



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**Efeito *in vitro* dos ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico sobre alguns parâmetros do sistema glutamatérgico em córtex cerebral de ratos e em astrócitos cultivados de córtex de ratos.**

**CAROLINA VARGAS SCHWARZBOLD**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-  
Bioquímica- do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas  
da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do**

**Grau de Mestre em Bioquímica**

Porto Alegre

2001

Ao meu pai, por seus ensinamentos de vida  
e por ter me ensinado a gostar de ciência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas do meu laboratório pelo constante incentivo e ajuda, em especial Ana Maria Brusque e Débora Junqueira, que assumiram juntas comigo este desafio e sem as quais o trabalho não teria o mesmo brilho. Ao Cêzar pelas estatísticas finais, ao Rafa, Dênis, Karina, Pati, Cristian, Guilhiam, Letícia...pela excelente convivência, amizade e alto astral que conquistamos.

Aos meus pais: Albano, um grande pai, amigo e pesquisador e minha mãe Gilsi, uma referência na minha trajetória e um grande exemplo de persistência e soliedariedade, pelo amor constante, patrocínio e principalmente por terem dado a oportunidade de realizar os meus sonhos.

Ao Irajá, meu grande amor, por toda a produção gráfica do trabalho, sugestões construtivas, e principalmente por seu apoio emocional e indescritível tolerância com os momentos difíceis (mesmo enfrentando a mesma situação), acreditando sempre em mim. Te amo!

Aos colegas do laboratório de cultivo, Proko e Kelly, pela imensa ajuda e sincera amizade, que levaremos para nossa vida, acompanhadas de muitos vinhos e música "heavy".

Ao amigo e desorientador, Prof. Marcos Frizzo, por seus ensinamentos, fundamentais para este trabalho, pela oportunidade de trabalhar com seu grupo e pelo carinho, respeito e grande amizade.

À Renata Sano, uma grande amizade que fiz no laboratório, pela sua paciência, seu ombro amigo e seu constante incentivo.

Ao prof. Moacir Wajner, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo respeito, confiança e muitas vezes, tolerância.

Ao prof. Clóvis Wannmacher, pelo seu sorriso e carinho sempre presentes no laboratório, e seus conhecimentos que sempre somaram muito ao trabalho.

Ao prof. Diogo Souza, pelas suas sugestões e sua carinhosa recepção à minha invasão quase diária no seu laboratório.

Às colegas do meu atual trabalho, Shirley, Cris, Mari e Bárbara, pela paciência e incentivo na reta final da tese.

Às amigas Liane Rotta e Rejane Tavares, pela ajuda incansável, pelas membranas e vesículas cedidas e pela amizade.

A CAPES pela bolsa concedida.

# Índice

RESUMO .....	ix
ABSTRACT.....	xi
I - INTRODUÇÃO.....	1
I.1- Erros inatos do metabolismo.....	1
I.1.1- Histórico.....	1
I.1.2 - Conceito e classificação dos EIM.....	2
I.1.3 – Sintomatologia.....	4
I.1.4 - Acidemias orgânicas.....	4
I.1.4.1 Acidemia glutárica tipo I. ....	5
I.1.4.1.1 - Manifestações clínicas.....	8
I.1.4.1.2 – Diagnóstico.....	9
I.1.4.1.3 – Neuropatologia.....	11
I.1.4.1.4 – Fisiopatogenia.....	13
I.1.4.1.5 – Tratamento.....	18
I.2 - O sistema glutamatérgico.....	19
I.2.1. O glutamato.....	19
I.2.2 – Glutamato x excitotoxicidade.....	20
I.2.3 – Ciclo glutamato–glutamina.....	25
I.2.4. Receptores de glutamato.....	29
I.2.4.1. Receptores Ionotrópicos.....	30
I.2.4.1.1. Receptores AMPA.....	32
I.2.4.1.2. Receptores Cainato.....	33
I.2.4.1.3. Receptores NMDA.....	34
I.2.4.2 .Receptores metabotrópicos (mGlu) .....	36
I.2.5. Transportadores de glutamato.....	39

II.OBJETIVOS.....	43
II. 1 Geral.....	43
II. 2 Específicos.....	43
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
III.1 Reagentes.....	44
III.2 Animais.....	44
III.3 Preparação de fração sinaptossomal para avaliação da captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato.....	44
III.4 Ensaio de lactato desidrogenase em sinaptossomas.....	45
III.5 Captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato por preparações sinaptossomais.....	46
III.6 Preparação de fração sinaptossomal para avaliação da liberação de L- [ <sup>3</sup> H]glutamato.....	46
III.7 Liberação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato pela fração sinaptossomal.....	47
III.8 Preparação de membranas sinápticas plasmáticas cerebrais. ....	48
III.9 União de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas.....	49
III.10 Preparação de vesículas sinápticas.....	50
III.11 Captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato por vesículas sinápticas.....	51
III.12 Cultura primária de astrócitos.....	51
III.13 Ensaio da viabilidade dos astrócitos por MTT.....	52
III.14 Medida de liberação da lactato desidrogenase (LDH) em culturas de astrócitos.....	53
III.15 Captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato por astrócitos .....	54
III.16 Medida de proteínas.....	54
III.17 Estatísticas.....	55
IV. RESULTADOS.....	56

IV.1. Efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a liberação de lactato desidrogenase de preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.....	56
IV.2. Efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.....	58
IV.3. Efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a liberação basal e estimulada por potássio de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. ....	59
IV.4. Efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a união de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos adultos, na presença ou ausência de sódio no meio de incubação.....	64
IV.5. Efeito dos ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato por preparações de vesículas sinápticas de cérebro de ratos adultos. ....	67
IV.6 Efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a viabilidade de astrócitos de córtex cerebral de ratos.....	69
IV.7 Efeito dos ácidos 3-hidroxi-glutárico e glutárico sobre a captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato em astrócitos de córtex cerebrall de ratos. ....	74
V. DISCUSSÃO.....	77
VI.CONCLUSÃO. ....	88
VII. REFERÊNCIAS.....	90

## Índice de Figuras

Figura I.1-Conseqüência da deficiência ou ausência da atividade de uma enzima pertencente a uma rota metabólica. ....	3
Figura I.2- Vias catabólicas dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano.....	6
Figura I.3- Modelo dinâmico de três estados da AG I.....	15
Figura I.4-Rota metabólica proposta para a formação do ácido quinolínico. ....	17
Figura I.5- Diagrama simplificado ilustrando algumas vias de dano neuronal excitotóxico	23
Figura I.6-Ciclo glutamato-glutamina nas estruturas sinápticas.....	26
Figura I.7-Destino metabólico do glutamato captado pelos astrócitos.....	28
Fig I.8-Representação de receptores ionotrópicos.....	30
Figura I.9-Modelos esquemáticos para o transportador de glutamato e canal de cloro associado a este transportador.....	41
Figura IV.1- Efeito dos ácidos 3-hidroxi glutárico e glutárico sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) de preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.....	57
Figura IV.2- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a captação de L-[ <sup>3</sup> H] glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. ....	58
Figura IV.3- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a liberação de L-[ <sup>3</sup> H] glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.....	60
Figura IV.4- Efeito do ácido glutárico sobre a liberação de L-[ <sup>3</sup> H ] glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.....	61
Figura IV.5- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a liberação de L-[ <sup>3</sup> H] glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. ....	63
Figura IV.6- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a união de L-[ <sup>3</sup> H ] glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos em meio sem sódio e cloro. ....	65
Figura IV.7- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico e glutárico sobre a união de L-[ <sup>3</sup> H] glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos em meio com sódio (NaCl 1 mM). ....	66

Figura IV.8- Efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a captação de L-[ <sup>3</sup> H]glutamato por preparações de vesículas sinápticas de cérebro de ratos.....	68
Figura IV.9- Efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a viabilidade celular de astrócitos de córtex cerebral de ratos. ....	70
Figura IV.10- Efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a viabilidade celular (liberação de LDH – incubação de 20 horas) de astrócitos de córtex cerebral de ratos.....	72
Figura IV.11- Efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a viabilidade celular (conversão de MTT-incubação de 20 horas) de astrócitos de córtex cerebral de ratos.....	73
Figura IV.12- Efeito do ácido glutárico sobre a captação de L[ <sup>3</sup> H] glutamato por astrócitos de córtex cerebral de ratos. ....	75
Figura IV.13- Efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a captação de L[ <sup>3</sup> H ] glutamato por astrócitos de córtex cerebral de ratos. ....	76

## Índice de Tabelas

Tabela I.1-Sensibilidade de marcadores diagnósticos em acidemia glutárica tipo I.....	11
Tabela I.2-Patologia cerebral e o curso da doença em pacientes com AG I.....	12
Tabela I.3 -Características dos subtipos de receptores de glutamato.....	31
Tabela I.4 - Família dos transportadores de glutamato.....	40



## RESUMO

A acidemia glutárica tipo I (AG I) é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva que se caracteriza bioquimicamente pela deficiência da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase da rota de degradação dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofânio. O bloqueio da rota na conversão de glutaril-CoA à crotonil-CoA e resultante da deficiência enzimática leva ao acúmulo tecidual e aumento da concentração nos líquidos biológicos predominantemente dos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico e, em alguns casos, do ácido glutacônico. Os pacientes afetados apresentam sintomas neurológicos especialmente após crises encefalopáticas, comuns no primeiro ano de vida, em que ocorre necrose bilateral dos gânglios da base, degeneração do globo pálido e da substância branca. Tendo em vista que a patogênese do dano cerebral na AG I é pouco conhecida e que as lesões do SNC dos pacientes muito se assemelham às lesões devido à excitotoxicidade, no presente estudo investigamos a ação dos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico sobre alguns parâmetros neuroquímicos envolvendo o sistema glutamatérgico em córtex cerebral e astrócitos cultivados de córtex cerebral de ratos. Alguns desses parâmetros já haviam sido testados previamente com o ácido glutárico. Observamos que o ácido 3-hidroxi glutárico, em concentrações de 10  $\mu$ M a 1 mM, não alterou a captação de L-[ $^3$ H]glutamato por preparações sinaptossomais. Verificamos também que os ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico, nas mesmas concentrações, não alteraram a liberação do L-[ $^3$ H]glutamato por estas estruturas em condições basais ou estimuladas (despolarizadas) por potássio (20 mM e 40 mM). Já nos ensaios de união do L-[ $^3$ H] glutamato a membranas plasmáticas, o ácido 3-hidroxi glutárico inibiu a união do neurotransmissor em meio de incubação sem sódio e cloreto (sítios receptores), quando em baixas concentrações (1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M), enquanto não alterou esta união em altas concentrações (500  $\mu$ M a 2 mM). Na presença de alto sódio (sítios transportadores), ambos os ácidos inibiram a união de L-[ $^3$ H]glutamato em todas as concentrações testadas (10  $\mu$ M a 1 mM). Outros

experimentos demonstraram que o ácido 3-hidroxi glutárico não alterou a captação vesicular de L-[<sup>3</sup>H]glutamato. Avaliamos também a influência dos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por astrócitos cultivados de córtex cerebral. Inicialmente verificamos a viabilidade destas células na presença dos ácidos pelo teste do MTT que reflete a atividade das desidrogenases mitocondriais e também pela liberação de lactato desidrogenase para o meio de incubação. Na concentração de 1 mM, os ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico não se mostraram citotóxicos para estas células. Por outro lado, quando incubados por 60 minutos, nas concentrações de 50 μM e 1mM, aumentaram significativamente a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato pelos astrócitos.

## ABSTRACT

Glutaric acidemia type I (GA I) is an autosomal recessive inborn error of metabolism biochemically characterized by deficient activity of glutaryl-coA dehydrogenase, an enzyme from the pathway of lysine, hydroxylysine and tryptophan degradation. The blockage of the conversion of glutaryl-CoA to crotonyl-CoA results in the tissue accumulation of predominantly glutaric and hydroxyglutaric acids, and sometimes of glutaconic acid as well. The affected patients present essentially neurologic symptoms especially after encephalopathic crises, frequent in the first year of life, in which bilateral necrosis of the basal ganglia, of the pallidum globus and the white matter occur. Since the pathogenesis of the brain damage in this disorder is poorly known and the cerebral lesions resemble those of excitotoxicity, in the present study we investigated the effect of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids on some neurochemical parameters involving the glutamatergic system in cerebral cortex and astrocytes from cerebral cortex of rats. Some of these parameters have been already tested with glutaric acid. We observed that 10  $\mu$ l to 1 mM 3-hydroxyglutaric acid did not change L-[3H] glutamate uptake by synaptosomal preparations. In addition, glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acids at the same concentrations did not alter L-[3H] glutamate basal and stimulated (in the presence of 20 mM to 40 mM KCl) release from synaptosomal preparations. Moreover, 3-hydroxyglutaric acid at low concentrations (1  $\mu$ M to 100  $\mu$ M) inhibited L-[3H] glutamate binding in the absence of sodium and chloride (receptor sites), with no effect at high concentrations (500  $\mu$ M to 2 mM). In the presence of sodium (transporter sites), glutaric and 3-hydroxyglutaric acids inhibited L-[3H] glutamate binding in all tested concentrations (10  $\mu$ M to 2 mM). Other experiments demonstrated that 3-hydroxyglutaric acid did not alter vesicular L-[3H] glutamate uptake. We also evaluated the effect of the two metabolites on L-[3H] glutamate uptake by cultured astrocytes from cerebral cortex. Initially, we tested the viability of these cells in the presence of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids by the MTT test which measures mitochondrial dehydrogenase activities and by lactate dehydrogenase release to the incubation medium. Both acids at 1 mM

concentration were shown not to be cytotoxic. On the other hand, when incubated for 60 min, both acids significantly increased L-[3H] glutamate uptake by astrocytes.

# **I - INTRODUÇÃO**

## **I.1- Erros inatos do metabolismo**

### **I.1.1- Histórico**

Em 1908 o inglês Archibal Garrod introduziu o termo erros inatos do metabolismo (EIM) quando observou casos de alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Graduado em química e medicina, estudou pacientes que excretavam pela urina quantidades aumentadas de várias substâncias. Garrod propôs que a excreção urinária aumentada dessas substâncias era devido ao seu acúmulo no organismo causado por um bloqueio parcial ou total na sua oxidação por deficiência de uma proteína responsável por uma reação específica em uma rota metabólica.

Essas doenças geralmente ocorriam em irmãos, filhos de pais normais e consangüíneos, sugerindo um modelo de herança autossômica recessiva, conforme as Leis de Mendel. A correlação entre síntese de uma proteína e um gene específico só foi desenvolvida por Beadle em 1945, permitindo explicar a etiologia dos EIM a partir de mutações nos genes das enzimas envolvidas. O primeiro defeito enzimático causador de uma doença genética foi demonstrado por Gibson em 1948. Entretanto, a hipótese de Garrod só foi confirmada em 1958, quando La Du e colaboradores comprovaram a deficiência da oxidase do ácido homogentísico no fígado de um paciente com alcaptonúria.

## I.1.2 - Conceito e classificação dos EIM

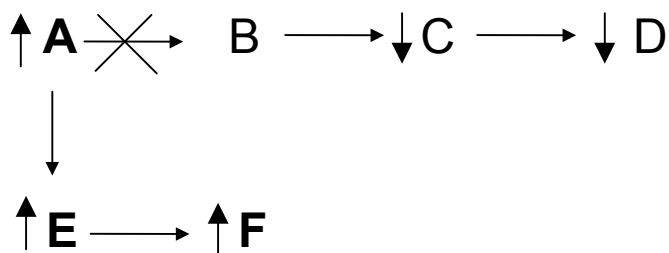
Erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças na sua quase totalidade de herança autossômica recessiva caracterizadas bioquimicamente pela deficiência ou ausência da atividade de uma enzima específica de uma rota metabólica. Além das enzimas, outras proteínas com função alterada podem estar afetadas nos EIM, como são os casos das proteínas de transporte, proteínas estruturais, imunoglobulinas, hormônios, etc. O indivíduo que possui um bloqueio em determinada rota metabólica usualmente apresenta distúrbios no seu desenvolvimento físico e/ou mental, pois substâncias que fazem parte dessa rota, bloqueada por um defeito enzimático, se acumulam, podendo ser tóxicas, enquanto outras, essenciais ao funcionamento do organismo, poderão não ser sintetizadas. Além disso, rotas alternativas também poderão dar origem a outras substâncias possivelmente tóxicas (Scriver *et alli*, 2001) (Figura.1).

Em 1982 os EIM foram classificados por Sinclair em quatro grupos, conforme o tipo de função exercida pela enzima deficiente, o tecido envolvido, bem como aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos.

1. *Desordens de transporte*: afetam basicamente o transporte renal e/ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiências de dissacaríases, defeito no transporte de magnésio, Doença de Hartnup.
2. *Desordens de armazenamento, degradação e secreção*: envolvem proteínas de organelas celulares como o aparelho de Golgi ou os lisossomas. Ocorre o acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose.

3. *Desordens de síntese*: deficiência na síntese de proteínas ou outras substâncias com funções importantes tais como hormônios, proteínas plasmáticas e de defesa imunológica. Exemplos: hiperplasia adrenal congênita por deficiência da enzima 21-hidroxilase da rota da síntese do cortisol.

4. *Desordens do metabolismo intermediário*: se caracterizam por deficiências enzimáticas das rotas do metabolismo intermediário de moléculas pequenas, comprometendo rotas importantes, como o ciclo do ácido tricarboxílico, o ciclo da uréia, ou outras rotas. Com o bloqueio, o substrato da enzima deficiente se acumula e o produto final da rota não é formado se não houver outra rota alternativa para sintetizá-lo. O substrato acumulado pode ser tóxico, causando alterações bioquímicas e dano em determinados tecidos, pois estas substâncias são liberadas na circulação e transportadas para todo o organismo, onde agem. Por outro lado, a falta de substâncias essenciais ao desenvolvimento do organismo, causadas por bloqueio metabólico, também leva a patologias. Essas desordens constituem a maioria dos EIM, tendo como exemplo as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas, da frutose, galactose e pentose, e outros.



**Figura I.1** - Conseqüência da deficiência ou ausência da atividade de uma enzima pertencente a uma rota metabólica.

O substrato A é convertido por uma série de intermediários no produto final D. As enzimas que catalizam estas reações estão indicadas pelas flechas horizontais. Neste caso, o bloqueio é na reação que converte A em B. O substrato A é convertido em F por uma via alternativa. Um defeito genético na enzima que converte A em B pode ter conseqüências fisiopatológicas relacionadas ao acúmulo de A (precursor tóxico), ou de F (via alternativa), ou então à deficiência de D (produto), ou alguma combinação destas possibilidades (Fonte: Beaudet, 1989).

### I.1.3 – Sintomatologia

Os pacientes portadores de algum tipo de erro inato do metabolismo apresentam sintomas muito variados e inespecíficos, inclusive aqueles que possuem o mesmo distúrbio. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, área do metabolismo envolvida e tecidos afetados. Algumas manifestações clínicas aparecem com maior frequência no período neonatal tais como deficiência no crescimento, vômitos, diarreia, convulsões, letargia ou coma, odor peculiar na pele ou urina e dificuldade alimentar, enquanto outras (atraso no desenvolvimento psicomotor, neurodegeneração progressiva) aparecem mais tardiamente (Burton, 1987).

#### **I.1.4 - Acidemias orgânicas**

Acidemias orgânicas são doenças genéticas autossômicas recessivas causadas por deficiência severa da atividade de uma enzima do metabolismo dos aminoácidos, lipídeos ou carboidratos e se caracterizam bioquimicamente pelo acúmulo tecidual de um ou mais ácidos carboxílicos (Chalmers & Lawson, 1982; Scriver *et alli*, 2001).

Os ácidos orgânicos encontrados no organismo, além de serem oriundos de compostos como aminoácidos, colesterol, fármacos, carboidratos e ácidos graxos, podem originar-se também de neurotransmissores, metabólitos bacterianos e de dietas especiais.

As acidemias orgânicas são denominadas de acordo com o ácido orgânico que está aumentado nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados. A acidemia glutárica tipo I é um exemplo de distúrbio onde o principal ácido acumulado é o ácido glutárico.

Comparativamente a outros grupos de erros inatos do metabolismo, as acidemias orgânicas são consideradas os mais frequentes distúrbios metabólicos

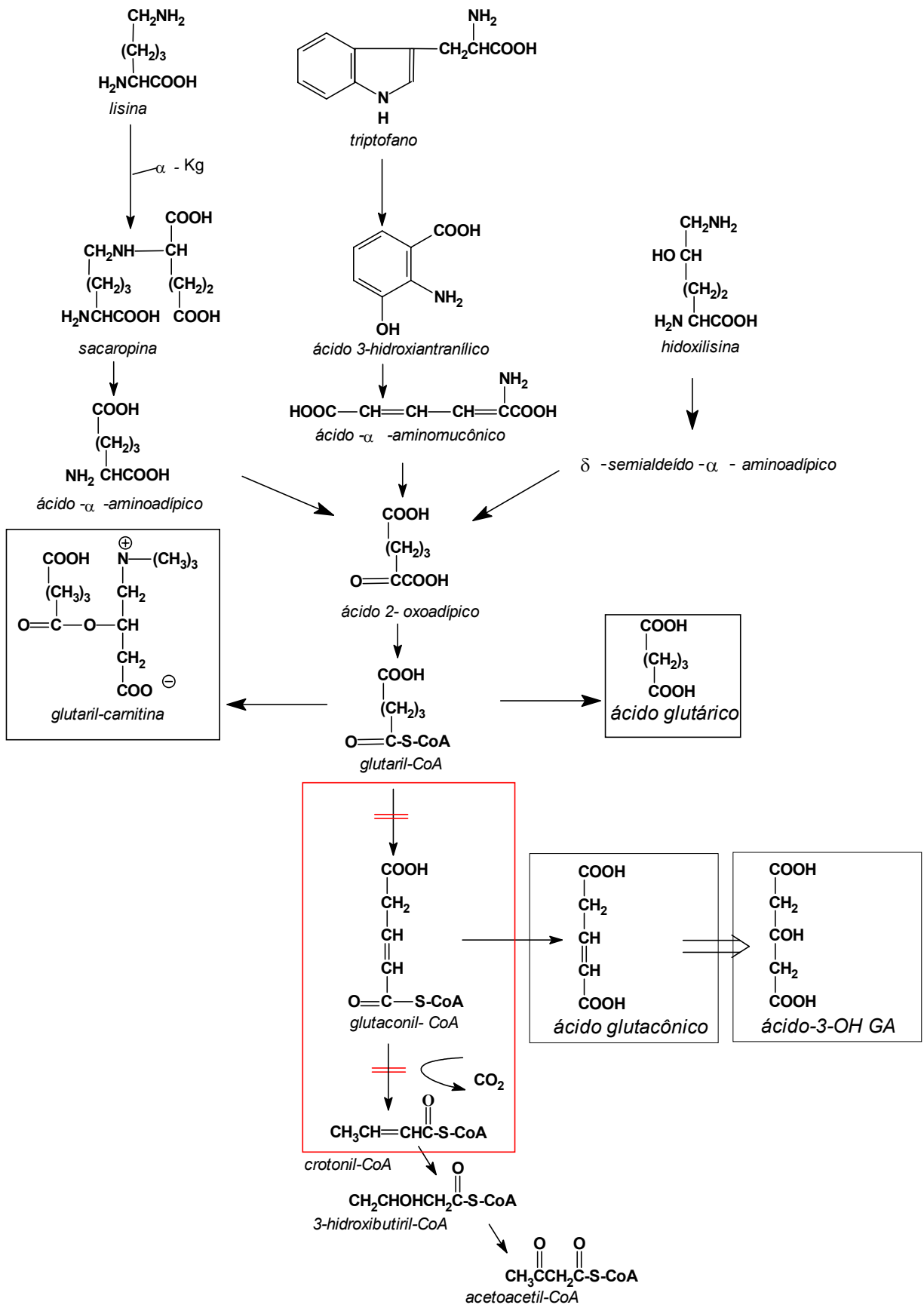


hereditários em crianças severamente enfermas (Chalmers,1980) e dos mais freqüentes grupos de enfermidades hereditárias do metabolismo (Hoffmann,1994).

### **I.1.4.1 Acidemia glutárica tipo I.**

A acidemia glutárica tipo I (AG I) é um erro inato do metabolismo descrito primeiramente por Goodman e colaboradores em 1975 quando observaram que dois irmãos apresentavam desordens severas dos movimentos e acidose metabólica intermitente. Esse distúrbio é caracterizado como uma neuropatologia de evolução lenta associada à idade e regiões cerebrais específicas (atrofia frontal e temporal) que pode progredir para uma encefalopatia aguda (Kölker *et alli*, 2000<sup>b</sup>; Hoffmann & Zschocke,1999). A AGI se caracteriza bioquimicamente pela deficiência severa da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH) (EC 1.3.99.7) da via catabólica dos aminoácidos L-lisina, L-triptofânio e L-hidroxilisina (Christensen & Brandt, 1978) (figura I.2).

A enzima GCDH é uma flavoproteína mitocondrial constituída como um homotetrâmero de subunidades de 43.3 KDa. Cada subunidade contém uma molécula de FAD ligada não-covalentemente (Goodman *et alli* ,1995). Os produtos do substrato marcado são crotonil-CoA e CO<sub>2</sub> com a formação intermediária do composto glutaconil-CoA, que pode ser clivado e excretado como ácido glutacônico ou hidratado para hidroxiglutaril-CoA (fig I.2). Esta



**Figura 1.2:** Vias catabólicas dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano (adaptado de Hoffmann *et alli.*, 1991).

última reação é catalisada pela enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase mitocondrial (Hoffmann & Zschocke, 1999).

Em indivíduos com AG I, ambas as fases, a desidrogenação mitocondrial de glutaril-CoA, bem como a seguida descarboxilação de glutaconil-CoA para crotonil-CoA, estão bloqueadas (Christensen,1993; Liesert *et alli*,1999). Este bloqueio causa um acúmulo de ácido glutárico (AG), ácido 3-hidroxi-glutárico (3-OH-AG) e ácido glutacônico nos fluidos corporais (plasma, urina e líquido) e tecidos dos pacientes afetados (Goodman *et alli*, 1977; Baric *et alli*, 1998). As concentrações séricas destes ácidos orgânicos usualmente encontradas ficam entre 5 e 400  $\mu$ M (Hoffmann *et alli*, 1991; Merinero *et alli*, 1995; Hofmann *et alli*, 1996) mas podem alcançar valores consideravelmente maiores (1-2 mM) durante crises encefalopáticas agudas (Land *et alli*, 1992; Goodman *et alli*, 1997)

A acidemia glutárica tipo I é uma das mais freqüentes desordens do metabolismo dos ácidos orgânicos (Kölker *et alli*, 2000), tendo como prevalência 1:40.000 caucasianos (Superti-Furga e Hoffmann, 1997). Na Suécia tem sido estimada uma freqüência de 1:30.000, equivalente à freqüência encontrada para a fenilcetonúria nesta região (Scriver *et alli*, 2001)

### **I.1.4.1.1 - Manifestações clínicas**

O quadro clínico dos pacientes com AG I é muito heterogêneo.

O curso da doença neurológica nesta acidemia parece ser seguido de diferentes padrões em diferentes idades. Durante os primeiros meses de vida os sintomas são usualmente leves. Alguns pacientes desenvolvem-se normalmente, enquanto outros podem apresentar hipotonia e atraso progressivo no desenvolvimento. Entre as primeiras semanas e o quarto e quinto ano de vida, doenças intercorrentes tais como infecções virais, gastroenterites ou imunizações de rotina podem precipitar uma encefalopatia aguda, freqüentemente sugerindo uma encefalite ou mais raramente uma síndrome similar à síndrome de Reye (Amir *et alli*, 1989). Encefalopatias agudas nestes pacientes usualmente duram poucos dias, mas cada episódio determina a morte neuronal com perda posterior de habilidades motoras previamente adquiridas, bem como o aparecimento de discinesia. Manifestações de hipotonia, opistótonos, perda do controle da cabeça, protusão da língua e distonia, bem como outras manifestações neurológicas (convulsões e coma) progredem lentamente com as crises encefalopáticas. A maioria dos pacientes sofre apenas um único episódio de encefalopatia aguda e o período de maior suscetibilidade é o primeiro ano de vida (Superti-Furga e Hoffmann, 1997). Independentemente do tipo de crise, há uma relativa preservação do intelecto e cognição (Scriver *et alli*, 2001).

A maior parte das análises laboratoriais de rotina, incluindo medida de eletrólitos no soro e medida de pH, são normais, exceto durante episódios agudos, quando acidose, hipoglicemia, cetonemia e cetonúria, bem como hiperamonemia podem tornar-se aparentes (Gregersen e Brandt, 1979; Aicardi *et alli*, 1985).

### **I.1.4.1.2 – Diagnóstico**

O diagnóstico precoce de AG I, bem como das demais acidemias orgânicas, é muito importante pois permite um tratamento eficaz, que pode retardar ou evitar manifestações neurológicas irreversíveis, permitindo que o portador da deficiência permaneça com um quadro clínico estável e até condições de vida normais.

Na maioria dos casos, o diagnóstico de AG I é embasado no aumento dos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico (3-OH-GA) na urina dos pacientes. A identificação destes ácidos é feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A presença do ácido 3-hidroxi glutárico é fundamental para diferenciar a acidemia glutárica tipo I da acidemia glutárica tipo II e de outras acidemias, pois este metabólito só está presente na urina e líquidos biológicos dos pacientes afetados pela AG I (Bennett *et alli*, 1991). Este diagnóstico discriminativo pode ser conseguido pela determinação do 3-hidroxi glutárico por um ensaio de diluição do isótopo estável na urina (Hoffmann e Zschocke, 1999).

Um número crescente de pacientes com AG I com elevações leves ou intermitentes, bem como excreções normais de ácido glutárico têm sido identificadas (Bergman *et alli*, 1989; Campistol *et alli*, 1992; Merinero *et alli*, 1995; Hoffmann *et alli*, 1996). Como este grupo de pacientes não é detectada pela análise regular de ácidos orgânicos, sua exata percentagem dentre os demais pacientes com AG I é desconhecida. Para estes casos, a atividade da enzima glutaril-coA desidrogenase em fibroblastos (ou leucócitos) deve ser medida sempre que a condição for fortemente suspeita por achados clínicos e/ou neuroradiológicos (Scriver *et alli*, 2001).

A medida da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase pode ser feita pela medida da descarboxilação de (1,5-<sup>14</sup>C) Glutaril-CoA (Goodman *et alli*, 1975) ou pela liberação de trício de (2,3,4-<sup>3</sup>H) glutaril-CoA em fibroblastos (Hyman e Tanaka, 1984).

A severidade dos sintomas nem sempre está correlacionada com a atividade residual da enzima. Há um relato de correlação entre genótipo e fenótipo bioquímico em que mutações específicas com significativa atividade residual da enzima podem estar associadas com baixa excreção de metabólitos em pacientes heterozigotos que expressam uma severa mutação em um dos alelos (Christensen *et alli*, 1997); no entanto, nenhuma correlação adequada entre genótipo e fenótipo clínico foi encontrada, de forma que a determinação da mutação alterada não orienta o prognóstico dos pacientes afetados (Goodmann *et alli*, 1998; Hoffmann e Zschocke, 1999).

Elevações de glutarilcarnitina identificadas em fluidos corporais dos pacientes com AG I podem ser detectadas através da análise de acilcarnitina em sangue usando bombardeamento rápido de átomos associado à espectrometria de massa (MS/MS Tandem) (Ziadeh *et alli*, 1994). Esta tecnologia aplicada a sangue seco impregnado em cartões de filtro tem sido implementada em programas de triagem neonatal; todavia, convém enfatizar que o diagnóstico específico para a detecção de AG I por análises de acilcarnitinas em pacientes com achados bioquímicos atípicos é inferior à análise quantitativa de 3-OH-glutárico na urina (Hoffmann & Zschocke, 1999). Pacientes com níveis normais de ácido glutárico também tendem a ter níveis normais de glutarilcarnitina (Baric, 1997<sup>b</sup>).

Atualmente, apesar da análise de ácidos orgânicos na urina ser fundamental para o diagnóstico de AGI, a análise enzimática de glutaril-CoA desidrogenase ou a análise de mutações são os métodos para estabelecer o diagnóstico de AG I com certeza (tabela I.1).

**Tabela I.1\*:** Sensibilidade de marcadores diagnósticos em acidemia glutárica tipo I

Tipo de ensaio	% de sensibilidade
Ensaio de glutaril-CoA desidrogenase	≥ 99%
Análises de mutação	≥ 99%
Quantificação do ácido 3-OH glutárico	≥ 98%
Análise de acilcarnitina	≥ 97%
Quantificação do ácido glutárico	> 95%

\* **Fonte: Hoffmann & Zschocke, 1999.**

### **I.1.4.1.3 – Neuropatologia**

A acidemia glutárica tipo I pode ser vista como uma síndrome de malformação cerebral tanto quanto uma desordem metabólica. O prejuízo no desenvolvimento do SNC já se inicia no útero e em excepcionais pacientes resulta nas principais malformações (ver tabela I.2). Após a trigésima semana de gestação, a maior parte das crianças afetadas mostra desenvolvimento de cabeça hidrocefálica e são freqüentemente macrocefálicas no nascimento. O desenvolvimento dos lobos frontal e particularmente dos lobos temporais é atrofiado (operculização reduzida ou atrofia frontotemporal) (Hoffmann & Zschocke, 1999). Enquanto o termo atrofia frontotemporal é rotineiramente empregado, ainda é desconhecido se os pequenos lobos temporais são atróficos ou hipoplásticos. Analisando as mudanças temporais neuroradiológicas em pacientes com AG I, Naidu e Moser (45) têm sugerido um mecanismo de edema citotóxico (possivelmente causando macrocefalia) seguido de perda neuronal secundária.

Além disso, achados neuroradiológicos mostram também um alargamento dos espaços subaracnóides da região frontotemporal e uma difusa atenuação da substância branca periventricular (Drigo *et alli*, 1996; Pineda *et alli*, 1998). A

significância clínica do alargamento dos espaços com fluido subdural em crianças com AG I é que estes espaços são atravessados por uma sutil rede de veias, o que as tornam mais propensas a sofrer hemorragias agudas subdurais, incluindo hemorragias após traumas de pequena intensidade na cabeça (Hoffmann & Zschocke, 1999).

---

**Tabela I.2:\*** Patologia cerebral e o curso da doença em pacientes com AG I

---

### **Patologia pré-natal**

Macrocefalia (comum)

Distúrbio no desenvolvimento dos lobos frontal e temporais (comum)

Agenesia do corpo caloso (raro)

Hipoplasia ótica (raro)

### **Patologia infantil**

Perda de mielinização

Hematomas crônicos

Necrose estriatal periaguda combinada com variáveis hipotalâmicas e perda neuronal frontal

Injúria da substância branca

### **Fase pré-escolar**

Lento e progressivo dano da substância branca

Lesões hipotalâmicas progressivas

### **Idade escolar e adolescência**

Lesões cerebrais estáveis e sintomas neurológicos

---

**\*fonte: Hoffmann & Zschocke, 1999.**

Exames de tomografia computadorizada (TC) são usualmente anormais, mostrando dilatação dos ventrículos laterais e aumento do sulco cortical



freqüentemente observados nos primeiros dias do início dos sintomas neurológicos (Dunger e Snodgrass, 1984; Stutchfield *et alli*, 1985)

Os núcleos da base, além dos lobos temporais e frontal, são as estruturas mais afetadas e que, quando atingidas, causam permanente desestabilidade motora nos pacientes, com distonia e discinesia. Esta injúria ocorre tipicamente entre os 6 e 18 meses de vida, seguindo-se às causas encefalopáticas (Kölker *et alli*, 2000). Esses pacientes apresentam perda neuronal severa, fibrose dos núcleos do caudado e putâmen e degeneração do globo pálido.

Sucedendo o dano nos gânglios da base, os pacientes seguem um curso pseudoestacionário da doença. Através dos anos que seguem, eles freqüentemente sofrem lento envolvimento progressivo da substância branca e das estruturas cerebrais, com regressão na freqüência de episódios encefalopáticos adicionais, principalmente associados com eventos catabólicos. O intelecto é inicialmente poupado mas pode tornar-se progressivamente diminuído. Sinais do trato piramidal e espasticidade também podem ocorrer. Dificuldades na deambulação e distúrbios do controle da temperatura corporal são as principais seqüelas, podendo os pacientes sucumbir para crises hiperpirécicas (Hoffmann e Zschocke, 1999).

As concentrações do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) apresentam-se extremamente baixas no caudado (0,60  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco, normal=3,03  $\mu\text{mol/g}$ ) e também no putâmen (0,87  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco, normal = 5,69  $\mu\text{mol/g}$ ), e a atividade da enzima responsável pela biossíntese de GABA (glutamato descarboxilase) encontra-se diminuída nestes tecidos (Leibel *et alli*, 1980).

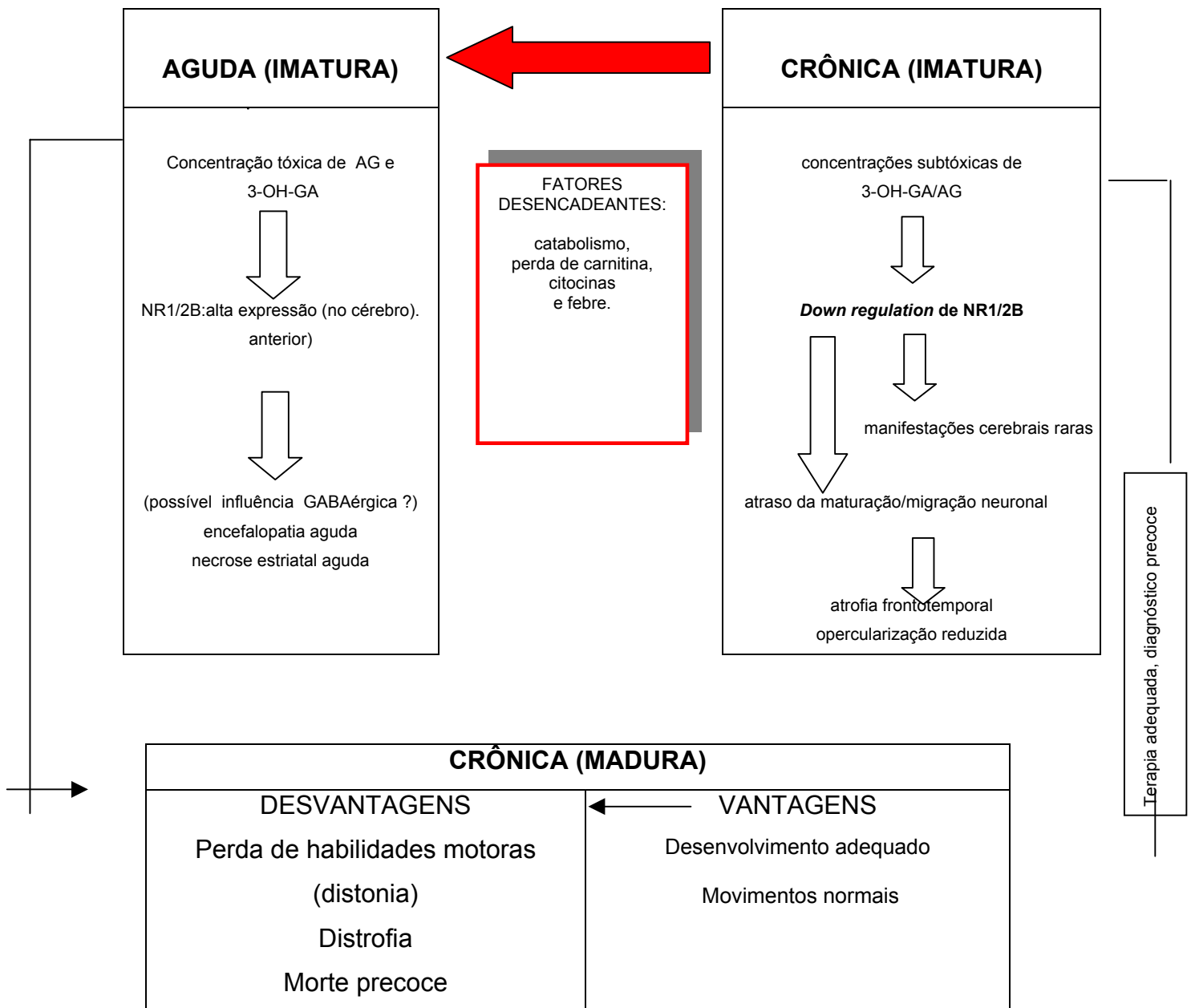
#### **I.1.4.1.4 – Fisiopatogenia**

A atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase varia de 0 a 10% da atividade normal nos tecidos dos pacientes afetados por AG I, incluindo fibroblastos cultivados, aminiócitos, leucócitos periféricos, fígado, rins e cérebro.

O grau de deficiência na atividade da enzima nem sempre está correlacionado com a severidade dos sintomas, possivelmente porque o número e a severidade das doenças intercorrentes, bem como a quantidade de proteínas na dieta, possuem fundamental papel na patogenia da doença.

A causa da disfunção estriatal e degeneração neuronal, principalmente dos gânglios da base, permanece desconhecida. Entretanto, foi demonstrado que o ácido glutárico é tóxico em cultura de células estriatais (Whetsell, 1984).

Kölker e colegas (2000<sup>a</sup>) atribuem a neuropatologia da AGI ao efeito neurotóxico dos principais metabólitos acumulados na doença- ácidos glutárico e 3-OH-glutárico- principalmente através da ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA. Estes ácidos orgânicos agiriam como excitotoxinas especificamente estimulando as subunidades NR1/NR2B dos receptores NMDA. Além disso, a extensão da neurotoxicidade induzida seria dependente da expressão destas subunidades durante a maturação neuronal ao longo do desenvolvimento. Estes estudos concordam com a hipótese que a doença neuronal observada na AG I pode ocorrer por alta expressão dos receptores NR1/NR2B no cérebro anterior (córtex e estriado) durante um específico e vulnerável período do desenvolvimento cerebral (Standaert *et alli*, 1994; Kosinski *et alli*, 1998; Stocca Di vicini, 1998) (figura I.3).



**Figura I.3\*:** Modelo dinâmico de três estados da AG I. AGI: acidemia glutárica tipo I; AG: ácido glutárico; 3-OH-GA: ácido 3-hidroxi-glutárico. (\*adaptado de Kölker *et al*, 2000 <sup>(b)</sup>).

A figura mostra que a alta expressão de receptores NR1/2B e concentrações tóxicas de 3-OH-GA ou AG são as condições necessárias para a indução de crises encefalopáticas agudas na AG I (aguda, imatura). Concentrações subtóxicas de 3-OH-GA ou AG não causam uma doença excitotóxica mas um *down-regulation* dos receptores NR1/2B *in vitro*, o qual é

suposto induzir um atraso na maturação neuronal (Komuro,1993; Resink,1996; Herkert,1998) (crônica, imatura). Vários fatores exógenos e endógenos podem precipitar crises encefalopáticas agudas (Kölker,1999). Após 5-6 anos de vida, nenhuma crise encefalopática aguda ocorre no cérebro maduro dominado pelos receptores do subtipo NR2A (crônica, madura). Apenas aquelas crianças que são diagnosticadas precocemente e que são tratadas adequadamente têm uma boa chance de desenvolver-se normalmente (Kölker *et alli*, 2000<sup>(b)</sup>).

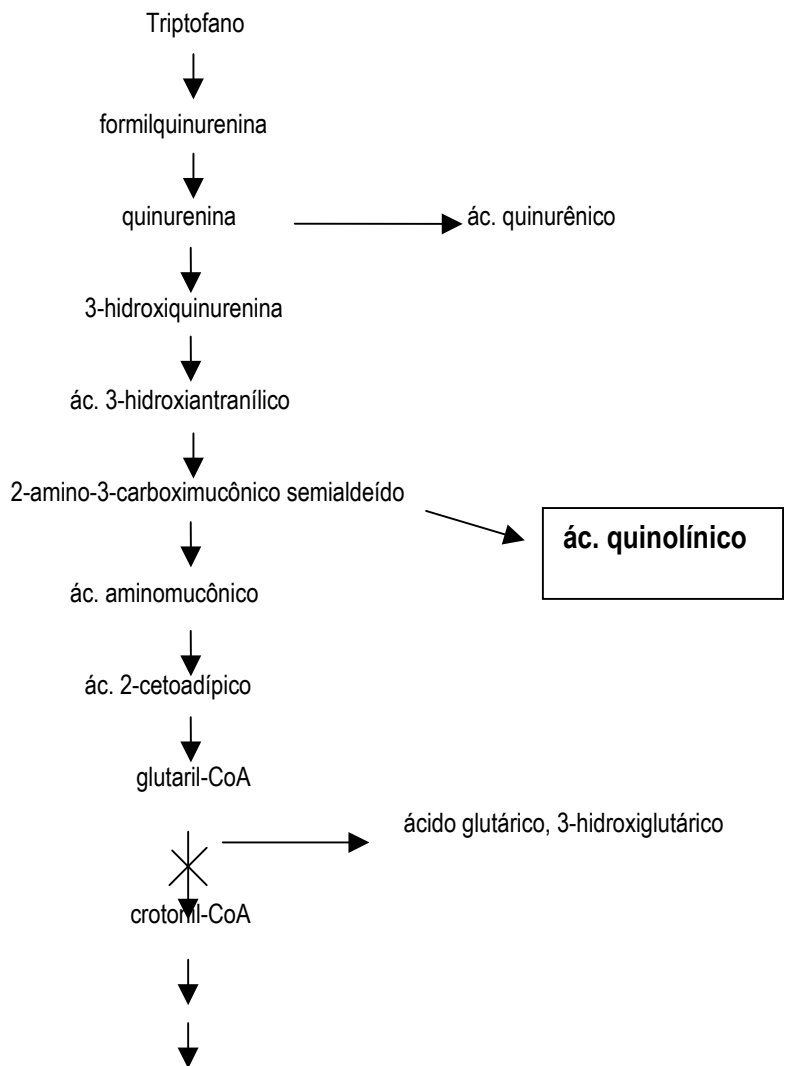
Outros mecanismos excitotóxicos podem provavelmente levar à degeneração neuronal em AG I, como a inibição da captação de glutamato por sinaptossomas causado pelo ácido glutárico (Bennett *et alli*, 1973; Porciúncula *et alli*, 1999), bem como a inibição competitiva da glutamato descarboxilase (GAD), enzima responsável pela biossíntese do ácido  $\delta$ -aminobutírico (GABA), causada pelos ácidos glutárico, 3-OH-glutárico e ácido glutacônico (Stokke *et alli*, 1976). Essas alterações podem resultar em um aumento nos níveis de glutamato na fenda sináptica e diminuição dos níveis de GABA, possivelmente levando a excitotoxicidade. Neste particular, convém enfatizar que concentrações reduzidas de GABA foram detectadas nos gânglios da base de pacientes afetados por AGI (Leibel *et alli*, 1980).

Apenas recentemente foi demonstrado que os processos axonais são enriquecidos de subunidades NR2B em cérebro de ratos neonatais , (Herkert *et alli*, 1998), fortalecendo a teoria de Kölker e colaboradores (2000).

Em outro estudo, Lima e colegas (1998) demonstraram propriedades convulsivantes do ácido glutárico (AG) em ratos adultos via mecanismo glutamatérgico não-NMDA e GABAérgicos. Esses investigadores observaram que a administração intraestriatal de AG em ratos induziu comportamento rotacional contralateral e convulsões clônicas de uma maneira dose-dependente. O comportamento rotacional foi prevenido por pré-administração intraestriatal de

DNQX (antagonista não-NMDA) e muscimol (6,7-diaitroquinoxalina-2,3-diona) (agonista GABAérgico), mas não por MK-801 (maleato de dizocilpine) (antagonista de NMDA).

Heyes (1987) propôs o envolvimento do ácido quinolínico na neurodegeneração encontrada na AG I. O ácido quinolínico é um intermediário formado no metabolismo do triptofano cerebral (Figura I.4). Esse ácido mostrou ser uma potente neurotoxina quando injetado no sistema nervoso central de animais (Schwarcz *et alli*, 1983). Enfatiza-se que os ácidos caínico e quinolínico são tóxicos em culturas de células córtico-estriatais somente quando as sinapses já estão bem estabelecidas (Whetsell & Schwarcz, 1983), diferentemente do ácido glutárico que causa neurodegeneração antes desse evento (Whetsell, 1984).



**Figura I.4:** Rota metabólica proposta para a formação do ácido quinolínico na degradação do triptofano.(Fonte: Heyes, 1987).

### **I.1.4.1.5 – Tratamento**

O tratamento inicial dos pacientes com AGI baseia-se na restrição de lisina, hidroxilisina e triptofano da dieta e administração de L-carnitina e riboflavina. Além disso, o tratamento nas crises agudas, após as infecções, consiste na administração de líquidos para evitar desidratação, ingesta hipercalórica devido catabolismo e outras medidas gerais. A administração de insulina, glicose e bicarbonato também pode prevenir ou diminuir o dano estriatal durante estes episódios, por inibir o catabolismo e a acidose severa.

Devido à inibição da glutamato descarboxilase neuronal e às baixas concentrações de GABA nos gânglios da base dos pacientes (Leibel *et alli*, 1980), apregoa-se o tratamento com agentes farmacológicos como o baclofen, o ácido valpróico e a vigabatrina que elevam as concentrações de GABA. Os efeitos deste tratamento medicamentoso são muito heterogêneos pois alguns pacientes não respondem ao tratamento com baclofen (Bennett *et alli*, 1986), enquanto outros apresentam uma certa melhora (Brandt *et alli*, 1979). O baclofen inicialmente era considerado um ativador de receptores GABAérgicos, mas outros estudos demonstraram que ocorre a ativação de neurônios que normalmente são inibidos pelo neurotransmissor GABA (Davidoff *et alli*, 1974; Fukuda *et alli*, 1977).

O tratamento com o ácido valpróico tem sido aplicado em alguns pacientes, desde que este composto causa aumento seletivo de GABA nas sinapses pela inibição da GABA transaminase ou semialdeído succinil desidrogenase (enzimas que metabolizam o GABA), ou ainda pela inibição da captação de GABA pelas células gliais e terminais nervosos. Algum progresso foi observado com este tratamento (Stutchfield *et alli*, 1985). Enfatiza-se no entanto que, se o dano

estriatal se estabelecer após uma ou mais crises encefalopáticas, o tratamento posterior poderá ser insatisfatório. Daí o importante na AGI de prevenir a instalação das crises encefalopáticas.

## **I.2 - O sistema glutamatérgico**

### **I.2.1. O glutamato**

A ação excitatória do glutamato em cérebro de mamíferos é conhecida desde meados de 1950 (Curtis & Watkins, 1960; Hayashi, 1952), mas foi na metade da década de setenta que ele tornou-se amplamente reconhecido como o principal aminoácido excitatório do sistema nervoso de vertebrados (Curtis e Johnston, 1974; Fonnum e Walaas, 1978; Fonnum *et alli*, 1981; Roberts *et alli*, 1981).

O glutamato é portanto o principal neurotransmissor excitatório no cérebro e suas interações com receptores de membrana específicos são responsáveis por muitas funções, incluindo: cognição, memória, movimento, aprendizado e formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Gasic e Hollmann, 1992; Ozawa *et alli*, 1997). Da mesma forma, influencia mudanças de plasticidade durante conexões sinápticas no sistema nervoso (Lipton e Kater, 1989).

O glutamato é também importante na síntese de proteínas e peptídeos, incluindo a glutationa (Meister, 1979).

Responsável por respostas excitatórias pós-sinápticas em diversas regiões cerebrais, o glutamato também produz alterações de longa duração na excitabilidade neuronal com a indução de potenciação de longa duração (LTP) na transmissão sináptica em neurônios do hipocampo e do córtex visual e na depressão de longa duração (LTD) no cerebelo e córtex visual (Artola & Singer, 1987; Ito, 1989). Todavia, a excessiva ativação de receptores de glutamato tem sido associada com a fisiopatogenia de injúria por hipóxia, hipoglicemia,

trauma, epilepsia e doenças neurodegenerativas. Existe uma forte associação entre injúria e excessiva ativação de receptores NMDA, os quais condicionam a entrada aumentada de cálcio nos neurônios (Kristian e Siesjo, 1998).

## **I.2.2 – Glutamato x excitotoxicidade**

O conceito clássico de excitotoxicidade refere-se à propriedade paradoxal compartilhada pelo glutamato e outros aminoácidos excitatórios análogos (EAA) de causar degeneração neuronal aguda por excessiva estimulação de receptores ionotrópicos pós-sinápticos (Olney, 1994).

O termo excitotoxicidade foi inicialmente usado para descrever morte neuronal provocada por administração de concentrações muito elevadas de glutamato exógeno ou compostos com ações agonísticas (ácido kaínico), agindo sobre receptores de glutamato (Olney e Ho, 1970; Olney, 1981). Subseqüentemente, como foi descoberto que antagonistas de receptor de glutamato podem ter efeitos benéficos em modelos de desordens neurológicas como epilepsia e isquemia (Bradford, 1995; Meldrum e Garthwaite, 1994), a noção de excitotoxicidade foi ampliada para neurotoxicidade mediada por glutamato endógeno, cujo potencial excitotóxico deve-se ao seu acúmulo no espaço extracelular (Obrenovitch *et alli*, 2000).

A concentração de glutamato na fenda sináptica é certamente uma determinante crítica na excitotoxicidade endógena, porque este é o compartimento onde o glutamato interage com seus receptores e a injúria neuronal excitotóxica é pensada resultar da excessiva abertura de canais de cátions operados por glutamato, ou ainda excessiva ativação de receptores metabotrópicos.

A transmissão sináptica pode ser interrompida pela combinação de recaptação de glutamato, sua difusão para fora da fenda sináptica e



dessensibilização dos receptores (Clements *et alli*, 1992; Glavinovic e Rabie, 1998).

Sob condições experimentais ou patológicas, a liberação (ou exocitose) do glutamato pode estar aumentada e/ou sua recaptação reduzida. Convém salientar, no entanto, que mudanças na concentração extracelular de glutamato não refletem necessariamente mudanças ao nível da fenda sináptica e vice-versa (Obrenovitch *et alli*, 2000).

Olney (1980) mostrou que injeções intracerebrais de aminoácidos excitatórios induziram, agudamente, lesões caracterizadas por massivo edema celular e vacuolação do citoplasma, expansão mitocondrial, enchimento dendrítico e acúmulo de cromatina nuclear. Axônios de terminais pré-sinápticos e células não neuronais foram poupados.

De forma resumida, é proposto um mecanismo para a excitotoxicidade aguda o qual postula que em uma fase preliminar de ativação da célula, há uma entrada massiva de sódio que ocorre dentro de minutos após a exposição ao glutamato. Esta etapa é seguida pelo influxo passivo de íons cloreto e água, os quais produzem edema osmótico (Rothman, 1992). Esta fase inicial é parcialmente reversível e denominada neurodegeneração precoce. Em uma segunda fase, a concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) livre aumenta devido o influxo de cálcio e liberação dos estoques intracelulares. Este aumento parece ser uma fase crucial, embora os eventos subsequentes que levam à morte celular sejam ainda pouco conhecidos.

A ativação de proteases dependentes de cálcio, bem como de lipases, nucleases e outras enzimas de degradação, podem ser um importante mecanismo de morte neuronal (Lee *et alli*, 1991; Manev *et alli*, 1991; Choi & Rothman, 1990) (figura I.5)

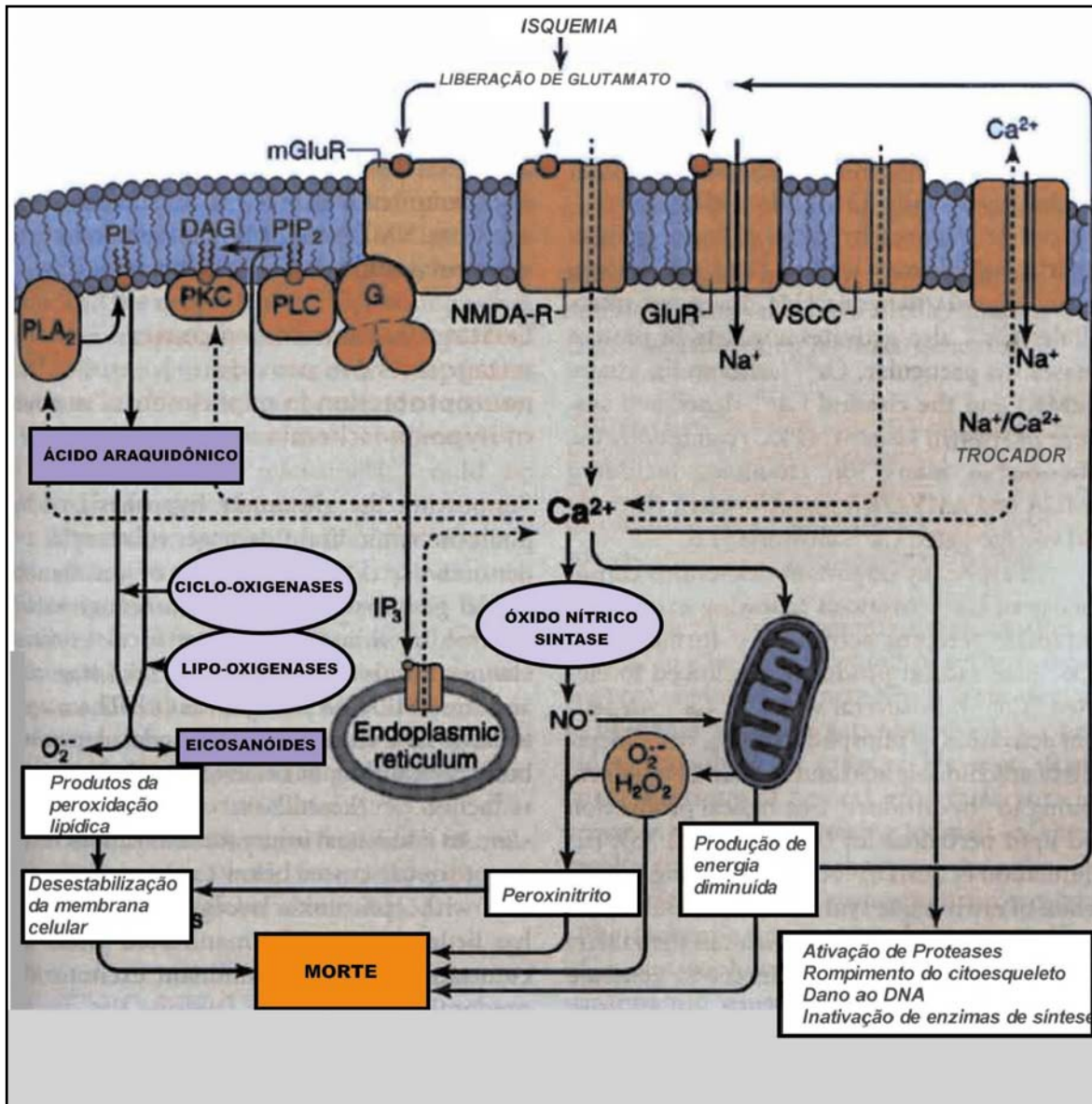
A ativação de fosfolipase A<sub>2</sub> gera a formação de ácido araquidônico, de seus metabólitos e do fator de ativação de plaquetas (PAF). O PAF aumenta os níveis de cálcio neuronal, aparentemente por estimular a liberação de glutamato (Clark *et alli*, 1992; Bito *et alli*, 1992).

O ácido araquidônico potencializa as correntes evocadas por ativação de receptores NMDA (Miller *et alli*, 1992) e inibe a recaptação de glutamato pelos neurônios e astrócitos, potencializando a situação de dano neuronal (Volterra *et alli*, 1992).

A disfunção mitocondrial ou a desorganização do citoesqueleto também pode ser causada pelo aumento nos níveis de cálcio intracitoplasmático (Orrenius e Nicoreta, 1994; Saito *et alli*, 1993).

Há claras evidências que mudanças degenerativas agudas seguidas de *status* epiléptico, hipoglicemia e isquemia cerebral possam parcialmente resultar na liberação endógena de aminoácidos excitatórios ativando receptores NMDA e não-NMDA (Choi & Rothman, 1990; Kaku *et alli*, 1991, Meldrum & Garthwaite, 1990; Mosinger *et alli*, 1991).

Vários relatos evidenciam a hipótese de que a doença neuronal induzida por depleção energética da célula desenvolve-se por um mecanismo que inclui ativação de receptores de glutamato (excitotoxicidade secundária). Henneberry e colegas (1989) sugerem em um trabalho *in vitro* que o déficit energético celular leva à uma ativação de canais NMDA por uma redução no potencial de membrana em repouso; isto induziria a liberação de magnésio dos canais voltagem-dependentes e permitiria a entrada de íons persistentemente pela célula.



**Figura 1.5.** Diagrama simplificado ilustrando algumas vias que possivelmente contribuem para o dano neuronal excitotóxico. mGluR, receptor de glutamato (Glu) metabotrópico; NMDA-R, receptor N-metil-D-aspartato; GluR, receptor de Glu do tipo AMPA/Cainato; PL, fosfolípidos; PLA<sub>2</sub>, fosfolipase A<sub>2</sub>; DAG, diacilglicerol; PLC, fosfolipase C; PKC, proteína quinase C; G, proteína G; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; NO<sup>•</sup>, óxido nítrico; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio; VSCC, canal de cálcio voltagem-dependente. Adaptado de Siegel *et alii*, 1999.

Outro possível mecanismo proposto para a injúria neuronal decorrente do déficit energético é a atividade reversa de transportadores de glutamato à falência da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Nesta situação, há um aumento na concentração intracelular de sódio que leva a uma despolarização da membrana e conseqüente liberação de glutamato (Lipton & Rosemberg, 1994).

Estudos eletrofisiológicos mostraram que perante um déficit energético celular, causado por inibição da fosforilação oxidativa pelo ácido 3-nitropropiónico (potente toxina mitocondrial), uma hiperpolarização temporária, devido à ativação de canais de potássio sensitivos ao ATP, é seguida de despolarização da membrana celular (Riepe *et alli*, 1992).

O estresse oxidativo é também pensado ser um importante fator na neurotoxicidade do glutamato através da geração de radicais livres que interferem na maioria dos processos celulares (Dykens *et ali*, 1987, Dawson *et alil* , 1991, Coyle & Puttfarcken, 1993, Lipton *et alil*, 1993)

As espécies reativas de oxigênio podem ser formadas durante o metabolismo do ácido araquidônico (Lafon-Cazal *et alli*, 1993), favorecendo ativação de fosfolipase  $A_2$ ; esta, quando ativada, produz mais ácido araquidônico gerando um mecanismo de retroalimentação positiva (Chan & Fishman, 1985).

Visto que o acúmulo de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na mitocôndria desacopla a transferência de elétrons da síntese de ATP (Bernardi *et al*,1994) e considerando que o prejuízo do metabolismo energético aumenta a produção de radicais livres, a mitocôndria emerge como uma plausível ligação entre a elevação de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e a neurotoxicidade do glutamato, permitindo considerar a disfunção desta organela como um evento fundamental no mecanismo excitotóxico glutamatérgico. Para isto, Shinder e colegas (1996) mostraram que a mitocôndria está envolvida no seqüestro de cálcio durante um insulto excitotóxico e que esta entrada de cálcio induz uma despolarização mitocondrial

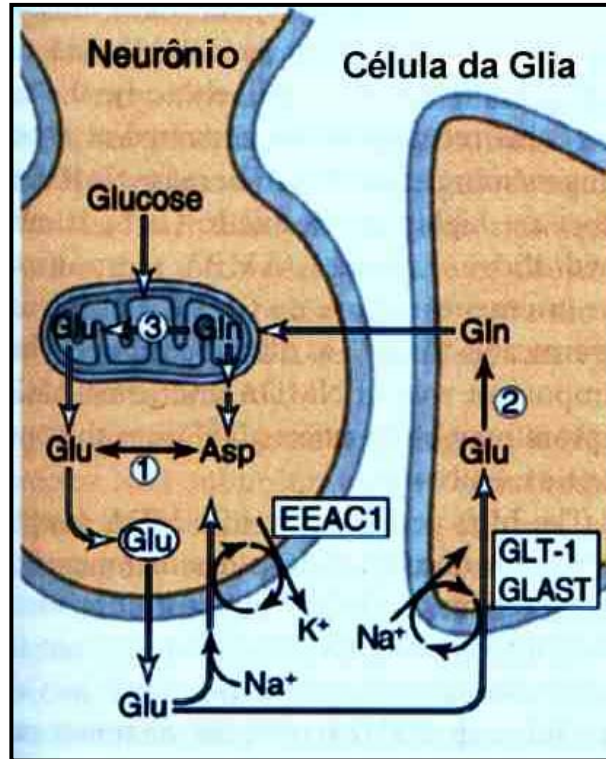
sustentada que induz morte neuronal (figura I.5). Todavia, a ponte completa entre a elevação de cálcio intracelular, radicais livres e morte neuronal permanece em discussão (Choi, 1995).

### **I.2.3 – Ciclo glutamato–glutamina**

O ciclo glutamato-glutamina é central no entendimento do metabolismo cerebral do glutamato. O ciclo inicia-se com a liberação de glutamato pré-sináptico para a fenda, um processo dependente da entrada de cálcio, que envolve a fusão de vesículas pré-sinápticas contendo o glutamato com a membrana neuronal (Fillenz, 1995) (fig I.6).

A concentração do glutamato na fenda sináptica é de 2-5 $\mu$ mol/L. Todavia, este valor pode alcançar mais de 50 a 100  $\mu$ mol/L após a despolarização neuronal (Daiklin & Yudkoff, 2000).

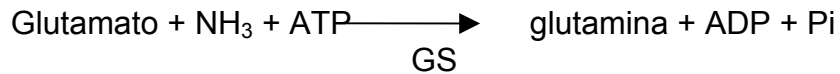
O glutamato presente na fenda sináptica deve ser removido rapidamente a fim evitar um processo excitotóxico. Há três possibilidades: 1) captação no compartimento pós-sináptico; 2) recaptção para o compartimento pré-sináptico (menos significativo nos últimos anos); 3) captação pela glia – compartimento não-neuronal – mais precisamente pelos astrócitos. Este último é o mecanismo mais representativo da remoção do glutamato da fenda (Danbolt, 1994; Gegelashvili & Schousbor, 1998; Takahashi *et alli*, 1997; Swanson *et alli*, 2000; Danbolt, 2001). Uma possível explicação para isto, é o fato de o potencial de membrana dos astrócitos ser mais baixo do que o de neurônios (Erecinska & Silver, 1990) favorecendo uma eficiente captação de glutamato via um mecanismo sódio-dependente.



**Figura I.6.** Ciclo glutamato-glutamina nas estruturas sinápticas. O glutamato é sintetizado e estocado em altas concentrações nas vesículas sinápticas dos terminais nervosos. A síntese do *pool* de glutamato (Glu) parece envolver duas principais vias: a conversão de glutamina para glutamato (3) dentro do compartimento mitocondrial e a formação do Glu por transaminação (1). Após a liberação de glutamato do terminal nervoso para a fenda sináptica, ele é captado pelas células gliais através do transportador de glutamato-1 (GLT1) e do transportador de glutamato-aspartato (GLAST) e dentro destas células é convertido a glutamina (Gln) (2). A Gln então entra nos neurônios como um precursor de Glu. De forma menos representativa, alguns terminais nervosos glutamatérgicos contêm o carreador de aminoácidos excitatórios -1 (EAAC1), que recapta diretamente o Glu. Adaptado de Siegel *et alii*, 1999.

Dentro dos astrócitos, o glutamato pode seguir a via que o exporta para os capilares sanguíneos (Brightman & Cheng-Tao, 1988). A desvantagem desta via é que ela resulta em uma perda líquida de carbono e nitrogênio do sistema. Também pode entrar no Ciclo de Krebs através de seu  $\alpha$ -cetoácido ( $\alpha$ -cetogluturato) para servir como fonte de energia. Alternativamente, o glutamato pode ser convertido em um outro composto não neuroativo, que permita seu tráfego através do fluido extracelular sem causar uma despolarização neuronal. O

glutamato captado pelos astrócitos é desta forma convertido a glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase (GS).



Como a reação catalisada pela GS envolve amidação do glutamato, a captação deste do meio extracelular é um evento importante para detoxificação da amônia, podendo a inibição da GS produzir convulsões generalizadas por excesso de amônia (Cooper e Plum, 1987).

A amônia que é consumida para gerar glutamina pode ser derivada tanto do sangue (Cooper *et alli*, 1979) como do metabolismo cerebral.

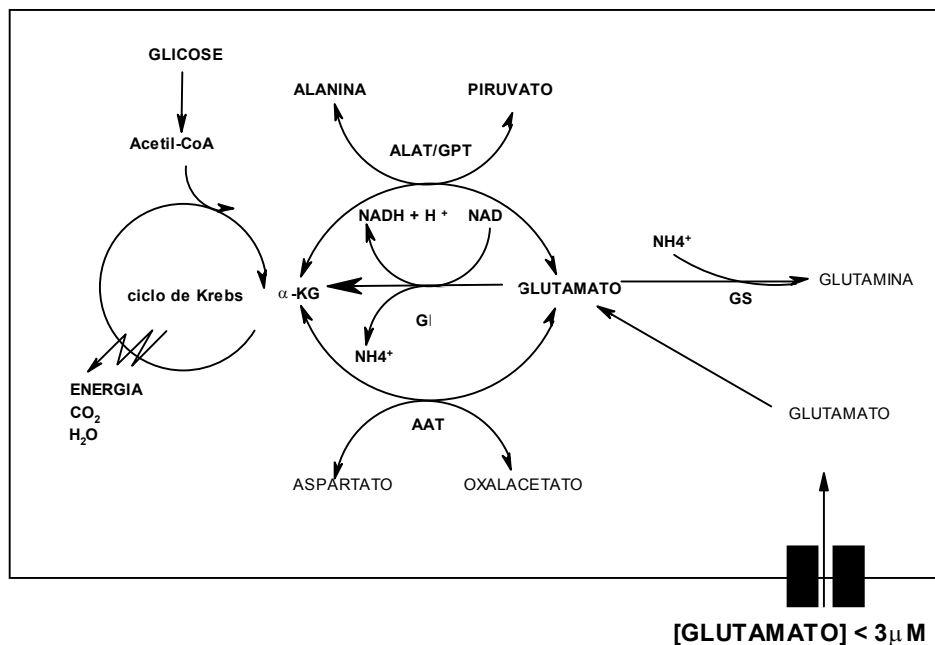
Os níveis de glutamina cerebral podem aumentar abruptamente em estados hiperamonêmicos, levando ao edema da glia (Takahashi *et alli*, 1991). Alguns autores sugerem que o aumento da glutamina aumentaria a osmolaridade intracelular e conseqüentemente geraria um influxo de água (Brusilow e Traystman, 1986).

Na glia, a entrada do glutamato captado na via oxidativa (via transaminação) ou na via de síntese de glutamina dependerá da concentração do glutamato externo. Logo, em baixas concentrações externas de glutamato, a via da glutamina sintetase é favorecida, mas quando estas concentrações estão elevadas, o processo oxidativo é favorecido, com quantidades consideráveis de glutamato sendo consumido (Mckenna *et alli*, 1996) (figura I.7).

A glutamina é captada tanto via mecanismo sódio-dependente como via sódio independente (Yudkoff *et alli*, 1989). Durante a despolarização, quando a

concentração interna de ATP diminui, a captação de glutamina nos terminais nervosos é aumentada (Erecinska *et alli*, 1990).

O destino predominante da glutamina recaptada pelos neurônios é sua hidrólise a glutamato e amônia pela ação da enzima mitocondrial glutaminase, que é dependente de fosfato. Conforme relatam Erecinska e colegas (1988, 1990), o glutamato derivado da glutamina não é todo utilizado para repor o *pool* do neurotransmissor. Uma parte deste glutamato pode ser oxidada nos terminais nervosos por transaminação para 2-oxoglutarato, via aspartato aminotransferase, e este substrato entrar no ciclo do ácido tricarboxílico. Desta forma, além de um simples precursor do glutamato neuronal, a glutamina é um potencial combustível que, como a glicose, suporta o requerimento energético cerebral.



**Figura I.7:** Destino metabólico do glutamato captado pelos astrócitos. ALAT, alanina aminotransferase; GDH, glutamato desidrogenase; GS, glutamina sintetase; AAT, aspartato aminotransferase; GPT, glutamato desidrogenase;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cetoglutarato. (Fonte: Magistretti, 1999).



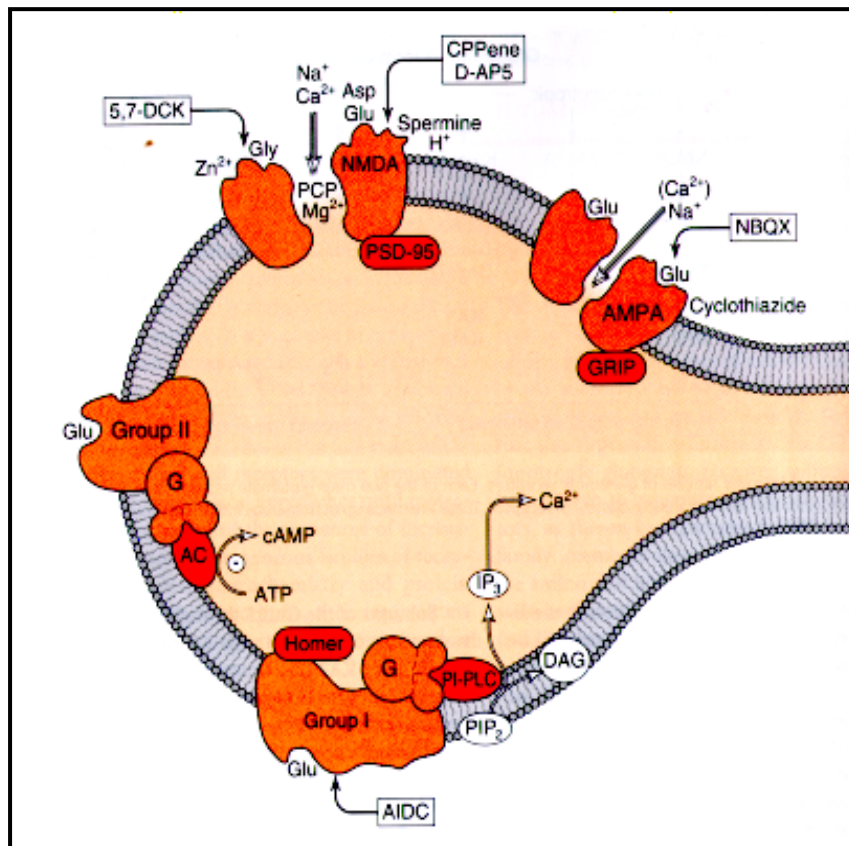
## I.2.4. Receptores de glutamato

O glutamato possui diversas funções provavelmente refletidas na existência de uma variedade de receptores, classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e funcionais.

Os receptores de glutamato (GLURs) medeiam a maioria das neurotransmissões sinápticas no sistema nervoso central de mamíferos e, por consequência, são extensivamente estudados nos últimos anos (Steinhäuser & Gallom, 1996).

Os GLURs estão caracterizados dentro de duas distintas classes, os receptores ionotrópicos e os metabotrópicos, de acordo com suas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas (Nakanishi, 1992; Hollmann e Heinemann, 1994; Danbolt, 2001).

Os receptores ionotrópicos (iGLURs) são canais iônicos que permitem a passagem de cátions específicos quando ativados e são subdivididos em três grupos: receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e cainato (receptores não-NMDA) e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Por outro lado, os receptores metabotrópicos (mGLURs) estão acoplados a proteínas ancoradas ao GTP (proteínas-G) e dirigem a produção de mensageiros intracelulares que modulam cascatas de transdução de sinal celular (Conn e Pin, 1997; Osawa *et alli*, 1998) (Figura I.8).



**Fig I.8.** Representação de receptores ionotrópicos (NMDA e AMPA) e receptores metabotrópicos (grupo I e II). PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; IP<sub>3</sub>: inositol-1,4,5-trifosfato; DAG: diacilglicerol; PSD-95, GRIP e Homer: proteínas citoplasmáticas; 5,7-DCK: ácido 5,7-diclorokinurenico; CPPene: ácido 3-(2-carboxipiperazina-4-yl)1-propenyl-1-fosfórico; DAP<sub>5</sub>: ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico; NBQX: 6-nitro-7-sulfamobenzol(f)quinoxalina-2,3-diona.; Gly: glicina; PCP: fenciclidina; cAMP: adenosil monofosfato cíclico; AC: adenilato ciclase; AIDC: 1-aminoindan-1,5-dicarboxilato (antagonista competitivo de mGluR1); PI-PLC: fosfolipase C específica a fosfoinositida. Fonte: Siegel *et alli*, 1999.

### I.2.4.1. Receptores Ionotrópicos

A clonagem molecular e estudos de expressão têm revelado que a diversidade de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGLuRs) é bem maior do que a esperada por estudos de eletrofisiologia e farmacologia (Osawa *et al*,1998).

A aplicação de tecnologia de clonagem molecular possibilitou a clonagem de várias subunidades de receptores glutamatérgicos que então foram

subdivididos conforme sua homologia: quatro subunidades para receptores AMPA (GLuR1, GLuR2, GLuR3 e GLuR4); cinco subunidades para receptores Cainato (GluR5, GLuR6, GLuR7, KA1 e KA2) e cinco subunidades para receptores NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D). (Tabela I.3)

A abertura dos canais de cátions de receptores ionotrópicos, após sua ativação, gera influxo de sódio, efluxo de potássio, despolarização da membrana e/ou influxo de cálcio, dependendo da composição de subunidades.

A ativação de subunidades AMPA resulta em uma rápida despolarização de rápida dessensibilização, enquanto ativação de receptores Cainato produz uma resposta longa e tardia não dessensibilizada. (Jabs *et al*, 1994).

**Tabela I.3\*:** Características dos subtipos de receptores de glutamato

receptor	Mecanismo	Acoplamento	Agonistas	Antagonistas	
ionotrópicos	AMPA (GLuR1/2/3/4)	Abertura de canal catiônico Influxo de sódio Influxo de cálcio (baixo) Despolarização da membrana Dessensibilização rápida	Canal iônico com sítio ligante	AMPA Quisqualato (QA)	CNQX DNQX
	Cainato (GLuR5/6/7/KA1/KA2)	Abertura de canal catiônico Influxo de cálcio Não-dessensibilizante Despolarização da membrana	Canal iônico com sítio ligante	Ácido caínico Acido domóico	CNQX DNQX
	NMDA (NR1/NR2A/B/C/D/NR3A)	Abertura de canal iônico Influxo de cálcio	Canal iônico com sítio ligante	NMDA Cis-ACBD	D-AP5 MK-801 CNQX
metabotrópicos	mGLuR I (1/5)	Ativação de PLC mediada por IP <sub>3</sub> Liberação de cálcio	Proteína-Gq	CHPG (R,S)-3,5-DHPG (1S,3R)ACPD QA	AIDA L-AP3 (S)-4-CPG
	mGLuR II (2/3)	Ação inibitória sobre adenilato ciclase Diminuição na produção de AMPc	Proteína Gi/o	(1S,3R)ACPD DCG-IV (s)-3C4HPG L-CCG-I	EGLU MCCG PCCG-IV
	mGLuR III (4/6/7/8)	Ação inibitória sobre adenilato ciclase Diminuição na produção de AMPc	Proteína Gi/o	L-CCG-I L-AP4 L-SOP	CPPG MSOP MAP4

\*Adaptado de Hansson, 2000.

### I.2.4.1.1. Receptores AMPA

Os receptores AMPA medeiam a neurotransmissão excitatória rápida na maioria das sinapses do SNC. Estes receptores foram inicialmente denominados receptores quisqualato. Todavia, foram renomeados para receptores AMPA desde que o quisqualato foi comprovado agir também em receptores metabotrópicos.

Notáveis diferenças nas propriedades funcionais de receptores AMPA nativos são consequência de diferentes arranjos de suas quatro subunidades (Osawa *et alli*, 1998). Cada uma das quatro subunidades (GLuR1-GLuR4) existe em duas diferentes formas: *flip* e *flop*. Estas formas são produzidas pela quebra diferencial em uma região de 115 pares de bases da molécula (Sommer *et alli*, 1990).

As subunidades do receptor AMPA são expressas predominantemente na forma *flip* em cérebros embrionários. As formas *flop* são expressas em baixos níveis até o oitavo dia pós-natal e gradualmente aumentam, alcançando níveis adultos no 14º dia pós-natal. Desta forma, a neurotransmissão excitatória no adulto parece ser mediada principalmente por receptores AMPA carregando o módulo *flop*. Todavia, tem sido notado que certas populações neuronais (células piramidais da região CA3 do hipocampo) expressam apenas módulos *flip* durante o estágio adulto (Monyer *et alli*, 1991).

Os canais de receptores AMPA são considerados permeáveis apenas ao sódio e ao potássio e quase impermeáveis ao cálcio em neurônios centrais. Apesar destas evidências, Lino e colegas (1990) têm indicado que as propriedades funcionais de receptores recombinantes AMPA dependem de sua composição de subunidades, podendo tipos celulares que expressam a subunidade GLUR2 apresentar alta permeabilidade ao cálcio.

Desde que potentes antagonistas de receptores AMPA tais como NBQX, YM90K e GYKI 52466 previnem a morte neuronal causada por isquemia cerebral,

sugere-se que receptores AMPA possuem um papel ativo nesta e outras patologias do SNC (Sheardown *et alli*, 1990; Le-Peillet *et alli*, 1992; Yatsugi *et alli*, 1996).

Os receptores AMPA têm pelo menos três sítios de união nos quais agonistas ou antagonistas podem agir: sítio de união ao glutamato, sítio de dessensibilização e sítio de união no canal iônico (interno). O sítio de união ao glutamato é o sítio para antagonistas competitivos enquanto um outro grupo de substâncias tais como a toxina JSTX (Joro Spider toxin) e seus análogos ligam-se no terceiro sítio dentro do canal iônico e bloqueiam o fluxo de íons (Osawa *et alli*, 1998).

#### **I.2.4.1.2. Receptores Cainato**

Embora o cainato seja um potente agonista de receptor AMPA, ele também ativa uma classe distinta de iGLUR conhecida como receptores cainato. Estes receptores se dividem em 5 subunidades (GLUR5, GLUR6, GLUR7, KA1 e KA2) sendo que as subunidades GLUR5, GLUR6 e GLUR7 representam o sítio de ligação ao cainato de baixa afinidade ( $K_d \sim 50\text{nM}$ ) enquanto KA1 e KA2 correspondem ao sítio de alta afinidade ( $K_d \sim 5\text{nM}$ ) (Seeburg, 1993; Bettler e Mulle, 1995).

Estes sítios de ligação são abundantes através de todo o SNC, embora algumas áreas cerebrais como a região CA3 hipocampal e a camada granular do cerebelo mostrem marcação mais intensa de ligação de [ $^3\text{H}$ ]-cainato (Foster *et alli*, 1981; Monaghan e Cotman, 1982; Miller *et alli*, 1990).

A localização pré-sináptica destes receptores tem sido sugerida pela marcação com anticorpos contra GLUR5, GLUR6 e GLUR7 em axônios desmielinizados na região CA3 (Represa *et alli*, 1987).

Em contraste com receptores AMPA, os receptores GLUR6 mostram substancial permeabilidade ao cálcio (Köhler *et alli*, 1993).

O cainato tem uma potente ação convulsivante quando aplicado *in vivo*. A sua administração intratecal ou parenteral em ratos resultou em convulsões límbicas e em um padrão de doença cerebral semelhante à epilepsia do lobo temporal em seres humanos (Ben-Ary, 1985). Já que algumas populações neuronais, como células piramidais da região CA3 do hipocampo e/ou neurônios reticulares talâmicos, são altamente sensíveis à doença induzida pelo cainato e sua distribuição aproxima-se daquela dos sítios de ligação ao cainato, o envolvimento dos receptores de cainato na epilepsia tem sido proposto (Chapman *et alli*, 1991).

### **I.2.4.1.3. Receptores NMDA**

Os receptores NMDA medeiam a neurotransmissão excitatória no SNC de forma diferente daquela exercida pelos receptores AMPA. Eles se caracterizam pelo bloqueio voltagem-dependente pelo magnésio ( $Mg^{2+}$ ) (Mayer *et alli*, 1984; Nowak *et alli*, 1984), pela alta permeabilidade aos íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (MacDermott *et alli*, 1986; Mayer e Westbrook, 1987) e uma cinética de abertura dos canais lenta (os canais ficam abertos por um tempo prolongado) (Lester *et alli*, 1990).

Eles são constituídos de cinco subunidades (NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D) e embora as subunidades NR2 não formem os canais de receptores NMDA funcionais sozinhas, quando uma delas é co-expressa com a subunidade NR1, as respostas de correntes geradas destes receptores heteroméricos são maiores. Desde que receptores NMDA heteroméricos recombinantes expressam diferentes propriedades dependendo de qual das quatro subunidades NR2 esta unida com NR1, as subunidades NR2 podem ser consideradas como subunidades

modulatórias, enquanto NR1 atua como uma subunidade fundamental (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Mori e Mishina, 1995).

Os receptores NMDA são encontrados em todo o cérebro, mas predominantemente dentro da parte anterior do cérebro. Concentrações maiores são encontradas na região CA1 do hipocampo (Monaghan *et alli*, 1989).

Estudos histoquímicos usando hibridização *in situ* mostraram que em roedores adultos, a subunidade NR1 é distribuída ubiquamente em contraste com as subunidades NR2 que possuem diferentes padrões de distribuição. A subunidade NR2A predomina no córtex, hipocampo e cerebelo, enquanto a NR2B é altamente expressa, com predominância para o córtex cerebral e hipocampo, o septo, o caudado e o putâmen e o bulbo olfatório. Já as subunidades NR2C predominam na camada celular granular do cerebelo, com maior expressão no bulbo olfatório e tálamo, onde também se detectam baixos níveis de NR2D (Monyer *et alli*, 1994). Os padrões de expressão das subunidades NR2 são também regulados pelo período de desenvolvimento do cérebro de roedores (Watanabe *et alli*, 1992; Monyer *et alli*, 1994). As subunidades NR2B e NR2D ocorrem pré-natalmente enquanto NR2A e NR2C são inicialmente detectados no período em torno do nascimento.

Johnson e Ascher (1987) têm demonstrado que a resposta à ativação de NMDA é marcadamente potencializada pela presença de glicina em neurônios centrais cultivados. O efeito da glicina é detectável em baixas concentrações ( $ED_{50} = 0.1-0.7 \mu M$ ) e não envolve o receptor sensível à estricnina que medeia a ação inibitória da glicina (Johnson e Ascher, 1987; Vyklícky *et alli*, 1990). Estudos posteriores comprovaram que a glicina não é apenas uma substância potencializadora de receptor NMDA, mas a sua presença é necessariamente requerida para a abertura do canal iônico do receptor, cumprindo desta forma o papel de um co-agonista.

As moléculas de D-serina e D-alanina são ativas no sítio de ligação da glicina insensível à estricnina e podem agir como co-agonistas em receptores NMDA (Kemp e Leeson, 1993; Matsui *et alli*, 1995).

Sucher e colegas (1996) caracterizaram quatro sítios de ligação em receptores NMDA: (1) o sítio de reconhecimento ao glutamato e/ou NMDA; (2) o sítio de ligação a glicina, insensível à estricnina; (3) sítio interno do canal iônico; e (4) sítios modulatórios tais como sítio sensitivo a próton, sítio de ligação ao zinco e sítio de ligação as poliaminas.

Devido às suas propriedades características citadas inicialmente, os receptores NMDA servem como um aparato molecular que pode detectar a coincidência da atividade pré-sináptica e despolarização pós-sináptica na sinapse e prover a célula pós-sináptica com uma quantidade suficiente de íons  $Ca^{2+}$ , com função de segundo mensageiros que iniciarão mudanças plásticas no processo de conexão sináptica. Possíveis mecanismos e implicações fisiológicas da plasticidade sináptica na qual o receptor NMDA está intimamente envolvido, tais como potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) no hipocampo e neo-cortex, têm sido constantemente documentado por diversos autores (Bliss e Collingridge, 1993; Bear e Malenka, 1995; Chen e Tonegawa, 1997).

#### **I.2.4.2 .Receptores metabotrópicos (mGlu)**

A família de receptores metabotrópicos (mGlu) compreende oito subtipos, subdivididos dentro de três grupos principais, tendo como base a similaridade das suas seqüências de aminoácidos, as vias de transdução intracelular que intermedeiam e a farmacologia de agonistas e antagonistas.



A ativação de receptores mGlu<sub>1</sub> leva a uma ampla variedade de efeitos imediatos e tardios na excitabilidade neuronal. Alguns são chamados efeitos delimitados de membrana e envolvem mudanças na condutância de canais de K<sup>+</sup> ou canais de Ca<sup>+2</sup> sensíveis à voltagem (VOCC) que podem depender da ligação a uma subunidade de proteína G. Muitos destes efeitos são mediados por diacilglicerol ou AMPc e podem causar alteração na fosforilação de várias enzimas receptoras ou transportadores que promoverão mudanças funcionais prolongadas (Conn e Pin, 1997).

O grupo I inclui os receptores mGlu<sub>1</sub> (com variantes: *a, b, c, d* e *e*) e mGlu<sub>5</sub> (com variantes *a* e *b*), que quando ativados estimulam a fosfolipase C (PLC), com subsequente formação de inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>), levando à liberação de cálcio dos estoques intracelulares, além da ativação da proteína quinase C (PKC) (Masu *et alli*, 1991; Abe *et alli*, 1992; Aramori e Nakanishi, 1992).

Enquanto estes eventos intracelulares podem prover um suporte trófico para neurônios em desenvolvimento, eles tornam-se potencialmente tóxicos se combinados com mecanismos adicionais que levam a um aumento acentuado de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Este ponto tem sido reforçado em estudos que demonstraram que a ativação de receptores do grupo I pode potencializar as respostas de receptores NMDA e AMPA (Fitzjohn *et alli*, 1996; Ugolini *et alli*, 1997) e aumentar a liberação de glutamato (via mGlu<sub>1</sub>) (Moroni *et alli*, 1998).

A habilidade da PKC em liberar o bloqueio do Mg<sup>2+</sup> de canais iônicos ligados a NMDA tem sido proposto como um dos processos fundamentais pelo qual a ativação de mGlu<sub>1</sub> amplifica a toxicidade de receptores NMDA (Bruno, 1995)

Um acoplamento negativo dos receptores do grupo I com canais de K<sup>+</sup> tem sido mostrado em algumas preparações neuronais e não-neuronais (Baskys *et alli*, 1990; Charpak *et alli*, 1990; Glaum e Miller, 1992; Ikeda *et alli*, 1995).

Os receptores mGlu<sub>1a</sub> estão localizados na periferia da membrana pós-sináptica, em oposição aos receptores ionotrópicos, os quais ocupam o núcleo da sinapse (Nusser *et alli*, 1994). Desta forma, espera-se que estes receptores sejam ativados por excessivas quantidades de glutamato, os quais são liberados durante a hiperatividade sináptica. Em adição, tem sido proposto a existência de um receptor mGlu<sub>1</sub> pré-sináptico, cuja ativação aumentaria a liberação de glutamato na presença de ácido araquidônico (Herrero *et alli*, 1992).

Os receptores metabotrópicos do grupo II (mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>3</sub>) ou grupo III (mGlu<sub>4a</sub>, mGlu<sub>4b</sub>, mGlu<sub>6</sub>, mGlu<sub>7a</sub>, mGlu<sub>7b</sub>, mGlu<sub>8</sub>) são negativamente acoplados à atividade da enzima adenilato ciclase quando expressos heterologicamente em células não-neuronais, bem como negativamente acoplados a VOCC (Trombley e Westbrook, 1992; Chavis *et alli*, 1994).

Os receptores mGlu do grupo II mostraram forte inibição sobre a formação de AMPc induzido por forskolina (Tanabe *et alli*, 1992; 1993).

A localização pré-sináptica tem sido mostrada para alguns membros dos grupos II e III de receptores metabotrópicos, incluindo mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>4</sub> e mGlu<sub>7</sub> (Pin e Duvoisin, 1995; Shigemoto *et alli*, 1995). A ativação farmacológica destes subtipos reduziu a liberação de glutamato (Glaum e Miller, 1995) enquanto que antagonistas de receptores mGlu<sub>2</sub> amplificaram a liberação deste neurotransmissor (Nicoletti *et alli*, 1996). Com isso, pelo menos os receptores mGlu<sub>2</sub> (e talvez outros subtipos) podem funcionar como autoreceptores inibitórios.

A partir disso, pode-se de forma generalizada assumir que a ativação de receptores mGlu do grupo I aumenta a excitabilidade neuronal enquanto a ativação de receptores mGlu<sub>8</sub> dos grupos II e III reduz a excitação sináptica.

Visto que a classe de receptores metabotrópicos está envolvida em uma variedade de atividades neuronais, a sua ativação pode regular certas condições patológicas no cérebro tais como atividades epiléticas, bem como exercer efeitos regulatórios sobre a neurotoxicidade induzida por glutamato (Osawa *et alli*, 1998).

### **I.2.5. Transportadores de glutamato**

Os transportadores de glutamato são expressos por muitos tipos celulares no SNC, incluindo astrócitos, neurônios, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais (Kanai e Hediger, 1992; Rothstein *et alli*, 1994; Kondo *et alli*, 1995; Domercq e Matute, 1999). Dentre estas, a captação mediada pelos astrócitos é quantitativamente a mais importante em manter as concentrações extracelulares de glutamato normais.

Os sistemas de captação podem ser de baixa ou alta afinidade ao substrato. A captação de alta afinidade ao glutamato é sódio dependente e é mediada por proteína transportadora localizada tanto em membrana plasmática de glia (Danbolt *et alli*, 1992; Levy *et alli*, 1993<sup>a</sup>) como em neurônios liberando glutamato como neurotransmissor (Gundersen *et alli*, 1993; Nakamura *et alli*, 1993).

A captação de baixa afinidade exhibe valores de Km acima de 500 $\mu$ M (Johnston, 1981) e é descrita como sódio-independente. Este sistema de captação tem sido sugerido para suprir as células cerebrais com aminoácidos para fins metabólicos ou ainda para ajudar a reduzir o pico da concentração de glutamato na fenda sináptica, devido sua V<sub>máx</sub> ser maior do que a da captação de alta afinidade (Danbolt, 2001).

Além dos sistemas de captação mencionados, há um terceiro sistema de alta afinidade, dependente de cloreto e independente de sódio, que tem sido descrito em estudos com tecido cerebral e cultivo celular (Balcar e Li, 1992). Este transportador é encontrado em fibroblastos, macrófagos, células gliais, endoteliais e hepatócitos. Ele funciona como um trocador de cisteína-glutamato, carregando cisteína para dentro da célula e transportando glutamato para o meio extracelular (Bannai, 1986). Desde que a função fisiológica deste transportador é captar cisteína às custas da liberação de glutamato, é mais apropriado referir-se a ele como um carreador de cisteína sensível a glutamato do que um transportador de glutamato propriamente dito.

A captação de cisteína é competitivamente inibida por altas concentrações de glutamato externo e nestas situações pode haver morte neuronal devido ao estresse oxidativo, já que a cisteína é requerida para a síntese de glutathione (antioxidante endógeno que participa da remoção de peróxidos) (Murphy *et alli*, 1989; Cho e Bannai, 1990).

A partir de estudos de clonagem molecular, cinco subtipos de transportadores de glutamato Na<sup>+</sup>-dependentes, estruturalmente distintos, têm sido identificados e caracterizados: GLT1, GLAST, EAAC1, EAAT4 e EAAT5 (Sims e Robinson, 1999) (tabela I.4).

**Tabela\* I.4:** Família dos transportadores de glutamato\*\*

Células gliais	GLAST/EAA T1	células de Muller (retina) células de Bergmann (cerebelo)
	GLT1/EAAT 2	astrócitos em todo o cérebro
Células neuronais	EAAC1/EAA T3	Somata e dendritos neuronais Células de Purkinje (cerebelo)

---

EAAT4

Células bipolares e fotoreceptoras  
retinais

EAAT5

---

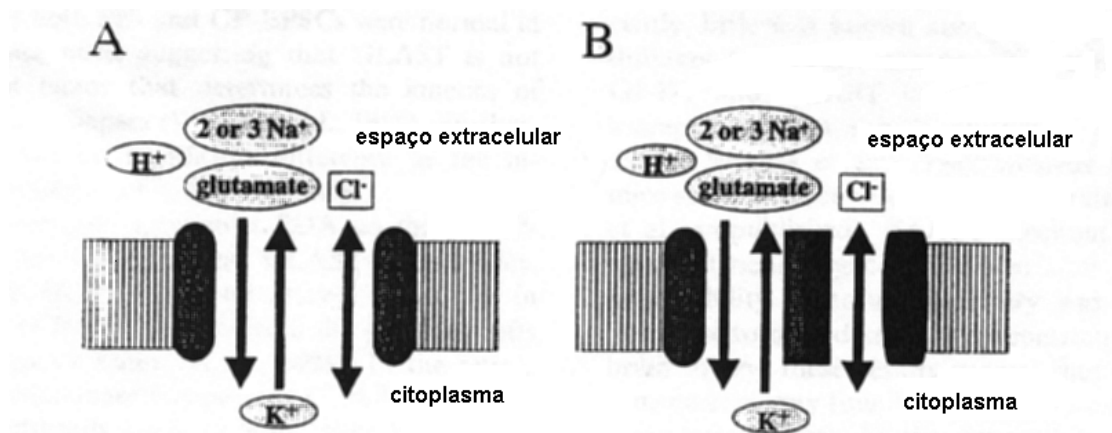
**\*\*Os nomes dos membros da família de transportadores e sua localização no cérebro. Os nomes dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) são para transportadores em seres humanos; outros nomes foram dados quando os transportadores foram primeiro clonados em espécies não-humanas: GLAST, transportador de glutamato e aspartato; GLT, transportador de glutamato; EAAC, carreador de aminoácido excitatório.**

\* Fonte: Attwell,2000.

O transporte de glutamato pelos seus transportadores parece ser termodinamicamente acoplado ao co-transporte de pelo menos dois íons sódio, um próton e o transporte contrário de um íon potássio, gerando a entrada líquida na célula de uma carga positiva por glutamato transportado (Barbour *et alli*, 1988; Kanai *et alli*, 1995; Zerangue e Kavanaugh, 1996).

Wadiche e colegas (1995<sup>a</sup>) constataram que a carga líquida que move-se com a entrada de glutamato é maior do que aquela prevista pela estequiometria descrita. Esta entrada de carga extra elicitada surge de um fluxo de íons cloreto não acoplados termodinamicamente e vários estudos sugerem que a condutância deste canal iônico pode ser ativada independentemente do transporte de glutamato (Billups *et alli*, 1996; Spiridon *et alli*, 1998).

Embora estes dados suportam o fato dos transportadores de glutamato neuronal funcionarem tanto como transportador bem como um canal de cloreto, nenhuma evidência estrutural sugere se o glutamato e o cloreto permeiam o mesmo poro ou atravessam a membrana por diferentes vias da proteína transportadora (Tanaka, 2000) (Figura I.9).



**Figura 1.9:** modelos esquemáticos para o transportador de glutamato e canal de cloreto associado a este transportador. Este canal pode estar localizado no mesmo poro (A) ou em uma porção diferente da proteína, possivelmente em associação com outra proteína (B) (Fonte: Tanaka, 2000).

Uma vez dentro da célula, o glutamato sofre uma redistribuição, podendo ser captado pela mitocôndria através de um sistema antiporte glutamato/OH<sup>-</sup> (que equivale a um simporte glutamato/H<sup>+</sup>) (Dennis *et alli*, 1976) ou através de um trocador Glutamato/Aspartato (Kramer e Palmieri, 1989). A maioria das enzimas que degrada glutamato se localiza na mitocôndria.

Por outro lado, o glutamato presente nos terminais nervosos pode ser captado pelas vesículas sinápticas através de um transportador que é muito diferente daqueles da membrana plasmática. A captação vesicular é independente de sódio e potássio, de baixa afinidade ao glutamato ( $K_m \sim 1\text{mM}$ ), não interage com aspartato e requer baixas concentrações de íons cloreto (Naito e Ueda, 1983; Fykse *et alli*, 1992). O sítio de ligação do íon cloreto é distinto do sítio de ligação ao substrato e regula a atividade do transporte.

A H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar, localizada na membrana vesicular, bombeia próton para dentro da vesícula. O potencial de membrana positivo interno, dirige o

transportador de glutamato vesicular (Naito e Ueda, 1985; Moriyama *et alli*, 1990; Tabb *et alli*, 1992).

## II.OBJETIVOS

### II. 1 Geral

Tendo em vista a importância crescente atribuída à excitotoxicidade na neuropatologia da acidemia glutárica tipo I e a similaridade estrutural entre as moléculas dos ácidos glutâmico, glutárico e 3-hidroxi glutárico, acumulados nestas doença, o presente estudo procurou investigar o efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico sobre alguns parâmetros do sistema glutamatérgico no sistema nervoso central (SNC) de ratos jovens.

### II. 2 Específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico sobre a liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico sobre a união de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos jovens, na presença e/ou ausência de íons sódio.
- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a captação do L-[<sup>3</sup>H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos jovens.



- Avaliar o efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em cultivos primários de astrócitos.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **III.1 Reagentes**

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau de pureza PA.

Os ácidos foram sempre diluídos no tampão de incubação específico para cada experimento, exceto nos experimentos de ligação de glutamato à membranas sinápticas e captação vesicular de glutamato, onde foram diluídos em água destilada (filtrada por milli-Q).

#### **III.2 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Animais com trinta dias de idade foram usados para as preparações de membranas sinápticas e sinaptossomas. Ratos de 60 dias foram usados para as preparações de vesículas sinápticas e ratos de 1-2 dias de vida para os cultivos primários de astrócitos. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado a 25°C, com intervalos de 12h, claro e escuro, com água e ração *ad libitum*.

#### **III.3 Preparação da fração sinaptossomal para avaliação da captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato**

Ratos Wistar de trinta dias de vida foram sacrificados por decapitação sem anestesia. Os bulbos olfatórios, o cerebelo e o pedúnculo cerebral foram descartados e o resto do cérebro isolado. O córtex foi separado e homogeneizado em meio contendo 0,32 M de sacarose, 5 mM de HEPES e 0,1 mM de EDTA em pH 7,5 (meio I), com homogeneizador elétrico a uma velocidade de 800 rpm. Os sinaptossomas foram obtidos conforme o método de Nagy & Delgado-Escueta (1984). Para tanto, o homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado com pipeta Pasteur e centrifugado a 12.000 g por 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 0,5 ml do mesmo meio I e 4 ml de uma solução de Percoll 8,5%, para que a solução de Percoll resultante fosse 7,5%. Este homogeneizado final foi então adicionado cuidadosamente sobre um gradiente descontínuo de Percoll de 16%, 10% e 7,5% que foi mantido em gelo. Este foi centrifugado a 15.000 g por 20 minutos. A fração sinaptossomal foi coletada na interface entre as soluções de Percoll 10% e 16% e homogeneizada em meio contendo 15 mM de Tris/acetato, pH 7,4 e 0,3 M de sacarose e centrifugada a 17.300 g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi novamente homogeneizado e centrifugado conforme descrito anteriormente. A diluição final das preparações (com mesmo meio das lavagens) ficou com uma concentração de proteína entre 1-2 mg/ml.

### **III.4 Ensaio de lactato desidrogenase em sinaptossomas**

Para avaliar a integridade dos sinaptossomas, a liberação de lactato desidrogenase (LDH; E 1.11.27) foi monitorada pela incubação dos sinaptossomas na ausência ou presença de 1mM dos ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico por 15 minutos. A atividade da LDH no meio de incubação foi também determinada em sinaptossomas rompidos usando Triton X-100 1,5%. Utilizou-se um Kit (Labtest reagentes, Brasil) para a medida espectrofotométrica da atividade da LDH.



### **III.5 Captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais.**

A captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais foi medida em meio contendo 110 mM de NaCl, 25 mM de glicose, 5,3 mM de KCl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 6 mM de sacarose em 40 mM de tampão Tris/Acetato, pH 7,4, 1 μM de L-[<sup>3</sup>H]glutamato e ácido 3-hidroxiglutárico (10 μM – 1mM). Os controles não continham ácido 3-hidroxiglutárico. A captação foi iniciada pela adição dos sinaptossomas (100-200 μg de proteína). Após um minuto de incubação a 37°C, a captação foi encerrada por filtração, utilizando filtros GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 ml de uma solução de 15 mM de Tris/Acetato, pH 7,4, contendo 155 mM de acetato de amônio. A captação inespecífica (10 a 20% da captação total) foi determinada pela incubação das amostras na ausência de sódio e cloreto em tampão 20 mM de Tris/Acetato, pH 7,4, contendo 0,32 M de sacarose. A radioatividade foi medida pela adição dos filtros, previamente secos, em 1,5 ml de líquido de cintilação (Optiphase 'Hisafe' 3-Wallac).

### **III.6 Preparação da fração sinaptossomal para avaliação da liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato**

As frações sinaptossomais foram obtidas de um gradiente descontínuo de Percoll/Sacarose descrito previamente (Dunkley *et alli*, 1986), com algumas modificações. O homogeneizado (1:10, peso/volume) de córtex cerebral foi preparado em meio contendo 1,28 M de sacarose, 4 mM de EDTA e 25 mM de DDT (pH 7,4) e centrifugado a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante contendo sinaptossomas foi aplicado sobre um gradiente de soluções de Percoll de 23, 15, 7

e 3% e centrifugado a 24.000 g por 10 minutos. A fração sinaptossomal foi isolada entre as bandas de Percoll de 15 e 7% e estocada a 0°C. As frações coletadas foram unidas e a solução resultante foi ressuspensa e homogeneizada em um tampão HBSS (solução salina de tampão Hepes) com baixo K<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> (pH 7,4) contendo 770 mM de cada: NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, e de HEPES, 1,2 mM de glicose e 1M de CaCl<sub>2</sub> e centrifugado a 21.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi cuidadosamente ressuspensa em tampão HBSS. A fração sinaptossomal isolada e usada na incubação continha aproximadamente 2,2 mg de proteína/ml. Esta fração continha 5% de contaminação por fragmentos de membranas mitocondriais interna e externa, microssomas, mielina, bem como membranas plasmáticas gliais e neuronais (Dunkley *et alli*, 1986; Miguez *et alli*, 1999; Nagy *et alli*, 1986).

### **III.7 Liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato pela fração sinaptossomal**

A determinação da liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato foi realizada conforme descrito por Miguez e colegas (1999). Os sinaptossomas foram inicialmente expostos a glutamato marcado, pela incubação da preparação sinaptossomal por 15 minutos a 37°C em um meio não despolarizante (baixo potássio) consistindo de HBSS (solução salina de tampão Hepes) com a seguinte composição: 27 mM de Hepes, 133 mM de NaCl, 2,4 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 mM de glicose, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>) na presença de 0,1 μCi L-[<sup>3</sup>H]glutamato (Amersham, com atividade específica de 53 Ci/mmol e concentração final de 5x10<sup>-7</sup> mM). As alíquotas de sinaptossomas carregados com L-[<sup>3</sup>H]glutamato foram centrifugadas a 16.000 g por 1 minuto. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados quatro vezes em HBSS por centrifugação a 16.000 g por 1 minuto (4°C). No ensaio de liberação basal de L-[<sup>3</sup>H]glutamato, o sedimento final foi ressuspensa em HBSS e incubado por 1 minuto na ausência (controles)

ou presença de ácido glutárico (10  $\mu$ M-1 mM) ou ácido 3-hidroxi glutárico (10  $\mu$ M-1 mM). A liberação de L-[ $^3$ H]glutamato estimulada por  $K^+$  foi realizada como descrito para a liberação basal, exceto que o meio de incubação continha 20 mM de KCl para induzir despolarização. A incubação foi interrompida por centrifugação a 16.000 g por 1 minuto a 4°C. Em alguns experimentos utilizou-se 40 mM de KCl. A radioatividade presente no sobrenadante e no sedimento foi separadamente determinada em um cintilador Wallac. O L-[ $^3$ H]glutamato liberado foi calculado como uma porcentagem da quantidade total de radioatividade presente no início do período de incubação. A quantidade total de glutamato carregado para dentro dos sinaptossomas nestas condições foi de 9,9 nmoles/mg de proteína.

### **III.8 Preparação de membranas plasmáticas cerebrais.**

As membranas plasmáticas foram preparadas de acordo com o método de Emanuelli e colegas (1998). Foram utilizados ratos de 30 dias de idade, sacrificados por decapitação sem anestesia. O córtex cerebral foi dissecado, pesado e homogeneizado em meio contendo 0,32 M de sacarose, 1 mM de Tris/HCl e 10 mM de  $MgCl_2$ , na proporção de 20 ml de meio por grama de tecido. A homogeneização foi feita manualmente em homogeneizador de vidro. O tecido homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g por 15 minutos. O sobrenadante denominado S1A foi mantido em gelo. O sedimento resultante foi homogeneizado novamente no mesmo volume e centrifugado na mesma velocidade e tempo. Os sobrenadantes resultantes, S1A e S1B, da primeira e segunda centrifugações foram centrifugados a 27.000 g por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado em Tris/HCl 1 mM, pH 7,4 (meio hiposmótico) e mantido em gelo por 30 minutos para lisar as vesículas formadas no meio isosmótico. O homogeneizado sofreu centrifugação a 27.000 g por 15 minutos. Após essa centrifugação, o precipitado foi homogeneizado em Tris/HCl ou Tris/Acetato 10 mM, pH 7,4, sendo centrifugado na mesma velocidade e tempo anteriores. Esse processo foi repetido por três vezes após o rompimento das

vesículas. O sedimento da última centrifugação foi homogeneizado em volume de aproximadamente 6ml/g de tecido original e congelado em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 24 horas. Após descongelamento, as membranas foram diluídas em 14 ml de Tris/HCl ou Tris/Acetato 10 mM, pH 7,4, 20 volumes em relação ao peso inicial do tecido e centrifugadas a 27.000 g por 15 minutos. O sedimento foi homogeneizado no mesmo volume anterior e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, sendo centrifugado na mesma velocidade e tempo anteriores por mais três vezes. Após a última centrifugação o sedimento foi homogeneizado de modo que a concentração proteica ficasse entre 1-2 mg/ml.

### **III.9 União de L-[ $^3\text{H}$ ]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas**

A incubação para a medida da união de L-[ $^3\text{H}$ ]glutamato a seus receptores e/ou transportadores foi iniciada pela adição das membranas plasmáticas em meio contendo Tris/Acetato 50mM ou Tris/acetato 50 mM contendo 100 mM de NaCl, pH 7,4, respectivamente, com 100nM de glutamato radioativo. A união inespecífica de glutamato foi medida pela adição de 100 $\mu\text{M}$  de glutamato frio ao meio de incubação. O ácido 3-hidroxi-glutárico foi diluído em água tridestilada e tamponado com hidróxido de potássio. Suas concentrações variaram de 1 $\mu\text{M}$  a 1mM. Os controles não continham ácido 3-hidroxi-glutárico. Após a adição das membranas plasmáticas, a incubação foi feita em banho a  $30^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O processo foi interrompido por centrifugação a 16.800 g por 15 minutos. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, lavou-se cuidadosamente o sedimento com água destilada gelada ( $4^{\circ}\text{C}$ ) (para remoção da radioatividade que não foi incorporada) e, após seco, o sedimento foi solubilizado com 300 $\mu\text{L}$  de solução de dodecil sulfato de sódio 0,1% por 24 horas. Um volume de 240 $\mu\text{L}$  da membrana solubilizada foi misturado a 1,5 mL de líquido de cintilação (Optiphase 'Hisafe' 3-Wallac) e a

radioatividade foi medida em cintilador. A união específica de L-[<sup>3</sup>H]glutamato foi calculada descontando-se a união inespecífica.

### **III.10 Preparação de vesículas sinápticas**

As vesículas sinápticas foram preparadas de córtex cerebral de cérebro de ratos de 60 dias como descrito por Fykse & Fonnum (1996), com algumas modificações. Brevemente, o homogeneizado (1:10, peso/volume) de córtex cerebral dos ratos feito em um tampão contendo 0,32 M de sacarose, 10 mM de tampão MOPS/Tris, pH 7,4 e 1 mM de EGTA foi centrifugado duas vezes por 10 minutos a 1.000 g. Ambos os sobrenadantes foram unidos e centrifugados por 30 minutos a 20.000 g para obter a fração sinaptossomal crua (P2). Esta fração sofreu um choque osmótico pela ressuspensão em 10 mM MOPS/Tris, pH 7,4, contendo 0,1 mM de EGTA (aproximadamente 0,8 ml/g de tecido fresco) e centrifugada a 17.000 g por 30 minutos. O sobrenadante contendo as vesículas sinápticas foi aplicado a um gradiente de densidade de sacarose de 0,4 M a 0,6 M e este foi centrifugado a 65.000 g por 2 horas. A fração de vesícula sináptica foi isolada da banda de sacarose a 0,4 M e estocada a -70°C por até quatro semanas sem perda da atividade. Estudos conduzidos por outros grupos mostraram que esta fração não contém estruturas contaminantes que possam interferir com a captação de glutamato por vesículas sinápticas. Utilizaram-se também controles com adição de altas concentrações de sódio para avaliar a presença de possíveis vesículas contaminantes formadas de membranas plasmáticas. Em todas as preparações de vesículas sinápticas testadas, a captação não foi estimulada pela adição de sódio (dados não mostrados).



### **III.11 Captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por vesículas sinápticas**

Os experimentos de captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato foram desenvolvidos em um meio padrão (volume final de 200 µl) composto de 10 mM de MOPS/Tris, pH 7,4, 4 mM de KCl, 140 mM de gluconato de potássio, 0,12 M de sacarose, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2 mM de ATP, como descrito por Wolosker *et alli* (1996). A captação de glutamato foi desenvolvida no meio padrão com 50 µM de L-[<sup>3</sup>H]glutamato (3 µCi/ml). Em experimentos para avaliar o efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico, o metabólito foi adicionado no meio de captação (1µM – 1mM). A captação foi iniciada pela adição das vesículas sinápticas (30-40 µg de proteína/tubo). O sistema foi incubado por 10 minutos a 35°C e a reação foi interrompida por filtração rápida do meio de ensaio através de filtros Millipore de 0,45 µm. Os filtros foram rapidamente lavados três vezes com 4 ml de tampão MOPS/Tris 10 mM, pH 7,4, a temperatura ambiente. A captação específica foi calculada pelo desconto da captação medida na ausência de ATP. A radioatividade foi medida por um cintilador líquido da marca Wallac.

### **III.12 Cultura primária de astrócitos**

As culturas primárias de astrócitos foram preparadas como descrito previamente (Saneto e Vellis, 1987), com algumas modificações. Ratos Wistar de 1 a 2 dias de idade foram decapitados sem anestesia e os cérebros dissecados em tampão HBSS estéril, pH 7,4, até a obtenção do córtex que foi transferido para uma placa de Petri com meio MEM (MEM- Eagle's minimal essential media) (GIBCO) O tampão HBSS é composto de 1,26 mM de CaCl<sub>2</sub> .2H<sub>2</sub>O, 5,36 mM de KCl, 0,44 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,49 mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,41 mM de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 137 mM de NaCl, 4,17 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,63 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 5,55 mM de D-glicose. O meio de plaqueamento foi MEM com 10% de FBS (soro bovino fetal) suplementado por 10 ng/ml de EGF -fator de crescimento epidérmico-(GIBCO).

Em cada preparação, os córtices de 6 ratos foram dissociados com tripsina (GIBCO) seguidos por DNase I (GIBCO) e as células foram semeadas em 3 placas de 24 poços (NUNC). As culturas de astrócitos foram mantidas em uma incubadora a 37°C em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Até o período de confluência, o meio original foi substituído por MEM com 5% de FBS a cada 72h. Quando a confluência foi atingida (7-8 dias *in vitro*, DIV), o meio foi substituído por MEM com 5% FBS e 10µM de citosina arabinosídeo (Ara-C) que foram adicionados por 48h para eliminar células mitóticas. A troca de meio subsequente foi realizada conforme as trocas anteriores à adição de Ara-C. Para cada experimento foram usadas culturas não-irmãs (que não eram do mesmo plaqueamento). Os experimentos foram realizados com cultivos de 14 DIV, com astrócitos mostrando uma morfologia poligonal. O meio de cultura foi trocado por meio fresco na tarde anterior à captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato.

### **III.13 Ensaio da viabilidade dos astrócitos por MTT**

O MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazóico bromida) (Sigma) é um sal tetrazóico solúvel em água que resulta em uma solução amarela quando preparado em meio ou solução salina sem vermelho fenol. O MTT dissolvido é convertido para um formazan púrpuro insolúvel quando seu anel tetrazóico é clivado por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias das células. Este formazan insolúvel em água pode ser dissolvido por alguns solventes, como o isopropanol ou dimetilsulfóxido (DMSO), e a mudança de coloração do produto dissolvido é medido espectrofotometricamente a 570 nm e 630 nm. A absorbância varia em função da concentração da cor convertida. Assim, a clivagem e a conversão da coloração amarelo solúvel para o formazan púrpuro insolúvel é usado como medida de citotoxicidade (viabilidade) celular. Desidrogenases mitocondriais ativas de células vivas causam esta conversão, enquanto células mortas não causam nenhuma mudança na absorbância.

Em nossos ensaios, substituímos o meio de incubação das culturas por 300  $\mu\text{L}$  de tampão HBSS (descrito previamente) a 37°C e deixamos brevemente as células (1-3 minutos) em uma incubadora a 37°C e em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ , para ambientação neste novo meio. Este tampão foi então aspirado e desprezado e recolocou-se novamente HBSS (37°C) em volumes de 280  $\mu\text{L}$  (poços controles) e 260  $\mu\text{L}$  (poços que receberiam ácido). Os ácidos (50  $\mu\text{M}$  ou 1mM) foram então adicionados (20  $\mu\text{L}$ ) nos poços com 260  $\mu\text{L}$  de tampão e incubados em estufa por 60 minutos nas condições atmosféricas descritas anteriormente. Após este período, o sobrenadante de todos os poços foi aspirado e substituído por 500  $\mu\text{L}$  de MEM (37°C) mais 50  $\mu\text{L}$  de MTT (5mg/ml) e a placa foi incubada por mais 90 minutos (ou 20 horas). Após este tempo, adicionou-se sobre este sistema de incubação 1 mL de DMSO (Sigma) e 125  $\mu\text{L}$  de tampão glicina, pH 7,4. Após 12 horas, o sobrenadante foi recolhido e quantificado através de leitura em espectrofotômetro em 570 nm e 630 nm. A diferença ( $\Delta$ ) entre as duas absorvâncias revelou o valor de conversão de cor do MTT (Slater *et alli*, 1963; Denizot e Lang, 1986).

### **III.14 Medida de liberação da lactato desidrogenase (LDH) em culturas de astrócitos**

A atividade da LDH é calculada medindo o decaimento de absorvância a 340 nm entre os tempos inicial e final de reação (15 e 180 segundos). O decaimento de absorvância representa a formação de  $\text{NAD}^+$  a partir de NADH adicionado (uma reação acoplada à formação de lactato a partir de piruvato), e corresponde à medida da atividade da enzima lactato desidrogenase. Para isso, se utiliza 100  $\mu\text{L}$  de amostra (sobrenadante da cultura). A reação inicia com a adição desta amostra sobre 900  $\mu\text{L}$  de um meio composto de 12 mM de piruvato, 0,15 mM de NADH e 50 mM de Tris-HCl, pH 7,2. O volume final do ensaio foi 1 mL. O branco se constitui de 1 mL deste meio sem a amostra.

### **III.15 Captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por astrócitos**

Para os ensaios de captação de glutamato por astrócitos, o meio de incubação foi trocado por 300 µL de HBSS (cuja composição é a mesma do tampão usado na preparação das culturas) a 37°C, pH 7,4. As células foram incubadas por 1-2 minutos em uma estufa a 37°C em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> para ambientação. O tampão foi então removido e novamente HBSS a 37°C, pH 7,4, colocado nos volumes de 280 µL (poços controles) e 260 µL (poços testes). Os ácidos 3-hidroxi-glutárico (50 µM e 1mM) e glutárico (50 µM e 1mM) foram adicionados (20 µl) nos poços com 260µl de tampão e incubados por 1 hora sobre as condições atmosféricas de incubação citadas anteriormente. Nos 53 minutos, decorridos do início da incubação, a captação foi iniciada pela adição de 20µl de L-[<sup>3</sup>H]glutamato (0,01µCi) (Amerishan Radiochemical-45 Ci/mmol) e 100 µM de glutamato não marcado por um período de 7 minutos. A captação foi interrompida por duas lavagens com 1ml de HBSS frio (4°C). As células foram desprendidas da placa adicionando-se então NaOH 0,5% (por 12 horas) e o meio foi coletado para determinação da radioatividade por um cintilador Wallac.

### **III.16 Medida de proteínas**

O conteúdo proteico em todas as técnicas empregadas foi determinado pelo método de Lowry *et alli* (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

### **III.17 Estatísticas**

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a média usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de

variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Duncan, quando o F foi significativo. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1.Efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico sobre a liberação de lactato desidrogenase de preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.**

Inicialmente, procuramos determinar se os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico alteram a permeabilidade das preparações sinaptossomais através da determinação da atividade da lactato desidrogenase nos sobrenadantes da incubação.

Preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade foram então incubadas por 15 minutos na presença dos dois ácidos. Foi também utilizado Triton X-100, um detergente que rompe as membranas celulares, e nesses ensaios a medida de lactato desidrogenase foi tida como 100%.

A figura IV.1 mostra que os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico na concentração de 1 mM não provocaram um aumento na liberação de lactato desidrogenase no meio incubado com preparações sinaptossomais [ $F(2,17)=0,117$ ,  $p =0,889$ ], indicando que nessa concentração não ocorre ruptura ou aumento da permeabilidade dos sinaptossomas.

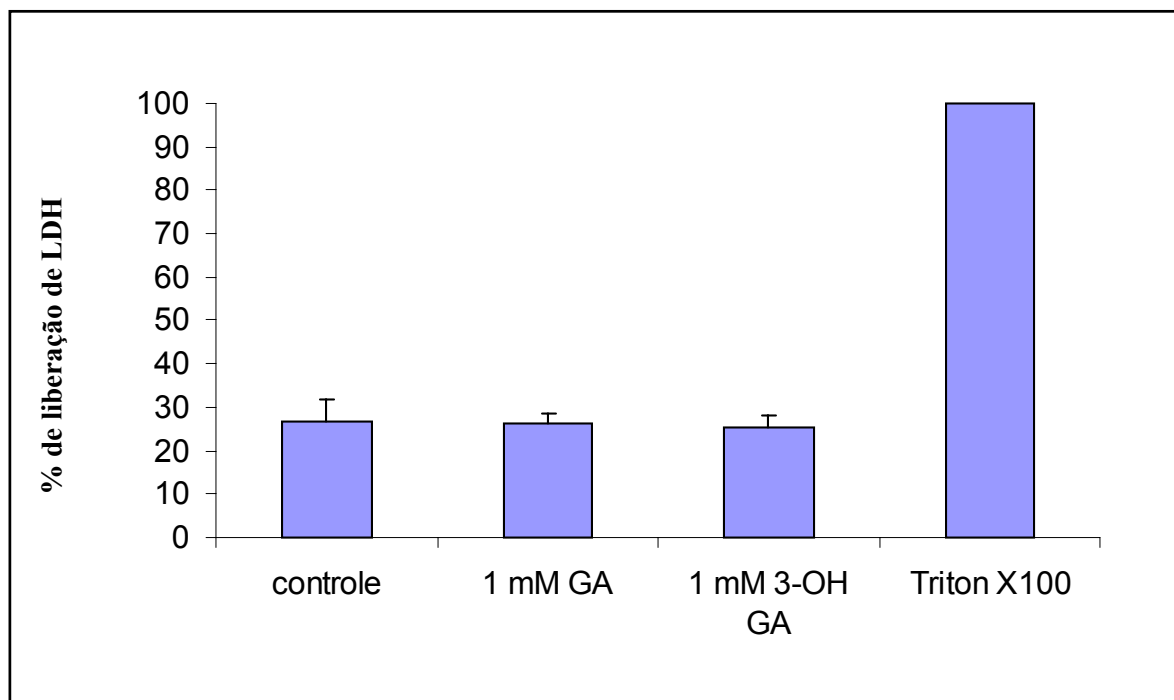


Figura IV.1- Efeito dos ácidos 3-hidroxiglutárico e glutárico sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) de preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos e expressam o percentual de liberação de lactato desidrogenase (LDH) em relação aos ensaios com Triton X-100. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

Tendo em vista esses resultados, passamos a investigar o efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a captação de glutamato por sinaptossomas. A captação de glutamato por preparações sinaptossomais na presença do ácido glutárico já foi estudada (Porciúncula *et alli*, 1999).

## IV.2. Efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

A figura IV.2 mostra que o ácido 3-hidroxi-glutárico nas concentrações de 10  $\mu$ m a 1 mM não altera significativamente a captação de glutamato pelas preparações sinaptossomais [F(5,47)=0,5163, p =0,7624 ].

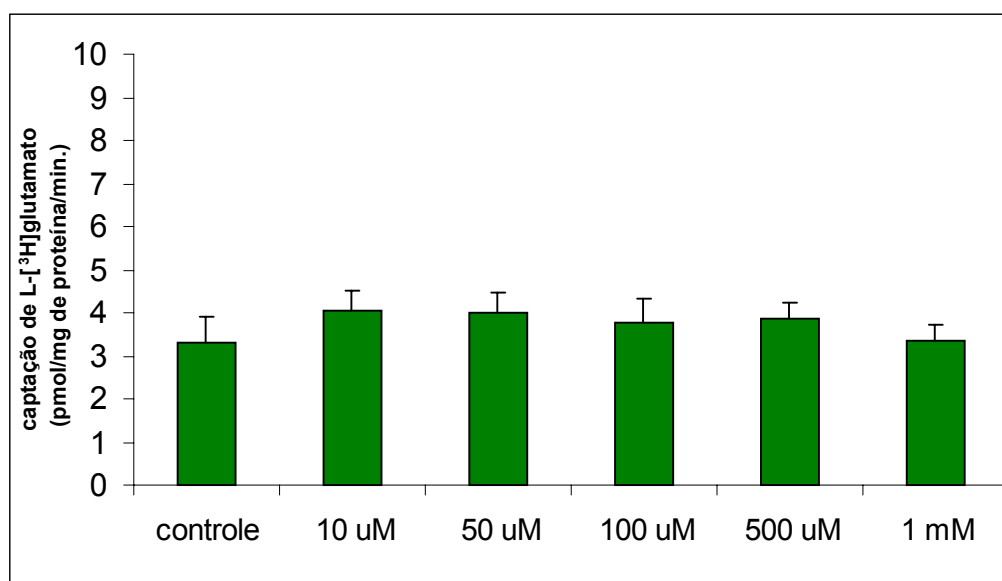


Figura IV.2- Efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 8 experimentos e estão expressos em pmol/mg de proteína/min. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).



### **IV.3. Efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a liberação basal e estimulada por potássio de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.**

Alterações nos sistemas de transporte glutamatérgico estão envolvidos na toxicidade de várias patologias neurodegenerativas, incluindo-se a isquemia cerebral e a doença de Alzheimer (Lipton & Rosenberg, 1994). Esses sistemas de transporte são sódio-dependentes e estão presentes nas células gliais e nos neurônios.

Tendo em vista a similaridade estrutural entre o ácido glutâmico e os ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico e os achados patológicos similares dos pacientes afetados por acidemia glutárica tipo I e por doenças neurodegenerativas causadas por neurotoxicidade do glutamato, decidimos investigar o efeito de três concentrações dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

As figuras IV.3 e IV.4 mostram respectivamente a liberação basal e estimulada por 20 mM de cloreto de potássio (membrana despolarizada) de glutamato das preparações sinaptossomais na presença dos ácidos 3-hidroxi-glutárico e glutárico. Verificamos que, nas concentrações de 10  $\mu$ M a 1 mM, o ácido glutárico, em meio basal [ $F(3,23)=0,066$ ,  $p=0,977$ ] e despolarizado [ $F(3,23)=0,043$ ,  $p=0,988$ ], bem como o ácido 3-hidroxi-glutárico [ $F(3,23)=0,119$ ,  $p=0,948$ ] em condições basais e despolarizadas [ $F(3,23)=0,096$ ,  $p=0,0961$ ], não modificaram significativamente esse parâmetro bioquímico.

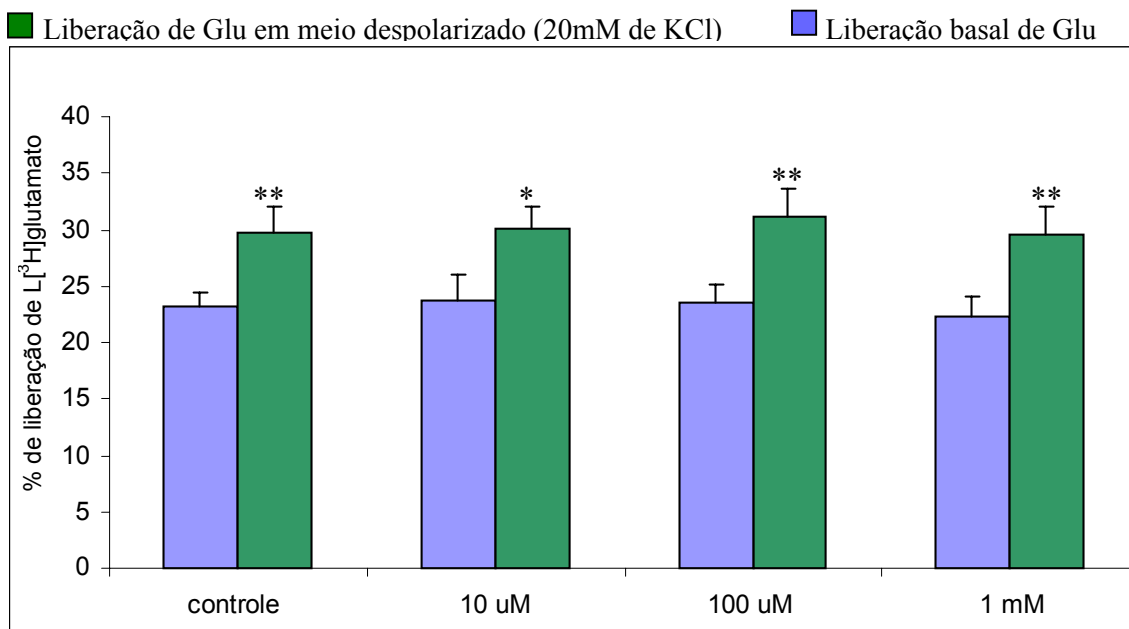


Figura IV.3- Efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos e expressam o percentual de liberação. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , comparado à liberação basal (teste T pareado).

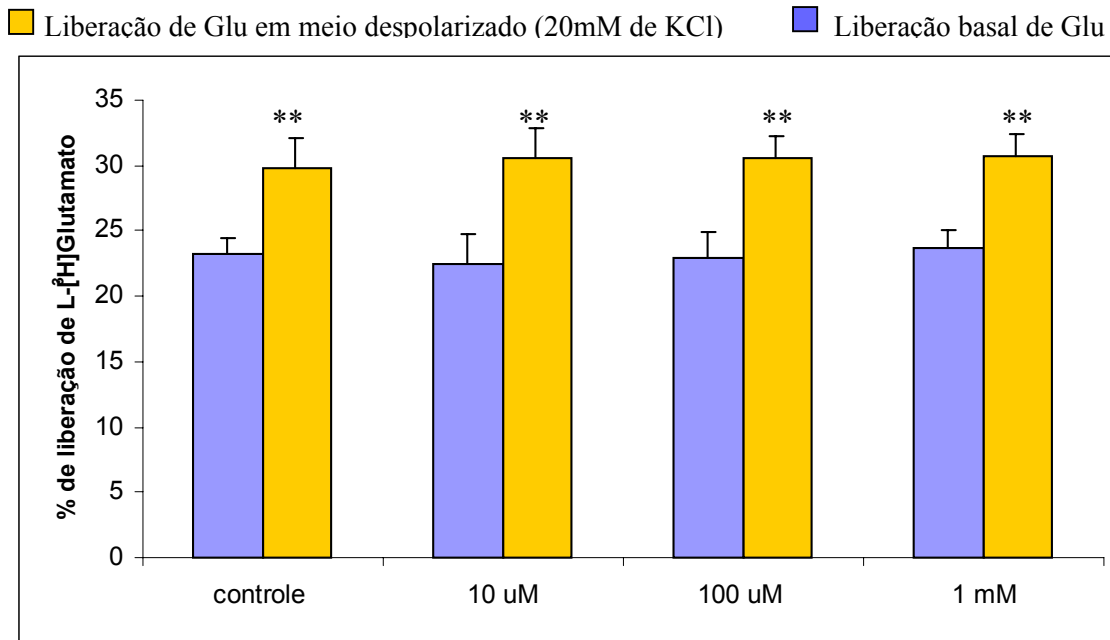


Figura IV.4- Efeito do ácido glutárico sobre a liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos e expressam a percentagem de liberação. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

\*\*  $p < 0,01$ , comparado à liberação basal (teste T pareado).

Investigamos também o efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico, nas concentrações de 1  $\mu$ M a 1 mM sobre a liberação de L-[ $^3$ H]glutamato por preparações sinaptossomais estimuladas por 40 mM de cloreto de potássio (Figura IV.5.). Observa-se que embora não fosse detectado nenhum efeito significativo do metabólito sobre a liberação basal de glutamato [ $F(4,39)=0.5634$ ,  $p= 0.69908$ ], ou estimulada por potássio (40 mM) [ $F(4,39)=1.1103$ ,  $p=0.3672$ ], ocorreu uma leve tendência de uma maior liberação de glutamato estimulada por 40 mM de potássio à medida que a concentração de ácido 3-hidroxi-glutárico aumentou.

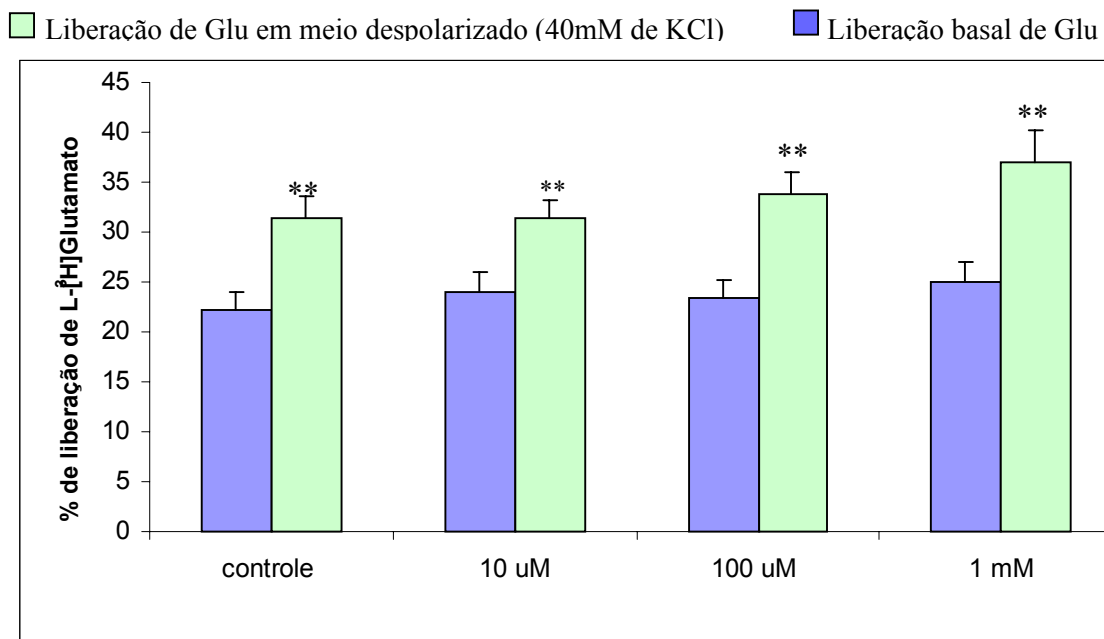


Figura IV.5- Efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a liberação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 8 experimentos e expressam a percentagem de liberação. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

\*\*  $p < 0,01$ , comparado à liberação basal (teste T pareado).

Os resultados de que os dois ácidos não interferiram com a liberação basal de glutamato indicam que os mesmos não causam despolarização nas preparações sinaptossomais.



#### **IV.4. Efeito dos ácidos 3-hidroxiglutárico e glutárico sobre a união de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos adultos na presença ou ausência de sódio no meio de incubação**

Em um sistema de incubação sem íons sódio e cloreto, o ácido 3-hidroxiglutárico nas concentrações de 1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M inibiu a união do L-[<sup>3</sup>H]glutamato às membranas, enquanto nas concentrações de 500  $\mu$ M a 2 mM não provocou qualquer alteração (Figura IV.6) [F(5,36)=7,482, p=0,0001]. Esses resultados indicam que, em concentrações pequenas, o ácido 3-hidroxiglutárico inibe a ligação de glutamato a receptores, visto que na ausência de sódio a ligação se dá predominantemente nestas estruturas.

Por outro lado, a união de L-[<sup>3</sup>H]glutamato à membranas sinápticas em meio com sódio, na presença dos ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico nas concentrações de 10  $\mu$ M a 1mM, foi inibida por ambos os ácidos e em todas as concentrações testadas (figura IV.7) [F(5,17)=6,070; p=0,005]. Esses resultados mostram que na presença destes ácidos orgânicos, a ligação do glutamato em transportadores é inibida em todas as concentrações, visto que, em nossas condições experimentais (altas concentrações extracelulares de sódio) medimos a união do glutamato a estes sítios sódio-dependentes (transportadores).

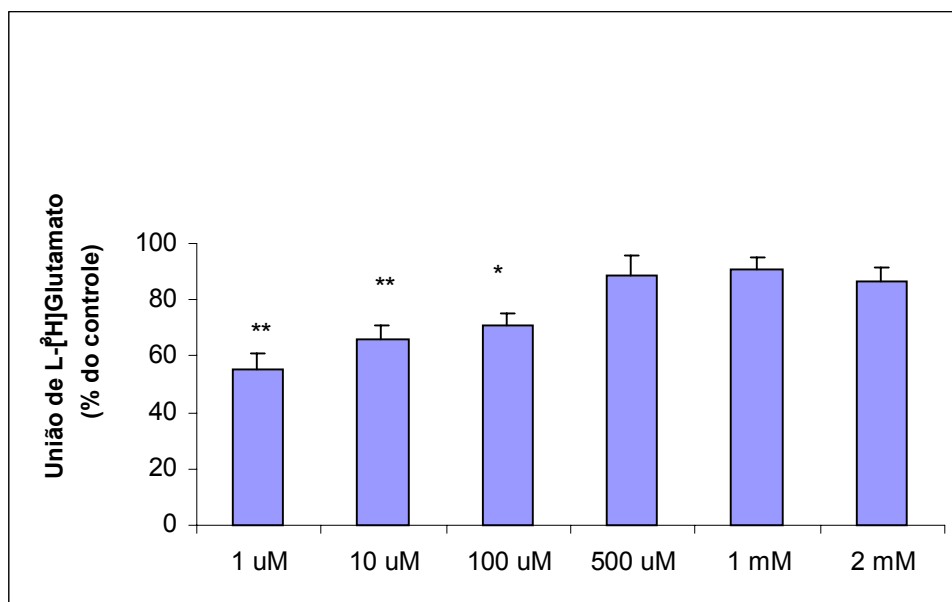


Figura IV.6- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a união de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos em meio sem sódio e cloreto.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos e estão expressos em porcentagem do controle (9,34 pmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de teste de Duncan (\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$  comparada aos controles)



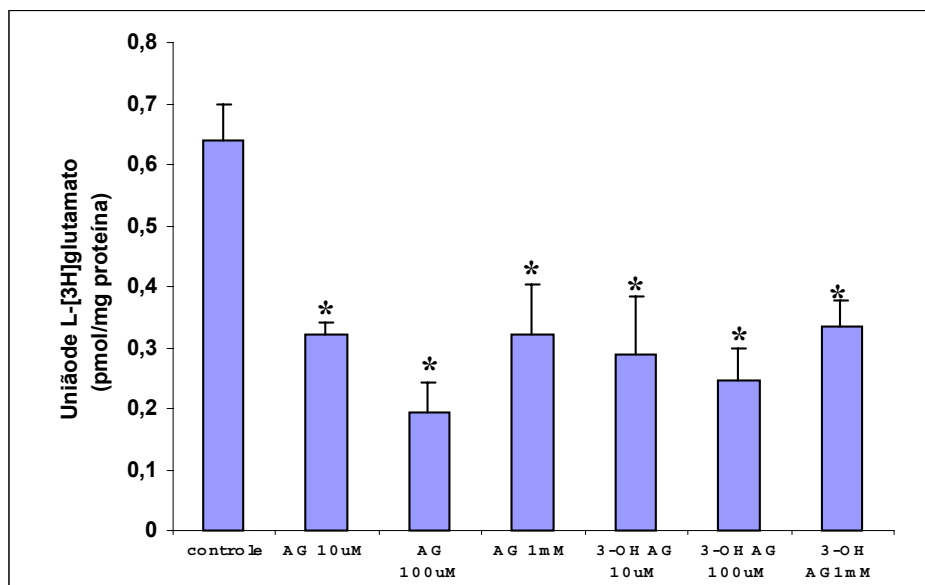


Figura IV.7- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico e glutárico sobre a união de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos em meio com sódio.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos e estão expressos em pmol/mg de proteína. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (\* $p < 0,05$  comparada aos controles)

## **IV.5. Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações de vesículas sinápticas de cérebro de ratos adultos.**

O sistema de captação de glutamato em vesículas sinápticas difere do sistema das membranas plasmáticas, tanto na utilização de energia para o transporte, como pela especificidade por glutamato.

A partir dessas considerações, foi investigado o efeito do ácido 3-hidroxi glutárico, nas concentrações de 1 µM a 1 mM, sobre a captação de glutamato por preparações de vesículas sinápticas.

A figura IV.8. mostra que o ácido 3-hidroxi glutárico não alterou a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por vesículas sinápticas nas concentrações testadas [F(4,34)=0,689 ,p=0,605].

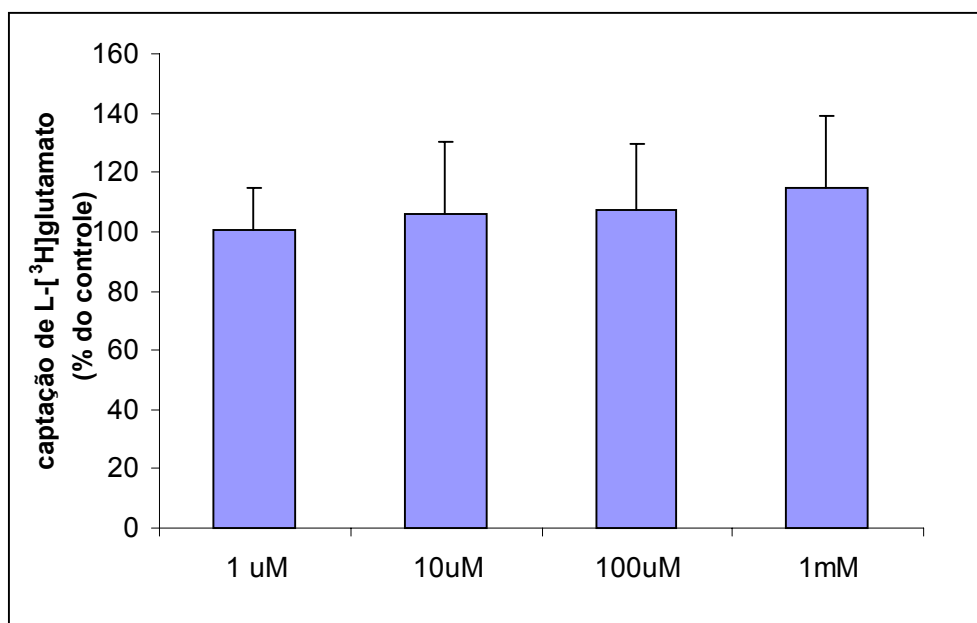


Figura IV.8- Efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por preparações de vesículas sinápticas de cérebro de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 7 experimentos e estão expressos em percentual do controle (0,82 pmol/mg de proteína). Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

A captação vesicular na presença do ácido glutárico já foi estudada (Porciúncula *et alli*, 1999).

## **IV.6 Efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a viabilidade de astrócitos de córtex cerebral de ratos**

Tendo em vista que nos próximos experimentos utilizamos astrócitos cultivados de córtex cerebral de ratos, investigamos inicialmente o efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a viabilidade dos astrócitos no 14<sup>o</sup> dia de cultivo, medida pelo teste do MTT, que indica a atividade de desidrogenases mitocondriais, e pela liberação de lactato desidrogenase para o meio de cultivo.

Incubando por 90 minutos os astrócitos, podemos verificar que o ácido 3-hidroxi-glutárico, nas concentrações de 50  $\mu$ M e 1 mM, não alterou significativamente a diferença das extinções medidas a 570 nm e a 630 nm dos grupos tratados com ácido em relação aos controles (Figura IV.9) [F(2,11)=1,323, p=0.314], indicando que as desidrogenases mitocondriais destas células, na presença do ácido 3-hidroxi-glutárico, estavam ativas e portanto não alteraram a sua viabilidade.

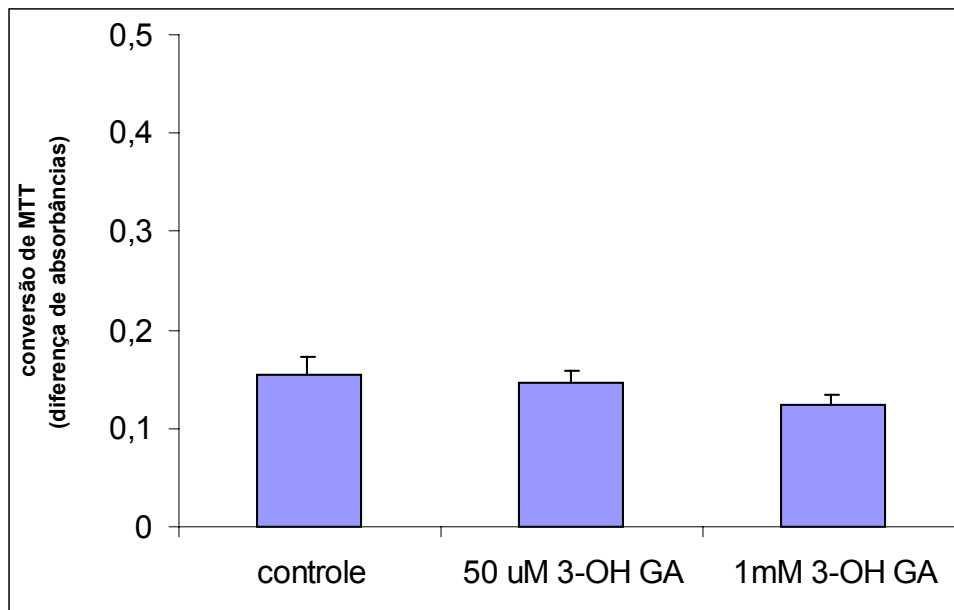


Figura IV.9- Efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a viabilidade celular (conversão de cor de MTT) de astrócitos de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos e expressam a diferença entre as absorvâncias em 570 nm e 630 nm.

Não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via).

Incubando os astrócitos por 20 horas com os ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico na concentração de 1 mM, verificamos também a viabilidade das células pelas medidas de conversão de MTT e da atividade da lactato desidrogenase. Observa-se nas figuras IV.10 e IV.11 que a viabilidade dos astrócitos incubados com os ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico, nesta concentração, não foi significativamente diferente daquela do controle para os dois testes de viabilidade. A figura IV.10 [ $F(2,14)=0,090$ ;  $p>0,05$ ] mostra que para um tempo de incubação de 20 horas com os dois ácidos, o percentual de liberação de lactato desidrogenase das células tratadas, não foi significativamente diferente das células controle, indicando que os mesmos não causam ruptura ou aumento de permeabilidade das células. Já na figura IV.11 [ $F(2,14)=6,847$ ;  $p>0,05$ ], as células incubadas com os dois ácidos por 20 horas não mostraram uma diferença de extinção (conversão de MTT) alterada em relação ao controle, indicando que as mesmas continuavam com as desidrogenases mitocondriais ativas

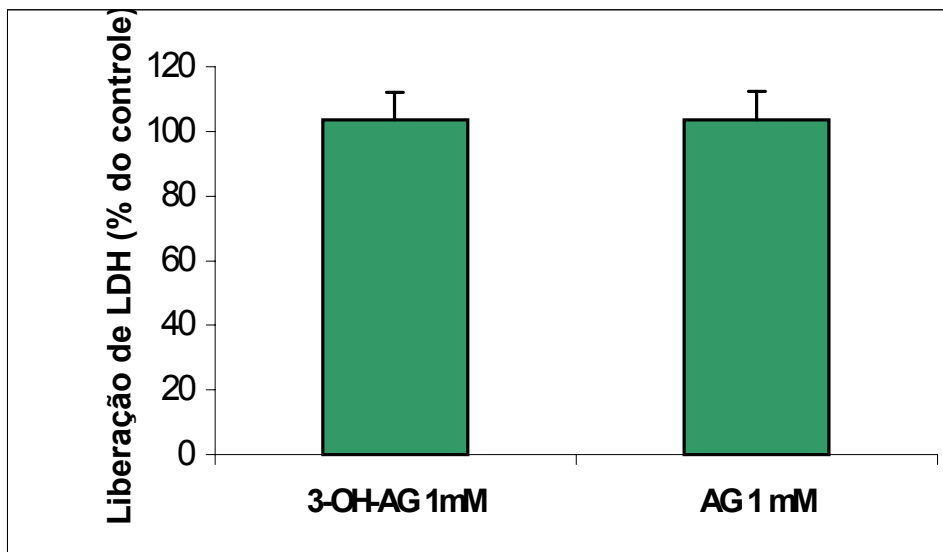


Figura IV.10- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a viabilidade celular (liberação de LDH – incubação de 20 horas) de astrócitos de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos e expressam o percentual de liberação de LDH em relação ao controle ( $0,0238 \pm 0,0014$ )

Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

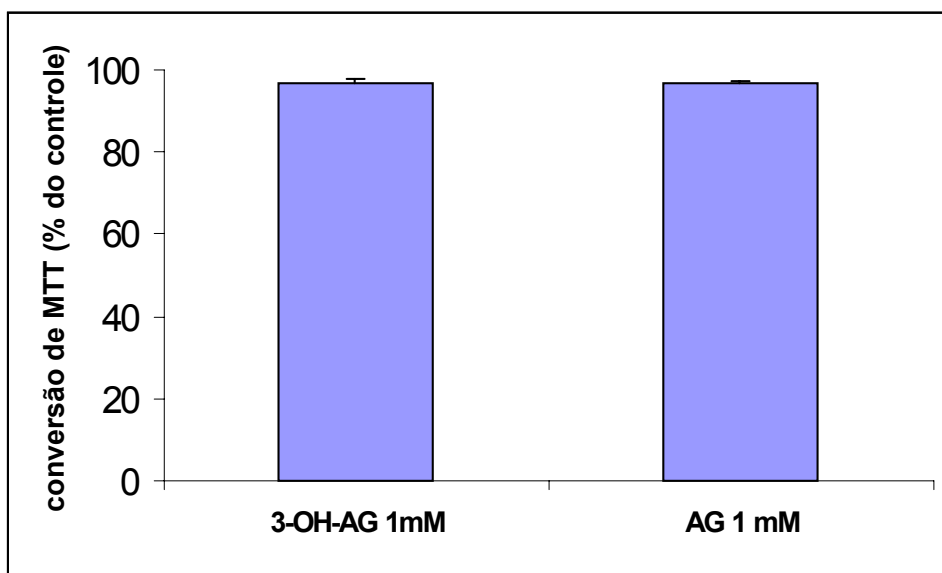


Figura IV.11- Efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a viabilidade celular (conversão de MTT-incubação de 20 horas) de astrócitos de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos e expressam a diferença entre as absorvâncias em 570 nm e 630 nm, em relação ao controle ( $0,653 \pm 0,0085$ ).

Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).



## **IV.7 Efeito dos ácidos 3-hidroxiglutárico e glutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em astrócitos de córtex cerebral de ratos.**

As figuras IV.12 e IV.13 mostram que os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico nas concentrações de 50 $\mu$ M e 1mM estimulam significativamente a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por astrócitos no 14<sup>o</sup> dia de cultivo (ácido glutárico; [F(2,14)=10,17, p=0,003]; ácido 3-hidroxiglutárico [F(2,17)=9,654, p=0,002]. Podemos observar que o ácido 3-hidroxiglutárico aumentou a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato em aproximadamente 30%, enquanto o ácido glutárico aumentou em aproximadamente 48%.

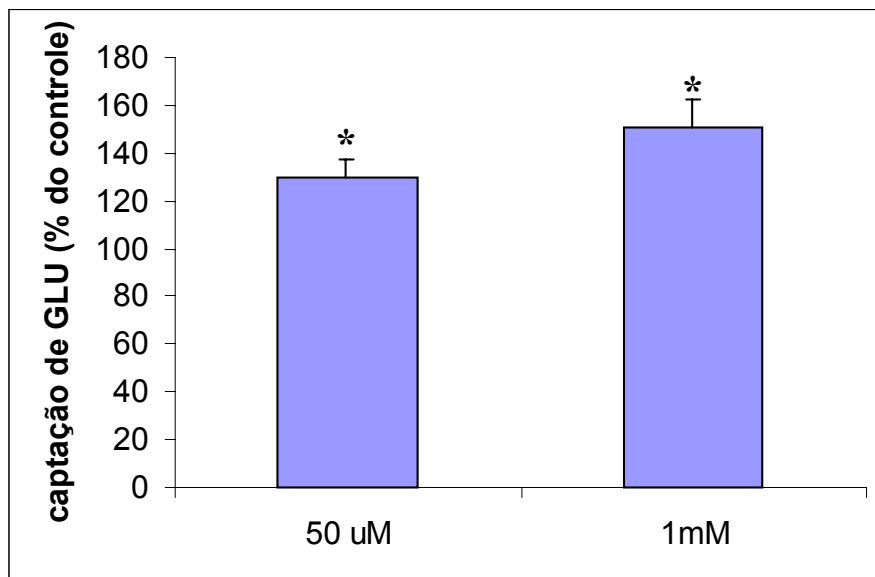


Figura IV.12- Efeito do ácido glutárico sobre a captação de L<sup>3</sup>H]glutamato por astrócitos de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos e estão expressos em percentual do controle (1,76 nmol/mg/min);  $p < 0,05$  comparada ao controle (teste de Duncan).

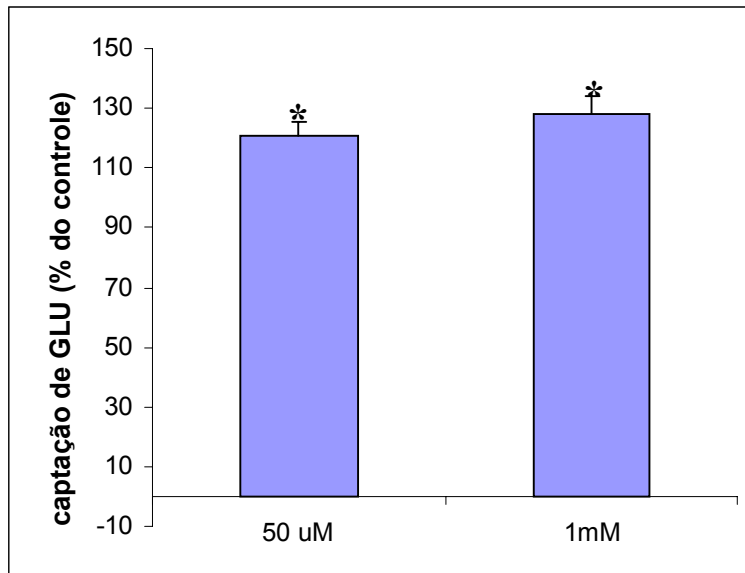


Figura IV.13- Efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por astrócitos de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos e estão expressos em percentual do controle (4,68 nmol/mg/min);  $p < 0,05$  comparada ao controle (teste de Duncan).

## V. DISCUSSÃO

A acidemia glutárica tipo I (AGI) é uma desordem autossômica recessiva da degradação dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano (Hoffmann *et alli*, 1991). Este erro inato do metabolismo se caracteriza bioquimicamente pela deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase, causando um bloqueio na rota de oxidação destes aminoácidos e mais especificamente na conversão de glutaril-CoA a crotonil-CoA. Este bloqueio leva ao acúmulo tecidual e excreção urinária elevada de grandes quantidades de ácido glutárico e de quantidades menores dos ácidos 3-hidroxi-glutárico e glutacônico nos pacientes afetados pelo distúrbio (Goodman e Frerman, 2001).

A deficiência da glutaril-CoA desidrogenase se manifesta clinicamente por uma encefalopatia de evolução progressiva com episódios de agudização precipitados por infecções e outros eventos catabólicos (Kölker, 2000<sup>b</sup>).

A doença inicia ainda *in utero* na segunda metade da gestação. A maturação do córtex frontal e temporal é retardada, levando a uma atrofia frontotemporal característica ao nascimento. Entre os 6 e 18 meses de vida dos pacientes, sintomas neurológicos relativamente suaves podem tornar-se exacerbados por febre ou por estados catabólicos no curso de infecções comuns ou imunizações de rotina, podendo também ocorrer durante jejum prolongado ou após cirurgia. Nestas ocasiões, os núcleos putamen e caudado são destruídos (necrose bilateral dos gânglios da base), resultando em uma permanente

alteração dos movimentos que é similar a uma paralisia cerebral e evolui para hipotonia acentuada e movimentos desordenados (coreoatetosis) , com manifestações de rigidez acompanhada de espasticidade. Degeneração do globo pálido e da substância branca também são observadas (Hoffmann e Zschocke, 1999). Embora a disfunção e degeneração dos gânglios da base na AG I ainda não estejam claramente elucidadas, existem vários estudos sugerindo o envolvimento de neurotransmissores como GABA e glutamato na sua etiopatogenia.

O conceito de excitotoxicidade leva em consideração o potencial de dano celular induzido por aminoácidos excitatórios, como o glutamato, via receptores NMDA e não-NMDA (Olney, 1980). Morfologicamente, um massivo edema celular e vacuolização do citoplasma de neurônios pós-sinápticos são observados, devido ao influxo de sódio e água. Acredita-se que um aumento secundário da concentração intracelular de cálcio (devido ao influxo e à liberação de estoques intracelulares) com inibição secundária de ATP-sintases, ativação de proteases e lipases e ativação da óxido-nítrico sintase possa levar à morte celular (Olney, 1993; Bittigau e Ikonomidou, 1997). Mais recentemente foi demonstrado que a ativação de receptores AMPA dos subtipos GluR2/R3 podem também induzir degeneração de células gliais (McDonald *et alli*, 1998).

Vários achados sugerem que mecanismos excitotóxicos possam ter um papel importante na fisiopatogenia da acidemia glutárica tipo I especialmente durante as crises encefalopáticas agudas acompanhadas por edema cerebral. Ainda durante essas crises ocorre excreção urinária aumentada de lactato e ácidos dicarboxílicos que indicam dano mitocondrial com déficit no metabolismo energético que também podem estar associadas à excitotoxicidade secundária (Gregersen e Brandt, 1979). Degeneração neuronal semelhante à encontrada na excitotoxicidade é observada em áreas cerebrais com alta densidade de receptores de glutamato e vacuolização pós-sináptica de neurônios tem sido

descrito em exames histológicos *post mortem* dos gânglios da base desses pacientes (Goodmann *et alli*, 1977; Soffer *et alli*, 1992).

Ainda em relação ao sistema glutamatérgico, Kölker e colegas (2000) demonstraram recentemente que os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico, em concentrações de 500 $\mu$ M a 5mM, induziram dano neuronal através de receptores NMDA dos subtipos NR1/2B em culturas neuronais primárias de telencéfalo de embrião de pinto, bem como em culturas mistas (neuronal e glial) de hipocampo de rato neonatal. A viabilidade neuronal foi determinada pelo método de exclusão com azul de tripan 24 horas após o início da incubação com os ácidos.

Em estudos prévios foi observado que a expressão temporal e espacial de subtipos de receptores NMDA mudam durante o desenvolvimento cerebral (Monyer *et alli*, 1994; Portera-Cailliau *et alli*, 1996; Wenzel *et alli*, 1997). O subtipo NR2B predomina no cérebro imaturo e é restrito ao córtex e estriado durante a maturação, enquanto a expressão do subtipo NR2A aumenta no período pós-natal e se mantém no cérebro maduro. Além disso, foi demonstrado que o cérebro imaturo, em que predomina a expressão de receptores do subtipo NR2B, é mais suscetível à excitotoxicidade do que o cérebro adulto composto na maioria por subtipo NR2A (McDonald *et alli*, 1988, 1997). Esses dados corroboram com os achados de excitotoxicidade mediados pelos ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico através de receptores NMDA dos subtipos NR1/2B e sustentam a hipótese de Kölker e colegas (2000) de que os danos neuronais associados a uma idade e região específicas, observados na AG I, seriam devido a uma alta expressão de subtipos NR2B em áreas cerebrais danificadas durante um período vulnerável do desenvolvimento cerebral.

Em relação ao sistema GABAérgico, os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico inibem competitivamente a atividade da glutamato descarboxilase, com um  $K_i$  de 1-3 mmol/L, correspondente à faixa de concentração do ácido glutárico encontrada no tecido cerebral dos pacientes afetados (Stokke *et alli*, 1976; Taberner *et alli*,

1977) e resultando em uma diminuição nos níveis de GABA nos núcleos caudado e putamen dos pacientes com AG I (Leibel *et alli*, 1980). Entretanto, não existe comprovação de que a inibição da glutamato descarboxilase seria responsável pela morte neuronal no estriado, embora tenha sido demonstrado que o ácido glutárico exerce efeito tóxico em culturas de células de estriado (Whetsell *et alli*, 1973).

Com base nos vários trabalhos mostrando que a excitotoxicidade possa estar envolvida na fisiopatogenia da AG I, resolvemos estudar o efeito dos principais metabólitos acumulados na acidemia glutárica, os ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico, sobre alguns parâmetros do sistema glutamatérgico, tais como captação e liberação de glutamato por preparações de sinaptossomas, união de glutamato em preparações de membranas sinápticas na presença e ausência de sódio, captação vesicular de glutamato e captação de glutamato por astrócitos. Alguns desses parâmetros já haviam sido analisados para o ácido glutárico (Porciúncula *et alli*, 1999).

Considerando resultados prévios do nosso grupo, demonstrando que o ácido glutárico (1mM) inibiu em 50% a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato por sinaptossomas (Porciúncula *et alli*, 1999), avaliamos inicialmente o efeito do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a captação do L-[<sup>3</sup>H]glutamato em preparações de sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Sob as mesmas condições experimentais, o ácido 3-hidroxi glutárico, em todas as concentrações testadas, não alterou a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato.

Investigamos então o efeito dos ácidos 3-hidroxi glutárico e glutárico sobre a liberação basal e estimulada por potássio de glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral. Para verificar a integridade dos sinaptossomas, testamos o efeito da presença dos ácidos sobre a liberação de lactato desidrogenase no meio de incubação. Verificamos que os dois metabólitos em concentrações de até 1 mM não alteram a liberação da enzima, indicando que os

o sinaptossomas estavam íntegros. A liberação basal de glutamato, nas condições experimentais utilizadas, não sofreu qualquer modificação pela presença dos metabólitos, indicando diretamente que os mesmos não alteram esse parâmetro e que indiretamente não causam despolarização. A liberação de glutamato nas preparações despolarizadas (na presença de 20 e 40 mM de cloreto de potássio) também não foram modificadas pela presença dos ácidos em concentrações até 1 mM. No entanto, embora não significativa, observou-se uma tendência de um aumento da liberação estimulada do neurotransmissor à medida que a concentração do ácido 3-hidroxi glutárico aumentava.

A próxima etapa na investigação foi a de verificar a influência do ácido 3-hidroxi glutárico sobre a união de glutamato em membranas plasmáticas de córtex cerebral de ratos na ausência de sódio e cloreto no meio de incubação (receptores glutamatérgicos) e na presença de sódio (receptores mais transportadores de glutamato). Verificamos inicialmente que, na presença de baixas concentrações do metabólito (1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M), ocorreu uma inibição da ligação do glutamato a membranas plasmáticas em meio sem sódio e cloreto. Tendo em vista que nestas condições experimentais a ligação se dá primordialmente em receptores, nossos resultados indicam que em baixas concentrações o ácido 3-hidroxi glutárico inibe a ligação de glutamato a receptores. Por outro lado, em concentrações mais altas (500  $\mu$ M a 2 mM) não verificamos esse efeito. Não temos até o momento uma explicação para esses achados. No entanto, tendo em vista estudos com enzimas, que tem demonstrado que compostos em baixa concentração inibem a atividade enzimática e em concentrações mais elevadas não apresentam qualquer efeito devido à interação dos mesmos a sítios moduladores (regulatórios), uma explicação para nossos achados poderia ser devida ao fato de que em baixas concentrações o ácido 3-hidroxi glutárico poderia deslocar o glutamato por competição dos sítios de ligação na membrana sináptica e em alta concentração se ligar a um sítio regulatório que interage com os receptores glutamatérgicos mudando a sua conformação e sensibilidade ao ácido. Esta hipótese é, entretanto, improvável, tendo em vista os



trabalhos de Ullrich e colaboradores (1999) que verificaram que o ácido 3-hidroxi-glutárico não se liga a receptores NMDA em culturas mistas de córtex cerebral de rato neonatal. Por outro lado, como nossas preparações de membranas sinápticas contêm em teoria todos os receptores glutamatérgicos, é possível que a reduzida ligação ao receptor identificada em nossos resultados possam refletir a ligação a outros receptores não-NMDA e metabotrópicos. Uma explicação alternativa e que leva também em consideração estudos sobre inibidores e ativadores enzimáticos poderia pressupor que os ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico se ligam distintamente, dependendo de sua concentração, a sítios modulatórios que regulam a ligação do glutamato a receptores.

Observamos também que na presença de sódio no meio de incubação o ácido 3-hidroxi-glutárico inibiu a ligação do glutamato em todas as concentrações testadas (10  $\mu$ M a 1 mM). Como o sódio é essencial para os sistemas transportadores de glutamato, nossos resultados poderiam sugerir que o metabólito causa uma diminuída ligação do neurotransmissor a esses transportadores. Finalmente, não se pode afastar a hipótese de que o efeito também esteja dirigido à ligação do glutamato a outras membranas, já que essas preparações contêm contaminação por mitocôndrias e outras organelas.

As vesículas sinápticas são responsáveis pela captação de glutamato do citosol cuja quase totalidade é proveniente da glutamina produzida nos astrócitos. Uma inibição da captação do neurotransmissor por essas vesículas poderia comprometer todo o ciclo glutamato-glutamina.

Desta forma estudamos o efeito do ácido 3-hidroxi-glutárico sobre a captação de glutamato por preparações de vesículas sinápticas de cérebro de ratos. A ação do ácido glutárico sobre a captação de glutamato por essas vesículas já havia sido estudada anteriormente (Porciúncula, 1999). Verificamos que o ácido 3-hidroxi-glutárico nas concentrações de 1  $\mu$ M a 1 mM não alterou essa captação.

Passamos então a investigar o efeito dos ácidos 3-hidroxi-glutárico e glutárico inicialmente sobre a viabilidade de astrócitos de córtex cerebral de ratos. A presença do ácido glutárico nas concentrações de 50  $\mu$ M e 1 mM por 90 minutos no meio de incubação não alterou a viabilidade dos astrócitos determinada pelo teste do MTT, que é uma medida da atividade das desidrogenases mitocondriais. Também estudamos o efeito dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico sobre a viabilidade dos astrócitos em cultura colocando os mesmos na presença dos metabólitos por 20 horas. Neste caso, a viabilidade foi medida através do MTT e da liberação da lactato desidrogenase. Verificamos que não houve qualquer diferença da viabilidade dos astrócitos na presença ou ausência (controles) dos metabólitos, indicando fortemente que os mesmos não são citotóxicos para astrócitos nas condições de nossos experimentos. Esses resultados são interessantes e diferem de outros (Kölker *et alli*, 2000<sup>a</sup>; Flott-Rhamel, 1997) que demonstraram citotoxicidade para neurônios em cultura para o ácido 3-hidroxi-glutárico. É possível, portanto, que astrócitos sejam mais resistentes que neurônios para estas condições.

Tendo em vista que os ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico não foram citotóxicos e não alteraram a permeabilidade da membrana plasmática dos astrócitos, estudamos a ação dos dois metabólitos sobre a captação de glutamato por astrócitos cultivados de córtex cerebral de ratos. Observamos que os dois metabólitos aumentam de forma significativa a captação do neurotransmissor por essas células. A literatura descreve que os transportadores de glutamato em células neurais são regulados por receptores glutamatérgicos, por fosforilação, por oxidação de grupos sulfidríla (-SH), por ácido araquidônico, pelo próprio glutamato [REP] ou ainda por derivados da guanina (Frizzo *et alli*, 2001). Embora não tenhamos estudado neste trabalho os mecanismos responsáveis pelo aumento da captação de glutamato pelos astrócitos, é possível que o efeito por nós registrado possa ser devido ao efeito isolado ou sinérgico de um ou outro desses fatores.

A fosforilação de proteínas está envolvida em processos cruciais de controle metabólico da célula, entre os quais o da atividade das proteínas transportadoras da membrana plasmática e de outras membranas. A fosforilação, portanto, afeta direta ou indiretamente a captação de neurotransmissores, tais como o glutamato. A fosforilação proteica pode também influenciar a expressão e a localização dos transportadores. Tem sido também demonstrado que proteinoquinasas afetam o tráfico desses transportadores do citoplasma para a membrana plasmática e vice-versa (Danbold, 2001). Por outro lado, acredita-se que as consequências da fosforilação sobre o transporte de aminoácidos excitatórios variam de acordo com os tipos de células envolvidas porque as distintas células neurais possuem metabolismos e processos únicos que responderão de várias maneiras à fosforilação (Carrick e Dunlop, 1999). Assim, estudos demonstraram que o H89 e a chelerythrina, inibidores respectivamente das proteinaquinasas A (PKA) e C (PKC), inibem de forma dose-dependente a captação de glutamato por células neurais cultivadas de córtex cerebral de ratos e que os respectivos ativadores destas quinase, forskolina e phorbol-12-myristato 13-acetato (PMA), possuem um efeito oposto, i.e., estimulam esta captação (Lortet *et alli*, 1999). Outros estudos realizados em sinaptossomas de estriato de ratos verificaram que a captação de glutamato é estimulada de forma dose-dependente com a ativação da PKA, mas não com a ativação da PKC (Pisano *et alli*, 1996).

Por outro lado, demonstrou-se que o transporte de glutamato é reduzido pela fosforilação do transportador GLAST, expresso principalmente em cultivo de astrócitos (Kondo et al., 1995), pela PKC, sem que houvesse uma mudança na expressão do transportador na membrana plasmática (Conradt e Stoffel, 1997). Portanto, é possível que os ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico inibam essa proteína quinase ou estimulem fosfatases que desfosforilem o transportador GLAST, permitindo um maior influxo de glutamato nos astrócitos.

De outra forma, considerando as evidências demonstrando que a expressão dos transportadores GLAST em astrócitos e a captação de

aminoácidos excitatórios por essas células são ativadas pelo estímulo de receptores glutamatérgicos (Gegelashvilli *et alli*, 1996; Anderson e Swanson, 2000; Munir *et alli*, 2000), uma explicação alternativa para o aumento da captação de glutamato por astrócitos cultivados como a apresentada no presente estudo poderia ser um estímulo desses receptores pelos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico que poderiam se comportar, desta forma, como agonistas glutamatérgicos. Essa hipótese é remota pelo menos para o ácido 3-hidroxi-glutárico, visto que o mesmo não se liga a receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Ullrich *et alli*, 1999), o que reflete que o mesmo não compete com o glutamato pelos mesmos sítios ligantes. Não se pode, todavia, afastar a hipótese de que os receptores glutamatérgicos localizados em astrócitos sejam diferentes dos presentes em neurônios, permitindo um maior influxo de glutamato como o verificado no presente trabalho.

Além disso, tem sido demonstrado que o glutamato e o aspartato são capazes de estimular a expressão dos transportadores GLAST em astrócitos por um mecanismo ainda desconhecido que é independente de alterações na expressão e na síntese do transportador ou no estímulo a receptores glutamatérgicos (Munir *et al.*, 2000). Já o ácido araquidônico estimula a proteína quinase C em astrócitos (Khan *et alli*, 1995) e influencia a expressão e função de várias moléculas como os transportadores de glutamato inibindo a sua captação (Breukel *et alli*, 1997; Volterra *et alli*, 1992). Uma ação, dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico poderia estar, portanto, ligada à diminuição nas concentrações do ácido araquidônico livre intracelular.

Por outro lado, está descrito que a oxidação/redução de grupos sulfidril em transportadores de glutamato possa representar um mecanismo regulatório fisiológico do transporte desse neurotransmissor. Assim, demonstrou-se que radicais livres do tipo superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito inibem a captação de glutamato em culturas de astrócitos (Volterra *et alli*, 1994<sup>a,b</sup>). Portanto, uma diminuição dessas moléculas reativas, causada pelos

ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico poderiam estar envolvidas no aumento da captação de glutamato por astrócitos como o verificado em nosso trabalho. Essa hipótese é, no entanto, pouco provável, visto trabalhos recentes demonstrando que em neurônios cultivados o ácido 3-hidroxi glutárico aumenta a produção de radicais livres (Kolker *et alli*, 2001<sup>a,b</sup>).

Concluindo, essas observações mostram a complexidade na identificação de um mecanismo que possa explicar o aumento na captação de glutamato verificada em nosso estudo e causada pelos compostos acumulados na acidemia glutárica tipo I. Existe uma série de hipóteses que devem ser investigadas para explicar nossos resultados de um aumento da captação de glutamato pelos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico. Estudos futuros serão portanto indispensáveis para esclarecer essa questão.

Os resultados do presente trabalho não indicam que os ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico atuem de forma significativa no sistema glutamatérgico de forma a induzir excitotoxicidade. Por outro lado, os resultados prévios apresentados por nosso grupo indicam que o ácido glutárico, ao inibir a captação de glutamato por preparações sinaptossomais e a ligação do glutamato a membranas sinápticas, indicando uma provável ação inibitória sobre os transportadores de glutamato (Porciúncula *et alli*, 1999), levam a crer que, no que se refere ao vários parâmetros do sistema glutamatérgico estudados, é possível que o ácido glutárico seja mais tóxico que o ácido 3-hidroxi glutárico, diferentemente do que tem sido publicado recentemente (Ullrich, 1999; Kölker, 1999, 2000). Enfatize-se, no entanto, os resultados de Kölker (2000) demonstrando uma ação citotóxica dos dois metabólicos diminuindo a viabilidade de neurônios cultivados. Recentemente também foi descrito que o ácido glutárico inibe a produção de energia em cérebro de ratos (Silva *et alli*, 2001), o que pode representar um mecanismo de neurotoxicidade. Portanto, podemos também propor que a excitotoxicidade demonstrada pelo ácido glutárico pode ser secundária ao déficit energético provocado.

Concluindo, não podemos no momento avaliar com precisão os resultados do presente trabalho em termos de neurotoxicidade causada pelos ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico, bem como quais dos mecanismos propostos até o momento (excitotoxicidade, estresse oxidativo ou déficit energético) são mais importantes para explicar a neurotoxicidade dos pacientes afetados por acidemia glutárica tipo I. Os resultados do presente trabalho e prévios de nosso laboratório (Porciúncula *et alli*, 1999) indicam que no que se refere aos parâmetros analisados do sistema glutamatérgico, o ácido glutárico é mais tóxico do que o ácido 3-hidroxi glutárico.

## VI. CONCLUSÕES

- O ácido 3-hidroxiglutárico, nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  a 1 mM, não alterou a captação *in vitro* de L-[ $^3\text{H}$ ]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos jovens.
- Os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico não alteraram a liberação basal e estimulada por potássio (20 mM e 40 mM) *in vitro* de L-[ $^3\text{H}$ ]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos jovens.
- O ácido 3-hidroxiglutárico em baixas concentrações (1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) inibiu a união *in vitro* de L-[ $^3\text{H}$ ]glutamato a membranas plasmáticas de córtex cerebral de ratos jovens em meio sem íons sódio (sítios receptores). Em altas concentrações, nenhum efeito do ácido 3-hidroxiglutárico sobre este parâmetro pode ser detectado.
- Os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico em todas as concentrações testadas (10  $\mu\text{M}$  a 1 mM) inibiram a união *in vitro* de L-[ $^3\text{H}$ ]glutamato a membranas plasmáticas de córtex cerebral de ratos jovens em meio com sódio (sítios transportadores dependentes de sódio).
- O ácido 3-hidroxiglutárico (1  $\mu\text{M}$  a 1 mM) não alterou a captação *in vitro* de L-[ $^3\text{H}$ ]glutamato por vesículas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações testadas.
- Os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico, na concentração de 1 mM não modificaram a viabilidade de astrócitos cultivados de córtex cerebral de ratos medida pela teste do MTT e pela liberação de lactato desidrogenase, indicando que os mesmos não foram citotóxicos para astrócitos.

- Os ácidos glutárico e 3-hidroxi glutárico cultivados de córtex cerebral de ratos estimularam a captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato pelos astrócitos em 50% e 30% respectivamente.



## VII. REFERÊNCIAS

- ABE, T. Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/ $Ca^{2+}$  signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267: 13361-68.
- AICARDI, J., Goutieres, F., Saudubray, J.M., Ogier, H. (1985) CT scans of infants with glutaric aciduria. *Devel. Med. Child. Neurol.* 27: 403.
- AMIR, N., Elpeleg, O.N., Shalev, R.S., Christensen, E. (1987) Glutaric Aciduria Type I: clinical heterogeneity and neuroradiologic features. *Neurology* 37: 1654-1657.
- AMIR, N., Elpeleg, O.N., Shalev, R.S., Christensen, E. (1989) Glutaric Aciduria Type I: enzymatic and neuroradiologic investigations in two kindreds. *J. Pediatr.* 114: 983-989.
- ANDERSON, C.M. and SWANSON, R.A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia* 32: 1-14.
- ARAMORI, I. and NAKANISHI, S. (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8: 757-65.
- ARRIZA, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4155-60.
- ARTOLA, A., Singer, W. (1987) (??) *Nature* 330: 649-652.
- BALCAR, V.J. and LI, Y. (1992) heterogeneity of high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate in the mammalian Central Nervous system. *Life Sci.* 51: 1467-78.
- BANNAI, S. (1986) Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261: 2256-63.

- BARBOUR, B., Brew, H., Attwell, D. (1988) Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335: 433-35.
- BARIC, I., Wagner, L., Buckel, W., Hoffmann, G.F. (1997<sup>a</sup>) Sensitivity of free and total glutaric and 3-OH-glutaric acid measurements by stable isotopic dilution-assays for the diagnosis of Glutaric Aciduria Type I. *J. Inher. Metab. Dis.* 20(supplement I):34.
- BARIC, I., Zschoke, J., Christensen, E., Duran, M., Goodman, S.I., Leonard, J.V., Müller, E., Morton, D.H., Superti-Furga, A, Hoffmann, G.F. (1998) Diagnosis and management of glutaric Aciduria Type I. *J. Inher. Metab. Dis.* 21: 326-340.
- BASKYS, A. *et. al.* (1990) *Neurosci. Lett.* 112: 76-81.
- BEADLE, G.W. (1945) *Chem. Rev.* 37: 15-21.
- BEAR, M.F. and MALENKA, R.C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 389-99.
- BEAUDET, A.L. (1989) Genetics and Biochemistry of variant human phenotypes, In: the metabolic and molecular basis of inherited disease, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. 6<sup>o</sup>ed, New York, Mcgraw-Hill, pp:3-53.
- BEM-ARY, Y. (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-403.
- BENNETT, J.P., Logan, W.J., Snyder, S.H. (1973) Amino acids as Central Nervous transmitters: the influence of ions, amino acids analogues and ontogeny on transport systems for L-glutamic and L-aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes of the rat. *J. Neurochem.* 21: 1533-1550.
- BENNETT, M.J., Marlow, N., Pollitt, R.J., Wales, J.K.H. (1986) *Eur. J. Pediatr.* 145: 403.
- BENNETT, M.J., pollitt, R.J., Goodman, S.I., Hale, D.E., Vamecq, J. (1991) (??) *J. Inher. Metab. Dis.* 14: 165.
- BERGMAN, I., Finegold, D., Gartner, C. (1989) Acute profound dystonia in infants with glutaric acidemia. *Pediatrics* 83: 228-234.

- BERNARDI, P., Brockemeier, K.M., Pfeiffer, D.R. (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore, a cylosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomemb.* 26: 509-17.
- BETTLER, B. and MULLE, C. (1995) Review: neurotransmitter receptor II. AMPA and Kainate receptors. *Neuropharmacology* 34: 123-139.
- BILLUPS, B., Rossi, D., Attwell, D. (1996) Anion conductance behavior of the glutamate uptake carrier in Salamander retinal glial cells. *J. Neurosci.* 16: 6722-31.
- BITO, H., Nakamura, M., Honda, Z. *et. al.* (1992) Platelet-activating factor (PAF) receptor in rat brain: PAF mobilizes intracellular  $Ca^{2+}$  in hippocampal neurons. *Neuron* 9: 285-94.
- BITTIGAU, P. and IKONOMIDOU, C. (1997) Glutamate in neurologic diseases. *J Child neurol.* 12: 471-485.
- BLISS, T.V.P. and COLLINGRIDGE, G.L. (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature (Lond)*, 361: 31-39.
- BRADFORD, H.F. (1995) Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 47: 656-659.
- BRANDT, N.J., Gregersen, N., Christensen, E., Gron, I.H., Rasmussen, K. (1979) *J. Pediatr.* 94: 669.
- BREUKEL, A.I.M., Besselsen, E., Dasilva, F.H.L., Ghijzen, W.E.J.M. (1997) Arachidonic acid inhibits uptake of amino acids and potentiates PKC effects on glutamate, but not GABA, exocytosis in isolated hippocampal nerve terminals. *Brain Res* 773: 90-97.
- BRIGHTMAN, M.W. and CHENG-TAO, J.H. (1998) Cell membrane interactions between astrocytes and brain endothelium, In:the biochemical pathology of astrocytes (Norenberg, M.D., Hertz, L., Schousboe, A., eds.) pp: 21-39, Alan R. Liss, New York, NY.
- BRISMAR, J., Ozand, P.T. (1995) CT and MR of the brain in Glutaric Acidemia Type I: a review of 59 published cases and a report of 5 new patients. *Am. J. Neuroradiol.* 16: 675-683.

- BRUNO, V. et. al. (1995) *Neuropharmacology* 34: 1089-98.
- BRUSILOW, S.W. and TRAYSTMAN, R.J. (1986) Letter to editor. *N. Engl. J. Med.* 314:786.
- BURTON, B.K. (1987) Inborn Errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics* 79: 359.
- CAMPISTOL, J., Ribes, A., Alvarez, L., Christensen, E., Millington, D.S. (1992) Glutaric Aciduria Type I: unusual biochemical presentation, *J. Pediatr.* 121: 83-86.
- CARRICK, T. and DUNLOP, J. (1999) Protein kinase C modulation of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of glutamate transporter. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25(1): 426.
- CHALMERS, R.A. and Lawson, A.M. Organic acids in man. Analytical Chemistry, Biochemistry and diagnosis of the organic acidurias, 1<sup>st</sup> ed., London, Chapman and Hall, 1982.
- CHAN, P.H. and FISHMAN, R.A. Free fatty acids, oxygen free radicals and membrane alterations in brain ischemia and injury. In: Cerebrovascular diseases (Plum, F., Pulsinelli, W. eds.), New York, Raven Press, 1985:161-71.
- CHAPMAN, A.G., Smith, S.E., Meldrum, B.S. (1991) The anticonvulsive effect of the non-NMDA antagonists, NBQX and GYKI 52466 in mice. *Epilepsy Res.* 9: 92-96.
- CHARPAK, S. et. al. (1990) *Nature* 347: 765-67.
- CHAVIS, P. et. al. (1994) *J. Neurosci.* 14: 7067-76.
- CHEN, C. and TONEGAWA, S. (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development learning and memory in the mammalian brain. *Ann. Rev. Neurosci.* 20: 157-84.
- CHO, Y. and BANNAI, S. (1990) Uptake of glutamate and cystine in C-6 glioma cells and cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 55: 2091-97.
- CHOI, D.W. (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18: 58-60.

- CHOI, D.W., Rothman, S.M. (1990) The role of Glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic cell death. *Ann. Rev. Neurosci.* 13: 171-82.
- CHRISTENSEN, E. (1993) A fibroblast Glutaryl-CoA Dehydrogenase assay using detritiation of <sup>3</sup>H-labelled Glutaryl-CoA: application in the genotyping of the Glutaryl-CoA Dehydrogenase locus. *Clin. Chim. Acta*, 220: 71-80.
- CHRISTENSEN, E., Brandt, N.J. (1978)(??) *Clin. Chim. Acta*, 88: 267.
- CHRISTENSEN, E., Ribes, A., Busquets, C., *et. al.* (1997) Compound heterozygosity in the Glutaryl-CoA Dehydrogenase gene with R227P in one allele is associated with no or very low free glutarate excretion. *J. Inher. Metab. Dis.* 20: 383-386.
- CLARK, G.D., Happel, L.T., Zorumski, C.F., Bazan, N.G. (1992) Enhancement of hippocampal excitatory synaptic transmission by platelet-activating factor. *Neuron* 9: 1211-16.
- CLEMENTS, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E., Westbrook, G.L. (1992) The time course of Glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258: 1498-1501.
- CONN, P.J. and PIN, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 205-37.
- CONRADT, M. and STOFFEL, w. (1997) Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J. Neurochem.* 68: 1244-51.
- COOPER, A.J.L. and PLUM, F. (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 67:440-519.
- COOPER, A.J.L., Mc Donald, J.M., Gelbard, A.S., Gledhill, R.F., Duffy, T.E. (1979) The metabolic fate of <sup>13</sup>N-labelled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* 254: 4982-992.
- COYLE, J.T., Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, Glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-95.
- CURTIS, D.R. & WATKINS, J.C. (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6:117-141.
- CURTIS, D.R. and JOHNSTON, G. A R. (1974) Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol.* 69: 94-188.

- DAIKHIN, Y and YUDKOFF, M. (2000) Glutamate and Glutamine in the brain: compartmentation of brain Gutamate metabolism in neurons and glia. *American Society for Nutritional Sciences* 1026-1031.
- DANBOLT, N.C. (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Progress in Neurobiology* 44: 377-96.
- DANBOLT, N.C. (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog. Neurobiol.* 44: 377-96.
- DANBOLT, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1-105.
- DANBOLT, N.C., Storm-Mathisen, J., Kanner, B.I. (1992) a  $[Na^+ + K^+]$  coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51: 295-310.
- DAVIDOFF, R.A. and SEAR, E.S. (1974) *Neurology* 24: 957.
- DAWSON, U.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bretz, D.S., Snyder, S.H. (1991) Nitric Oxide mediates Glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 88: 6368-71.
- DENNIS, S.C., Land, J.M., Clark, J.B. (1976) Glutamate metabolism and transport in rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 156: 323-31.
- DOMERCQ, M. and MATUTE, C. (1999) Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum. *Brain Res. Mol.* 67: 296-302.
- DRIGO, P., Piovan, S., Battistella, A.P. (1996) Macrocephaly, subarachnoid fluid collection and Glutaric Aciduria Type I. *Journal of Child Neurology.* vol.11, n° 5.
- DUNGER, D.B., Snodgrass, G.J.A.I. (1984) Glutaric Aciduria Type I presenting with hypoglycemia. *J. Inher. Metab. Dis.* 7: 122.
- DUNKLEY, P.R., Heath, J., Harrison, S.M., Jarvie, P.E., Glenfield, P.J., Rostas J.A.P. (1986) A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.* 441: 59-71.

- DYKENS, J.A., Stern, A., Trenkner, E. (1987) Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons *in vitro* is analogous to reperfusion tissue injury. *J. Neurochem.* 49: 1222-28.
- ERECINSKA, M. and SILVER, I.A. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 35: 245-96.
- ERECINSKA, M., Zaleska, M.M., Nelson, D., Nissim I., Yudkoff, M. (1988) Glucose and the metabolism of [<sup>15</sup>N] glutamine in synaptosomes. *J. Neurochem.* 51: 892-902.
- FILLENZ, M. (1995) Physiological release of excitatory amino acids. *Behav. Brain Res.* 71: 51-67.
- FITZJOHN, S.M., Irving, A.J., Palmer, M.J., Lodge, D., Collingridge, G.L. (1996) Activation of group I mGluR5 potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 203: 211-23.
- FONNUM, F. and WALAAS, I. (1978) The effect of intrahippocampal kainic acid injections and surgical lesions on neurotransmitters in hippocampus and septum. *J. Neurochem.* 31: 1173-1181.
- FONNUM, F., Storm-Mathisen, J., Divac, I. (1981) Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in the cortico-striatal and cortico-thalamic fibres in rat brain. *Neuroscience* 6: 863-875.
- FOSTER, A. C., Mena, E.E., Monaghan, D.T. and Cotman, C.W. (1981) Synaptic localization of kainic acid binding sites. *Nature (Lond)*, 289: 73-75.
- FRIZZO, M.E.S., Lara, D.R., Dahm, K.C.S., Prokopiuk, A .S., Swanson, R.A., Souza, D.O. (2001) Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *NeuroReport*, 426 (12): 879-881.
- FUKUDA, H., Kudo, Y., Ono, H. (1977) *Eur. J. Pharmacol.* 44:17.
- FYKSE, E.M. and FONNUM, F.J. (1996) Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem. Res.* 21: 1053-60.
- FYKSE, E.M., Iversen, E.G., Fonnum, F. (1992) Inhibition of L-glutamate uptake into synaptic vesicles. *Neurosci. Lett.* 135: 125-28.
- GARROD, A.E. (1908) Inborn errors of metabolism. *Lancet*, 2: 1.

- GASIC, G.P., Hollmann, M. (1992) Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Ver. Physiol.* 54: 507-536.
- GEGELASHVILI, G. and SCHOUSBOE, A. (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull* 45: 233-38.
- GEGELASHVILI, G., Civenni, G., Racagni, G., Danbolt, N.C., Schousboe, I., Schousboe, A. (1996) Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 8: 261-65.
- GIBSON, Q.H. (1948) *Biochem. J.* 42:13-18.
- GLAUM, S.R. and MILLER, R.J. (1992) *J. Neurosci.* 12: 2251-58.
- GLAUM, S.R. and MILLER, R.J. (1995) In: The metabotropic glutamate receptors: acute regulation of synaptic transmission by metabotropic glutamate receptors (Conn, P.J. and Patel, J. eds.) pp 147-172, Human Press.
- GLAVINOVIC, M.I. and RABIE, H.R. (1998) Monte Carlo simulation of spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents in rat hippocampal synapse in the presence and absence of desensitization Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.* 435: 193-202.
- GOODMANN, S.I. and FRERMMAN, F.E. Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia, In: The metabolic and molecular bases of inherited disease (Scriver *et alli* eds.), 7th ed., New York, McGraw-Hill, Inc, 2001.
- GOODMANN, S.I., Kratz, L.E., Digiulio, K.A , *et al* (1995) Cloning of glutaryl-CoA Dehydrogenase cDNA and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Hum. Mol. Genet.* 4: 1493-1498.
- GOODMANN, S.I., Markey, S.P., Moe, P.G., Miles, B.S., Teng, C.C. (1975) (??) *Biochem. Med.* 12: 12-21.
- GOODMANN, S.I., Norenberg, M.D., Shikes, R.H., Breslich, D.J., Moc, P.G. (1977) *J. Pediatr.* 90: 746-50.
- GOODMANN, S.I., Norenberg, M.D., Shikes, R.H., Breslieh, D.J., Moe, P.G. (1997) Glutaric aciduria biochemical and morphological considerations. *J. Pediatr.* 90: 746-750.



- GOODMANN, S.I., Stein, D.E., Schlesinger, S., Christensen, E., Schwartz, M., Greenberg, C.R., Elpeleg, O.N. (1998) (??) *Hum. Mutant*. 12 (3): 141-144.
- GREGERSEN, N., Brandt, N.J. (1979) Ketotic episodes in Glutaryl-CoA Dehydrogenase deficiency (Glutaric Aciduria). *Pediatr. Res.* 13: 977.
- GUNDERSEN, V., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1993) Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience* 57: 97-111.
- HAYASHI, T. (1952) A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. J. Physiol.* 3: 46-64.
- HENNEBERRY, R.C., Novelli, A., Cox, J.A., Lysko, P.G. (1989) Neurotoxicity at the N-methyl-D-Aspartate receptor in energy-compromised neurons: a hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann NY Acad. Sci.* 568: 225-33.
- HERKERT, M., Röttger, S., Becker, C.M. (1998) The NMDA receptor subunit NR2B of neonatal rat brain: complex formation and enrichment in axonal growth cones. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1553-62.
- HERRERO, I., Miras-Portugal, T., Sánchez-Prieto, J. (1992) *Nature* 360: 163-66.
- HERRERT, M., Röttger, S., Becker, C.M. (1998) The NMDA receptor subunit NR2B of neonatal rat brain: complex formation and enrichment in axonal growth cones. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1553-1562.
- HEYES, M.P. (1987) *Can. J. Neurol. Sci.* 14; 441.
- HOFFMANN, G.F. (1994) Selective screening for inborn errors of metabolism-past, present and future. *Eur. J. Pediatr.* 153(Suppl 1): S2-S8.
- HOFFMANN, G.F., Athanassopoulos, S., Burlina, A.B. (1996) Clinical course, early diagnosis, treatment and prevention of disease in Glutaryl-CoA Dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 27: 115-123.
- HOFFMANN, G.F., Trefz, F.K., Barth, P., Böhles, J.H., Biggemann, B., Bremer, H.J., Christensen, E., Frosch, M., Hanefeld, F., Hunneman, D.H., Jacobi, H., Kurlmann, G., Lawrenz-Wolf, B., Rating, D., Doe, C.R., Schutgens, R.B.H.,

- Ulrich, K., Weisser, J., Wendel, U., Lehnert, W. (1991) Glutaril-CoA Deficiency: a distinct encephalopathy. *Pediatrics* 88:1194-1203.
- HOFFMANN, G.F., Zschocke, J. (1999) Glutaric Aciduria Type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J. Inher. Dis.* 22: 381-391.
- HOLLMANN, M. and HEINEMANN, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.
- HYMAN, D.B., Tanaka, K. (1984) (??) *J. Clin. Invest.* 73: 778.
- IINO, M., Osawa, S., Tsuzuki, K. (1990) Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol (Lond)*, 424: 151-63.
- IKEDA, S.R. *et. al.* (1995) *Neuron* 14: 1029-38.
- INSEL, T.R., Miller, L.P., Gelhard, R.E. (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35: 31-43.
- ITO, M. (1989) (??) *Ann. Ver. Neurosci.* 12: 85-102.
- JABS, R., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., Steinhäuser, C. (1994) Kainate activates Ca<sup>2+</sup>-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K<sup>+</sup> currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflugers Arch.* 426:310-19.
- JAKOBS, C., Jaeken, J., Gibson, K.M. (1993) *J. Inher. Metab. Dis.* 16: 704–715.
- JOHNSON, J.W. and ASCHER, P (1987) glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature (Lond)*, 325: 529-31.
- JOHNSTON, G.A.R. (1981) Glutamate uptake and its possible role in neurotransmitter inactivation, In: glutamate: transmitter in the Central Nervous System, pp. 77-87. Eds. P.J. Roberts, J. Storm-Mathisen and G.A.R. Johnston. John Wiley: Chichester.
- KAKU, D.A., Goldberg, M.P., Choi, D.W. (1992) Antagonism of non-NMDA receptors augments the neuroprotective effect of NMDA receptor blockade in cortical cultures subjected to prolonged deprivation of oxygen and glucose. *Brain. Res.* 554: 344-47.

- KANAI, Y. and HEDIGER, M.A. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-71.
- KANNY, Y., Nussberger, S., Romero, M.F., Boron, W.F., Hebert, S.C., Hediger, M.A. (1995) Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high-affinity glutamate transporter. *J. Biol. Chem.* 270: 16561-568.
- KEMP, J.A. and LEESON, P.D. (1993) The glycine site of the NMDA-receptor five years on. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 20-25.
- KHAN, W.A., Blobe, G.C., Hannun, Y.A. (1995) Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell signal* 7: 171-84.
- KÖHLER, M., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1993) Determination of  $Ca^{2+}$  permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10: 491-500.
- KÖLKER, S., Ahlemeyer, B., Hühne, R., Mayatepek, E., Krieglstein, J. and Hoffmann, G.F. (2001<sup>b</sup>). Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal cultures. *European journal of Neuroscience* 13: 2115-2122.
- KÖLKER, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. and Hoffmann, G.F. (2001<sup>a</sup>). Contribution of Reactive Oxygen Species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick Embryo telencephalons. *Pediatric Research.* 50: 76-82.
- KÖLKER, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., and Hoffmann, G.F. (2000<sup>a</sup>) Cerebral organic acid disorders induce neuronal damage via excitotoxic organic acids in vitro (??), 18: 31-40.
- KÖLKER, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F. (2000<sup>b</sup>) Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Research.* 47: 495-503.
- KOMURO, H. and RAKIC, P. (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260: 95-97.

- KONDO, K., Hashimoto, H., Kitanara, J., Sawada, M., Sukumura, A., Marunovchi, T., Baba, A. (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci. Lett.* 188: 140-142.
- KOSINSKI, C.M., Standaert, D.G., Counihan, T.J., Scherzer, C.R., Kerner, J.A., Daggett, L.P., Velcelebi, G., Penney, J.B., Young, A.B., Landwehrmeyer, G.B. (1998) Expression of N-methyl-D-Aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: striatum and globus pallidus. *J. Comp. Neurol.* 390: 63-74.
- KRÄMER, R. and PALMIERI, F. (1989) Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* 974: 1-23.
- KRISTIAN, T. & SIESJO, B.K. (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29: 705-718.
- LAND, J.M., Goulder, P., Johnson, A., Hockaday, J. (1992) Glutaric Aciduria Type I: an atypical presentation together with some observations upon treatment and the possible cause of cerebral damage. *Neuropediatrics* 23: 322-326.
- LEE, K.S., Frank, S., Vanderklish, P., Arai, A., Lynch, G. (1991) Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7233-37.
- LEIBEL, R.L., Shih, V.E., Goodman, S.I., Bauman, M.L., McCabe, E.R.B., Zwerdling, R.G., Bergman, I., Costello, C. (1980) Glutaric Acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. *Neurology*: 1163-1168.
- LE-PEILLET, E., Arvin, B., Moncada, C., Meldrum, B.S. (1992) The non-NMDA antagonists, NBQX and GYKY 52466, protect against cortical and striatal cell loss following transient global ischaemia in the rat. *Brain Res.* 571: 115-120.
- LESTER, R.A.J., Clements, J.D., Westbrook, G.L., Jahr, C.E. (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature (Lond)*, 346: 565-567.

- LEVY, L.N., Lehre, K.P., Rolstad, B., Danbolt, N.C. (1993<sup>a</sup>) A monoclonal antibody raised against an [Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>] coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Lett.* 317: 79-84.
- LIESERT, M., Zschocke, J., Hoffmann, G.F., Mühlhäuser, N., Buckel, W. (1999) Biochemistry of Glutaric Aciduria Type I: activities of *in vitro* expressed wild-type and mutant cDNA encoding human Glutaryl-CoA Dehydrogenase. *J. Inher. Metab. Dis.* 22: 256-258.
- LIMA, T.T.F., Begnini, J., Bastiani, de J., Fialho, D.B., Jurach, A., Ribeiro, M.C.P., Wajner, M., Mello, de C.F. (1998) Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Research.* 802: 55-60.
- LIPTON, S.A. and ROSENBERG, P.A. (1994) Mechanisms of disease. *The New England Journal of Medicine* 330(9): 613-22.
- LIPTON, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-32.
- LIPTON, S.A., Kater, S.B. (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci.* 12: 265-270.
- LORTET, S., Samuel, D., Had-Aissouni, L., Masméjean, F., Kerkerian-Le Goff, L., Pisano, P. (1999) Effects of PKA and PKC modulators on high affinity glutamate uptake in primary neuronal cell cultures from rat cerebral cortex. *Neuropharmacology* 38: 395-402.
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75.
- MAC-DERMOTT, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J., Backer, J.L. (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature (Lond)*, 321: 519-22.
- MANEV, H., Favaron, M., Siman, R., Guidotti, A., Costa, E. (1991) Glutamate neurotoxicity is independent of Calpain I inhibition in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 57: 1288-95.

- MASU, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature (Lond)*, 349: 760-65.
- MATSUI, T., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T., Wada, K. (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J. Neurochem.* 65: 454-58.
- MAYER, M.L. and Westbrook, G.L. (1987<sup>a</sup>) Permeation and block of N-methyl-D-Aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol. (Lond)*, 394: 501-27.
- MAYER, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature (Lond)*, 309: 261-63.
- MCDONALD, J.W., Althomsons, S.P., Hyrc, K.L., Choi, D.W., Goldberg, M.P. (1998) Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nature Medicine* 4: 291-97.
- MCDONALD, J.W., Behrens, M.I., Chung, C.Bhattacharyya, T., Choi, D.W. (1997) Susceptibility to apoptosis is enhanced in immature cortical neurons. *Brain Res.* 759: 228-232.
- MCDONALD, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M.V. (1988) Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 459: 200-203.
- MCKENNA, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J., Zielke, H.R. (1996) Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.* 66: 386-393.
- MEISTER, A. (1979) Biochemistry of glutamate, glutamine and glutathione, In: *Advances in Biochemistry and Physiology, glutamic acid* (Keler Jr, L.J., Garattini, S., Kane, M.R., Reynolds, W.A., Wurtman, R.J. eds), pp: 64-84, Raven Press, New York.
- MELDRUM, B. and GARTHWAITE, J. (1994) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 54-62.

- MELDRUM, B., Garthwaite, J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS* 11: 379-387.
- MERINERO, B., Pérez-Cerdá, C., Font, L.M., *et al.* (1995) Variable clinical and biochemical presentation of seven spanish cases with Glutaril-CoA Dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 26: 238-242.
- MIGUES, P.V., Leal, R.B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N.H. (1999) Synaptosomal glutamate release induced by the fraction BC2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*, *NeuroReport* 10: 67-70.
- MILLER, B., Sarantis, M., Traynelis, S.F., Attwell, D. (1992) Potentiation of NMDA receptor currents by Arachidonic Acid. *Nature* 355: 722-25.
- MILLER, L.P., Johnson, R.E., Gelhard, R.E., Insel, T.R. (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain II. Kainic acid receptors. *Neuroscience* 20: 739-48.
- MONAGHAN, D.T. and COTMAN, C.W. (1982) The distribution of [3H] Kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res.* 252: 91-100.
- MONAGHAN, D.T., Bridges, R. J. , Cotman, C.W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the functions of the central nervous system. *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402.
- MONYER, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Saskmann, B., Seeburg, P.H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-40.
- MONYER, H., Seeburg, P.H., Wisden, W. (1991) Glutamate operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 6: 799-810.
- MORI, H. and MISHINA, M. (1995) Review: Neurotransmitter receptors VIII, structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34: 1219-37.

- MORIYAMA, Y., Maeda, M., Futai, M. (1990) Energy coupling of L-glutamate transport and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in brain synaptic vesicles. *J. Biochem.* 108: 689-93.
- MORONI, F., Cozzi, A., Lombardi, G., Sourtcheva, S. *et. al.* (1998) Presynaptic mGluR1 type receptors potentiate transmitter output in the rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 347: 189-95.
- MOSSINGER, J.L., Price, M.T., Bay, H.Y., Xiao, H., Wozniak, D.F., Olney, J.W. (1991) Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Exp. Neurol.* 113: 10-17.
- MUNIR, M, Correale, D.M., Robinson, M.B. (2000) Substrate-induced up-regulation of Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport activity. *Neurochem. Int* 37: 147-62.
- MURPHY, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., Cyle, J.T. (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2: 1547-58.
- NAGY, A. and Delgado-Escueta, A. V.(1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J. Neurochem.* 43: 114-1123.
- NAGY, A., Shuster, T.A., Delgado-Escueta, A.V. (1986) Ecto-ATPase of Mammalian Synaptosomes: Identification and Enzymic Characterization. *J. Neurochem* 47: 976-86.
- NAIDU, S. and MOSER, H.W. (1991) Value of neuroimaging in metabolic diseases affecting the CNS. *Am J. Neuroradiol* 12: 413-16.
- NAITO, S. and UEDA, T. (1983) Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 258: 696-99.
- NAITO, S. and UEDA, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44: 99-109.
- NAKAMURA, Y., Iga, K., Shibata, T., Shudo, M., Kataoka, K. (1993) Glial plasmalemmal vesicles – a subcellular fraction from rat hippocampal homogenate distinct from synaptosomes. *Glia* 9: 48-56.



- NAKANISHI, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science (Wash. DC)*, 258: 597-603.
- NICOLL, R.A. and MALENKA, R.C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature (Lond)*, 377: 115-18.
- NOWAK, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. (1984) Magnesium Gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature (Lond)*, 307: 462-65.
- NUSSER, Z. *et. al.* (1994) *Neuroscience* 61: 421-27.
- OBRENOVITCH, T.P., Urenjak, J., Zilkha, E., Jay, T.M. (2000) Excitotoxicity in neurological disorders – the Glutamate paradox. *Int. J. devl. Neuroscience* 18: 281-287.
- OLNEY, J.W. (1980) Excitotoxic mechanisms of neurotoxicity. In: *Clinical and Experimental Neurotoxicology*.(Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., eds.).Baltimore: Williams & Wilkins, 272-94.
- OLNEY, J.W. (1981) Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 27: 375-384.
- OLNEY, J.W. (1993) Role of excitotoxins in development neuropathology. *APMIS* 101; 103-112.
- OLNEY, J.W. (1994) New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J. Neurol. Transm.* 43: 47-51.
- OLNEY, J.W., and HO, O.L. (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of Glutamate, Aspartate or Cysteine. *Nature* 227: 609-611.
- OLSEN, R.W., Szamraj, O., Houser, C.R. (1987) [<sup>3</sup>H] AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain. *Brain Res.* 402: 243-54.
- ORRENIUS, S. and NICORETA, P. (1994) The calcium ion and cell death, *J. Neural Transm.* 43: 1-11.
- OSAWA, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1997) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology.* 54: 581-618.
- OSAWA, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54: 581-618.

- PIN, J.P. and DUVOISIN, R. (1995) *Neuropharmacology* 33: 715-17.
- PINEDA, M., Ribes, A , Busquets, C., Vilaseca, M.A., Aracil, A., Christensen, E. (1998) Glutaric Aciduria Type I with residual Glutaryl-CoA Dehydrogenase activity. *Developmental Medicine & Child Neurology* 40: 840-842.
- PISANO, P., Samuel, D., Nieoullon, A. and Kerkeröan-Le Goff, L. (1996) Activation of the adenylate cyclase-dependent protein kinase pathway increases high affinity glutamate uptake into rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 35: 541-47.
- PORCIÚNCULA, L. *et. al.* (1999) Inhibition of synaptosomal [<sup>3</sup>H]glutamate uptake and [<sup>3</sup>H]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by Glutaric acid in vitro. *Journal of the Neurological Sciences* (1):6287.
- PORTERA-CAILLIAU, C., Price, D.L., Martin, L.J. (1996) N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J. Neurochem* 66: 692-700.
- REPRESA, A., Tremblay, E., Ben-Ari, Y. (1987) Kainate binding sites in hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* 20: 739-48.
- RESINK, A., Villa, M., Benke, D., Hidaka, H., Möhler, H., Balázs, R. (1996) Characterization of agonist-induced down-regulation of NMDA receptors in cerebellar granule cell cultures. *J. Neurochem.* 66: 369-377.
- RIEPE, M., Hori, N., Ludolph, A.C., Carpenter, D.O., Spencer, P.S. (1992) Inhibition of energy metabolism by 3-nitropropionic acid activates ATP-sensitive potassium channels. *Brain Res.* 586: 61-66.
- ROBERTS, P.J., Storm-Mathisen, J., Johnston, G.A.R. Glutamate transmitter in the central nervous system, 1981, John Wiley & Sons, Chichester.
- ROTHMAN, S.M. (1992) Excitotoxins: Possible mechanisms of action. *Ann NY Acad. Sci.* 648: 132-39.

- ROTHSTEIN, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-25.
- SAITO, K.I., Elce, J.S., Hamos, J.E. and Nixon, R.A. (1993) Widespread activation of calcium activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2628-2632.
- SANETO, R.P. and DE VELLIS, J. (1987) Neuronal and glial cells: cell culture of the central nervous system In: *Neurochemistry a practical approach* (A.J. Turner and H.S. Brachelard eds.), IRL Press, Oxford-Washington, DC, pp. 27-63.
- SCHWARCZ, R., whetsell, W.O., Mangano, R.M. (1983) *Science* 219: 316.
- SCRIVER, C.R., Beaudet, A L., Sly, W.S. and Valle, D. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th ed.,In: *Academia organic*, New York, McGraw-Hill, Inc, 2001.
- SEEBURG, P.H. (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16: 359-65.
- SHEARDOWN, M.J., Nielsen, E.O., Hansen, A.J., Jacobsen, P., Honoré, T. (1990) 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (F) quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischaemia. *Science (Wash. DC)*, 247: 571-74.
- SHIGEMOTO, R. et. al. (1995) *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 846.
- SHINDER, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C., montal, M. (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in Glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience* 16(19): 6125-133.
- SILVA, C.G. da, Silva, A.R., Ruschel, C., helegda, C., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Dutra filho, C.S., Wajner, M. (2000) Inhibiion of energy production in vitro by glutaric acid in cerebral cortex of young rats. *Metabolic Brain Disease* 15: 123-131.
- SIMS, K.D. and ROBINSON, M.B. (1999) Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13: 169-97.

- SINCLAIR, L.A. (1982) A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann. Clin. Biochem.* 19: 314-21.
- SOFFER, D., Amir N., Elpeleg, O.N., Gomori, J.N., Shalev, R.S., Gottschalk-Sabag, S. (1992) Striatal degeneration and spongy myelinopathy in glutaric acidemia. *J. Neurol. Sci.* 107: 199-204.
- SOMMER, B., Keinänen, k., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1990) Flip and Flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science (Wash. DC)* 249: 1580-85.
- SPIRIDON, M., Kamm, D., Billups, B., Mobbs, P., Atwell, D. (1998) Modulation by Zinc of the glutamate transporter in glial cells and cones isolated from the tiger Salamander retina. *J. physiol. (Lond)* 506: 363-76.
- STANDAERT, D.G., Testa, C.M., Young, A.B., Penney Jr, J.B. (1994) Organization of N-methyl-D-Aspartate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.* 343: 1-16.
- STEINHÄUSER, C. and GALLO, V. (1996) News on glutamate receptors in glial cells. *Trens Neurosci.* 19: 339-345.
- STOCCA GI VICINI, S. (1998) Increased contribution to NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *J. Physiol. (Lond)* 507: 13-24.
- STOKKE, O., Goodmann, S.I., Moe, P.G. (1976) Inhibition of brain Glutamate Decarboxylase by Glutarate, Glutaconate and B-hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in Glutaric Aciduria type I. *Clin. Chim. Acta.* 66: 411-415.
- STUTCHFIELD, P., Edwards, M.A., Gray, R.G.F., Crawley, P., Green, A (1985) Glutaric Aciduria Type I misdiagnosed as Leigh's encephalopathy and cerebral palsy. *Dev. Med. Child. Neurol.* 27: 403.
- SUCHER, N.J., Awobuluyi, M., Choi, Y.B., Lipton, S.A. (1996) NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 348-55.

- SUPERTI-FURGA, A., Hoffmann, G.F. (1997) Glutaric aciduria Type I (Glutaril-CoA Dehydrogenase deficiency): advances and unanswered questions. *Eur. J. Pediatr.* 156: 821-828.
- TABB, J.S., Kish, P.E., Van Dyke, R., Ueda, T. (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles-roles of membrane potential, pH gradient and intravesicular pH. *J. Biol. Chem.* 267: 15412-15418.
- TAKAHASHI, H., Koehler, R.C., Brusilow, S.C., Traystman, R.J. (1991) Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am. J. Physiol.* 261: H825-H829.
- TAKAHASHI, M., Billups, B., Rossi, D., Sarantis, M., Hamann, M., Attwell, D. (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J. Exp. Biol.* 200: 401-409.
- TANABE, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8: 169-79.
- TANABE, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1993) Signal transduction, pharmacological properties and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors , mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* 13: 1372-78.
- TANAKA, K. (2000) Functions of glutamate transporters in the brain. *Neuroscience Research* 37: 15-19.
- TROMBLEY, P.Q. and WESTBROOK, G.L. (1992) *J. Neurosci.* 12: 2043-50.
- UGOLINI, A., Corsi, M., Bordi, F. (1997) Potentiation of NMDA and AMPA responses by group I mGluR in spinal cord motoneurons. *Neuropharmacology* 36: 1047-55.
- ULLRICH, K., Flott-Rahmel, B., Schluff, P., Musshoff, U., Das, A., Lücke, T., Steinfeld, R., Christensen, E., Jakobs, C., Ludolph, A., Neu, A. and Röper, R. (1999) Glutaric aciduria type I: Pathomechanisms of neurodegeneration. *J. Inher. Metab. Dis.* 22: 392-403.
- VOLTERA, A., Trotti, d., Cassutti, P., Tromba, C., Salvaggio, A., Melcangi, R.C., Racagni, G. (1992) High sensitivity of glutamate uptake to extracellular free

- arachidonic acid levels in rat cortical synaptosomes and astrocytes. *J. Neurochem.* 59: 600-606.
- VOLTERRA, A., Trotti, D., Cassutti, P, *et al* (1992) High sensitivity of glutamate uptake to extracellular free Arachidonic Acid levels in rat cortical synaptosomes and astrocytes. *J. Neurochem.* 59: 600-6.
- VYKLICKY JR, L., Benveniste, M., Mayer, M.L. (1990) Modulation of N-Methyl-D-Aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurons. *J. Physiol (Lond)*, 428: 313-31.
- WADICHE, J.I., Amara, S.G., Kavanaugh, M.P. (1995<sup>a</sup>) Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* 15: 721-28.
- WATANABE, M., Inove, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *NeuroReport* 3: 1138-40.
- WENZEL, A., Fritschy, J.M., Mohler, H., Benke, D. (1997) NMDA-receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression. *J. Neurochem.* 68: 469-78.
- WHETSELL, W.O. (1984) The use of organotypic tissue culture for study of amino acid neurotoxicity and its antagonism in mammalian CNS. *Clin. Neuropharmacol. (Suppl 1)* 7: 452.
- WHETSELL, W.O., Schwarcz, R. (1983) *J. Neural Transm. (Suppl)* 19:53.
- WOLOSKER, H., Souza, D.O.G., De Meis, L.J. (1996) Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J. Biol. Chem.* 271: 11726-731.
- YATSUGI, S., Takahashi, M., Koshiya, K., Sakamoto, S. *et al.* (1996) Neuroprotective effect of YM90K, a novel AMPA/Kainate receptor antagonist in focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 959-66.
- YUDKOFF, M., Zaleska, M.M., Nissim, I., Nelson, D., Erecinska, M. (1989) Neuronal glutamine utilization: pathways of nitrogen transfer studied with [<sup>15</sup>N] glutamine. *J. Neurochem.* 53:632-40.

- ZERANGUE, N. and KAVANAUGH, M.P. (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383: 634-637.
- ZIADEH, R., Naylor, E.W., Finegold, D. (1994) Identification of two cases of Glutaric Aciduria Type I through routine neonatal screening using liquid secondary ionization tandem mass spectrometry. Abstracts of the 6th International Congress of Errors of Metabolism, Milano, 1994.