GABA visualizado através da atividade da GAD por HPLC.

Figura 8 – Diminuição na frequência das CIPS espontânea nas células piramidais neocorticais dos animais Gcdh^{-/-}-Lis.

Figura 9 - Diminuição na frequência CIPS miniaturas nas células piramidais neocorticais dos animais Gcdh^{-/-}-Lis.

Figura 10 - Diminuição da expressão da subunidade α e aumento da fosforilação do resíduo Ser943 da bomba Na⁺,K⁺-ATPase no neocórtex dos animais Gcdh^{-/-}-Lis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Epilepsia	10
1.2 Acidemia Glutárica Tipo I	13
1.2.1 Modelo animal para Acidemia Glutárica Tipo I	17
1.3 Sistema GABAérgico	19
1.4 Bomba Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	23
1.5 Hipótese	25
2. OJBETIVOS	25
2.1 Objetivos Gerais	25
2.2 Objetivos Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Atividade da enzima GAD por HPLC	27
3.3 Eletrofisiologia <i>in vitro</i>	29
3.3.1 Obtenção e manutenção das fatias	29
3.3.2 <i>Whole-cell patch clamp</i> (modo <i>voltage-clamp</i>)	30
3.4 Imunodeteção da subunidade α da bomba Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	31
3.5 Biossegurança e descarte de resíduos	32
3.6 Análise dos dados	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Atividade da enzima GAD no neocórtex	34
4.2 Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas	36
4.3 Correntes inibitórias pós-sinápticas miniaturas	37
4.4 Expressão e estado de fosforilação da subunidade α da bomba Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	39
5. DISCUSSÃO	40
5.1 Transmissão GABAérgica neocortical	41
5.2 Bomba Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	47
6. CONCLUSÃO	49

7. PERSPECTIVAS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

Epilepsia é a desordem neurológica mais comum que afeta indivíduos de todas as idades (COBEN *et al*, 2015). Aproximadamente 65 milhões de pessoas em todo o mundo tem epilepsia (THURMAN *et al*, 2011). A incidência média relatada foi de 50,4 casos de epilepsia por 100.000 indivíduos por ano (NGUGI, *et al*, 2011). As causas de epilepsia são múltiplas, e resultam num desequilíbrio entre a excitação e a inibição nas redes neurais cerebrais (BROMFIELD *et al*, 2006). Pessoas com epilepsia ainda hoje convivem com a discriminação, incompreensão, estigma social e o estresse de viver com uma desordem imprevisível crônica que pode levar à perda de autonomia para as atividades da vida diária (QUINTAS *et al*, 2012). Além disso, cerca de 50% dos adultos com epilepsia apresentam pelo menos uma comorbidade psiquiátrica (KEEZER *et al*, 2016), levando a uma diminuição da qualidade de vida e tornando a epilepsia como um dos grandes problemas de saúde pública mundial (WHO, 2004). Em países em desenvolvimento a prevalência média de casos de epilepsia ativa é de 12,7 por 1.000 indivíduos em áreas rurais e 5,9 por 1.000 em áreas urbanas. Enquanto que a prevalência média em países desenvolvidos é de 4,9 por 1.000 indivíduos (NGUGI *et al*, 2010).

O entendimento sobre o conceito de epilepsia requer o conhecimento sobre o que é uma crise epiléptica. A Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE) definiu o termo crise epiléptica como “uma ocorrência transiente de sinais e/ou sintomas devido à anormal atividade neuronal excessiva ou síncrona no cérebro”. Em outras palavras, crises epilépticas são manifestações clínicas resultantes de descargas paroxísticas, sincrônicas e anormais entre os neurônios em determinadas áreas do cérebro. Aplicar na prática cotidiana a definição conceitual pode ser difícil. Assim, a ILAE em 2014 publicou uma definição operacional mais adequada para o uso

clínico. De acordo com a definição operacional, considera-se que um paciente tenha epilepsia quando preencha qualquer uma das seguintes condições: “(i) ter pelo menos duas crises não provocadas (ou reflexa) com intervalo maior que 24 horas; (ii) ter uma crise não provocada (ou reflexa) e uma probabilidade de ter mais crises semelhantes para o risco de recorrência geral (pelo menos 60%), após duas crises não provocadas ao longo dos próximos 10 anos; (iii) ter diagnóstico de uma síndrome epiléptica”. Os pacientes que tiveram uma síndrome epiléptica idade-dependente, porém atualmente já passaram da idade ou então aqueles pacientes que estão livres de crises nos últimos 10 anos, e sem o uso de medicamentos antiepiléptico, são considerados resolvidos para a epilepsia (FISHER *et al*, 2014).

Tentativas têm sido feitas para organizar e classificar crises e epilepsias desde a primeira publicação em 1960, com a última atualização oficial para crises feita em 1981 (Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional Contra a Epilepsia) e para epilepsias em 1989 (Comissão de Classificação e Terminologia da Liga Internacional Contra a Epilepsia). Tendo em vista os avanços científicos nas últimas décadas, em 2010, a Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE), propôs alterações nos conceitos e terminologias para a classificação de crises e formas de epilepsias. Os termos crises generalizadas e crises focais foram redefinidos. As crises epiléticas generalizadas se originam em alguma região no cérebro envolvendo rapidamente redes neurais distribuídas bilateralmente, as quais podem ser estruturais corticais e subcorticais. As crises generalizadas podem ser assimétricas, ou seja, não necessariamente ocorre o envolvimento de todo o neocórtex de ambos os hemisférios. Já as crises epiléticas focais têm o ponto de origem em uma área no cérebro limitada a um dos hemisférios, podendo ocorrer em estruturas subcorticais. As crises generalizadas e as crises focais são subdivididas em diferentes tipos como podemos observar na figura 1. Importante salientar que para as crises focais, a distinção entre os diferentes tipos (por exemplo, crise parcial complexa e parcial simples) foi eliminada. As crises focais passaram a levar em consideração o grau de comprometimento da consciência durante a crise. A crise parcial simples corresponde à crise focal sem o

comprometimento da consciência e a crise parcial complexa corresponde à crise focal com o comprometimento da consciência.

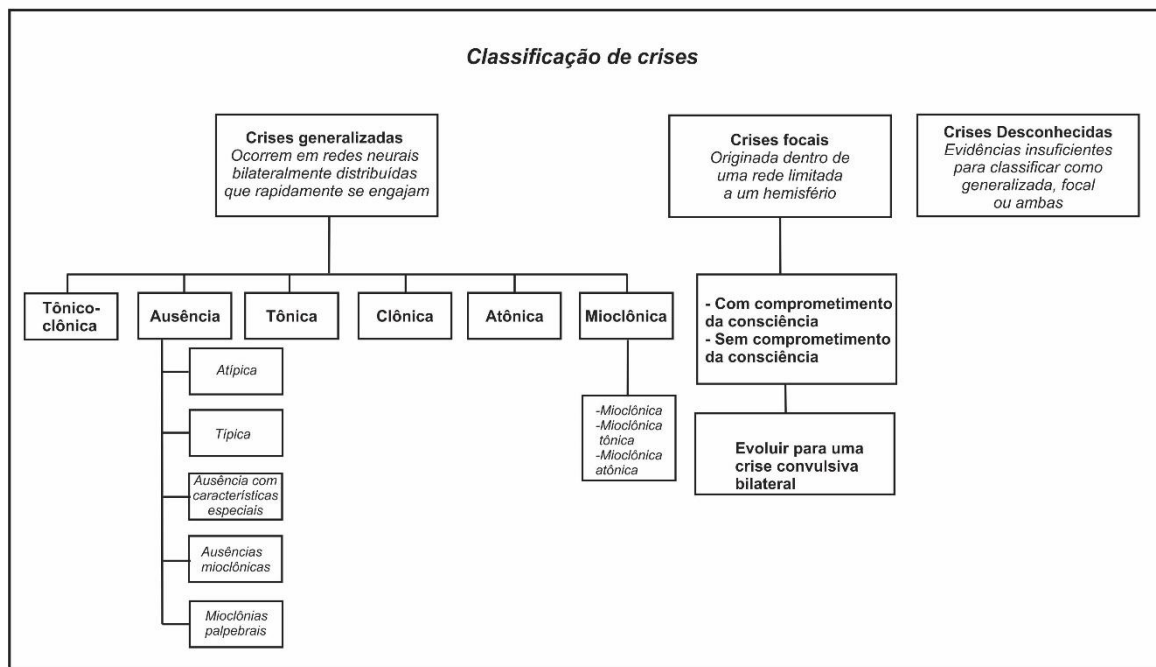


Figura 1 - Diagrama da revisão terminológica para organização de crises e epilepsias de acordo com a Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE) de 2010.

As causas da epilepsia são diversas, e vão desde doenças metabólicas hereditárias ou adquiridas até o envolvimento de certas mutações genéticas, como defeitos nos canais iônicos. Entretanto, a maioria das causas ainda é desconhecida (SHNEKER & FOUNTAIN, 2003). Hoje três termos são considerados para a etiologia da epilepsia de acordo com a Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE) de 2010. Os termos genética, estrutural/metabólica e desconhecida representam conceitos modificados para substituir os termos idiopática, sintomática e criptogênica, respectivamente, antes usados. A epilepsia de causa genética tem como o principal sintoma crises epilépticas resultantes de um efeito direto a partir de um defeito genético conhecido ou presumido. As epilepsias atribuídas às causas metabólicas/estruturais constituem

um grupo que apresentam uma condição estrutural ou metabólica ao demonstrarem o aumento do risco de desenvolverem epilepsias. Como por exemplo, malformação do desenvolvimento cortical, traumas, infecções, acidentes vasculares cerebrais. As epilepsias de causa desconhecida constituem o grupo no qual a causa da epilepsia ainda é desconhecida, podendo haver um defeito genético ou um distúrbio metabólico/estrutural ainda não reconhecido.

Apesar dos erros inatos do metabolismo (EIM) não serem a causa frequente de epilepsia, o sintoma mais comum presente em desordens metabólicas são crises epiléticas ocorrendo principalmente na infância (RAHMAN *et al*, 2012). Os mecanismos patogênicos das crises epiléticas nos EIM podem ser desde um prejuízo energético, efeitos tóxicos dos metabólicos, distúrbios no sistema de neurotransmissores até malformações do cérebro (WOLF *et al*, 2005). As crises epiléticas geralmente ocorrem em períodos de descompensação metabólica aguda, como por exemplo, em uma crise de hiperamonemia que constitui o grupo dos distúrbios do ciclo da ureia ou as acidemias orgânicas (RAHMAN *et al*, 2012). Diversas acidemias orgânicas podem levar a geração de crises epiléticas durante um episódio de descompensação metabólica aguda, entre elas está a acidemia glutárica tipo I (WOLF *et al*, 2005).

1.2 Acidemia Glutárica Tipo I

Acidemia glutárica tipo I (AG I) faz parte das acidemias orgânicas que se aplicam a um grupo de doenças caracterizadas pela excreção de ácidos orgânicos não-aminos na urina (SEASHORE, 2009). É uma desordem neurometabólica autossômica recessiva, descrita pela primeira vez em 1975 por Goodman e colaboradores, causada pela deficiência na enzima mitocondrial glutaril-CoA desidrogenase (GCDH, EC 1.3.99.7). Os genes da GCDH no cromossomo 19p13.2 contém 11 éxons e 7kb (BIERY *et al*, 1996). Ele codifica uma proteína de 438 aminoácidos, que inclui uma sequência de direcionamento N-terminal de 44

aminoácidos, a qual é clivada após a importação para a matriz mitocondrial (GREENBERG *et al*, 1994; GOODMAN *et al*, 1995). Mais de 150 mutações no gene da enzima GCDH têm sido relacionadas com AG I, levando a deficiência da enzima GCDH e, assim causando a AG I. Sendo a mutação R402W mais frequente encontrada. (GOODMAN *et al*, 1998; BUSQUETS *et al*, 2000; ZSCHOCKE *et al*, 2000). A frequência da AG I baseada na triagem neonatal por cromatografia de massa em tandem (MS/MS) de 2,5 milhões de crianças é que a cada 100.000 nascidos 1 apresenta AG I (LINDNER *et al*, 2004). De acordo com alguns estudos, a prevalência da AG I pode variar de 1: 30.000 a 1:100.000 recém-nascidos. (HOFFMAN, 1994; KOELLER ET AL, 2002, JAFARI, 2011). Em algumas comunidades, a frequência da AG I diminui para 1: 300, como, por exemplo, a comunidade de Old-Ordem Amish da Pensilvânia (MORTON *et al*, 1991) e a comunidade Ojibway-Cree no Canadá (HAWORTH *et al*, 1991).

A GCDH é a enzima chave na descarboxilação oxidativa do glutaril-CoA, um intermediário da via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano (KÖELLER *et al*, 2002; JAFARI *et al*, 2011). A reação catalisada por esta enzima ocorre em duas etapas consecutivas: a desidrogenação do glutaril-CoA formando glutaconil-CoA, seguida pela descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA e CO₂. O composto intermediário glutaconil-CoA pode ser clivado e excretado como ácido glutacônico ou hidratado para ácido 3-hidroxi-glutaril-CoA (HÄRTEL *et al*, 1993) (Figura 2).

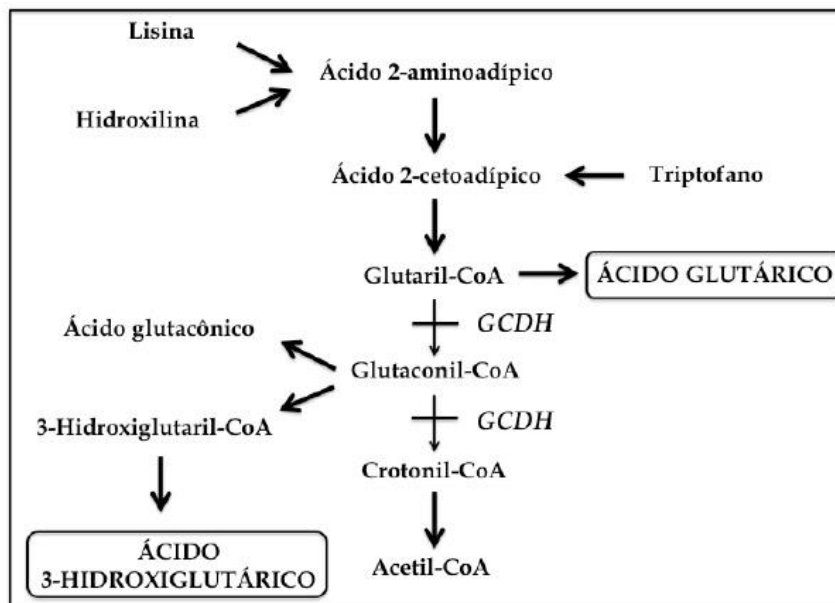


Figura 2 – Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilina e triptofano. Adaptado de Scriver *et al*, 2001.

As características bioquímicas da AG I é o acúmulo dos ácidos glutárico (AG), 3-hidroxiglutarico (3-OHGA) e glutacônico, glutaril-CoA e conjugados da carnitina em tecidos e líquidos corporais devido à deficiência da enzima GCDH. Estes metabólitos, assim como carnitina e os ésteres de glicina, podem ser detectados por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) ou Cromatografia de massa em tandem (GOODMAN *et al*, 1977; BARIC *et al*, 1999; MEYBURG *et al*, 2001). Existem dois subgrupos bioquimicamente definidos, os chamados excretores altos (AG na urina > 100 mmol/mol creatinina) e os excretores baixos (AG < 100mmol/mol creatinina) (BARIC *et al*, 1999). Um estudo com 10 pacientes na Universidade de Utah que foram diagnosticados por triagem na urina ou por manifestações clínicas apresentaram uma média de AG na urina de 970,1 mmol/ mol creatina e de 3-OHGA na urina de 87,2 mmol/mol creatina (VIAU *et al*, 2012). As medidas das concentrações de AG e 3-OHGA no sistema nervoso central (SNC) foram realizadas em estudos *post-mortem*. Em pacientes que não foram tratados, a concentração de AG foi aproximadamente 500-5000 mmol/L e a concentração de 3-OHGA 40-200 mmol/L no tecido cerebral (BENNETT *et al*, 1986;

FUNK *et al*, 2005; GOODMAN *et al*, 1977; KÖLKER *et al*, 2003; KÜLKENS *et al*, 2005; LEIBEL *et al*,1980).

A microcefalia foi a primeira evidência clínica observada em recém-nascidos com AG I (HOFFMANN *et al*,1996). Sem o devido tratamento, 90% dos pacientes irão desenvolver desordens neurológicas durante um período finito de desenvolvimento do cérebro (entre 3 a 36 meses) devido a crises agudas de encefalopatia geralmente precipitadas por febre, infecções gastrointestinais, pneumonia ou imunizações de rotina (HOFFMANN *et al*,1999; KÖLKER *et al*,2006). Cada episódio de crise de encefalopatia leva à morte neuronal massiva. Por isso, os sintomas relacionados com degeneração estriatal (caudado e putâmen), distonia progressiva, discinesias e crises epiléticas surgem após as crises agudas de encefalopatia (HOFFMANN e ZSCHOCKE, 1999; GOODMAN *et al*,2001; KÖLKER *et al*,2006). Isto indica uma vulnerabilidade restrita a um período do desenvolvimento neurológico. Através de exames complementares, foi possível observar os níveis aumentados de AG, 3-OHGA e glutacônico na urina e no sangue, além de verificar por exames de neuroimagem atrofia fronto-temporal bilateral, desmielinização e lesões nos gânglios da base (JAMJOOM *et al*, 1995; HOFFMANN *et al*, 1996). O prejuízo no desenvolvimento do SNC já começa no útero, que em alguns casos, pode resultar em malformações do desenvolvimento cortical frontal e temporal. O comprometimento da substância branca pode ocorrer ao longo dos anos afetando o desenvolvimento intelectual (HOFFMAN e ZSCHOCKE, 1999). Alguns pacientes podem ser assintomáticos, ou apresentar crises epiléticas e macrocrania, ou então atraso no desenvolvimento sem episódios agudos de descompensação (MARINERO *et al*, 1995).

O diagnóstico é realizado pela detecção do AG e 3-OHGA na urina através das técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (KÖLKER *et al*, 2006). Em alguns casos, como, por exemplo, em pacientes que não excretam na urina os ácidos, a confirmação do diagnóstico é feita através da medida da atividade enzimática da GCDH fibroblastos ou leucócitos (SCRIVER *et al*, 2001).

A base do tratamento dos pacientes com AG I é uma dieta restrita de lisina e a administração de carnitina e riboflavina (GOKMEN *et al*, 2012). Agentes farmacológicos como benzodiazepínicos e valproato podem ser utilizados para amenizar os sintomas neurológicos desencadeados pela doença (MARINERO *et al*, 1995; HOFFMAN *et al*, 1996). Algumas alternativas de tratamentos adicionais têm sido propostas, como a suplementação com arginina (KÖLKER *et al*, 2012; SAUER *et al*, 2011). A diminuição da entrada de lisina através da barreira hemato-encefálica por competição pelo sistema de transporte Y com a arginina tem o objetivo de reduzir o acúmulo dos metabólitos tóxicos produzidos pela deficiência da GCDH. Estudos recentes têm relatado os benefícios dessa dieta (KÖLKER *et al*, 2012; SAUER *et al*, 2011).

1.2.1 Modelo animal para Acidemia Glutárica Tipo I

O desenvolvimento de modelos animais que reproduzam as alterações bioquímico-metabólicas e os achados neuropatológicos da AG I tem sido o foco de diversos estudos. Um dos modelos animais para AG I foi à geração de um modelo de camundongos deficiente para a GCDH ($Gcdh^{-/-}$) realizado por Köeller e colaboradores em 2002, através da recombinação homóloga em células-tronco. Ensaio enzimático em amostras de fígado confirmaram a perda de atividade da enzima. Estes animais $Gcdh^{-/-}$ apresentam altos níveis de excreção de ácido glutárico e 3-OHGA na urina e grande quantidade de glutaril-carnitina e glutaril-glicina, semelhante àquela em pacientes com AG I, os quais também estão presentes em níveis elevados no cérebro.

O modelo proposto apresenta um fenótipo bioquímico similar aos pacientes com AG I, porém, como os próprios autores relataram, o modelo não reproduz o fenótipo neurológico e a degeneração estriatal característica dos pacientes afetados por esta doença (KÖELLER *et al*, 2002). Um aperfeiçoamento do modelo foi proposto por Zinnanti e colaboradores em 2006, no qual através da administração de

uma dieta com sobrecarga de lisina nos animais $Gcdh^{-/-}$, estes apresentaram obliteração ventricular cerebral, formação de grandes vacúolos e dilatação capilar no neocórtex e no estriado, paralisia e crises epilépticas quando comparados a animais $Gcdh^{-/-}$ submetidos a uma dieta normal (ZINNANTI *et al*, 2006). Ocorre uma grave perturbação na arquitetura cortical com perda neuronal e gliose evidente no neocórtex e no hipocampo. Além disto, uma análise em tecidos homogeneizados de cérebro de animais $Gcdh^{-/-}$ com sobrecarga de lisina mostrou um aumento significativo na concentração dos AG e 3-OHAG. Foi observado também que quanto maior a quantidade de lisina na dieta, maior a concentração destes ácidos no cérebro (KÖELLER *et al*, 2002; SAUER *et al*, 2006, 2015). Deste modo, a neuropatologia observada nos animais expostos a uma dieta com sobrecarga de lisina pode estar associada com o acúmulo de AG e 3-OHAG no soro e no tecido encefálico gerado pelo aumento do metabolismo da lisina no contexto da doença.

Nos últimos anos, distintos mecanismos têm sido propostos para explicar a fisiopatologia dos danos cerebrais na AG I. Apesar de alguns dos mecanismos já terem sido elucidados parcialmente em modelos *in vitro* e *in vivo*, ainda não se sabe completamente os mecanismos fisiopatológicos que levam ao dano estriatal e cortical apresentado pelos pacientes com AG I. Estudos *in vitro* têm identificado os AG e 3-OHAG como neurotoxinas responsáveis pelos danos na desordem causada pela deficiência da GCDH (KÖLKER *et al*, 2004). Um estudo realizado em cérebros de ratos e coelhos demonstrou a inibição competitiva da glutamato descarboxilase (GAD), enzima chave na biossíntese do neurotransmissor inibitório GABA, pelos AG, 3-OHAG e glutacônico (STOKEE *et al*, 1976). Em investigações *post-mortem*, concentrações extremamente baixas de GABA foram encontradas no putâmen e caudado em pacientes com AG I e correlacionada com a diminuição da GAD nesta área (LEIBEL *et al*, 1980). Os efeitos sobre a atividade GABAérgica também foram suportados pela demonstração de que o agonista do receptor de $GABA_A$ muscimol protegeu as crises induzidas por AG (LIMA *et al*, 1998). Portanto, os AG e 3-OHAG indiretamente modulam a neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, resultando no desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória (LIMA *et al*, 1998). A atividade da bomba Na^+, K^+ -ATPase é essencial para a manutenção do

potencial de repouso e ação, liberação e captação de neurotransmissores (STAHL & HARRIS,1986). Em um estudo com cérebros de ratos foi demonstrado que o AG inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (KÖLKER *et al*, 2002).

No modelo de camundongos deficientes para a GCDH ($\text{Gcdh}^{-/-}$) foram demonstrados a presença de crises epiléticas espontâneas e o aumento da susceptibilidade de crises epiléticas induzidas nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ que receberam uma dieta com sobrecarga de lisina. Em partes, isto provavelmente é causado pela diminuição de ácido γ -aminobutírico (GABA) devido à diminuição da enzima GAD e também pelo aumento da liberação de glutamato em relação ao GABA em situações de despolarização neuronal (PASQUETTI, 2014). Além disso, um estudo mostrou que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi fortemente inibida e teve a expressão da subunidade $\alpha 2$ diminuída em animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ que receberam uma dieta com sobrecarga de lisina (AMARAL *et al*, 2012).

1.3 Sistema GABAérgico

O sistema GABAérgico é crucial para o desenvolvimento de circuitos neuronais funcionais (WANG e KRIEGSTEIN, 2011). Durante o desenvolvimento dos circuitos corticais, o GABA e a ativação do seu receptor GABA_A possuem um papel crucial em processos neuronais como migração (HECK *et al*,2007; DE LIMA *et al*, 2009; BALTZ *et al*,2010), proliferação (BARBIN *et al*, 1993; LO TURCO *et al*,1995) e na formação de sinapses excitatórias para formar interações sinápticas funcionais promovendo um equilíbrio entre a inibição e excitação na formação do neocórtex (WANG e KRIEGSTEIN, 2008).

A sinalização GABAérgica é feita através do neurotransmissor GABA que age nos seus receptores GABA_A , GABA_B e GABA_C . (BEN-ARI *et al*, 2007). O GABA foi descoberto no SNC em 1950 (AWAPARA, 1950; ROBERTS *et al*, 1950; UDENFRIEND, 1950) e desde então tem sido estabelecido como o

neurotransmissor inibitório no SNC (KRNJEVIC e PHILLIS, 1963; CURTIS *et al*,1970). A síntese e a degradação do GABA são realizadas por 3 enzimas: (1) enzima descarboxilase do ácido glutâmico/ glutamato descarboxilase (GAD) forma GABA através da remoção do grupo α carboxil do glutamato, liberando CO_2 (KRAVITZ, 1962); (2) transaminase de GABA converte GABA a succinato semialdeído na presença de α -cetoglutarato (HALL e KRAVITZ, 1967a); (3) succinato semialdeído desidrogenase completa o metabolismo de GABA a ácido succínico na presença de NAD (HALL e KRAVITZ, 1967b) (Figura 3).

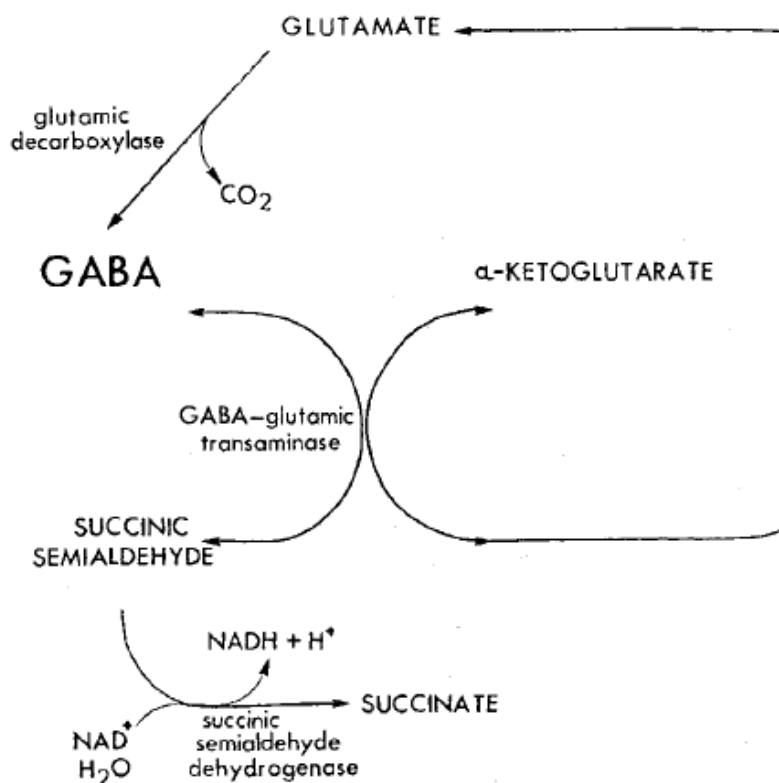


Figura 3 – Via de síntese e degradação do neurotransmissor GABA. Figura retirada do artigo de Molinoff e Kravitz de 1967.

O receptor GABA_A é responsável pela mais rápida inibição sináptica no cérebro de mamíferos, controlando a atividade tanto da rede neuronal quanto a nível celular (JABOC *et al*, 2008). Como outros membros da superfamília de canais iônicos dependentes de ligante, os receptores ionotrópicos de GABA são constituídos de

subunidades proteicas dispostas em torno de um poro central que constitui o canal do íon. Cada subunidade tem um grande domínio N-terminal extracelular, seguido de 3 domínios que atravessam a membrana (M1-3), um ciclo intracelular de comprimento variável e um quarto domínio que atravessa a membrana (M4), com a extremidade C-terminal. Cada subunidade se arranja de um modo que o segundo domínio (M2) que atravessa a membrana forma a parede do poro do canal. Nos mamíferos, são 19 subunidades distintas que compõem os receptores de GABA_A (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π) (JACOB *et al*, 2008; LUSCHER *et al*, 2011) (Figura 4).

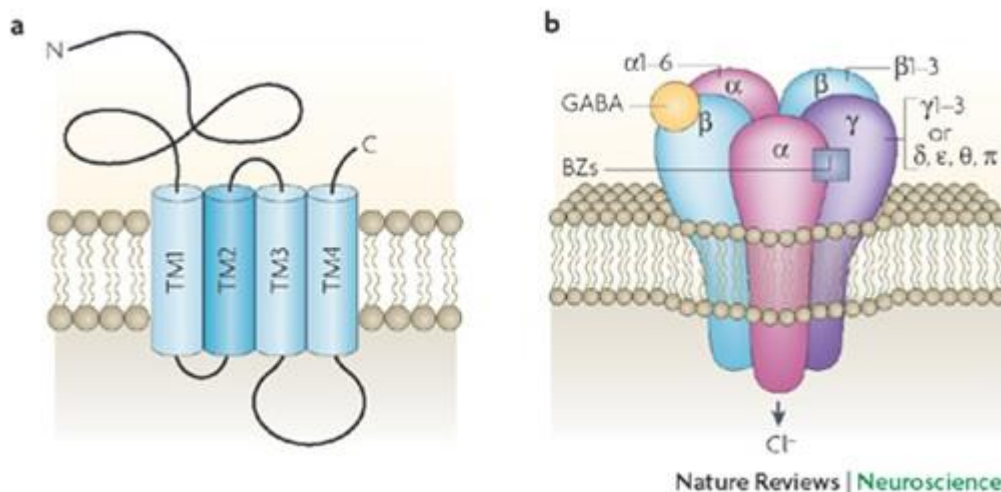


Figura 4 – Estrutura do receptor GABA_A. **A:** Subunidades do receptor GABA_A consistem em quatro domínios transmembrana (TM1-4), sendo o domínio M2 que constitui a parede do canal. **B:** Subunidades dos receptores GABA_A α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π que formam o canal permeável ao íon Cl^- . Figura retirada do artigo de revisão JACOB *et al*, 2008.

Em neurônios adultos, o nível intracelular do íon cloreto [Cl^-]_i é relativamente baixo, com o potencial de reversão do Cl^- próximo ao potencial de membrana ($V_m \approx -65\text{mV}$). Assim, pequenas alterações na [Cl^-]_i podem afetar significativamente a força e até mesmo a polaridade do efeito de GABA. Quando a [Cl^-]_i é alta, o equilíbrio do Cl^- (E_{Cl^-}) é positiva em relação V_m , assim a ativação do receptor GABA_A pelo GABA resulta em um efluxo dos íons Cl^- levando a uma despolarização neuronal. Quando a

$[Cl^-]_i$ é baixa (mais fisiológico), o E_{Cl^-} é negativo em relação ao V_m , e assim a ativação do receptor $GABA_A$ desencadeia um influxo de íons Cl^- e a uma hiperpolarização neuronal (MOHAJERANI E CHERUBINI, 2005; BANKE E MCBAIN, 2006) (Figura 5).

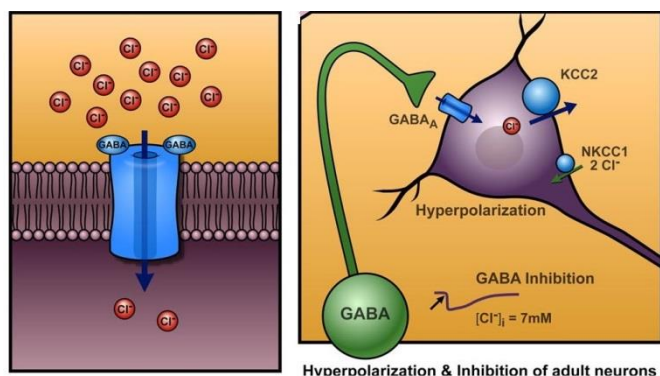


Figura 5 – Inibição (hiperpolarização) em neurônios adultos mediada pela ativação de receptores $GABA_A$. Figura retirada do artigo de revisão BEN-ARI *et al*, 2007.

Os receptores $GABA_B$ são acoplados a Proteína G_i ou a Proteína G_o . Sua localização pode ser tanto na membrana do neurônio pré-sináptico como pós-sináptico. A ativação dos receptores pós-sinápticos geralmente ativa os canais de potássio retificadores que são importantes na fase tardia do potencial pós-sináptico inibitório. Já a ativação dos receptores $GABA_B$ pré-sinápticos diminui a liberação de neurotransmissores pela inibição dos canais de Ca^{+2} voltagem-dependente (COUVE *et al*, 2000; BOWERY *et al*, 2002; BETTLER *et al*, 2003; BEN-ARI *et al*, 2007).

Da mesma forma que o receptor de $GABA_A$, o receptor de $GABA_C$ é um canal iônico dependente de ligante permeável ao íon Cl^- . A ativação do receptor $GABA_C$ provoca um influxo de íons Cl^- , inibindo o neurônio pós-sináptico (CHEBIB e JOHNSTON, 1999). Estudos eletrofisiológicos e farmacológicos identificaram o receptor de $GABA_C$ através da expressão do seu RNA em oócitos de *Xenopus* obtidos da retina bovina (POLENZANI *et al*, 1991; WANG *et al*, 1994). Através de clones da retina de humanos, ratos, pintos e camundongos foi possível identificar as diferentes subunidades ρ (1,2,3) dos receptores $GABA_C$ (CUTTING *et al*, 1991; WANG *et al*, 1994; ZHANG *et al*, 1995). Porém, existem diferenças entre os

receptores GABA_A e os receptores GABA_C. Enquanto que o receptor GABA_A é modulado por barbitúricos, benzodiazepínicos e neuroesteroides os receptores GABA_C são insensíveis a estes agentes. Os receptores GABA_C são insensíveis também a bicuculina (agonista seletivo GABA_A) e ao baclofen (agonista seletivo GABA_B) (CHEBIB e JOHNSTON, 1999).

Os interneurônios representem apenas $\frac{1}{4}$ dos neurônios do neocórtex, eles desempenham um importante papel na regulação na função cortical. São responsáveis pela modulação e sincronização da atividade das células piramidais, que é crítico para o funcionamento normal cortical (MARÍN, 2012). Déficits no sistema GABAérgico estão associados com desordens do SNC como por exemplo a epilepsia (CALCAGNOTTO *et al*, 2002). Muitos estudos mostram que diminuição de GABA, alterações na forma ou número de interneurônios GABAérgicos ou alterações nos receptores de GABA estão associados a vários tipos de epilepsias (COBOS *et al*, 2005). Alterações na liberação de GABA pelos interneurônios na AG I ainda são desconhecidas. Se os interneurônios apresentarem um decréscimo da liberação de GABA, o funcionamento do circuito inibitório sináptico pode ser abalado contribuindo para epileptogênese (CALCAGNOTTO *et al*, 2002, COBOS *et al*, 2005, ALVAREZ *et al*, 2006).

1.4 Bomba Na⁺,K⁺ -ATPase

A enzima Na⁺,K⁺-ATPase ou bomba de sódio (EC 3.6.3.9) é uma proteína de membrana plasmática que está presente virtualmente em todas as células eucarióticas (SKOU & ESMANN, 1992). A reação básica catalisada pela bomba é o transporte de 3 íons Na⁺ para o meio extracelular e de 2 íons K⁺ para o meio intracelular, usando energia proveniente da hidrólise do ATP gerada pela glicólise celular e fosforilação oxidativa (SKOU & ESMANN, 1992; MOBASHERI *et al*, 2000).

A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico pelos potenciais de repouso e ação e captação e

liberação de neurotransmissores no cérebro (STAHL e HARRIS,1986). Conseqüentemente, qualquer alteração na atividade da Na^+, K^+ -ATPase afetam diretamente a sinalização celular via neurotransmissores e a atividade neuronal, assim como o comportamento do animal (MOSELEY *et al*, 2007). Sendo assim, a diminuição da recaptção de glutamato (BALCAR *et al*,1972) pode contribuir para um aumento da excitabilidade do sistema. Neste contexto, um prejuízo ao funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase ocasiona uma alteração da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (GRISAR *et al*,1992). Estudos experimentais mostraram que o ácido glutárico e 3-hidroxi glutárico inibem a atividade da enzima no cérebro de ratos e em cultura neuronal de telencéfalo embrionário de pintos (KÖLKER *et al*, 2002), bem como a recaptção de glutamato em astrócitos (PORCIÚNCULA *et al*, 2004, ROSA *et al*, 2007). Além disso, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi fortemente inibida e teve a expressão da subunidade $\alpha 2$ diminuída em animais deficientes para a enzima GCDH com uma sobrecarga de lisina (AMARAL *et al*, 2012).

Um dos mecanismos importantes da regulação da Na^+, K^+ -ATPase é a fosforilação de resíduos específicos na enzima, principalmente na subunidade α . Neste sentido, neurotransmissores, hormônios e outras substâncias agem diretamente na enzima ou em seus receptores de membrana específicos, podendo ativar vias de sinalização que regulam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (NISHI *et al*, 1999). Uma das maneiras de modular a atividade da Na^+, K^+ -ATPase pode ser através da alteração do estado de fosforilação dos resíduos de serina 943 ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e serina 23 em $\alpha 1$ (FISONE *et al*, 1994; NISHI *et al*, 1999). Os mecanismos pelos quais a fosforilação destes resíduos afeta a atividade da Na^+, K^+ -ATPase podem incluir na afinidade pelos substratos Na^+ , K^+ , e ATP e/ou aumento ou diminuição da quantidade de moléculas de enzima na membrana plasmática (NISHI *et al*, 1999; TEIXEIRA *et al*, 2003).

Considerando que a fosforilação é um importante mecanismo do controle da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, alterações na fosforilação podem estar relacionadas a sua disfunção. Diminuição da atividade desta bomba, incluindo alterações na

subunidade α , seja por mutação ou fosforilação, afeta de forma importante a sinalização sináptica e a atividade neuronal.

1.5 Hipótese

Considerando a presença de crises epiléticas, a diminuição dos níveis corticais de glutamato e GABA e a diminuição da atividade da bomba Na^+K^+ -ATPase nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ com uma sobrecarga de lisina, nossa hipótese é de que existe uma diminuição da função sináptica GABAérgica mediada pelos interneurônios inibitórios neocorticais causado pela inibição da enzima GAD. Além disto, a disfunção da bomba Na^+K^+ -ATPase relacionada ao seu estado de fosforilação estaria ocasionando mudanças nas propriedades eletrofisiológicas da membrana plasmática neuronal e na liberação e recaptação de neurotransmissores contribuindo também para os mecanismos de epileptogênese observada em AG I.

2. Objetivos

Para testar nossa hipótese temos os seguintes objetivos:

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar de maneira funcional a transmissão GABAérgica no neocórtex e a expressão e o estado de fosforilação da subunidade α da bomba Na^+K^+ -ATPase nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ tratados com uma sobrecarga de lisina.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar no córtex cerebral dos animais $Gcdh^{-/-}$ tratados com uma sobrecarga de lisina avaliando:

- 1) A atividade da enzima GAD;
- 2) A magnitude e cinética das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas;
- 3) A magnitude e cinética das correntes inibitórias pós-sinápticas miniaturas;
- 4) A expressão e o estado de fosforilação da subunidade α da bomba Na^+,K^+ -ATPase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizamos camundongos machos deficientes para a enzima glutaril-CoA desidrogenase ($Gcdh^{-/-}$), com idade de 28 a 40 dias pós-natal (P28-40), desenvolvidos por Köller e colaboradores (2002). Os controles utilizados foram os animais $Gcdh^{+/+}$, de mesma idade e ambos os sexos. Os animais foram fornecidos pela Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), genotipados e transportados para o Biotério do Departamento de Bioquímica UFRGS. Os animais foram mantidos na sala de passagem dos camundongos, climatizada (22-26^o, umidade constante) e submetida a um ciclo de iluminação de 12h claro / 12h escuro (luzes acesas das 7 às 19h durante todo o ano), no Biotério do Departamento de Bioquímica – Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram acondicionados em grupos de 5 em gaiolas individualmente ventiladas através do sistema de habitação em rack DGM TM (Digital ready Green line Mouse rack)

pertencente à marca Tecniplast. As gaiolas ventiladas possuem uma área de 501cm² e dimensões 391x199x160 mm, são ligadas a um sistema de ventilação, possuem um filtro (0.2 micron) eficiente para filtrar bactérias e vírus. No assoalho das gaiolas ventiladas foi colocado maravalha seca e limpa trocada a cada dois dias. Os animais tiveram livre acesso à água e dieta padrão (0,9 % lisina e 20% de proteínas - NUVILAB) ou dieta com sobrecarga de lisina (20% de proteínas sendo 4,7% de lisina), equivalente a aproximadamente 3 e 5 vezes à quantidade encontrada na dieta normal. O manuseio e todos os procedimentos dos animais experimentais, incluindo procedimento de eutanásia, envolveram o mínimo de desconforto ou sofrimento, sendo realizados de acordo com (1) a diretriz legal brasileira – Lei nº 11.794/2008, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794, 8 de outubro de 2008); (2) a Resolução Normativa n. 12, de 20 de setembro de 2013 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e (3) a Resolução Normativa N. 13, de 20 de Setembro de 2013 (Diretrizes da Prática de Eutanásia) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) .

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (nº 140270).

Os animais foram divididos em 3 grupos de acordo com a dieta oferecida:

1) Grupo controle (camundongos Gcdh^{+/+}) com dieta normal;

2) Grupo Gcdh^{-/-} com dieta normal (Gcdh^{-/-}-N);

3) Grupo Gcdh^{-/-} com dieta com sobrecarga de lisina (Gcdh^{-/-}-Lis): 4,7% de lisina, iniciada no período pós-natal de 28 dias (P28), a qual persistiu durante até 12 dias.

Todos os animais recebiam dieta normal. No dia pós-natal 28 (P28) um grupo dos animais Gcdh^{-/-} começaram a receber uma dieta com sobrecarga de lisina (4,7%) e os demais grupos continuaram a receber dieta normal.

3.2 Atividade da enzima GAD por HPLC

A atividade da GAD foi determinada pela quantificação de GABA, produto da reação da enzima GAD com seu substrato glutamato, usando a técnica de HPLC. De acordo com Alberts et al (1959), utilizando a penicilamina, um inibidor da GAD, podemos obter a sua atividade através da razão entre a amostra sem inibidor (atividade total) e a amostra com inibidor. Os animais foram sacrificados no período pós-natal de 32 dias (P32) por decapitação, o encéfalo removido e o neocórtex dissecado. O neocórtex foi homogeneizado com uma solução de fosfato de potássio 50mM, pH 6.4, com um potter de vidro. Nas alíquotas homogeneizadas foram adicionados glutamato 1M com ou sem a adição do inibidor de GAD penicilamina 10mM. As amostras foram incubadas 2 h a 37 ° C e 0,25 mL de ácido tricloroacético 7% foi adicionado para parar a reação, seguido por centrifugação (5min, 1000 g, 4 ° C). O sobrenadante foi recolhido e, em seguida, 0,1 ml de hidróxido de sódio 1 M foram adicionados para neutralizar as amostras. Na técnica de HPLC, as amostras foram derivatizadas com o-ftalaldeído e a separação foi realizada através de uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 250mm×4,6mm, Supelco) em um cromatógrafo líquido Shimadzu (válvula de injeção em laço 50µL). A fase móvel fluiu a taxa de 1,4mL/min e a temperatura da coluna foi de 22°C. As composições dos tampões foram A: tampão fosfato de sódio monoidratado 0,04 mol/L, pH 5.5, contendo 20% de metanol; B: tampão fosfato de sódio monoidratado 0.01 mols/L, pH 5.5, contendo 80% de metanol. O padrão do gradiente foi modificado de acordo com o tampão B na fase móvel: 0% a 0.00 min, 25% a 13.75 min, 100% a 15.00–20.00 min, 0% a 20.01–25.00 min. A absorbância foi lida a 360nm (excitação) e 455nm (emissão) em um detector de fluorescência Shimadzu. Foram utilizados 25µL de amostra e a concentração expressa em µM/ µg de proteína.

3.3 Eletrofisiologia *in vitro*

Para a avaliação do sistema GABAérgico cortical utilizamos uma análise eletrofisiológica *in vitro* das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPS espontâneas) e miniaturas (CIPS miniaturas) nos neurônios piramidais corticais de fatias cerebrais de camundongos *Gcdh*^{+/+} e *Gcdh*^{-/-}, nos diferentes tratamentos descritos, utilizando a técnica de *patch-clamp* no modo *voltage-clamp*.

3.3.1 Obtenção e manutenção das fatias

No período entre os dias pós-natais de 28 dias a 40 dias (P28-40) os animais foram anestesiados com ketamina:xilazina (80-120 mg/kg: 10-16mg/kg ip) e decapitados. O encéfalo foi rapidamente removido e colocado na base do recipiente do vibrátomo (VTS-1000, Leica) que continha o líquido cefalorraquidiano artificial de corte (LCRAc) composto por (em mM) 220 sacarose, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 10 dextrose (295-305 mOsm), constantemente oxigenado (95% O₂ – 5%CO₂) e mantido a 4°C. Os encéfalos foram cortados em fatias coronais medindo 280µm de espessura e as fatias foram imediatamente transferidas para um recipiente contendo a solução LCRA de registro (LCRAr), constantemente oxigenada, composta de (em mM) 124 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 MgO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 10 dextrose (295-305 mOsm). As fatias foram incubadas durante 45 minutos a 37°C neste recipiente contendo a solução LCRAr e, posteriormente, foram mantidas à temperatura ambiente até o uso sob constante oxigenação. A cada experimento uma fatia individual foi transferida para a câmara de submersão onde os registros eletrofisiológicos foram realizados. Nesta câmara as

fatias do encéfalo foram continuamente perfundidas com a solução LCRAr oxigenada, e mantidas à temperatura de 33°C-35°C (Calcagnotto et al. 2002).

3.3.2. *Whole-cell patch-clamp* (modo *voltage-clamp*)

O registro das CIPS espontânea e CIPS miniatura foram realizados nos neurônios piramidais da camada V do neocórtex somatossensorial nas fatias cerebrais dos camundongos *Gcdh*^{+/+} e *Gcdh*^{-/-}, nos diferentes tratamentos descritos. As células foram visualizadas por um sistema de vídeo microscopia que utiliza contraste de interferência diferencial (IR-DIC). As micropipetas (eletrodos de registro) utilizadas para a técnica de *patch-clamp* (3-7MΩ) foram manufaturadas a partir de tubos capilares de borosilicato medindo 1,5mm de diâmetro utilizando o estirador de micropipetas (Sutter P-100). Após o estiramento, as micropipetas foram polidas através de um processo de conformação mecânica utilizando microforge para diminuir a resistência capilar. A solução intracelular utilizada dentro das micropipetas foi composta por (em mM) 135 CsCl₂, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 Na₂ATP, 0,2 Na₂GTP, 1,25 QX-314, ajustada ao pH 7,2 com CsOH (285-290 mOsm). As CIPS espontâneas foram registradas nos neurônios piramidais com potencial de membrana fixado a 0mV. Para isolar a resposta GABAérgica, adicionamos ao banho de perfusão CNQX 20μM e D-AP5 50μM, antagonistas dos receptores de glutamato AMPA e NMDA, respectivamente. Para registro das CIPS miniaturas TTX (tetrodotoxina) 1μM foi adicionado à perfusão. Após alguns registros CIPS foram bloqueadas com bicuculina (antagonista dos receptores GABA_A) (10 μM) adicionada ao banho de perfusão comprovando serem mediadas por receptores GABA_A. A corrente foi registrada com o amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments – Molecular Devices), e monitoradas por um osciloscópio. Os dados foram filtrados a 1 kHz (3 dB, 8-pole Bessel filter), digitalizados em amostras a 10 kHz, e monitorados por um computador utilizando o programa pClamp 10.0 (Axon Instruments – Molecular Devices). A resistência de acesso celular foi

cuidadosamente monitorada durante todo o registro, e as células com mudança de valores acima de 15% ou com valores maiores do que 20 MΩ foram excluídas.

3.4 Imunodeteção da subunidade α da bomba Na^+, K^+ -ATPase

A expressão e o estado de fosforilação da subunidade α da bomba Na^+, K^+ -ATPase foram avaliados por western blot. Os animais no período pós-natal de 32 dias (P32) foram anestesiados com ketamina:xilazina (80-120 mg/kg: 10-16mg/kg ip) e decapitados. O neocórtex foi rapidamente dissecado em uma placa de Petri invertida colocada em gelo. O tecido foi homogeneizado 1:5 (g/v) em proteína de tecido com o reagente de extração de proteínas de tecido (T-PER) (Pierce) com coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Pierce). Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 xg, a 4°C durante 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido. A concentração de proteína foi ajustada para 2 mg/mL. As amostras (20 μ g de proteína) foram misturadas com tampão de carga de SDS e fervida durante 10 minutos. Logo em seguida, as alíquotas (20 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (9%) e transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno. As membranas foram bloqueadas com 5 % (g/v) de albumina de soro bovino (BSA) em soro fisiológico tamponado com Tris (TBS) durante 1 h e durante a noite a 4°C foram incubadas com anticorpos primários direcionados contra a subunidade α da bomba Na^+, K^+ -ATPase não-fosforilada (1:10.000) e fosforilada em Ser943 (1:10.000) em solução TBS contendo 2,5 % BSA. As membranas foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com Tris, contendo 0,01 % (v/v) de Tween 20 (TBS - T) e incubadas durante 1 h com o anti-anticorpo secundário de coelho biotilado (1:10000, Sigma - Aldrich) em TBS contendo 2,5 % de BSA. Em seguida, as membranas foram lavadas mais três vezes e incubadas durante 1 h com um polímero de estreptavidina peroxidase (1:2500, Sigma Aldrich) em TBS contendo 2,5 % de BSA. As bandas foram reveladas utilizando 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina.

As bandas foram verificadas e quantificadas com o software ImageJ (RIID: ni - 0000-30467).

3.5 Biossegurança e descarte de resíduos

Os camundongos são de linhagem mista C57Bl/6J × 129SvEv (KÖELLER *et al*, 2002) e a manutenção da colônia foi realizada na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre seguindo a Lei de Biossegurança (Lei n. 11.105, de 24 de março de 2005). O acasalamento foi feito através de camundongos homozigotos dominantes (selvagens) e recessivos (doentes), já que os homozigotos doentes são férteis. A genotipagem foi realizada por métodos de biologia molecular no momento do desmame para confirmar o genótipo dos mesmos. Os camundongos foram genotipados por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de DNA genômico utilizando técnicas já estabelecidas no laboratório. Aos 24 dias de vida todos os animais em estudo foram transportados para o Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Após 4 dias de adaptação, isto é, quando os animais terão 28 dias de vida, os experimentos foram iniciados. Durante os experimentos realizados no Departamento de Bioquímica da UFRGS, os equipamentos de proteção individual foram utilizados para proteger a saúde e garantir a integridade física do pesquisador.

Todo material biológico – especialmente as carcaças dos animais e as fatias de cérebros depois do uso – foram acondicionados em sacos plásticos brancos fornecidos pela empresa coletora licitada pela Universidade no período em que se realizaram os experimentos, e ficaram armazenados em freezer horizontal exclusivamente destinado a esse fim, localizado dentro das instalações do biotério do Departamento de Bioquímica. Seu recolhimento pela empresa licitada foi feito regularmente, de acordo com as normas vigentes de biossegurança. Os materiais de plástico com resíduos biológicos não-tóxicos (luvas, tubos de eppendorf, ponteiros utilizados para manuseio dos animais e preparo de soluções) foram colocados no

lixo branco ao final de cada experimento e armazenados em recipiente adequado no Departamento de Bioquímica, para posterior recolhimento pelo serviço específico da empresa licitada para esse fim, e destinados a um processo de autoclavagem. Agulhas, lâminas de bisturi e eletrodos de vidro foram colocadas em caixas específicas para material perfurocortante para posterior processamento.

Os resíduos químicos foram separados de acordo com a seguinte classificação: resíduos orgânicos halogenados, orgânicos não-halogenados, solventes aquosos, solventes orgânicos passíveis de purificação e resíduos sólidos. As embalagens foram periodicamente coletadas e enviadas para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos do Instituto de Química da UFRGS.

O gel de eletroforese utilizado na técnica de Western Blot foi separado em um recipiente específico rotulado com as especificações de resíduo sólido e com a composição do rejeito, as membranas foram descartadas no lixo branco.

3.6 Análise dos dados

Os dados obtidos através das técnicas de HPLC e Western Blot foram analisados por uma análise de variância, One-Way ANOVA, seguido de teste post-hoc (Tukey) para comparar os diferentes grupos. O nível de significância foi convencionado como $P < 0,05$.

As CIPS espontâneas e CIPS miniaturas foram medidas utilizando o software Mini Analysis 6.0.7 (Synaptosoft). Cada evento de CIPS foi manualmente selecionado baseado na amplitude, tempo de decaimento e de subida da resposta. A análise dos eventos por célula correspondeu entre 100 a 200 eventos ou o total de eventos presentes em 1 minuto de registro tanto para as CIPS espontâneas quanto para CIPS miniaturas. A amplitude, frequência, tempo de subida 10-90% e o tempo de decaimento 10-90% foram analisados. Análise de variância, One-Way ANOVA, seguida de teste post-hoc (Tukey) foi utilizada para comparar os resultados entre as

células dos diferentes grupos animais. O nível de significância foi convencionado como $P < 0,05$.

Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão e todas as análises estatísticas e gráficos foram feitos utilizando-se o software GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade da enzima GAD no neocórtex

A atividade da GAD foi medida através da técnica de HPLC, comparando a razão da amostra sem inibidor (atividade total) e a amostra com inibidor da GAD penicilamina. A razão entre a atividade total e a atividade da GAD inibida teve uma diminuição significativa nos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis ($1,19\mu\text{M}/\mu\text{g} \pm 0,04$; $n=7$) quando comparados aos animais $Gcdh^{+/+}$ ($1,72\text{M}/\mu\text{g} \pm 0,16$; $n=10$) (One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos $Gcdh^{-/-}$ -Lis e o grupo de animais $Gcdh^{-/-}$ -N ($1,49\mu\text{M}/\mu\text{g} \pm 0,13$; $n=6$) (Figura 6). Podemos visualizar a diferença do pico de GABA entre as amostras com ou sem inibidor dos diferentes grupos no cromatograma representativo da atividade da GAD por HPLC (Figura 7). Observamos que não existe diferença nos picos de GABA entre as amostras com ou sem inibidor no grupo dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis. Isto demonstra que a atividade da GAD neste grupo está diminuída. A diminuição da atividade da GAD observada nos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis juntamente com os resultados obtidos de um estudo anterior do nosso grupo (PASQUETTI, 2014) mostram uma possível contribuição para a hiperexcitabilidade e epileptogênese na AG I.

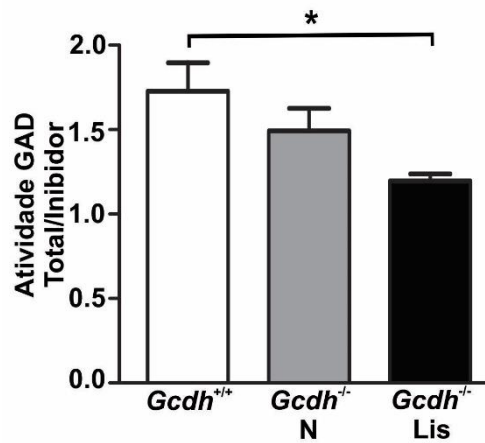


Figura 6 – Diminuição na atividade da enzima GAD no neocórtex, analisada por HPLC. Os animais *Gcdh*^{-/-}-Lis apresentam uma menor atividade da enzima GAD quando comparado com os animais *Gcdh*^{+/+}. Dados apresentados em μM/μg de proteína.

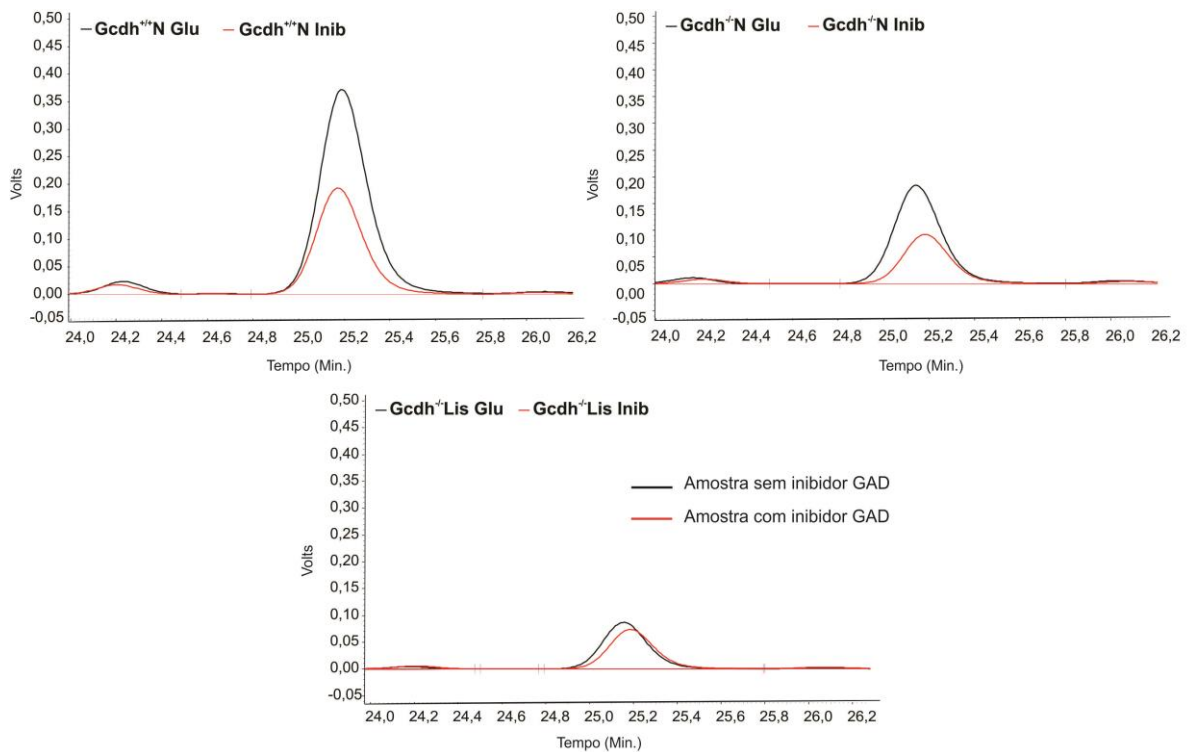


Figura 7 – Cromatograma representativo do pico de GABA visualizado através da atividade da GAD por HPLC.

4.2 Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPS espontâneas)

Além da diminuição da atividade da enzima GAD no neocórtex dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis, em estudos prévios do nosso grupo (PASQUETTI, 2014) foi observado também uma diminuição do imunocontéudo enzima GAD e uma mudança nos níveis dos neurotransmissores glutamato e GABA no neocórtex destes animais. Para avaliar se funcionalmente a transmissão sináptica GABAérgica cortical está comprometida realizamos registros das correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) em neurônios corticais. Utilizando a técnica de *patch-clamp*. Avaliamos as propriedades cinéticas das CIPS espontâneas registradas no modo *whole-cell voltage-clamp* nas células piramidais da camada V do neocórtex dos camundongos $Gcdh^{+/+}$ e $Gcdh^{-/-}$, nos diferentes tratamentos descritos. Os registros foram feitos com o potencial de membrana fixado a 0mV (potencial de reversão das correntes mediadas por glutamato) mediante a perfusão LCRAr contendo os antagonistas dos receptores de glutamato (20 μ M CNQX e 50 μ M D-AP5). A adição de 10 μ M de bicuculina aboliu as CIPS, confirmando o envolvimento dos receptores de GABA_A (dado não mostrado). Os traçados representativos das CIPS espontâneas são encontrados na figura 8A. A análise das CIPS espontâneas mostrou uma significativa redução na frequência nas células piramidais dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis (1,57Hz \pm 0,1; n=17) quando comparada aos demais grupos ($Gcdh^{-/-}$ -N: 3,93Hz \pm 0,2; n=13; $Gcdh^{+/+}$: 3,78Hz \pm 0,3; n=16; One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,0003$ (Figura 8B). A curva de probabilidade cumulativa e a análise estatística de Kolmogorov-Smirnov confirmou a diminuição na frequência das CIPS espontâneas nas células dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis (n=7) quando comparado às células dos demais grupos ($Gcdh^{+/+}$: $P < 0,0001$; n=5 e $Gcdh^{-/-}$ -N: $P < 0,0001$; n=4). Não houve diferença na frequência das CIPS espontâneas entre as células piramidais dos animais $Gcdh^{-/-}$ -N e dos animais $Gcdh^{+/+}$ ($P > 0,06$) (Figura 8C). Não observamos diferença significativa na análise da amplitude ($Gcdh^{+/+}$: 8,09pA \pm 0,5, n=13; $Gcdh^{-/-}$ -N: 6,92pA \pm 0,6, n=16; $Gcdh^{-/-}$ -Lis: 7,11pA \pm 0,4, n=13), tempo de decaimento 10-90% ($Gcdh^{+/+}$: 3,36ms \pm 0,2, n=13; $Gcdh^{-/-}$ -N:

2,94ms \pm 0,1, n=16; Gcdh^{-/-}-Lis: 3,16ms \pm 0,2 , n=13) e tempo de subida 10-90% (Gcdh^{+/+}: 3,29ms \pm 0,1 , n=13; Gcdh^{-/-}-N: 3,09ms \pm 0,1 , n=16; Gcdh^{-/-}-Lis: 3,18ms \pm 0,2 , n=13) (One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações p>0,05). O que podemos observar na figura 8D.

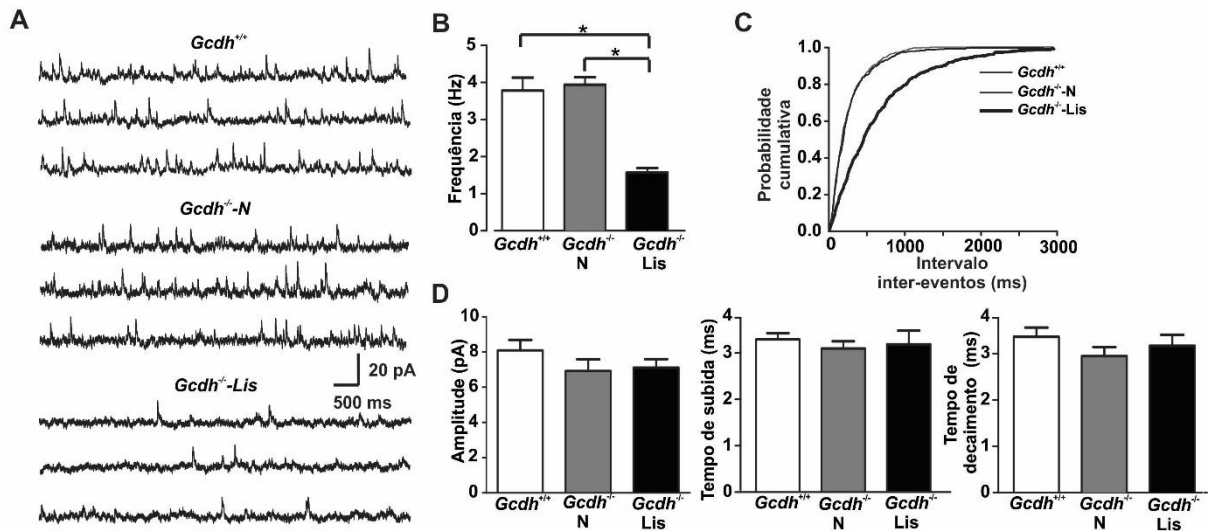


Figura 8 – Diminuição na frequência das CIPS espontânea nas células piramidais neocorticais dos animais Gcdh^{-/-}-Lis. **A:** Traçados representativos das CIPS espontâneas nas células piramidais da camada V do neocórtex dos animais Gcdh^{+/+}, Gcdh^{-/-}-N e Gcdh^{-/-}-Lis. **B:** Média da frequência das CIPS espontâneas. **C:** Curva de probabilidade cumulativa das CIPS espontâneas (teste Kolmogorov-Smirnov, P<0,001). **D:** Média da amplitude (pA), tempo de decaimento (ms) e tempo de subida (ms) das CIPS espontâneas.

4.3 Correntes inibitórias pós-sinápticas miniaturas (CIPS miniaturas)

As CIPS miniaturas foram registradas mediante a adição de 1 μ M TTX ao banho de perfusão. O potencial de membrana continuou fixado a 0mV. Os canais de sódio voltagem-dependente bloqueados pela presença de TTX não permitem a geração de potenciais de ação. Desta forma, as medidas das CIPS miniaturas representam a quantidade basal de neurotransmissores liberada na fenda sináptica através de vesículas sinápticas independentes de potencial de ação.

Os traçados representativos das CIPS miniaturas são mostrados na figura 9A. Da mesma forma que as CIPS espontâneas, a frequência das CIPS miniaturas nas células piramidais da camada V do neocórtex dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis (1,28Hz \pm 0,07; n=11) apresentou uma significativa diminuição quando comparada às células dos demais animais ($Gcdh^{-/-}$ -N :3,18Hz \pm 0,1; n=11; $Gcdh^{+/+}$:3,12Hz \pm 0,09; n=7; One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,0001$) (Figura 9B). A curva de probabilidade cumulativa e a análise estatística de Kolmogorov-Smirnov confirmou a diminuição na frequência das CIPS miniatura nas células dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis (n=5) quando comparado às células piramidais dos demais grupos ($Gcdh^{+/+}$: $P < 0,0001$; n=5; $Gcdh^{-/-}$ -N; $P < 0,0001$; n=5). Não houve diferença na frequência das CIPS miniaturas entre as células piramidais dos animais $Gcdh^{-/-}$ -N e dos animais $Gcdh^{+/+}$ ($P > 0,1$) (Figura 9C). Não foi observada uma diferença significativa na análise da amplitude ($Gcdh^{+/+}$: 4,85pA \pm 0,3 , n=7; $Gcdh^{-/-}$ -N: 4,62pA \pm 0,2 , n=11; $Gcdh^{-/-}$ -Lis: 4,26pA \pm 0,2 , n=11), tempo de decaimento 10-90% ($Gcdh^{+/+}$: 3,29ms \pm 0,1, n=7; $Gcdh^{-/-}$ -N: 3,06ms \pm 0,2 , n=11; $Gcdh^{-/-}$ -Lis: 2,98ms \pm 0,1, n=11) e tempo de subida 10-90% ($Gcdh^{+/+}$: 3,48ms \pm 0,1 , n=7; $Gcdh^{-/-}$ -N: 3,93ms \pm 0,1, n=11; $Gcdh^{-/-}$ -Lis: 3,84ms \pm 0,2, n=11) (One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p > 0,05$). O que podemos observar na figura 9D.

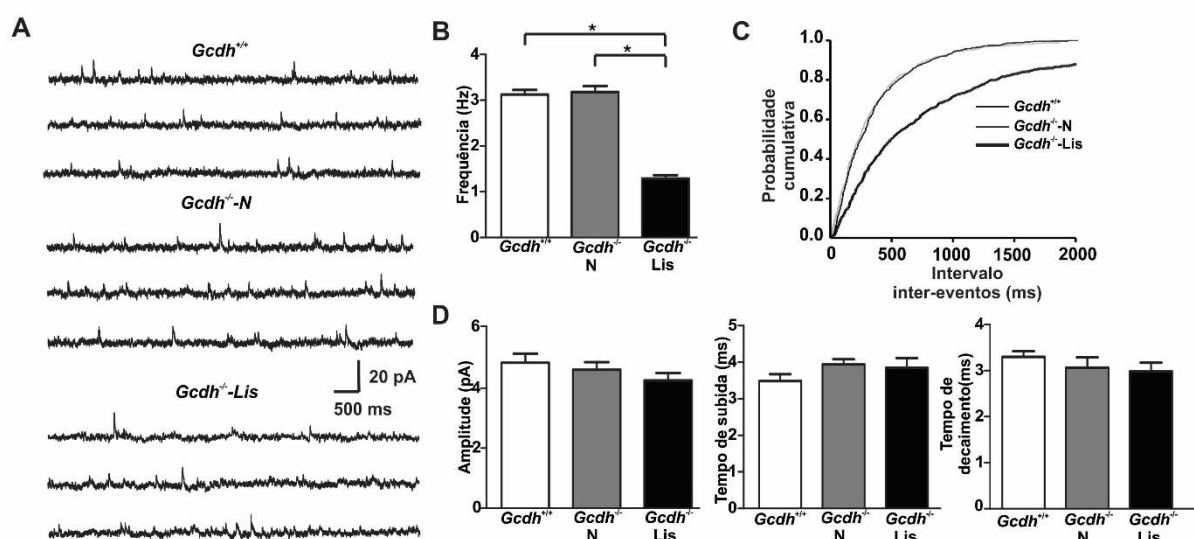


Figura 9 - Diminuição na frequência CIPS miniaturas nas células piramidais neocorticais dos animais Gcdh^{-/-}-Lis. **A:** Traçados representativos das CIPS miniaturas nas células piramidais da camada V do neocórtex dos animais Gcdh^{+/+}, Gcdh^{-/-}-N e Gcdh^{-/-}-Lis. **B:** Média da frequência das CIPS miniaturas. **C:** Curva de probabilidade cumulativa das CIPS miniaturas (teste Kolmogorov-Smirnov, P<0,001). **D:** Média da amplitude (pA), tempo de decaimento (ms) e tempo de subida (ms) das CIPS miniaturas

4.4 Expressão e estado de fosforilação da subunidade α da bomba Na⁺,K⁺-ATPase

Segundo AMARAL *et al*, 2012 a atividade da bomba Na⁺,K⁺-ATPase apresenta-se diminuída no neocórtex dos animais Gcdh^{-/-}-Lis. A fim de investigar se a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase é causada por uma diminuição na quantidade de enzima disponível, resolvemos analisar expressão da subunidade catalítica α da bomba Na⁺,K⁺-ATPase através da determinação de sua imunorreatividade por western blot. De fato, a análise estatística revelou que a expressão da subunidade α da bomba Na⁺,K⁺-ATPase está diminuída no neocórtex dos animais Gcdh^{-/-}-Lis (0,43 \pm 0,09; n = 6) quando comparada com os demais grupos (Gcdh^{-/-}-N: 0,77 \pm 0,1; n = 7; Gcdh^{+/+}: 0,99 \pm 0,04; n = 7; One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, p<0,001) (Figura 10A). Entretanto ao analisar a fosforilação da enzima no resíduo Ser943 da subunidade α , o qual é crítico para regulação da atividade da enzima, não observamos diferença estatística entre os grupos (Gcdh^{-/-}-Lis: 0,93 \pm 0,1, n=6; Gcdh^{-/-}-N: 0,75 \pm 0,09, n= 7; Gcdh^{+/+}: 1,06 \pm 0,06, n=7; One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, p>0,1) (Figura 10B). Para corrigir a real expressão da fosforilação do resíduo943 pela quantidade da subunidade α total que cada grupo realizamos a razão entre o resíduo fosforilado Ser943 e a subunidade α da bomba Na⁺,K⁺-ATPase. A análise estatística revelou que os animais Gcdh^{-/-}-Lis (2,1 \pm 0,3, n=6) apresentam um aumento significativo da expressão do resíduo943 no neocórtex quando comparada aos demais grupos Gcdh^{-/-}-N: 1,1 \pm 0,2, n=7; Gcdh^{+/+}: 1,07 \pm

0,06, n=7; One-Way ANOVA seguida pelo teste Tukey de múltiplas comparações, $p < 0,001$) (Figura 10C). Desta forma, podemos sugerir que a diminuição da atividade da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ possivelmente pode ser causada pela quantidade de enzima disponível e pelo envolvimento da fosforilação do resíduo Ser943 da subunidade α .

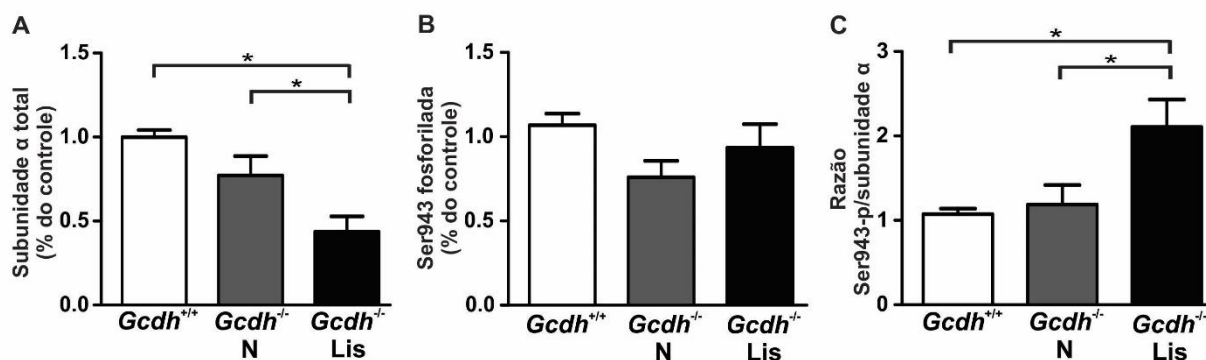


Figura 10 - Diminuição da expressão da subunidade α e aumento da fosforilação do resíduo Ser943 da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ no neocórtex dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis. A: Expressão da subunidade α da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ no neocórtex. **B:** Expressão da fosforilação do resíduo Ser943 da subunidade α da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ no neocórtex. **C:** Razão do resíduo fosforilado Ser943 pela subunidade α da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ no neocórtex.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos a transmissão sináptica GABAérgica cortical através da análise da atividade da enzima GAD e das CIPS espontâneas e miniaturas. Além disto, avaliamos a expressão e estado de fosforilação do resíduo Ser 943 da subunidade α da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$.

5.1 Transmissão GABAérgica neocortical

Tem-se sido sugerido na literatura que o acúmulo destes ácidos, principalmente o AG e 3-OHAG, estão envolvidos em processos de patogênese da neurodegeneração da AG I (KÖLKER *et al*, 2004), como por exemplo, influenciando na recaptação de glutamato (PORCIUNCULA *et al*, 2000; BUSANELLO *et al*, 2014), produção de GABA (STOKEE *et al*, 1976) e na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (KÖLKER *et al*, 2002). Estudos mostram que AG e 3-OHAG são inibidores competitivos da GAD, enzima que converte glutamato em GABA (STOKKE *et al*, 1976). Interessante que pacientes com AG I acumulam ácidos orgânicos em tecidos e fluidos corporais (GOODMAN *et al*, 1977; HOFFMANN *et al*, 1999; KÖLKER *et al*, 2006). O acúmulo de AG e 3-OHAG, em tecido como cérebro, fígado e músculo, são similares aos encontrados nos animais Gcdh^{-/-}-Lis (KÖELLER *et al*, 2002). Além disto, estudo *post-mortem* com pacientes com AG I mostrou uma diminuição dos níveis de GABA nos núcleos da base (GOODMAN, 1995). Um estudo anterior do nosso laboratório demonstrou uma diminuição nos níveis de liberação de GABA basal e um aumento de glutamato induzido por despolarização nas preparações de sinaptossomas, além da diminuição do imunocontéudo da GAD no neocórtex dos animais Gcdh^{-/-}-Lis (PASQUETTI, 2014). Seria de se esperar que a atividade da GAD estivesse diminuída nestas condições. Mediante a análise dos sinaptossomas do neocórtex dos animais Gcdh^{-/-}-Lis podemos comprovar que a atividade desta enzima está realmente diminuída. Portanto, os AG e 3-OHAG parecem estar modulando indiretamente a neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, resultando no desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória (LIMA *et al*, 1998) a qual leva a uma hiperexcitabilidade neuronal, contribuindo para a epileptogênese (WANG *et al*, 2011).

A análise das correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) mediadas pelo receptor GABA_A é uma ferramenta importante para se avaliar a transmissão sináptica GABAérgica (JONES e HARRISON *et al*, 1994; BORST *et al*, 1994). A cinética das CIPS é determinada pelas propriedades biofísicas dos receptores pós-

sinápticos (SCHOFIELD e HUGUENARD, 2007; EYRE *et al*, 2012). Além disto, através da análise da frequência das CIPS podemos mensurar a liberação de GABA na fenda sináptica (KRAUSHAAR e JONAS *et al*, 2000).

Com o intuito de confirmar que os animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis possuem uma diminuição na síntese de GABA, causada pela diminuição da atividade da enzima GAD, realizamos a análise funcional das sinapses GABAérgicas no neocórtex destes animais. Para tanto utilizamos a técnica de *patch-clamp* registrando as CIPS espontâneas e miniaturas nas células piramidais corticais. Se a síntese de GABA e a liberação avaliada pelas análises dos sinaptossomas estão diminuídas, esperaríamos que a frequência das respostas mediadas pelo GABA estivesse igualmente diminuída, já que este parâmetro reflete na liberação de neurotransmissor pelos neurônios pré-sinápticos (EL-HUSSEINI *et al*, 2000; COBOS *et al*, 2005; CALCAGNOTTO *et al*, 2010) Corroborando com esta hipótese, observamos que nas células piramidais no neocórtex dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis existem uma diminuição na frequência não somente das CIPS espontâneas como também das CIPS miniaturas que indicam a quantidade de GABA sendo liberado na fenda sináptica através da ligação do GABA com seu receptor ($GABA_A$) no neurônio pós-sináptico. Na verdade, os animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis apresentaram uma redução significativa na frequência das CIPS espontâneas quando comparado aos animais do grupo $Gcdh^{+/+}$ e $Gcdh^{-/-}$ -N. Essa diferença pode ser explicada pelo próprio modelo no qual a dieta de lisina leva a um maior acúmulo de ácidos orgânicos e, conseqüentemente inibição da síntese de GABA (KÖELLER *et al*, 2002; ZINNATI *et al*, 2006). Uma possibilidade que poderia explicar adicionalmente esta diminuição das CIPS seria alteração no transporte vesicular de GABA nos interneurônios. No entanto dados anteriores do nosso laboratório mostram que o imunoconteúdo de vGAT (transportador vesicular de GABA) no neocórtex dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis apresenta-se igual aos controles, descartando esta hipótese (PASQUETTI, 2014). Esta diminuição de GABA encontrada no neocórtex, possivelmente pode ser encontrada no estriado, já que em investigações *post-mortem* no putâmen e causado de pacientes com AG I, as concentrações de GABA estão extremamente baixas (LEIBEL *et al*, 1980) e resultados preliminares do nosso grupo encaminham-

se para a mesma direção (dados não publicados). Outra hipótese que poderia explicar estas alterações no sistema GABAérgico seria a alteração nos receptores de GABA. Para que isso seja corroborado, deveríamos ter observado alterações na amplitude e na cinética das CIPS espontâneas e/ou miniaturas (WU *et al*, 2012; DIXON *et al*, 2014, 2015). Uma análise minuciosa da amplitude, tempo de subida e tempo de decaimento destas respostas inibitórias nas células piramidais do neocórtex dos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis mostrou ausência de alterações em relação aos controles, deixando esta hipótese pouco provável. A diminuição de GABA favorece a hiperexcitabilidade da rede neuronal e isso associado ao aumento da liberação de glutamato já descrita, pode explicar em parte a presença de crises epilépticas espontâneas nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis (PASQUETTI, 2014). Os prejuízos no SNC na AG I começam no período pré-natal, resultando em alguns casos em malformação cortical frontal e temporal (HOFFMAN e ZSCHOCKE, 1999). Sabemos que o GABA é crucial nos processos de migração, proliferação e maturação das sinapses participando ativamente no desenvolvimento de circuitos neuronais funcionais (WANG e KRIEGSTEIN, 2011; OWENS e KRIEGSTEIN, 2002). Portanto, uma diminuição função GABAérgica observada nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis poderia estar envolvida nos mecanismos alterações da circuitaria neuronal e neurodegeneração cerebral além de epileptogênese em pacientes com AG I.

O GABA é liberado nos estágios iniciais do desenvolvimento, pois já foi constatado que marcadores de GABA são expressos antes do período da formação de sinapses. Este GABA atua como um fator trófico para modular diversos processos envolvidos no desenvolvimento de circuitos neurais. Um destes processos é a formação de sinapses excitatórias (BEN-ARI *et al*, 2007). A sinalização GABAérgica precede a sinalização glutamatérgica no desenvolvimento do neocórtex, sendo que os neurônios em desenvolvimento expressam receptores GABA_A (OWENS *et al*, 1999; HENNOU *et al*, 2002). Além disto, a ação do GABA no seu receptor pode despolarizar ou hiperpolarizar os neurônios dependendo da fase do desenvolvimento devido à expressão dos transportadores e co-transportadores de Cl⁻ (OWENS e KRIEGSTEIN, 2002). O principal transportador do íon Cl⁻ em neurônios maduros é o transportador KCC2, sendo o mais expresso. Este

transportador promove o efluxo dos íons K^+ e Cl^- , contribuindo para a baixa concentração intracelular do íon Cl^- . Desta forma, a ativação do receptor $GABA_A$ leva a uma hiperpolarização. Enquanto que em neurônios imaturos, a maior expressão é do co-transportador $Na^+,K^+,2Cl^-$ NKCC1, que tem um importante papel na alta concentração intracelular de Cl^- . Desta forma, a ativação do receptor $GABA_A$ leva a uma despolarização. Portanto, o GABA no início do desenvolvimento pode excitar neurônios (DELPIRE, 2000). Um estudo com animais nocautes para o co-transportador NKCC1 mostrou que a despolarização mediada pelo GABA é necessária para a formação de sinapses excitatórias via ativação dos receptores NMDA e no crescimento de dendritos no desenvolvimento do neocórtex (WANG e KRIEGSTEIN *et al*, 2008). Este mesmo estudo mostrou que o bloqueio do NKCC1 provoca alterações persistentes nos circuitos neuronais corticais em adultos (WANG e KRIEGSTEIN *et al*, 2008). Isto nos leva a pensar que diminuição de GABA nos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis pode estar comprometendo a sinalização e transmissão glutamatérgica. Alguns indícios da disfunção glutamatérgica já têm sido relatados nos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis. Foi verificada uma diminuição significativa na recaptação de glutamato no neocórtex cerebral dos animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis induzida pela aplicação exógena local de AG. Além disto, a utilização de um inibidor competitivo do transportador astrocitário de glutamato indicou que a diminuição na recaptação de glutamato causada pelo AG pode ser devida à competição entre o AG e o glutamato pelo mesmo sítio no transportador (BUSANELLO *et al*, 2014). Outro estudo com os animais $Gcdh^{-/-}$ -Lis demonstrou um significativo aumento na expressão de mRNA da subunidade NR2B do receptor de glutamato NMDA no neocórtex destes animais (RODRIGUES *et al*, 2015), o qual parece ser crítico na excitotoxicidade /neurotoxicidade em modelos AG I (KÖLKER *et al*, 1999, 2000). Contudo, mais estudos focando na análise funcional da transmissão sináptica glutamatérgica ajudariam a reforçar estes achados.

Um aspecto importante é o circuito neocortical-hipocampal, crucial para a memória associativa, que envia projeções inibitórias de longo alcance do córtex entorrinal, sendo que esta estrutura recebe aferências de várias regiões do neocórtex, ao hipocampo. Estas projeções inibitórias fazem sinapses com os

interneurônios GABAérgicos na região de CA1 no hipocampo. Estas projeções provocam a desinibição dos interneurônios GABAérgicos, estes fazem sinapses com as células piramidais da região de CA1. Assim, a desinibição dos interneurônios promove a excitação dos neurônios piramidais por suprimir a inibição por ativação. Isso aumenta a capacidade dos neurônios piramidais de disparo de potenciais de ação nos dendritos através de sinapses evocadas e promovem um ritmo na geração de plasticidade heterossináptica aumentando assim a precisão de memórias associativas de longo prazo (BASU *et al*, 2016). Em outro estudo, foi demonstrado que a ativação dos axônios GABAérgicos de longo alcance a partir do neocórtex melhorou a atividade rítmica teta nos neurônios pós-sinápticos no hipocampo (MELZER *et al*, 2012). Desta forma, a diminuição na liberação de GABA no neocórtex nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis confirmada através da diminuição da frequência tanto das CIPS espontâneas quanto miniaturas podem estar influenciando no circuito neuronal neocortical-hipocampal e assim prejudicando a memória destes animais. Um indício desse prejuízo na memória foi relatado nos animais *Gcdh*^{-/-}-Lis através do teste da esQUIVA inibitória, no qual os animais apresentaram um déficit na memória de curto e longo prazo (BUSANELLO *et al*, 2013).

A degeneração estriatal, principalmente no putâmen e caudado, é a consequência mais grave em pacientes com AG I, deixando muitas vezes sequelas neurológicas (STRAUSS *et al*, 2003). Distúrbios do movimento como discinesia e distonia são as manifestações clínicas associadas à degeneração estriatal demonstradas através de estudos de neuroimagens (HOFFMANN *et al* 1996; STRAUSS *et al*, 2003, 2007). O complexo estriatal recebe inputs excitatórios glutamatérgicos do neocórtex e estruturas talâmicas, os quais estabelecem sinapses com distintas populações de neurônios de espinhos médios (NEM). Toda a aferência para núcleos da base chega ao estriado (putâmen e caudado) e depois seguem para o globo pálido (interno e externo) ou *substantia nigra*. A ativação ou inibição da atividade locomotora ou do movimento é dependente da via que está sendo ativada, podendo ser a via direta ou indireta. A ativação cortical produz a liberação de glutamato que age nas projeções dos NEM para a *substantia nigra pars reticulata* (SNPr) e para o globo pálido interno (GPI). Os NEM são neurônios GABAérgicos e

eles exercem uma ação inibitória nos neurônios da SNPr que também são GABAérgicos. Desta forma, a inibição dos neurônios da SNPr conduz uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo, que recebe o input e projeções da SNPr. Assim, o resultado da ativação desta via direta são eventos de ativação locomotora/movimentos. A via indireta por sua vez ocorre através da ativação dos NEM, que se projetam indiretamente a SNPr através do globo pálido externo (GPe) e ao núcleo subtalâmico (NST). A ativação desta via inibe os neurônios GABAérgicos do GPe que conduz uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos do NST. O aumento da liberação dos neurônios excitatórios do NST ativa os neurônios GABAérgicos da SNPr que se projeta ao tálamo. Assim, o resultado desta via é a redução da atividade locomotora e do movimento (CALABRESI *et al*, 2014). O déficit na transmissão GABAérgica no neocórtex dos animais *Gcdh^{-/-}*-Lis foi confirmado por estudos do nosso grupo de pesquisa. Dados deste trabalho e de estudos anteriores do nosso laboratório mostram diminuição do imunoconteúdo da GAD cortical (PASQUETTI, 2014), assim como da atividade da GAD no neocórtex dos animais *Gcdh^{-/-}*-Lis (dados desta dissertação). Em função da diminuição da atividade da GAD, eles provavelmente apresentam diminuição da síntese de GABA, o que foi confirmada através da análise das CIPS espontâneas e miniaturas mostradas aqui. Por fim, a diminuição da atividade da GAD pode promover o aumento na quantidade de glutamato que foi observado no neocórtex dos animais *Gcdh^{-/-}*-Lis (PASQUETTI,2014). Portanto, estes dados apontam para um desbalanço entre a transmissão GABAérgica e glutamatérgica no neocórtex nos animais *Gcdh^{-/-}*-Lis. Assim, a disfunção nos sistemas GABAérgico e glutamatérgico no neocórtex podem influenciar o circuito neuronal nos núcleos da base que recebem inputs neocorticais, promovendo distúrbios dos movimentos observados em pacientes com AG I.

5.2 Bomba Na⁺,K⁺-ATPase

Estudos experimentais mostraram que os ácidos glutárico e 3-OHAG inibem a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase (KÖLKER *et al*, 2002). Além disso, dados mostram que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está inibida em Gcdh^{-/-}-Lis (AMARAL *et al*, 2012). A diminuição da atividade desta enzima poderia ser explicada pelo menos em parte, pelo decréscimo dos níveis de moléculas disponíveis da subunidade catalítica α da enzima e por alterações no estado de fosforilação dos resíduos de Ser943 da subunidade α que regula atividade da enzima. De acordo com esta proposta nossos dados mostraram que os animais Gcdh^{-/-}-Lis apresentam uma significativa redução no imunoconteúdo da subunidade α no neocórtex. Por outro lado, não observamos que diferença significativa no imunoconteúdo da fosforilação do resíduo de Ser943. Porém, como os animais Gcdh^{-/-}-Lis possuem um imunoconteúdo da subunidade α menor, a correção feita através da razão entre o imunoconteúdo de Ser943 pelo da subunidade α , mostrou que estes animais Gcdh^{-/-}-Lis realmente apresentam um aumento significativo no imunoconteúdo da fosforilação da enzima. Assim, desde que a fosforilação da Ser943 está associada com diminuição da atividade da enzima, podemos propor que a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase neste resíduo pode ser mais um dos fatores que levam à diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no neocórtex dos animais Gcdh^{-/-}-Lis. Os mecanismos pelos quais a fosforilação do resíduo Ser943 afeta a atividade Na⁺,K⁺-ATPase são variados, e incluem mudanças de afinidade pelos substratos Na⁺, K⁺ e ATP (FISONE *et al.*, 1994; LOGVINENKO *et al.*, 1996) e/ou aumento ou diminuição da quantidade de moléculas da enzima na membrana plasmática através de endocitose (FISONE *et al.*, 1994; LOGVINENKO *et al.*, 1996). De fato, em muitos tecidos, a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase no resíduo de Ser943 resulta em endocitose da enzima, diminuindo seus níveis na membrana plasmática e consequentemente sua atividade (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Por outro lado, a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase no resíduo de Ser943 também pode alterar a

atividade da enzima por alterar sua eficiência catalítica (FISONE et al., 1994; LOGVINENKO et al., 1996).

Também é importante mencionar que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está diminuída no cérebro *post-mortem* de pacientes com epilepsia (GRISAR et al., 1992). Um estudo em modelo animal experimental de epilepsia, a diminuição da atividade da enzima foi sugerida pelo aumento significativo da fosforilação dos resíduos de Ser943 (MARQUEZAN et al., 2013).

A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico pelos potenciais de repouso e ação e captação e liberação de neurotransmissores no SNC (STAHL & HARRIS, 1986). Em registros de *whole-cell patch-clamp* em neurônios piramidais da camada V do neocórtex, a aplicação de ouabaína, inibidor da Na⁺,K⁺-ATPase, promove uma despolarização no potencial de membrana (ANDERSON et al., 2010), aumentando a frequência das CIPS, influenciando a transmissão GABAérgica (RICHARDS et al., 2007). Isto leva à hiperexcitabilidade, alteração na liberação de neurotransmissores e consequente geração de crises epilépticas (JAMME et al., 1995). Portanto, a diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase somada à diminuição do imunoconteúdo da subunidade α e ao aumento da fosforilação do resíduo Ser943, pode ser alguns dos mecanismos que alteram a excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores contribuindo para a epileptogênese nos animais Gcdh^{-/-}-Lis.

A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase pode ser regulada por uma variedade de hormônios e neurotransmissores, e a ação da regulação parece ser mediada, direta ou indiretamente, pela fosforilação de proteínas (BERTORELLO et al., 1991; APERIA et al., 1994; EWART et al., 1995). As principais proteínas cinases que atuam no cérebro são: proteínas cinases dependentes de AMPc (PKA), proteínas cinases dependentes de cálcio e fosfolipídios (PKC) e proteínas tirosina-cinases (NESTLER e GREENGARD, 1994). Estudos tem demonstrado que as proteínas PKA e PKC fosforilam resíduos na subunidade α da Na⁺,K⁺-ATPase regulando sua atividade. Na subunidade α_1 , a PKA fosforila o resíduo Ser943 enquanto que a PKC fosforila o resíduo Ser23 (BEGUIN et al., 1994; FESCHENKO et al., 1994; FISONE et al., 1994).

A fosforilação destes resíduos na bomba Na^+, K^+ -ATPase tem sido demonstrado pela alteração da afinidade da bomba pelo Na^+ , K^+ e por alterar o equilíbrio da ligação do Na^+ na forma conformacional E1 e da ligação do K^+ na forma E2 da bomba, desta forma inibindo-a e diminuindo a atividade (FISONE *et al*, 1994; LOGVINENKO *et al*, 1996). Wang e colaboradores em 1995 demonstraram que a fosforilação do resíduo Ser23 é essencial para a inibição da bomba Na^+, K^+ -ATPase na subunidade $\alpha 1$ induzida por PKC, pois a mutação do resíduo Ser23 por alanina aboliu a inibição por PKC. Outro estudo demonstrou que a inibição da bomba Na^+, K^+ -ATPase por PDBu, ativador de PKC, é influenciado pelo estado de fosforilação no sítio de PKA, Ser943. Pois a mutação no resíduo Ser943 por Alanina943 (aminoácido não fosforilável) atenuou a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase dependente de PDBu. Além disto, quando a PKA foi ativada e a fosforilação no resíduo Ser943 aumentou, a inibição dependente de PDBu foi potenciada (CHENG *et al*, 1997). Assim, o aumento na fosforilação no resíduo Ser943 observada nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis pode indicar um aumento na PKA, está ativada por AMPc, e também pode influenciar na fosforilação do resíduo Ser23 fosforilado pela PCK. Desta forma, este resultado possibilita estudar outros mecanismos e vias pelos quais podem estar diminuindo a atividade da bomba e influenciando na excitabilidade neuronal observada nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que os animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis apresentam uma redução significativa na transmissão sináptica GABAérgica cortical evidenciada pela diminuição da frequência das CIPS espontâneas e miniaturas nas células piramidais neocorticais. Isto pode estar relacionado a uma diminuição na atividade da GAD. Observamos também que o neocórtex dos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis apresenta uma diminuição no imunocontéudo da subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase e um aumento da fosforilação do seu resíduo Ser943. Podendo ser um dos mecanismos da diminuição

da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, além de influenciar a transmissão GABAérgica. Em conjunto estas alterações podem estar contribuindo para a epileptogênese em AG I.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade funcional da Na^+, K^+ -ATPase nas células piramidais e interneurônios neocorticais nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis (por registros de *patch-clamp*);
- Avaliar a transmissão sináptica excitatória nas células piramidais neocorticais e estriatais nos animais $\text{Gcdh}^{-/-}$ -Lis (por registros de *patch-clamp*);
- Completar as análises das CIPS espontâneas e miniaturas no estriado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, K; MONYER, H. Interneuron control of hippocampal oscillations. **Curr Opin Neurobiol.** Apr;31:81-7, 2015.

ALVAREZ-DOLADO, M; CALCAGNOTTO, ME; KARKAR, KM; SOUTHWELL, DG; JONES-DAVIS, DM; ESTRADA, RC; RUBENSTEIN, JL; ALVAREZ-BUYLLA, A; BARABAN, SC. Cortical inhibition modified by embryonic neural precursors grafted into the postnatal brain. **J Neurosci.** Jul 12;26 (28):7380-9, 2006.

BASU, J; ZAREMBA, JD; CHEUNG, SK; HITTI, FL, ZEMELMAN, BV; LOSONCZY, A; SIEGELBAUM, SA. Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition. **Science**, Jan 8;351(6269):aaa5694, 2016.

AMARAL, AU; SEMINOTTI, B, CECATTO, C; FERNANDES, CG; BUSANELLO, ENB; ZANATTA, Â; KIST, LW; BOGO, MR; DE SOUZA, D OG; WOONTNER, M; GOODMAN, S; KOELLER, DM; WAJNER, M. Reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity and expression in cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: a possible mechanism for brain injury in glutaric aciduria type I. **Molecular genetics and metabolism**, 107(3), p. 375-82, 2012.

ANDERSON, TR; HUGUENARD, JR AND PRINCE, DA. Differential effects of Na⁺-K⁺ ATPase blockade on cortical layer V neurons. **J Physiol** 588.22 (2010) pp 4401-4414

APERIA, A; HOLTBACK, U; SYRÉN, ML; SVENSSON, LB; FRYCKSTEDT, J; GREENGARD, P. Activation/deactivation of renal Na⁺,K⁺-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. **FASEB J.** 8:436-439, 1994.

BERTORELLO, AM; APERIA, A; WALAAS, SI; NAIRN, AC. Greengard P. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88:11359-11362, 1991.

BORST. JGG; LADDER, JC; KITS, KS. Large amplitude variability of GABAergic IPSCs in melanotropes from *Xenopus laevis*: evidence that quanta size differs between synapses. **J. Neurophysiol.** 71, 639-655, 1994.

BUSANELLO, EM; FERNANDES CG; MARTELL RV; LOBATO VG; GOODMAN S; WOONTNER M; DE SOUZA DO; WAJNER M. Disturbance of the glutamatergic system by glutaric acid in striatum and cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase-deficient knockout mice: possible implications for the neuropathology of glutaric acidemia type I. **J Neurol Sci.** Nov 15;346(1-2):260-7, 2015.

BUZSÁKI, G. Theta oscillations in the hippocampus. **Neuron**,33:325-340, 2002.

CALABRESI, P; PICCONI, B; TOZZI, A; GHIGLIERI, V; DI FILIPPO, M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nat Neurosci.** Aug;17(8):1022-30, 2014.

COUVE, A; MOSS, SJ; PANGALOS, MN. GABAB Receptors: A New Paradigm in G Protein Signaling. **Molecular and Cellular Neuroscience** 16, 296–312, 2000.

BERG, AT; BERKOVIC, SF; BRODIE, MJ; JEFFREY BUCHHALTER, J. HELEN CROSS, WALTER VAN EMDE BOAS, JEROME ENGEL, JACQUELINE FRENCH, TRACY A. GLAUSER, GARY W. MATHERN, SOLOMON L. MOSHE, DOUGLAS NORDLI, PERRINE PLOUIN, AND INGRID E. SCHEFFER. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. **Epilepsia**, 51(4):676–685, 2010.

AWAPARA, J. Free gamma-aminobutyric acid in brain. **J. Biol. Chem.**, 187, 35-39, 1950.

BALCAR, VJ; JOHNSTON, GAR. The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. **Journal of Neurochemistry**, 19,p. 2657–2662, 1972.

- BALTZ, T; DE LIMA, AD; VOIGT, T. Contribution of GABAergic interneurons to the development of spontaneous activity patterns in cultured neocortical networks. **Front Cell Neurosci.** Jun 21;4:15, 2010.
- BANKE TG, MCBAIN CJ. GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development. **J Neurosci** 26:11720–5, 2006.
- BARBIN G et al. Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. **Neurosci Lett** 152:150 –154, 1993
- BARIC, I; WAGNER, L; FEYH, P. Sensitivity and specificity of free and total glutaric and 3-hydroxyglutaric acids measurements by stable isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. **J Inherit Metab Dis**; 22:867– 881, 1999.
- BEGUIN, P; BEGGAH, AT; CHIBALIN, AV; BURGNER-KAIRUZ, P; JASSIER, F; MATHEWS, PM; ROSSIER, BC; GEERING, K. Phosphorylation of the Na,K-ATPase α -subunit by protein kinase A and C (PKC) in vitro and in intact cells: identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. **J. Biol. Chem**, 1994.
- BEN-ARI, Y; GAIARSA, J; TYZIO, R; KHAZIPOV, R. GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. **Physiol Rev** 87: 1215–1284, 2007.
- BENNETT, MJ; MARLOW, N; POLLITT, RJ. AND WALES, JK. Glutaric aciduria type 1: biochemical investigations and postmortem findings. **Eur. J. Pediatr.** 145, 403–405, 1986.
- BETTLER, B. Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 84, n. 3, p.835-867, 1 jul. 2003
- BIERY, BJ; STEIN, DE; MORTON, DH; GOODMAN, SI. Gene structure and mutations of Glutaryl-Coenzyme A Dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to na A4221V substitution causes Glutaric Acidemia Type I in the Amish. **Am.J.Genet.** 59:1006-1011, 1996.

BOWERY, NG; BETTLER, B; FROESTL, W; GALLAGHER, JP; MARSHALL, F; RAITERI, M; BONNER, TI; ENNA., SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian α -Aminobutyric AcidB Receptors:Structure and Function. **Pharmacol Rev** 54:247–264, 2002.

BROMFIELD, EB; CAVAZOS, JE; SIRVEN, JI. An Introduction to Epilepsy. eds.:West Hartford (CT): **American Epilepsy Society**, 2006.

BUSQUETS, C; MERINERO, B; CHRISTENSEN E. GlutarylCoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. **Pediatr Res** 48: 315–322, 2000.

BUSANELLO, EN; FERNANDES, CG; MARTELL, RV; LOBATO, VG; GOODMAN, S; WOONTNER, M; DE SOUZA, DO; WAJNER, M. Disturbance of the glutamatergic system by glutaric acid in striatum and cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase-deficient knockout mice: possible implications for the neuropathology of glutaric acidemia type I. **J Neurol Sci**. Nov 15;346(1-2):260, 2014.

CALCAGNOTTO, ME; PAREDES, MF; BARABAN SC. Heterotopic neurons with altered inhibitory synaptic function in an animal model of malformation-associated epilepsy. **J Neurosci**. Sep 1;22(17):7596-605, 2002.

COBEN, R; MOHAMMAD-REZAZADEH, I. Neural Connectivity in Epilepsy as Measured by Granger Causality. **Front Hum Neurosci**. Jul 14;9:194, 2015.

COBOS, I; CALCAGNOTTO, ME; VILAYTHONG, AJ; THWIN, MT; NOEBELS, JL; BARABAN, SC; RUBENSTEIN ,JL. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. **Nat Neurosci**. Aug;8(8):1059-68, 2005.

CHEBIB, M; JOHNSTON, GAR. GABA-Activated Ligand Gated Ion Channels: Medicinal Chemistry and Molecular Biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, Vol. 43, No. 8, 1999.

CHENG, XJ; HOOG, JO; NAIRN, AC; GREENGARD, P; APERIA, A. Regulation of rat Na(+)-K(+)-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. **Am J Physiol**. Dec;273(6 Pt 1):C1981-6, 1997.

CHROBAK ,JJ; BUZSÁKI, G. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal–entorhinal axis of the freely behaving rat. **J Neurosci Off J Soc Neurosci**, 16:3056-3066, 1996.

COMMISSION ON EPIDEMIOLOGY AND PROGNOSIS. INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. **Epilepsia**; 34:592–6, 1993.

CSICSVARI, J; HIRASE, H; CZURKO, A; MAMIYA, A; BUZSÁKI, G. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving rat. **J Neurosci Off J Soc Neurosci**,19:274-287, 1999.

CSICSVARI, J; JAMIESON, B; WISE, KD; BUZSÁKI, G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. **Neuron**, 37:311-322, 2003.

CURTIS, DR; DUGGAN, AW; FELIX, D; JOHNSTON, GA. GABA, bicuculline and central inhibition. **Nature**, 226(5252),1222-4, 1970.

CUTTING, GR; LU, L; O'HARA, BF; KASCH, LM; MONTROSE-RAFIZADEH, C; DONOVAN ,DM; SHIMADA, S; ANTONARAKIS, SE; GUGGINO, WB; UHL, GR. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. **Proc Natl Acad Sci U S A** Apr 1;88(7):2673-7, 1991.

DE LIMA, AD; GIESELER, A; VOIGT, T. Relationship between GABAergic interneurons migration and early neocortical network activity. **Dev Neurobiol**. Feb 1-15;69(2-3):105-23, 2009.

DELPIRE, E. Cation-chloride cotransporters in neuronal communication. **News Physiol Sci** 15:309 –312, 2000.

DIXON, C; SAH, P; LYNCH, JW AND KERAMIDAS, A. GABAA receptor alpha and gamma subunits shape synaptic currents via different mechanisms. **J. Biol. Chem.** 289, 5399–5411, 2014.

DIXON, C; ZHANG, Y AND LYNCH, JW. Generation of Functional Inhibitory Synapses Incorporating Defined Combinations of GABA(A) or Glycine Receptor Subunits . **Front. Mol. Neurosci.**, 23 December, 2015 .

DORIS D. WANG AND ARNOLD R. KRIEGSTEIN. Blocking Early GABA Depolarization with Bumetanide Results in Permanent Alterations in Cortical Circuits and Sensorimotor Gating Deficits. **Cereb Cortex.** Mar; 21(3): 574–587, 2011.

DRAGOI, G; BUZSÁKI, G. Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. **Neuron**, 50:145-157, 2006

EWART, HS; KLIP, A. Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. **Am. J. Physiol.** 269(Cell Physiol. 38):C295–C311, 1995.

EYRE, MD; RENZI, M; FARRANT, M, NUSSER, Z. Setting the time course of inhibitory synaptic currents by mixing multiple GABA(A) receptor α subunit isoforms. **J. Neurosci.** 32, 5853–5867, 2012

EL-HUSSEINI, AE; SCHNELL, E; CHETKOVICH, DM; NICOLL, RA; BRETT, DS. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. **Science.** Nov 17;290(5495):1364-8, 2000.

ERECINSKA, M; SILVER, IA. Ions and energy in mammalian brain, **Prog. Neurobiol.** 43 37–71, 1994.

ERECINSKA, M; CHERIAN, S; SILVER, A. Energy metabolism in mammalian brain during development, **Prog. Neurobiol.** 73, 397–445, 2004.

FESCHENKO, MS; SWEADNER, KJ. Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. **J. Biol. Chem.** 269:30436–30444, 1994.

FISHER, RS; VAN EMDE BOAS, W; BLUME, W; ELGER, C; GENTON ,P; LEE, P; ENGEL, JJR. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**; Apr;46(4):470-2, 2005.

FISHER ,RS. Redefining epilepsy. **Curr Opin Neurol**. Apr; 28 (2):130-5, 2014.

FISONE, G; CHENG, SX; NAIRN, AC; CZERNIK, AJ; HEMMINGS, HC; HÖÖG, J. O; BERTORELLO, AM; KAISER, R; BERGMAN, T; JÖRNVALL, H. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺,K⁺-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9368-9373, 1994.

FOSTER, DJ; WILSON, MA. Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. **Nature**, 440:680-683, 2006.

FREUND, TF; BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**, 6:347-470, 1996.

FUNK, CB; PRASAD, AN; FROSK, P; SAUER, S; KOŁKER, S; GREENBERG, CR. and del BIGIO, MR. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. **Brain** 128,711–722, 2005.

GOKMEN-OZEL H; MACDONALD A; DALY A; ASHMORE C; PREECE MA; HENDRIKSZ C; VIJAY S; CHAKRAPANI A. Dietary practices in glutaric aciduria type 1 over 16 years. **J Hum Nutr Diet**. 2012 Dec;25(6):514-9

GOODMAN, SI; MARKEY, SP; MOE, PG; MILES, BS; TENG, CC. Glutaric aciduria: a new disorder of aminoacid metabolism. **Biochemical Medicine**, 12, p.12-21, 1975.

GOODMAN, SI; NORENBURG, MD; SHIKES, RH; BRESLICH, DJ; MOE, PG. Glutaric aciduria: biochemical and morphological considerations. **Journal of Pediatrics**, 90, p. 746-750, 1977.

GOODMAN, SI; KRATZ, LE; DIGIULIO, KA. Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in Escherichia coli. **Hum Mol Genet**; 4:1493–1498, 1995.

GOODMAN, SI; STEIN, DE; SCHLESINGER, S; CHRISTENSEN, E; SCHWARTZ, M; GREENBERG, CR; ELPELEG, ON. Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): Review and report of thirty novel mutations. **Hum Mutat**, 12:141–144, 1998.

GOODMAN, SI; FRERMAN, EF. Organic Acidemias Due to Defects in Lysine Oxidation: 2-Ketoadipic Acidemia and Glutaric Acidemia, edi 8. **MacGranw-Hill**, New York, 2001.

GRISAR, T; GUILLAUME, D; DELGADO-ESCUETA, AV. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Research**, v. 12, p. 141-149, 1992.

GREENBERG, CR; DUNCAN, AM; GREGORY, CA. Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. **Genomics** 21:289 –290, 1994.

HALL, ZW; KRAVITZ, EA. The metabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the lobster nervous system. I. GABA-glutamate transaminase. **J Neurochem.** Jan;14(1):45-54, 1967a.

HALL, ZW; KRAVITZ, EA. The metabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the lobster nervous system. II. Succinic semialdehyde dehydrogenase. **J Neurochem.** Jan;14(1):55-61, 1967b.

HÄRTEL, U; ECKEL, E; KOCH, J; FUCHS, G; LINDER, D; BUCKEL, W. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from Pseudomonas sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. **Archives of Microbiology**, 159, p. 174-181, 1993.

HAWORTH, JC; BOOTH, FA; CHUDLEY, AE; DEGROOT, GW; DILLING, LA; GOODMAN, SI; GREENBERG, CR; MALLORY, CJ; MCCLARTY, BM; SESHIA, SS. Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds. **J Pediatr** 118: 52–58, 1991.

HECK, N; KILB, W; REIPRICH, P; KUBOTA, H; FURUKAWA, T; FUKUDA, A; LUHMANN, HJ. GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo. **Cereb Cortex**. Jan;17(1):138-48.

HENNOU, S; KHALILOV, I; DIABIRA, D; BEN-ARI, Y; GOZLAN, H. Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. **Eur J Neurosci**16:197–208, 2002.

HOFFMANN GF, GIBSON KM, TREFZ FK ,NYHAN WL,BREMER HJ, RATING D, Neurological manifestations of organic acid disorders, **Eur. J. Pediatr**. 153, S94–S100, 1994.

HOFFMANN, GF; ATHANASSOPOULOS, S; BURLINA, AB; DURAN, M; DE KLERK, JB; LEHNERT, W; LEONARD, JV; MONAVARI, AA; MÜLLER, E; MUNTAU, AC; NAUGHTEN , ER; PLECKO-STARTING, B; SUPERTI-FURGA, A; ZSCHOCKE, J; CHRISTENSEN, E. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**. Jun;27(3):115-23, 1996.

HOFFMANN, GF; ZSCHOCKE, J. Glutaric Aciduria Type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. **Journal Inherited Metabolic Disease**, 22, p. 381-391, 1999.

ILAE, COMMISSION REPORT. The epidemiology of the epilepsies: future directions. International League Against Epilepsy. **Epilepsia**; 38:614–8, 1997.

JACOB, CT; MOSS, SJ; JURD, R. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Neuroscience**, volume 9 | may 2008, 331-343

JAFARI, P; BRAISSANT, O; BONAFÉ, L; BALLHAUSEN D. The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I. **Molecular Genetics and Metabolism**, 104(4), p. 425-37, 2011.

JAMJOOM, ZAB; OKAMOTO, E; AL-HAJERY, O; ABU-MELHA, A. Bilateral arachnoid cysts of the sylvian region in female siblings with glutaric aciduria type I. **Journal of Neurosurgery**, 82, p. 1078-1081, 1995.

JAMME, I; PETIT, E; DIVOUX, D; GERBI, A; MAIXENTm, JM; NOUVELOT, A. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 29, p. 333-337, 1995.

JONES, MV AND HARRISON, NL. Effects of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured campal neurones. **J. Neurophysiol.** 70, 1339-1349, 1993.

KEEZER, MR; SISODIYA, SM; SANDER, JW. Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. **Lancet Neurol.** Jan;15(1):106-15. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00225-2. Epub 2015 Nov 6. Review, 2016.

KNEUSSEL M; BRANDSTÄTTER, JH; GASNIER, B; FENG, G; SANES, JR; BETZM,H. Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. **Mol. Cell. Neurosci.** 17, 973–982, 2001.

KOELLER, DM; WOONTNER, M; CRNIC, LS; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B; STEPHENS, J; HUNT, EL. Goodman SI. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. **Hum Mol Genet.** 15;11(4):347-57. 2002.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, GF. 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro, **J. Inherit. Metab. Dis.** 22 (3) 259–262, 1999.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, GF. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new

pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, *Pediatr. Res.* 47 (4 Pt 1) 495–503, 2000.

KÖLKER, S; AHLEMEYER, B; KRIEGLSTEIN, J; HOFFMANN, GF. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neuro- toxicity in primary neuronal 47 cultures from chick embryo telencephalons. ***Pediatrics Research***, 50, p. 76–82, 2001.

KÖLKER, S; OKUN ,JG; AHLEMEYER, B. Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in cultures from chick embryo telencephalon. ***J Neurosci Res*** 68:424–431, 2002.

KÖLKER, S; HOFFMANN, GF; SCHOR, DS. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. ***Neuropediatrics*** 34, 253–260, 2003.

KÖLKER, S; KOELLER, DM; OKUN, JG; HOFFMANN, GF. Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. ***Ann Neurol.*** Jan;55(1):7-12, 2004.

KÖLKER, S; GARBADE, S; GREENBERG, CR. Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. ***Pediatrics Research***, 59, p.840–847, 2006.

KÖLKER, S; BOY, SP; HERINGER, J; MÜLLER, E; MAIER, EM; ENSENAUER, R; MÜHLHAUSEN, C; SCHLUNE, A; GREENBERG, CR; KOELLER, DM; HOFFMANN, GF; HAEGE, G; BURGARD, P. Complementary dietary treatment using lysine-free, arginine-fortified amino acid supplements in glutaric aciduria type I - A decade of experience. ***Mol Genet Metab.*** Sep;107(1-2):72-80, 2012.

KÖRBER, C; RICHTER, A; KAISER, M; SCHLICKSUPP, A; MÜKUSCH, S; KUNER, T; KIRSCH, J; KUHSE, J. Effects of distinct collybistin isoforms on the formation of GABAergic synapses in hippocampal neurons. ***Mol. Cell. Neurosci.*** 50, 250–259, 2012.

KRAUSHAAR, U; JONAS, P. Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. **J Neurosci.** Aug 1;20(15):5594-607, 2000.

KRAVITZ, EA. Enzymic formation of gamma-aminobutyric acid in the peripheral and central nervous system of lobsters. **J Neurochem.** Jul-Aug;9:363-70, 1962.

KRNJEVIC, K; PHILLIS, JW. Ionophoretic studies of neurons in the mammalian cerebral cortex. **J. Physiol.**, 165, 274-304, 1963.

KÜLKENS, S; HARTING, I; SAUER, S; ZSCHOCKE, J; HOFFMANN, GF; GRUBER, S; BODAMER, OA; KÖLKER, S. Neurology Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neurology** 64, 2142–2144, 2005.

LEIBEL, RL; SHIH, VE; GOODMAN, SI; BAUMAN, ML; MCCABE, ER; ZWERDLING, RG; BERMAN, I; COSTELLO, C. Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. **Neurology** 30, 1163–1168, 1980.

LIMA, TTF; BEGNINI, J; DE BASTIANI, J. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. **Brain Res** 802:55– 60, 1998.

LINDNER, M; KOLKER, S; SCHULZE, A; CHRISTENSEN, E; GREENBERG, CR; HOFFMANN, GF. Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J Inherit Metab Dis** 27:851–859, 2004.

LOGVINENKO, NS; DULUBOVA, I; FEDOSOVA, N; LARSSON, SH; NAIRN, AC; ESMANN, M; GREENGARD, P; APERIA, A. Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na⁺,K⁺-ATPase affects its conformational equilibrium. **Proceedings of National Academy Science United States of America**, v. 20, p. 9132-9137, 1996.

LOGVINENKO, NS; DULUBOVA, I; FEDOSOVA, N; LARSSON, SH; NAIRN, AC; ESMANN, M; GREENGARD, P; APERIA, A. Phosphorylation by protein kinase C of

serine-23 of the $\alpha 1$ subunit of rat Na^+, K^+ -ATPase affects its conformational equilibrium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:9132–9137, 1996.

LO TURCO, JJ; OWENS, DF; HEATH, MJ; DAVIS, MB; KRIEGSTEIN, AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. **Neuron**. 1995 Dec;15(6):1287-98, 1995.

LUSCHER, B; FUCHS, T; KILPATRICK, CL. GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. **Neuron** 70, 385–409, 2011.

MARÍN, O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**. Jan 18;13(2):107-20, 2012.

MARQUEZAM P, FUNCK VR, OLIVEIRA CV, PEREIRA LM, ARAÚJO SM, SZARZECKIB MS, ROYES LF, FURIAN AF, OLIVEIRA MS. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na^+, K^+ -ATPase activity decrease and α subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. **Epilepsy Research** Volume 105, Issue 3, August 2013, Pages 396–400

MELZER, S; MICHAEL, M; CAPUTI, A; ELIAVA, M; FUCHS, EC; WHITTINGTON, MA; MONYER, H. Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. **Science**, Mar 23;335(6075):1506-10, 2012.

MERINERO, B; PÉREZ-CERDA, C; FONT, LM. Variable clinical and biochemical presentation of seven spanish cases with glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**, 26, p. 238-242, 1995.

MEYBURG, J; SCHULZE, A; KOHLMU“LLER, D. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. **Pediatr Res**;49:125–129, 2001.

MOBASHERI A, AVILA J, CÓZAR-CASTELLANO I, BROWNLEADER MD, TREVAN M, FRANCIS MJ, LAMB JF MARTÍN-VASALLO P. Na^+, K^+ -ATPase isozyme diversity: Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports**, v. 20, p. 51-91, 2000.

MORTON, DH; BENNETT, MJ; SEARGEANT, LE; NICHTER, CA; KELLEY, RI. Glutaric aciduria type I: A common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. **Am J Med Genet** 41:89–95, 1991.

MOHAJERANI, MH; CHERUBINI, E. Spontaneous recurrent network activity in organotypic rat hippocampal slices. **Eur J Neurosci** 22:107–18, 2005.

MOSELEY, AE; WILLIAMS, MT; SCHAEFER, TL; BOHANAN, CS; NEUMANN, JC; BEHBEHANI, MM; VORHEES, CV; LINGREL, JB. Deficiency in Na⁺,K⁺-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **Journal of neuroscience**, n. 27, p. 616-626, 2007.

NESTLER, E. J.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. In: Siegel, G.; Agranoff, B. W.; Alberts, R. W.; Molinoff, P. B. (Eds) **Basic Neurochemistry**. Raven Press, New York, p. 449-474, 1994.

NGUGI, AK; BOTTOMLEY, C; KLEINSCHMIDT, I; SANDER, JW; NEWTON, CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**. May;51(5):883-90, 2010.

NGUGI, AK; KARIUKI, SM; BOTTOMLEY, C; KLEINSCHMIDT, I; SANDER, JW; NEWTON, CR. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. **Neurology**. Sep 6; 77(10):1005-12, 2011.

NICOLE I. WOLF, THOMAS BAST, ROBERT SURTEES. Epilepsy in inborn errors of metabolism. **Epileptic Disord**; 7 (2): 67-81, 2005.

NISHI A, FISONE G, SNYDER GL, DULUBOVA I, APERIA A, NAIRN AC, GREENGARD P. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, p. 1492-1501, 1999.

OWENS, DF; LIU, X; KRIEGSTEIN, AR. Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development. **J Neurophysiol** 82:570 – 583, 1999.

OWENS DF AND KRIEGSTEIN AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nat Rev Neurosci**. Sep;3(9):715-27, 2002.

PASQUETTI, MV. Perfil eletroencefalográfico e de liberação de glutamato e GABA associados à epileptogênese em modelo de acidemia glutárica tipo I. 64 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

POLENZANI, L; WOODWARD, RM; MILEDI, R. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. May 15;88(10):4318-22, 1991.

PORCIÚNCULA, LO; EMANUELLIA, T; TAVARES, RG; SCHWARZBOLD, C; FRIZZO, MES; SOUZA, DO; WAJNER, M. Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. **Neurochemistry International** 45 1075–1086, 2004.

QUINTAS, R; RAGGI, A; GIOVANNETTI, AM. Psychosocial difficulties in people with epilepsy: a systematic review of literature from 2005 until 2010. **Epilepsy Behav**; 25: 60–67, 2012.

RAHMAN, S; FOOTITT, ES; VARADKAR, S; CLAYTON, PT. Inborn errors of metabolism causing epilepsy. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 55: 23–36, 2012

RICHARDS, KS; BOMMERT, K; SZABO, G AND MILES, R. Differential expression of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunits in mouse hippocampal interneurons and pyramidal cells. **J Physiol** 585.2 pp 491–505, 2007.

ROBERTS, E; FRANKEL, S. Gamma-Aminobutyric acid in brain, its formation from glutamic acid. **J. Biol. Chem.**, 187, 55-63, 1950.

RODRIGUES, MD; SEMINOTTI, B; AMARAL, AU; LEIPNITZ, G; GOODMAN, S; WOONTNER, M; DE SOUZA, DO; WAJNER, M. Experimental evidence that overexpression of NR2B glutamate receptor subunit is associated with brain vacuolation in adult glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A potential role for glutamatergic-induced excitotoxicity in GA I neuropathology. **J Neurol Sci.** Dec 15;359(1-2):133-40, 2015.

ROSA, RB; DALCIN, KB; SCHMIDT, AL; GERHARDT, D; RIBEIRO, CAJ; FERREIRA, GC; SCHUCK, PF; WYSE, AT; PORCIÚNCULA, LO; WOFCHUK, S; SALBEGOA, CG; SOUZA, DO; WAJNER, M. Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats. **Life Sciences** 81 1668–1676, 2007.

SAUER, SW; OKUN, JG; FRICKER, G; MAHRINGER, A; MÜLLER, I; CRNIC, LR; MÜHLHAUSEN, C; HOFFMANN, GF; HÖRSTER, F; GOODMAN, SI; HARDING, CO; KOELLER, DM; KÖLKER, S. Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J Neurochem.** May;97(3):899-910, 2006.

SAUER, SW; OPP, S; HOFFMANN, GF; KOELLER, DM; OKUN, JG; KÖLKER, S. Therapeutic modulation of cerebral L-lysine metabolism in a mouse model for glutaric aciduria type I. **Brain.** Jan;134(Pt 1):157-70, 2011.

SAUER, SW; OPP, S; KOMATSUZAKI, S; BLANK, A; MITTELBRONN, M; BURGARD, P; KOELLER, DM; OKUN, JG; KÖLKER, S. Multifactorial modulation of susceptibility to L-lysine in an animal model of glutaric aciduria type I. **Biochimica et Biophysica Acta** 1852: 768–777, 2015.

SCHOFIELD, CM; HUGUENARD, JR. GABA affinity shapes IPSCs in thalamic nuclei. **J. Neurosci.** 27, 7954–7962, 2007.

SCOVILLE, WB; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**. Winter;12(1):103-13, 1957.

SCRIVER, CR; BEAUDET, AL; SLY, WS; VALLE, D. (Eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8.ed, p. 1971-2001.

SEASHORE, MR. The Organic Acidemias: An Overview. *Medicine* 1-53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=oa-overview>. 2009.

SHAMIMA RAHMAN, EMMA J FOOTITT, SOPHIA VARADKAR, PETER T CLAYTON. Inborn errors of metabolism causing epilepsy. **Developmental Medicine & Child Neurology**; 55: 23–36, 2013.

SHNEKER, B. F.; FOUNTAIN, N. B. Epilepsy. **Disease a Month**, v. 49, p. 426-478, 2003.

STRAUSS, KA; PUFFENBERGER, EG; ROBINSON, DL; MORTON, DH. Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**,121:38-52, 2003.

STRAUSS, KA; LAZOVIC, J; WINTERMARK, M. Multimodal imaging of striatal degeneration in Amish patients with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Brain** 130(Pt7):1905-1920, 2007.

STOKKE, O; GOODMAN, SI; MOE, PG. Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and α -hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria? **Clin Chim Acta** ;66:411–415, 1976.

STAHL, WL; HARRIS, WE. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Advances Neurology**, v. 44, p. 681-693, 1986.

SKOU, JC; ESMANN, M. The Na⁺,K⁺-ATPase. **Journal of Bioenergetics Biomembranes**, v. 24, p. 249-261,1992.

TEIXEIRA, VL.; KATZ, AI; PEDEMONTE, CH.; BERTORELLO, AM. Isoform-specific regulation of Na⁺,K⁺-ATPase endocytosis and recruitment to the plasma membrane. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 587-594, 2003.

THURMAN, DJ; BEGHI, E; BEGLEY, CE; BERG, AT; BUCHHALTER, JR; DING, D; HESDORFFER, DC; HAUSER, WA; KAZIS, L; KOBAN, R; KRONER, B; LABINER, D; LIOW, K; LOGROSCINO, G; MEDINA, MT; NEWTON, CR; PARKO, K; PASCHAL, A; PREUX, PM; SANDER, JW; SELASSIE, A; THEODORE, W; TOMSON, T; WIEBE, S; ILAE. Commission on Epidemiology. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**. Sep;52 Suppl 7:2-26. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03121.x, 2011.

UDENFRIEND, S. Identification of gamma-aminobutyric acid in brain by the isotope derivative method. **J. Biol. Chem.**, 187, 65-69, 1950.

VIAU, K; ERNST, SL; VANZO, RJ; BOTTO, LD; PASQUALI, M; LONGO, N. Glutaric acidemia type 1: outcomes before and after expanded newborn screening. **Mol Genet Metab**; Aug;106(4):430-8, 2012.

WANG, DD; KRIEGSTEIN, AR. GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. **J Neurosci**. May 21;28(21):5547-58, 2008.

WANG, TL; GUGGINO, WB; CUTTING, GR. A novel gamma-aminobutyric acid receptor subunit (rho 2) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. **J Neurosci**. Nov;14(11 Pt 1):6524-31, 1994.

WANG, Y; ZHAN, L; ZENG, W; LI, K; SUN, W; XU, Z. C; XU, E. Downregulation of hippocampal GABA after hypoxia-induced seizures in neonatal rats. **Neurochemistry Research**, 36(12), p. 2409-16, 2008

WANG DD AND KRIEGSTEIN AR. Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits. **Cereb Cortex**. Mar;21(3):574-87, 2011.

WANG Z; BELUSA, RLID; AIZMAN, O; AIZMAN, R; SAHLGREN, B; APERIA, A. Protein kinase C phosphorylation of rat renal Na/K-ATPase increases intracellular Na and inhibits Rb uptake (Abstract). **J. Am. Soc. Nephrol.** 6:356, 1995.

WHITTINGTON, MA; TRAUB, RD. Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. **Trends Neurosci**, 26:676-682, 2003.

WOLF, NI; BAST, T; SURTEES, R. Epilepsy in inborn errors of metabolism. **Epileptic Disord** 2005; 7 (2): 67-81

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epilepsy in the WHO Africa region, Bridging the Gap: The Global campaign against epilepsy "Out of the Shadows." WHO, Geneva, 2004.

WU, X; WU, Z; NING, G; GUO, Y; ALI, R; MACDONALD, RL. Gamma Aminobutyric acid type A (GABAA) receptor alpha subunits play a direct role in synaptic versus extrasynaptic targeting. **J. Biol. Chem.** 287, 27417–27430, 2012.

ZHANG, D; PAN, ZH; ZHANG, X; BRIDEAU, AD; LIPTON, SA. Cloning of a γ -aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 92, 11756-11760, 1995.

ZSCHOCKE, J; QUAK, E; GULDBERG, P; HOFFMANN, GF. Mutation analysis in glutaric aciduria type I. **J Med Genet** 37: 177–181, 2000.

ZINNANTI WJ, LAZOVIC J, WOLPERT EB, ANTONETTI DA, SMITH MB, CONNOR JR, WOONTNER M, GOODMAN SI, CHENG KC. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. **Brain.** Apr;129(Pt 4):899-910, 2006.

