

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DIORLON NUNES MACHADO

**EXPRESSÃO DOS COTRANSPORTADORES DE CLORETO
NO CEREBELO E ESTRIADO DE RATOS NEONATOS
DE AMBOS OS SEXOS**

Porto Alegre

2019

DIORLON NUNES MACHADO

**EXPRESSÃO DOS COTRANSPORTADORES DE CLORETO
NO CEREBELO E ESTRIADO DE RATOS NEONATOS
DE AMBOS OS SEXOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga

Coorientador: Me. Rafael Bandeira Fabres

Porto Alegre

2019

*Dedico este trabalho à minha querida mãe,
por seu amor e apoio imensurável.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, minha eterna gratidão é destinada à minha mãe – Dona Maria, pelo seu amor, carinho, apoio total e confiança em mim. É meu alicerce para todos meus projetos na vida.

Ao meu namorado e grande amor, Volnei, por acreditar na minha capacidade de ser humano e cientista, por me dar apoio total em momentos difíceis em que estive caído e por seu amor que torna meus dias mais alegres e coloridos.

Ao Professor Dr. Luciano Stürmer de Fraga por seu conhecimento incrível e incomparável, pelo seu voto de confiança em mim em várias etapas da minha graduação, por suas aulas ricas e espetaculares, por seus conselhos e sermões altamente construtivos, por enxergar seus alunos e colegas como filhos e amigos, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisas e por ser uma peça fundamental para todos que o conhecem. Por ser um orientador excepcional e sensacional, tanto no TCC, quanto no LabFluor.

Ao Me. Rafael Bandeira Fabres por enriquecer muito meu trabalho durante esta jornada, por seu enorme conhecimento teórico e prático em Neurociências, pelos conselhos, apoio, força, ajuda e ideias brilhantes.

Às minhas amigas/irmãs Kamila Machado, Verônica Krein, Isadora Tassinari, Mirella Kielek, Thais Rodrigues, Anna Clara, Elcyus Boff, Letícia Terumi, pelo amor, carinho e ensinamentos. Ao Yahi Camboim e Ricardo Nunes, por seus ensinamentos e grande força na pesquisa. À Dra. Luz Elena, por seu conhecimento imensurável e seus ensinamentos de vida, de técnicas e de bancada. À Claudia Chiarel por seu grande apoio, ensinamentos e acolhimento no LabFluor.

À Professora Dra. Tatiana Montanari por seu conhecimento e ensinamentos de Ciências Morfológicas e de vida, pelo seu grande carinho, amizade e afeto; pelo enorme apoio durante minha graduação.

À UFRGS, ao ICBS, ao Departamento de Fisiologia, ao LaMEC e ao LabFluor, por serem minha segunda casa e espaço de descobertas e produções durante minha graduação.

“Acima de tudo, não tema os momentos difíceis.

O melhor vem deles.”

Rita Levi-Montalcini

RESUMO

O GABA, o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central em mamíferos adultos, tem papel excitatório no início do neurodesenvolvimento. Os efeitos despolarizantes (excitatórios) ou hiperpolarizantes (inibitórios) provocados pelo GABA dependem da concentração do ânion cloreto dentro e fora da célula. Para promover essas respostas GABAérgicas, os neurônios possuem os transportadores transmembrana NKCC1 e KCC2. O NKCC1 injeta íons cloreto para dentro da célula, aumentando a concentração interna deste íon, e o KCC2 ejeta íons cloreto para fora da célula, diminuindo a concentração interna deste íon. O padrão de expressão e atividade destes cotransportadores de cloreto é dependente da região, do sexo e da idade. Considerando a escassez de dados em relação ao dimorfismo sexual de estruturas do SNC fundamentais para a motricidade, no presente estudo avaliamos a expressão de NKCC1 e KCC2 no cerebelo e estriado de ratos Wistar neonatos (P3 e P7) de ambos os sexos através da técnica de *Western blot*. Os resultados obtidos demonstram que no cerebelo de machos houve redução da expressão de NKCC1 e KCC2 de P3 para P7, ao passo que em fêmeas não houve redução de nenhum cotransportador. Já no estriado de machos não houve redução de expressão de NKCC1 e KCC2, enquanto que em fêmeas houve redução apenas de NKCC1 de P3 para P7. A razão entre NKCC1 e KCC2 no cerebelo não apresentou diferença entre os sexos ou entre as idades. Já no estriado, houve redução na razão NKCC1/KCC2 entre fêmeas P3 e P7, mas em machos, não. Assim, parece haver um dimorfismo sexual importante desses transportadores em ratos neonatos.

Palavras-chave: GABA, NKCC1, KCC2, dimorfismo sexual, neonatos.

ABSTRACT

GABA is the major central nervous system inhibitory neurotransmitter in adult mammals and plays an excitatory role in the onset of neurodevelopment. The depolarizing (excitatory) or hyperpolarizing (inhibiting) effects caused by GABA depends on the concentration of chloride anions inside and outside the cell. To promote these GABAergic responses, neurons have transmembrane proteins NKCC1 and KCC2. NKCC1 injects chloride into the cell, increasing the internal concentration of this ion, and KCC2 eject the chloride out of the cell, decreasing the internal concentration of this ion. The expression pattern and activity of these chloride cotransporters depend on region, gender and age. Considering the scarcity of data regarding the sexual dimorphism of fundamental CNS structures of motricity, in present study we evaluated the expression of NKCC1 and KCC2 in the cerebellum and striatum of neonatal Wistar rats at ages P3 and P7 of both sexes with Western Blot. The obtained results show that the male cerebellum reduced NKCC1 and KCC2 expression between P3 and P7, whereas in females that was not reduced of any cotransporter. In the striatum there was no reduction of NKCC1 and KCC2 expression, whereas there was a reduction of only NKCC1 between P3 and P7. The ratio between NKCC1 and KCC2 in the cerebellum did not differ between sexes or age. In the striatum, there was a reduction in the NKCC1/KCC2 ratio between P3 and P7 females, but not males. There was significant sexual dimorphism among neonatal rats.

Key words: GABA, NKCC1, KCC2, sexual dimorphism, newborns.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diferença nas atividades dominantes dos cotransportadores de cloreto e o efeito do GABA sobre neurônios entre machos e fêmeas em função do tempo.....13
- Figura 2** – Padrão de expressão de NKCC1 e KCC2 no cerebelo de machos e fêmeas com idades P3 e P7.....23
- Figura 3** – Padrão de expressão de NKCC1 e KCC2 no estriado de machos e fêmeas com idades P3 e P7.24
- Figura 4** – Razão NKCC1/KCC2 no cerebelo e estriado de machos e fêmeas com idades P3 e P7.....25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Neurotransmissão Inibitória e Receptores de Envolvidos	3
1.2 Homeostase do Cloreto em Neurônios	4
1.3 Cotransportadores de Cloreto	5
1.4 Cerebelo	8
1.5 Estriado	9
1.6 Dimorfismo Sexual	11
1.7 Hipóxia-isquemia Neonatal	13
2. JUSTIFICATIVA	16
3. HIPÓTESE	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo Geral	17
4.2 Objetivos Específicos.....	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS	18
5.1 Animais	18
5.2 Aspectos Éticos.....	18
5.3 Western blotting	19
5.4 Análise Estatística.....	21
6. RESULTADOS	22
7. DISCUSSÃO	26
8. CONCLUSÃO	31
9. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos adultos. Entretanto, em estágios iniciais do desenvolvimento neural, o GABA assume um papel excitatório. Isso está associado à presença de um transportador de membrana que aumenta a concentração intracelular de cloreto dos neurônios, o que produz um efluxo deste íon no momento em que canais de cloreto ativados pelo GABA são abertos. Já foi demonstrado que o GABA despolariza neurônios imaturos em várias regiões do sistema nervoso central de diversas espécies animais (Ben-Ari et al., 2002, 2012; Owens et al., 2002).

1.1 Neurotransmissão Inibitória e Receptores Envolvidos

O GABA exerce sua atividade, tanto como agente excitatório quanto inibitório, por meio de sua ligação aos seus receptores GABAérgicos (GABAR), que são pentâmeros compostos por um conjunto de subunidades distribuídas em oito classes ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π e $\rho 1-3$). As subunidades geralmente se reúnem em uma estequiometria do tipo $2\alpha:2\beta:\gamma$, embora a composição do receptor difira entre os subtipos neuronais. Sabe-se que há pelo menos três tipos de receptores de GABA: o GABA_A, o GABA_B e o GABA_C. Os receptores GABA_A e GABA_C são proteínas transmembrana de múltiplas subunidades. Ao se ligar a esses receptores, a molécula de GABA provoca a abertura de um canal iônico de cloreto, portanto esses receptores são considerados ionotrópicos. Os receptores GABA_B são receptores heterodiméricos acoplados à proteína G que afetam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros, portanto são metabotrópicos (Watanabe et al., 2002; Jelitai e Madarasz, 2005). O fluxo de cloreto ativado pelo GABA é passivo e depende do potencial de equilíbrio da célula para este ânion (Ben-Ari et al., 2012).

No cérebro imaturo, progenitores neuronais expressam o receptor GABA_A desde os estágios iniciais. Em roedores, estes receptores estão presentes nas células-tronco neuronais (LoTurco et al., 1995; Owens et al., 1996) e nos neuroblastos migratórios (Manent et al., 2005), antes mesmo do início da sinaptogênese GABAérgica.

1.2 Homeostase do Cloreto em Neurônios

A ação excitatória do GABA é encontrada na maioria dos neurônios em desenvolvimento de todas as regiões do cérebro incluindo hipotálamo, hipocampo, bulbo olfatório, medula espinal, estriado, cerebelo e córtex (Connor et al., 1987; Cherubini et al., 1990, 1991; Yuste e Katz, 1991; Ben Ari et al., 1994; LoTurco et al., 1995; Obrietan e van den Pol, 1995; Serafini e outros, 1995; Chen et al., 2016). A capacidade de troca de função da sinalização GABAérgica de inibitória para excitatória, ou vice-versa, depende, em parte, da concentração de cloreto intracelular ($[Cl^-]_i$), a qual é a determinante chave da resposta neuronal ao GABA (Ben-Ari et al., 2012). Como os receptores $GABA_A$ são canais de Cl^- controlados por ligantes, existe uma relação direta entre as concentrações de Cl^- intracelular e a resposta produzida pela sinalização GABAérgica (Tsukahara et al., 2015). O receptor $GABA_A$ permite a entrada ou a saída passiva de íons Cl^- de acordo com o potencial de equilíbrio do neurônio para este íon, isto é, o ânion fluirá pelo canal em qualquer direção, dependendo do seu gradiente eletroquímico. Quando a $[Cl^-]_i$ é alta, como no caso de neurônios imaturos em condições normais, o potencial de equilíbrio do Cl^- é positivo em relação ao potencial da membrana em repouso e, conseqüentemente, a ativação do receptor $GABA_A$ resulta no efluxo líquido de Cl^- , o que facilita a despolarização neuronal. Quando a $[Cl^-]_i$ é baixa, como no caso de neurônios maduros em condições normais, o potencial de equilíbrio do Cl^- é negativo em relação ao potencial de membrana em repouso e, conseqüentemente, a ativação do receptor $GABA_A$ resulta no influxo líquido de Cl^- , facilitando a hiperpolarização neuronal. Sabe-se que as chances de ocorrência de um potencial de ação aumentam com a despolarização e diminuem com a hiperpolarização da membrana neuronal. Dessa forma, uma baixa $[Cl^-]_i$ facilita a inibição pós-sináptica mediada pelo GABA, ao passo que a alta $[Cl^-]_i$ facilita a excitação (Ben-Ari et al., 2012).

Obviamente, o equilíbrio entre inibição e excitação neuronal é crítico para o funcionamento adequado do sistema nervoso (Buzsaki et al., 2007; Haider et al., 2006), e os neurônios regulam as concentrações intracelulares de cloreto para garantir respostas elétricas apropriadas (Ben-Ari et al., 2012). A $[Cl^-]_i$ basal é relativamente baixa – em torno de 5 mM – ao passo que a concentração extracelular de cloreto está em torno de 110 mM, no SNC maduro. Aumentos

relativamente pequenos da $[Cl^-]_i$ destes neurônios podem tornar o GABA excitatório (Raimondo et al., 2017).

1.3 Cotransportadores de Cloreto

A homeostase dos íons cloreto não é regulada exclusivamente pelos receptores GABAérgicos, mas também por outras proteínas responsáveis pelo transporte de Cl^- e que atuam simultaneamente. Esse equilíbrio dinâmico é importante para uma série de processos neurofisiológicos. O cloreto é primordial em vários processos fisiológicos, como a regulação gênica (Succol et al., 2012; Valdivieso et al., 2016), a manutenção do pH (Ruffin et al., 2014) e o controle do volume celular (Sardini et al., 2003). A regulação precisa da $[Cl^-]_i$ é atingida, em parte, pela atividade de cotransportadores de cloreto-cátion (CCCs). Os CCCs são proteínas de membrana que promovem o transporte de íons Cl^- juntamente com íons Na^+ e/ou K^+ . A energia para o transporte é fornecida pelos gradientes transmembrana combinados de sódio, potássio (estabelecidos pela bomba Na^+/K^+ -ATPase) e cloreto. Os cotransportadores acoplados ao sódio, os cotransportadores $Na-K-Cl$ (NKCC1 e NKCC2) transportam íons cloreto para dentro da célula, elevando a quantidade desses íons acima do seu equilíbrio eletroquímico. Por outro lado, ao acoplar o transporte de cloreto ao gradiente externo de potássio, os CCCs acoplados ao potássio ou cotransportadores $K-Cl$ (KCC1, KCC2, KCC3 e KCC4) transportam íons cloreto principalmente para fora da célula, reduzindo a quantidade desses íons abaixo de seu equilíbrio eletroquímico (Kahle et al., 2008).

Nos neurônios, os principais cotransportadores de íons cloreto são o NKCC1 e o KCC2 (Tzanoulinou et al., 2014). A presença do NKCC1 aumenta o potencial de reversão do Cl^- , acumulando este ânion dentro da célula. Já a presença do KCC2 reduz o potencial de reversão do Cl^- e, portanto, expulsa este ânion da célula, invertendo as ações do GABA da excitação para a inibição (Veerawatananan et al., 2015). Na vida embrionária e neonatal de roedores, em condições fisiológicas basais, os neurônios mostram forte expressão de NKCC1, mas baixa expressão de KCC2 (Wang et al., 2009; Ben-Ari et al., 2002). A mudança gradual da atividade dominante do NKCC1 em neurônios imaturos para uma atividade dominante do KCC2 em neurônios mais maduros (Plotkin et al.,

1997; Rivera et al., 1999; Yamada et al., 2004) faz com que a ativação do receptor GABA_A varie gradualmente de despolarizante para hiperpolarizante (típica de neurônios maduros), uma vez que a concentração de cloreto intracelular diminui gradualmente ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso (Ben-Ari et al., 1994).

Dessa forma, o balanço funcional entre os cotransportadores de cloreto é um determinante importante do momento de inversão do papel do neurotransmissor GABA (de excitatório para inibitório), necessário para o desenvolvimento das funções apropriadas do SNC. Qualquer retardo na troca de função GABAérgica pode originar um desequilíbrio entre neurônios excitatórios e inibitórios no SNC, levando a um desbalanço entre estimulação e inibição (Furukawa et al., 2017; O'Marín, 2012; Nelson e Valakh, 2015).

Por exemplo, o bloqueio da atividade e/ou expressão do NKCC1 prejudica a maturação morfológica dos neurônios corticais, reduz a arborização dendrítica, aborta a atividade motora, reduz a população de neurônios motores e interneurônios, e provoca uma redução na elaboração de axônios, levando à redução do tamanho do encéfalo e da medula espinal (Isering et al., 1998; Ploktin et al., 1997). Em neonatos de várias espécies, o KCC2 é expresso em níveis muito baixos (Wang et al., 2002). Um desvio negativo no potencial de reversão de GABA é acompanhado por um aumento na expressão do KCC2 em neurônios do córtex e do hipocampo de ratos em torno da segunda semana de vida (Clayton et al., 1998). Em seres humanos, a expressão do KCC2 no neocórtex começa a aumentar em torno da 40^a semana após a concepção (Rivera et al., 1999) e a expressão de NKCC1 atinge níveis similares aos de adultos em torno da 50^a semana após a concepção (Dzhala et al., 2005). Em estágios iniciais de neurodesenvolvimento, o aumento na expressão de KCC2 ocorre simultaneamente com a diminuição da expressão de NKCC1, resultando na prevalência do efluxo sobre o influxo de cloreto, o que diminui a [Cl⁻]_i. No córtex cerebral de roedores, a expressão de KCC2 é mínima ao nascimento, baixa durante a primeira semana de vida e comparável ao adulto em P14–15. Já a expressão de NKCC1 em neurônios corticais é mais alta durante a primeira semana pós-natal, diminuindo em P14 para níveis mais baixos, similares aos encontrados em adultos (Dzhala et al., 2005).

O desequilíbrio entre excitação e inibição GABAérgicas é característico

de vários distúrbios neurológicos, podendo causar anormalidades como epilepsia, esquizofrenia e depressão (Ramamoorthi et al., 2011). Déficits na expressão do KCC2 estão associados a quadros de epilepsia em humanos e em modelos animais (Kelley et al., 2018). Quadros clínicos graves de epilepsia na infância com convulsões focais migratórias são observados em seres humanos com mutações de perda de função do KCC2 (Saitou et al., 2016; Stödberg et al., 2015). Um déficit de 95% no KCC2 resulta em convulsões e mortalidade entre a segunda e a terceira semanas de vida pós-natal (Woo et al., 2002).

Tsukahara et al. (2017), também demonstraram que o estresse materno em camundongos retarda a troca de função GABAérgica no hipocampo da prole. O estresse repetido induzido também gera alterações nos padrões de expressão de KCC2 e NKCC1 no hipocampo de camundongos fêmeas, contribuindo para a geração de estados hiperexcitatórios, como epilepsia e esquizofrenia, em virtude do desequilíbrio entre excitação e inibição (Tsukahara et al., 2015; Hyde et al., 2011). Além disso, em algumas condições fisiopatológicas, como isquemia, hipóxia e trauma, a expressão de NKCC1 aumenta significativamente (Sung et al., 2000), ao passo que a expressão de KCC2 diminui (Jaenisch et al., 2009; Wang et al., 2014).

O padrão de expressão dos cotransportadores de cloreto também difere – de acordo com o período de desenvolvimento cerebral – em tempo, em região e entre machos e fêmeas (Castillo et al., 2013), o que será detalhado a seguir. Rivera et al. (1999) realizaram experimentos *in vivo* para obter informação sobre os padrões de expressão de KCC2 em alguns locais do encéfalo do rato em desenvolvimento. Os resultados obtidos apontaram que o hipocampo e o neocórtex não possuíam RNAm de KCC2 em E20, ao passo que o tálamo possuía e em regiões mais caudais do tronco encefálico havia forte expressão; alguns neurônios já expressaram KCC2 no neocórtex em P0, porém uma expressão mais intensa foi detectada em P5 e, depois de duas semanas após o nascimento, estabilizou-se o nível de RNAm de KCC2.

Há vários estudos a respeito do padrão de expressão dos cotransportadores de cloreto e do receptor GABA_A em estruturas do sistema nervoso central como o hipocampo (Ben-Ari et al., 2007, 2012, 2014), mas isso permanece pouco conhecido para outras estruturas não menos importantes, como o estriado e o cerebelo, que são centros importantes do controle motor.

1.4 Cerebelo

Em ratos, o cerebelo é imaturo ao nascimento e o neurodesenvolvimento considerável desta região encefálica ocorre no período pós-natal (Bayer et al., 1995), tornando-se um bom modelo para a investigação de mecanismos de desenvolvimento neuronal. As sinapses inibitórias surgem no final da primeira semana pós-natal e o número de sinapses GABAérgicas aumenta durante a segunda e a terceira semanas pós-natais na camada granular cerebelar em ratos (Hamori et al., 1983; Hallonet et al., 1990). Durante esse momento, a localização intracelular da enzima GAD (glutamato descarboxilase) muda drasticamente (Barker et al., 1993) bem como a composição das subunidades dos receptores GABA, com subunidades específicas e distintas expressas e localizadas nos neurônios pós-sinápticos no cerebelo (Araki et al., 1992; Laurie et al., 1992).

O córtex cerebelar possui três camadas: a camada molecular, a camada de células de Purkinje e a camada granular. As células estreladas estão localizadas na camada molecular e as células em cesto estão localizadas na parte profunda desta mesma camada. Os corpos celulares das células de Purkinje estão dispostos em uma única camada, formando a camada de células de Purkinje. As células granulares ocupam a camada granular ao passo que as células de Golgi estão localizadas principalmente na metade superior desta camada. Entre esses neurônios principais do cerebelo, as células de Purkinje, as células estreladas, as células em cesto e as células de Golgi são GABAérgicas. No cerebelo em desenvolvimento, os neurônios começam a expressar os receptores GABA_A funcionais após o término da proliferação celular. As células de Purkinje diferenciadas expressam a subunidade $\alpha 3$, as células granulares em migração e maturação expressam a subunidade $\alpha 2$ e ambas as subunidades desaparecem do córtex cerebelar após o término da sinaptogênese; as subunidades $\beta 3$, $\gamma 1$ e $\gamma 3$ são abundantemente expressas no cerebelo em desenvolvimento e os transportadores de GABA (GAT) também surgem durante a formação sináptica (Takayama et al., 2005). O GAT-1 aparece em P5 nos axônios e o GAT-3 aparece em P10 nos astrócitos da camada granular. O número de sinapses GABAérgicas aumenta muito em todas as camadas cerebelares durante a segunda e terceira semanas pós-natais (Takayama et al., 2004; Jakab et al., 1988).

O cerebelo está intimamente envolvido no aprendizado de habilidades

motoras. Durante a segunda semana pós-natal, os ratos abrem os olhos e começam a se movimentar. O aumento da atividade motora implica no desenvolvimento do controle motor, coordenação e aprendizado. Durante o mesmo período do desenvolvimento, a inibição GABAérgica começa a imperar no córtex cerebelar (Llinas et al., 1969).

Mikawa et al. (2002), demonstraram que a expressão dos RNAm de KCC2 e NKCC1 foi regulada em relação ao tempo no cerebelo: em P7 e P14, houve forte expressão de RNAm do NKCC1. Já o padrão de expressão do RNAm do KCC2 no cerebelo de ratos em desenvolvimento foi correlacionado com a maturação dos neurônios, de modo que o RNAm do KCC2 foi expresso nas células de Purkinje (que surgem entre E13 e E15) em P1; fracamente expresso em células granulares (que surgem entre P4 e P19) em P7 e fortemente expresso em P14; na camada germinativa externa não foi expresso, uma vez que as células eram prematuras. Embora haja relatos sobre a expressão gênica de NKCC1 e KCC2 no cerebelo em relação ao tempo de desenvolvimento, permanece desconhecido esse padrão entre machos e fêmeas.

1.5 Estriado

Além do cerebelo, o corpo estriado é um centro crítico no controle e execução do comportamento voluntário. O estriado de mamíferos possui neurônios espinhosos médios e subclasses de interneurônios, ambos GABAérgicos (Kawaguchi et al., 1995; Smith et al., 1990). Em roedores, os interneurônios perfazem cerca de 10% dos neurônios do estriado (Bolam et al., 1983). Uma das vias mais importantes que liga o estriado à substância nigra é GABAérgica (Fonnum et al., 1978). Logo, a estimulação dos neurônios do estriado, que é a porta de entrada do GABA à substância nigra, exerceria um efeito anticonvulsivo. Além disso, o bloqueio da transmissão GABAérgica no estriado resulta em ativação significativa e/ou interrupção do comportamento motor (Yoshida et al., 1991; Yamada et al., 1995). Os distúrbios desse núcleo são a base de uma variedade de doenças neurológicas e psiquiátricas, como a doença de Parkinson (Dubois et al., 1996), a doença de Huntington (Cummings et al., 1993), a Coreia de Sydenham (Cummings et al., 1993), a Síndrome Gilles de la Tourette (Cummings et al., 1985), a esquizofrenia (Buchsbaum et al., 1992) e o transtorno

obsessivo-compulsivo (Insel et al., 1983).

Há evidências da existência de sinapses entre os neurônios espinhosos médios (Kitai e Wilson, 1983; Somogyi et al., 1989; Wilson e Groves, 1983), mas há poucas evidências fisiológicas sobre as rápidas interações inibitórias entre esses neurônios (Tepper e Koós, 1999), que representam 90 a 95% da população neuronal do estriado em roedores (Bolam et al., 1983). Registros iniciais sugerem que os neurônios espinhosos médios estimulados por seus próprios axônios podem inibir os neurônios vizinhos (Katayama et al., 1981). Tunstall et al. (2002), através de registros intracelulares simultâneos de pares de neurônios espinhosos médios utilizados para testar a ocorrência de interações inibitórias, demonstraram pela primeira vez a existência de interações sinápticas mediadas pelo receptor GABA_A entre essas células do estriado, corroborando a existência desse receptor de membrana. Tepper et al. (1999) demonstrou que os interneurônios GABAérgicos podem controlar a atividade dos neurônios espinhosos médios, reduzindo significativamente a taxa de disparo momentâneo de seus alvos pós-sinápticos. Além destes neurônios, há interneurônios que desempenham papéis importantes no circuito do estriado. Destes, os interneurônios positivos para parvalbumina, óxido nítrico sintase, NADPH-diaforase e interneurônios positivos para calretinina contêm GABA (Cowan et al., 1990; Kawaguchi et al., 1995). Os interneurônios positivos para parvalbumina possuem níveis elevados de GABA, de enzimas sintetizadoras de GABA e do transportador de GABA (Chesselet et al., 1989; Augood et al., 1995). Interneurônios GABAérgicos de rápido crescimento perfazem cerca de 1% do total de neurônios do estriado (Luk et al., 2001); estes neurônios recebem entradas diretas do córtex cerebral e fazem sinapse sobre neurônios eferentes do estriado (Bennett et al., 1994). Além disso, também promovem a inibição do avanço cortical de neurônios espinhosos médios (Kita et al., 1990; Bennett et al., 1994; Plenz et al., 1996; Koos et al., 1999; Tepper et al., 1999).

Estudos em embriões demonstraram que os interneurônios GABAérgicos de rápido crescimento nascem um pouco mais cedo do que a maioria dos neurônios espinhosos médios (Bayer et al., 1984; Sadikot et al., 1997), amadurecendo durante a segunda e terceira semanas pós-natais em ratos (Schlosser et al., 1999), o que, por sua vez, corresponde ao período de maturação das propriedades morfofuncionais dos neurônios espinhosos médios (Tepper et

al., 1999; Colwell et al., 1998; Uryu et al., 1999; Hurst et al., 2001). Estudos eletrofisiológicos realizados em ratos em P16 mostraram que os interneurônios GABAérgicos do estriado em já têm a capacidade de disparar em frequências extremamente altas com pouca adaptação, potenciais de ação estreitos e grande amplitude rápida após hiperpolarização (Koos e Tepper, 1999). No rato, o período de maior sinaptogênese do estriado ocorre durante a fase pós-natal (Chesselet et al., 1989; Szele et al., 1994; Butler et al., 1998).

Brand et al. (1984) estudaram o neurodesenvolvimento do estriado em macacos Rhesus e demonstraram que durante o segundo mês fetal, o estriado consistia principalmente de células imaturas, principalmente bipolares, e um pequeno número de cones de crescimento; as primeiras sinapses surgiram no putâmen em E60 e no caudado em E65; no terceiro mês fetal, os corpos celulares neuronais e as células gliais aumentam, além dos axônios e dendritos que se tornaram mais complexos; no quarto mês fetal, emergiram as quatro principais classes de células do estriado.

Apesar destes dados importantes sobre a função GABAérgica, não há muitas evidências descritas a respeito do perfil de expressão dos cotransportadores KCC2 e NKCC1 em neurônios do estriado em ratos.

1.6 Dimorfismo Sexual

O dimorfismo sexual é um fenômeno evolutivo presente em vários aspectos biológicos, incluindo os mecanismos de funcionamento GABAérgico. O cérebro de ratos está à mercê da transformação perene por parte dos hormônios esteroides das gônadas, entre o 18º dia de vida intrauterina e o 10º dia de vida pós-natal, resultando em um fenótipo de dimorfismo sexual cerebral em virtude da exposição à testosterona ou ao estrogênio (Cherubini et al., 1990). Portanto, machos e fêmeas iniciam com o mesmo número de neurônios em uma população específica, perdendo esses neurônios em função da exposição hormonal diferencial (Arai et al., 1996).

Sabe-se que há variações no padrão de expressão de NKCC1 e KCC2 entre machos e fêmeas nas diferentes idades. Castillo et al. (2013) observaram o dimorfismo sexual em ratos na expressão de NKCC1 e KCC2 no hipocampo e no córtex entorrinal durante o período neonatal. Nunez e McCarthy (2007) demonstraram que o GABA se torna inibitório mais cedo em fêmeas do que em

machos, baseando-se nas variações de expressão e atividade dos cotransportadores de cloreto entre machos e fêmeas durante o desenvolvimento pós-natal. Fêmeas possuem níveis mais baixos de NKCC1 fosforilado do que machos, entre P0 e P10. Em P14, os níveis atingem marcas reduzidas e equivalentes em ambos os sexos (Nunez et al., 2007). Em neurônios hipocâmpais de ratos, os efeitos hiperpolarizantes do GABA aparecem durante a primeira semana pós-natal em fêmeas e durante a segunda semana pós-natal em machos (Galanopoulou, 2008a). Também já foram demonstradas diferenças significativas sexo-específicas na mudança do padrão de expressão do RNAm do receptor GABA_A (Pae et al., 2011). Na substância nigra, uma estrutura sexualmente dimórfica importante no controle motor, o momento da inversão da função GABAérgica é gênero-específico (Galanopoulou et al., 2003a; Galanopoulou, 2005; Kyrozis et al., 2006). A ativação do receptor GABA_A pelo agonista muscimol causa despolarização, aumento da concentração de cálcio intracelular e a expressão de genes regulados pelo cálcio, como o KCC2, em neurônios da substância nigra de ratos machos entre P14 e P17. Entretanto, em fêmeas de idades equivalentes (P14 a P17) o muscimol hiperpolariza os neurônios da substância nigra, não aumenta o cálcio intracelular e diminui a expressão de KCC2 (Galanopoulos, 2005). O estradiol também está relacionado a alterações na expressão do KCC2. Em ratos machos em P15, o estradiol diminui a expressão do mRNA do KCC2 em neurônios da substância nigra. Já em ratas da mesma idade, o estradiol não influencia a expressão do KCC2 (Galanopoulos, 2005).

Embora as diferenças sexuais em relação à homeostasia do cloreto em neurônios imaturos estejam se tornando cada vez mais claras à luz da ciência (Fig. 1), fazem-se necessários mais estudos sobre esse fenômeno em regiões do sistema nervoso central pouco exploradas, como o cerebelo e o estriado. Através disso, será possível elucidar mecanismos bioquímicos e fisiopatológicos que perturbam a relação harmônica dos cotransportadores de cloreto e afetam o equilíbrio dos íons cloreto. Dessa forma, será possível buscar estratégias específicas para cada sexo no caso de distúrbios neurológicos que afetam esse equilíbrio, como, por exemplo, situações clínicas de hipóxia-isquemia ou asfixia perinatal.

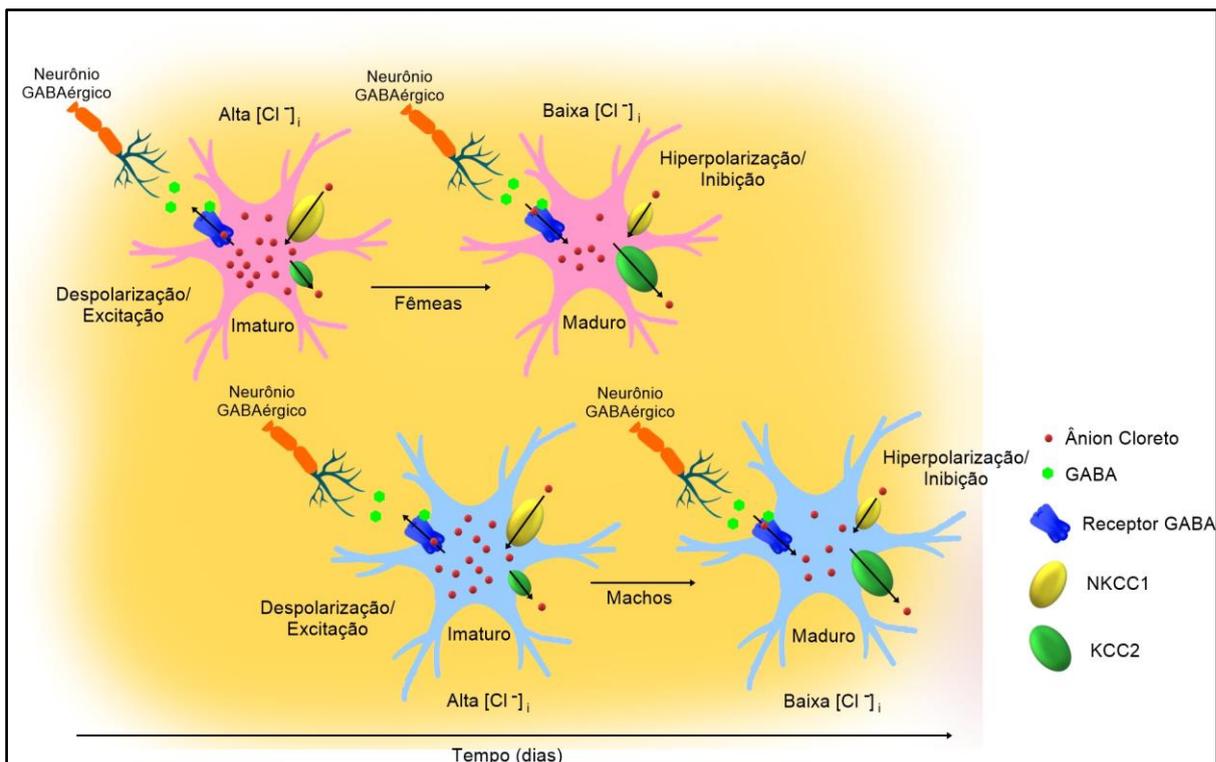


Figura 1 – Diagrama esquemático das atividades dos cotransportadores de cloreto e o efeito do GABA sobre neurônios entre machos e fêmeas em função do tempo. Em neurônios de fêmeas (em rosa), a atividade hiperpolarizante/inibitória do GABA inicia mais cedo do que em neurônios de machos (em azul) como consequência da redução da $[Cl^-]_i$ promovida, em parte, pela atividade dominante de KCC2 sobre NKCC1 com a maturação neuronal. Adaptado de Ben-Ari et al., 2002.

1.7 Hipóxia-isquemia Neonatal

A hipóxia-isquemia é um dos principais fatores de risco que causam distúrbios ao SNC, sendo capaz de alterar tanto a expressão dos receptores de GABA quanto a expressão dos cotransportadores de cloreto. Esse quadro clínico acomete entre 1,5 a 3 a cada 1.000 recém-nascidos a termo (Hagberg et al., 2015; Kurinczuk et al., 2010) e cerca de 7 a cada 1000 recém-nascidos prematuros (Chalak et al., 2012). Cerca de 40% dos recém-nascidos com lesão cerebral hipóxico-isquêmica (HI) não sobrevivem no período neonatal e quando sobrevivem, 30% desenvolvem distúrbios neurológicos, como paralisia cerebral, convulsões, epilepsia, deficiência visual, retardo mental e dificuldades de aprendizado e de memória, além de, anomalias comportamentais. (Rocha-Ferreira e Hristova, 2015, 2016; Volpe et al., 2001; Vannucci et al., 2004).

A hipóxia deprime rapidamente a atividade neuronal e a transmissão sináptica em ratos (Pena e Ramirez, 2005) devido ao alto custo metabólico desses processos, uma vez que a geração e a propagação do potencial de ação

consomem 47% do ATP disponível e que os potenciais pós-sinápticos consomem 34% desse ATP, na substância cinzenta de roedores (Attwell e Laughlin, 2001). Lesões neonatais oriundas da hipóxia-isquemia são fatores que levam a alterações na diferenciação morfológica dos neurônios GABAérgicos e à perda significativa de células que expressam receptores GABA_A (Robinson et al., 2006). Também podem levar à morte neuronal rápida por necrose, caso a lesão seja grave; ao passo que a lesão menos grave ou duradoura causa morte neuronal lenta principalmente por apoptose (Nakajima et al., 2000).

O déficit de suprimento sanguíneo para o cérebro, causado pela hipóxia-isquemia, gera uma cascata de eventos celulares que altera a homeostase iônica neuronal. Gallefi et al. (2004), em um modelo de isquemia *in vitro*, registraram que a [Cl⁻]_i aumenta em neurônios hipocâmpais de ratos em resposta à privação de glicose e oxigênio. Durante o evento isquêmico, o aumento da atividade de NKCC1 pode ser responsável pelo acúmulo intracelular de íons Cl⁻, lesionando a população neuronal devido à hiperexcitabilidade (Lipton, 1999). Yan et al. (2001) documentaram o aumento da expressão de NKCC1 no córtex cerebral após 2h de oclusão da artéria cerebral média esquerda em um modelo de isquemia cerebral. Também demonstraram o papel do NKCC1 no edema cerebral e nos danos neuronais durante a isquemia cerebral em ratos machos. Além disso, registraram que a expressão de NKCC1 aumentou durante 2h de hipóxia-isquemia e persistiu durante 24h de reperfusão, no córtex cerebral e estriado do cérebro de ratos. Liu et al. (2010) demonstraram o papel do NKCC1 na indução de edema em camundongos jovens e idosos no modelo hipóxico-isquêmico cerebral e também demonstraram que a expressão de NKCC1 aumenta mais em camundongos jovens em comparação aos camundongos idosos. O aumento dos níveis de NKCC1 faz com que a [Cl⁻]_i mude a ação GABAérgica da hiperpolarização para despolarização, induzindo convulsões (Brandt et al., 2010). Em modelos animais de hipóxia-isquemia cerebral, os níveis de mRNA para o KCC2 são reduzidos significativamente (Jaenisch et al., 2010; Wu et al., 2016).

Modelos em roedores neonatais são muito utilizados para mimetizar a condição humana com o intuito de analisar os efeitos fisiopatológicos da hipóxia-isquemia neonatal. Roedores entre P7 a P10 têm maturidade cerebral equivalente à maturidade do recém-nascido humano a termo (Rumajogee et al., 2016). Esse é o caso do modelo de Rice-Vannucci, em que ratos dessa faixa de idade sofrem um

bloqueio unilateral da artéria carótida comum e são expostos a um ambiente hipóxico (Goren et al., 2017; Rice et al., 1981; Fabres et al., 2018; Durán-Carabali et al., 2018). Diversos estudos do nosso grupo de pesquisa e de grupos associados têm avaliado os efeitos da hipóxia-isquemia cerebral neonatal utilizando o modelo de Rice-Vannucci em animais nas idades de P3 e P7. Por exemplo, Fabres et al. (2018) avaliaram os possíveis efeitos neuroprotetores do neuroesteroide progesterona em ratos Wistar machos P7 submetidos à hipóxia-isquemia neonatal baseada nesse modelo. Durán-Carabali et al. (2018) demonstraram a capacidade do ambiente enriquecido em reduzir os efeitos fisiopatológicos, como apoptose e ativação astrocitária, em ratos Wistar neonatos submetidos à hipóxia-isquemia. Já Netto et al. (2011) registraram os efeitos morfológicos, bioquímicos e comportamentais da nutrição pobre em proteínas durante a gestação e lactação sobre o SNC de ratos Wistar submetidos, também submetidos ao mesmo modelo hipóxico-isquêmico supracitado.

Pouco se sabe a respeito dos efeitos hipóxico-isquêmicos em ratos com idades inferiores a P7, tornando-se necessário mais estudos para elucidar as consequências fisiopatológicas do modelo nestes animais. Além disso, seria muito interessante conhecer a ação do neurotransmissor GABA sobre as populações neuronais nas duas idades aqui trabalhadas (P3 e P7) diante do insulto promovido pela hipóxia-isquemia neonatal.

2. JUSTIFICATIVA

O padrão de expressão dos cotransportadores de cloreto NKCC1 e KCC2 difere temporalmente e entre os sexos e, portanto, pode ter reflexo na maturação estrutural e neurofisiológica de diferentes regiões do sistema nervoso central. Embora se conheça o padrão temporal de inversão da função GABAérgica em neurônios hipocampais, pouco é sabido sobre essas mudanças em outras regiões encefálicas. Por exemplo, não são conhecidas as alterações GABAérgicas durante a maturação dos neurônios do estriado (um núcleo da base envolvido na motricidade) em machos e fêmeas; também há poucos registros sobre o cerebelo. Conhecer os aspectos morfofuncionais e o padrão temporal e gênero-específico dessa maturação no estriado e no cerebelo poderia contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento dos componentes motores do SNC, podendo colaborar para a definição de tratamentos clínicos mais adequados e específicos de acordo com a idade e o gênero.

Além disso, nosso grupo de pesquisa, além de outros dentro da Universidade, trabalha com modelos animais de hipóxia-isquemia encefálica neonatal e, portanto, conhecer o padrão de amadurecimento GABAérgico é de extrema importância para as intervenções e aperfeiçoamento do modelo. Os resultados obtidos por meio deste projeto visam elucidar mecanismos fisiológicos básicos, mas ainda pouco conhecidos, e poderão fornecer a base para diversos projetos de pesquisa futuros.

3. HIPÓTESE

Valendo-se dos achados até o momento, trabalhei com a hipótese de que o núcleo estriado e o cerebelo tenham um amadurecimento neural GABAérgico distintos, esperando que o cerebelo se desenvolva em um espaço de tempo em relação ao estriado e que ambos se desenvolvessem em tempos diferentes entre fêmeas e machos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Avaliar a expressão proteica dos cotransportadores de cloreto KCC2 e NKCC1 e inferir um direcionamento da função excitatória ou inibitória do neurotransmissor GABA no estriado e no cerebelo de ratos neonatos machos e fêmeas em P3 e P7 a partir da expressão proteica de NKCC1 e KCC2.

4.2 Objetivos Específicos

1. Quantificar a expressão proteica dos cotransportadores de cloreto KCC2 e NKCC1 em neurônios do núcleo estriado e do cerebelo de ratos neonatos machos e fêmeas nos dias pós-natais P3 e P7 através da técnica de *Western blotting*;
2. Com base nos resultados obtidos, determinar a presença de dimorfismo sexual na expressão dos transportadores KCC2 e NKCC1 no estriado e no cerebelo;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos Wistar neonatos (12 machos e 12 fêmeas entre P3 e P7) e 4 ratas mães (4 ninhadas). Também foi utilizado 1 rato macho adulto, cujos tecidos foram utilizados para controle dos experimentos. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS e após o recebimento foram mantidos no Biotério Setorial do ICBS. Foi solicitado ao CREAL o envio de ratas prenhas (no início da prenhez) para que ocorresse a aclimatação dos animais e o nascimento dos filhotes no Biotério Setorial do ICBS (uma vez que o estresse poderia levar a alterações das variáveis analisadas no presente projeto e os animais já foram utilizados em P3). Os filhotes foram mantidos em caixas de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, juntamente com suas respectivas mães (1 ninhada por caixa). O assoalho das caixas foi recoberto com maravalha. As ratas mães e os machos adultos receberam alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos sob períodos de 12h luz/12h escuro e temperatura média de 22°C.

5.2 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução normativa nº37, de 15 de fevereiro de 2018 e a resolução normativa nº30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th edition, 2011) do *National Research Council of the National Academies*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS) sob o número 37553.

Finalizado o período experimental, todas as fêmeas (ratas mães), não utilizadas nos experimentos, foram eutanasiadas. Para a eutanásia das ratas mães, as mesmas foram anestesiadas com uma dose letal i.p. de tiopental sódico (100 mg/kg) associado à lidocaína (5 mg/kg) e imediatamente

decapitadas com o uso de guilhotina para a confirmação da eutanásia. Os animais neonatos cujos tecidos foram utilizados para a técnica de *Western blotting* (descrita a seguir) foram mortos por decapitação com o uso de guilhotina. A decapitação para a técnica de *Western blotting* foi realizada sem anestesia por um pesquisador treinado em uma sala separada de onde os demais ratos se encontravam. Estas medidas visaram evitar o estresse dos animais e a alteração dos níveis hormonais devido à anestesia (Mazzanti et al., 1986). O rato macho adulto (cujos tecidos foram utilizados como controle da técnica) foi anestesiado e decapitado para a técnica de *Western blotting*. Esse rato macho adulto foi anestesiado com isoflurano (o isoflurano foi embebido em algodão e colocado em um recipiente fechado juntamente com o animal, com uma separação física entre o animal e o algodão para evitar o contato direto do animal com o líquido no algodão, fazendo com que o animal fosse exposto apenas ao vapor). Após a anestesia, o animal foi guilhotinado e o sistema nervoso rapidamente retirado para processamento para a técnica de *Western blotting*.

5.3 Western blotting

A técnica de *Western blotting* foi executada para a quantificação de expressão proteica (imunoconteúdo) dos cotransportadores de cloreto. Para os experimentos utilizando este método, o estriado e o cerebelo foram rapidamente dissecados e coletados em tubos Eppendorf após a decapitação dos animais (neonatos e machos adultos), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer (-80°C) para posterior homogeneização (Bodzon-Kulakowska et al., 2007). A homogeneização consistiu em fragmentar completamente os tecidos obtidos em uma solução composta pelo tampão PIK (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, NP40 1%) e inibidores de protease e fosfatase (1 µg/mL aprotinina, leupeptina e pepstatina; e 1 mM de fluoreto de metilfenilsulfonil). A concentração foi de 1 µL de inibidor de fosfatase para 100 µL de PIK. As amostras de cerebelo foram embebidas em 200 µL desta solução, ao passo que as amostras de estriado foram embebidas em 100 µL. Homogeneizadas, as amostras lisadas foram submetidas à centrifugação refrigerada a 4°C por 15 minutos a uma força de 7500 x g, a fim

de obter proteínas celulares. Ao final do processo de centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para outros tubos Eppendorf, enquanto que o pellet foi desprezado. Após esse processo, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até a etapa seguinte.

O ensaio de Bradford (Bradford, 1976) foi o método utilizado para quantificar as proteínas, consistindo na alteração da cor acastanhada do corante Comassie Blue G-250 (0,06% ou 60 ng/100 mL) em solução ácida para uma cor azulada na presença de proteínas. Para quantificar a concentração proteica na amostra, foi feita a curva padrão da proteína albumina sérica bovina (BSA) sob absorvância em 595 nm. Através da curva, obtivemos a equação linear para qual os valores médios de absorvâncias das amostras foram submetidos e, obtendo por fim, as concentrações proteicas de cada amostra. O coeficiente de correlação linear foi superior a 0,9. Logo depois, as amostras foram preparadas com tampão Laemmli 5x (Laemmli, 1970) (previamente aquecido a 90°C por 3 minutos no banho-seco) para permitir e detectar o deslocamento das proteínas durante a eletroforese e adicionou-se mercaptoetanol (50 µL para cada mL tampão Laemmli 5x). Este tampão é composto de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0,01%, Tris-HCl 1,5 M cujo pH é igual a 6,8. As amostras foram criopreservadas em ultrafreezer (-80°C) até a próxima etapa.

Com as amostras prontas para a corrida eletroforética, iniciou-se a síntese dos géis necessários para este processo – o gel de corrida ("resolving gel") e o gel de entrada ("stacking gel"). O gel de corrida 8% foi preparado com glicerol 50%, água, Tris 1,5 M pH 8,8, Acril-Bis e SDS 10%. Para a polimerização de 15 mL deste gel, acrescentou-se 150 µL de APS e 15 µL de TEMED. Já o gel de entrada 8% foi produzido com água, Tris 0,5 pH 6,8, Acril-Bis e SDS 10%. O tampão de corrida foi preparado com Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 %.

Quarenta microgramas de proteína das amostras foram separados por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio) entre 40 mV e 50 mV por 2 horas e 30 minutos (Vesterberg, 1993; Silva & Sousa, 2002) e transferidas para membranas de nitrocelulose. A confirmação

da transferência para essa membrana se deu por detecção de antígenos presentes nas proteínas através da ligação do corante orgânico de Ponceau-S (Pagano, 1999). As membranas foram lavadas com TTBS 0,1 M (contendo 0,05% Triton X-100) por 1 hora em temperatura ambiente e processadas para imunodeteção com os anticorpos primários contra as proteínas de interesse (*overnight* a 4°C): anti-NKCC1 (Millipore; AB3560P) e anti-KCC2 (Cell Signaling; 55473), ambas na concentração de 1:1000. Após a lavagem das membranas (3 lavagens com TBS por 5 minutos, cada) e a incubação destas com os anticorpos secundários específicos anti-IgG (ambos anti-rabbit; na concentração 1:1000; SC2357, Santa Cruz), as membranas foram reveladas em sistema de quimiluminescência (ImageQuant LAS 4000) e as imagens obtidas foram analisadas densitometricamente (Image Studio Lite 5.2). Os resultados foram normalizados pela expressão da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), com anticorpo primário anti-GAPDH (1:1000; MAB374, Millipore) e anticorpo secundário anti-IgG (anti-mouse; 1:10.000, AP132P, Millipore).

5.4 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste T de Student para avaliar a expressão isolada de cada cotransportador entre P3 e P7 para um mesmo sexo (macho ou fêmea) e para uma mesma região de interesse (cerebelo ou estriado). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: idade e sexo) seguida post-hoc de Bonferroni para a avaliação da razão NKCC1/KCC2. O nível de significância foi de 0,05. A análise estatística foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism 8.0.2. O teste estatístico analisou 24 indivíduos neonatos, seis machos e seis fêmeas de idade P3 e seis machos e seis fêmeas de idade P7. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

6. RESULTADOS

Através da técnica de *Western blot*, no presente estudo analisamos o perfil de expressão proteica (imunoconteúdo) dos cotransportadores de cloreto NKCC1 e KCC2 no cerebelo e estriado de ratos machos e fêmeas neonatos de idades P3 e P7. Também foi avaliada a relação entre os dois transportadores.

No cerebelo, foram observadas mudanças na expressão tanto de NKCC1 quanto de KCC2 tanto em relação ao sexo quanto às idades dos animais (Fig. 2). Em machos, a expressão de NKCC sofreu uma redução significativa de 63,1% de P3 para P7 (teste T, $p=0,0215$) (Fig. 2a) ao passo que a expressão de KCC2 também foi reduzida significativamente em 75,6% entre essas idades ($p=0,0392$) (Fig. 2b). Nas fêmeas, não houve mudanças significativas tanto na expressão de NKCC1 ($p=0,1236$) quanto na de KCC2 (teste T, $p=0,6070$) entre P3 e P7 (Figs. 2c e 2d).

A razão NKCC1/KCC2 foi analisada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Não foi observada significância estatística da razão NKCC1/KCC2 nas comparações múltiplas entre machos e fêmeas nem entre as idades de P3 e P7. Entretanto, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do sexo ($p=0,0119$) (Fig. 4a).

No estriado, mudanças nos níveis de expressão de NKCC1 e KCC2 foram observados tanto em relação ao sexo quanto às idades dos animais (Fig. 3). Em machos, não houve diferença significativa na expressão de NKCC1 entre P3 e P7 ($p=0,7911$) (Fig. 3a) nem na expressão de KCC2 entre essas idades ($p=0,4607$) (Fig. 3b). Nas fêmeas, houve redução significativa na expressão de NKCC1 em 93% (teste T; $p=0,0309$) (Fig. 3c), enquanto não foi observada alteração significativa na expressão de KCC2 entre P3 e P7 (teste T; $p=0,9832$) (Fig. 3d).

A razão NKCC1/KCC2 foi analisada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Foi observada significância estatística da razão NKCC1/KCC2 nas comparações múltiplas entre fêmeas nas diferentes idades, mas em machos, não. Entretanto, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito dos fatores sexo e idade, além de interação entre esses fatores, ambos com $p<0,0001$ (Fig. 4b).

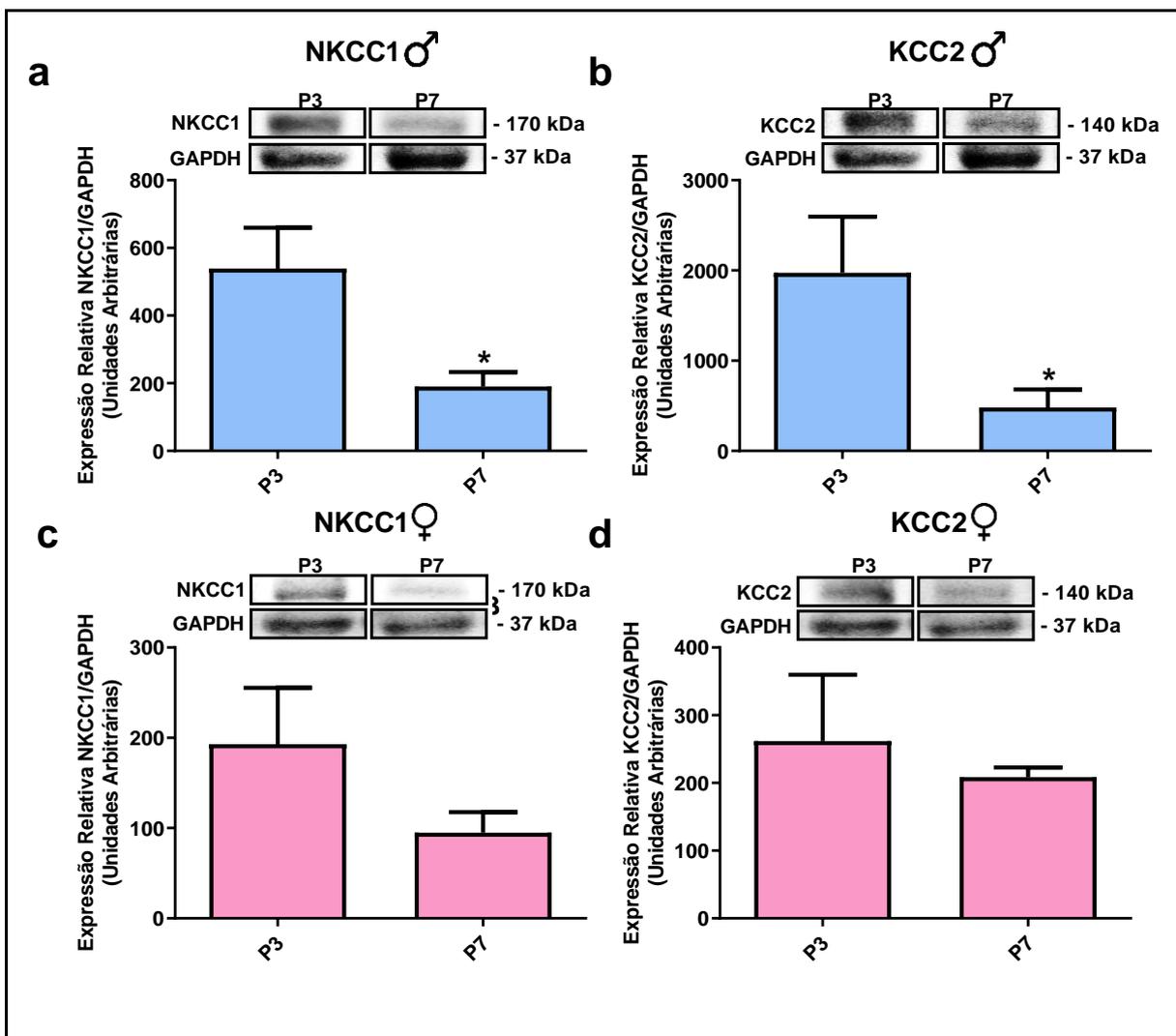


Figura 2 – Padrão de expressão proteica dos cotransportadores de cloreto NKCC1 e KCC2 no cerebelo de ratos machos e fêmeas com idades de P3 e P7. Acima de cada gráficos (a–d) estão mostradas bandas representativas relativas à expressão de NKCC1, KCC2 e GAPDH (controle de carga) de cada grupo experimental. Os dados dos gráficos de “a” a “d” foram analisados através do teste T de Student. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

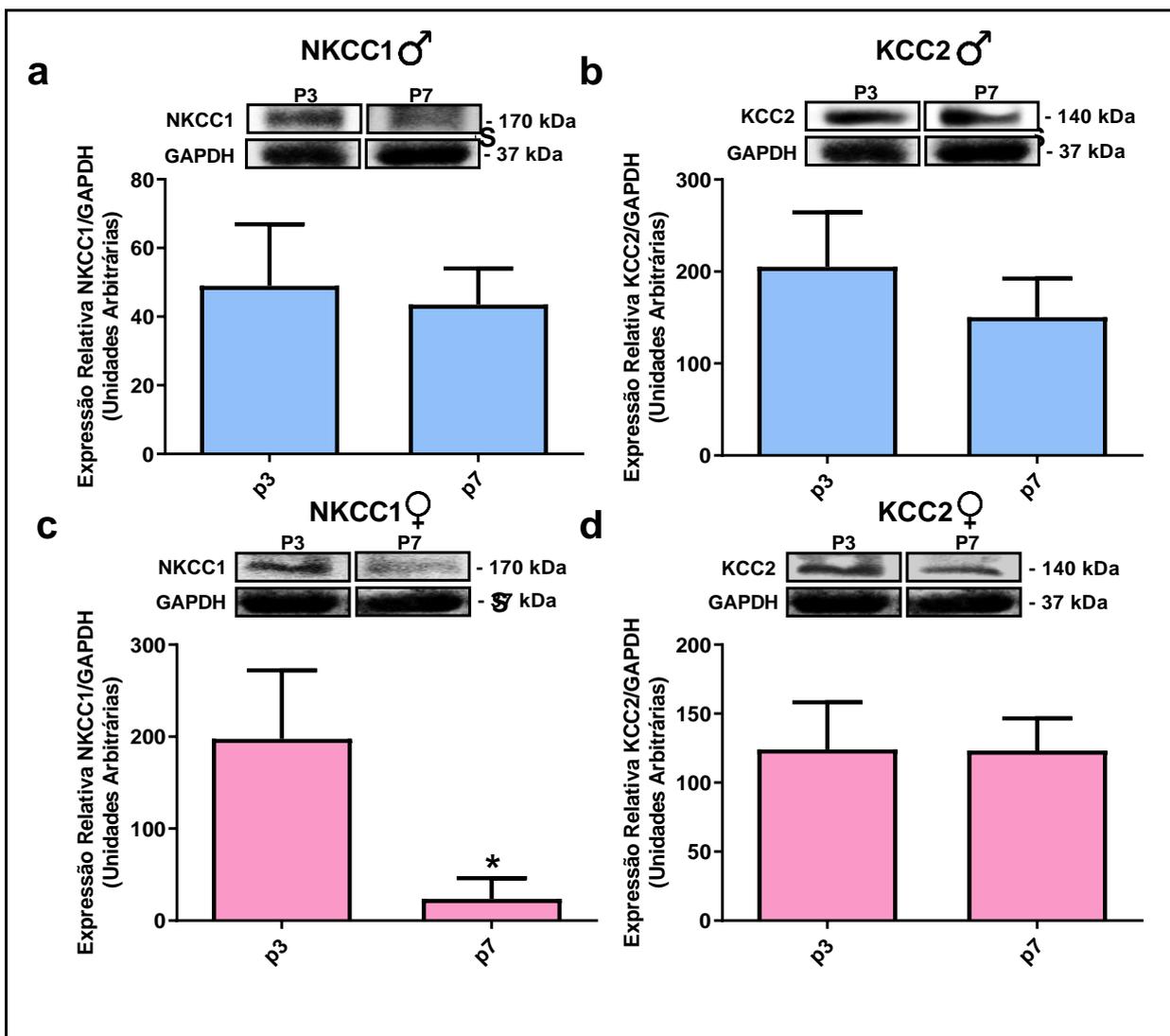


Figura 3 – Padrão de expressão proteica dos cotransportadores de cloreto NKCC1 e KCC2 no estriado de ratos machos e fêmeas com idades de P3 e P7. Acima de cada gráfico (a–d) estão mostradas bandas representativas relativas à expressão de NKCC1, KCC2 e GAPDH (controle de carga) de cada grupo experimental. Os dados dos gráficos de “a” a “d” foram analisados através do teste T de Student. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os dados são apresentados

como média \pm erro padrão da média.

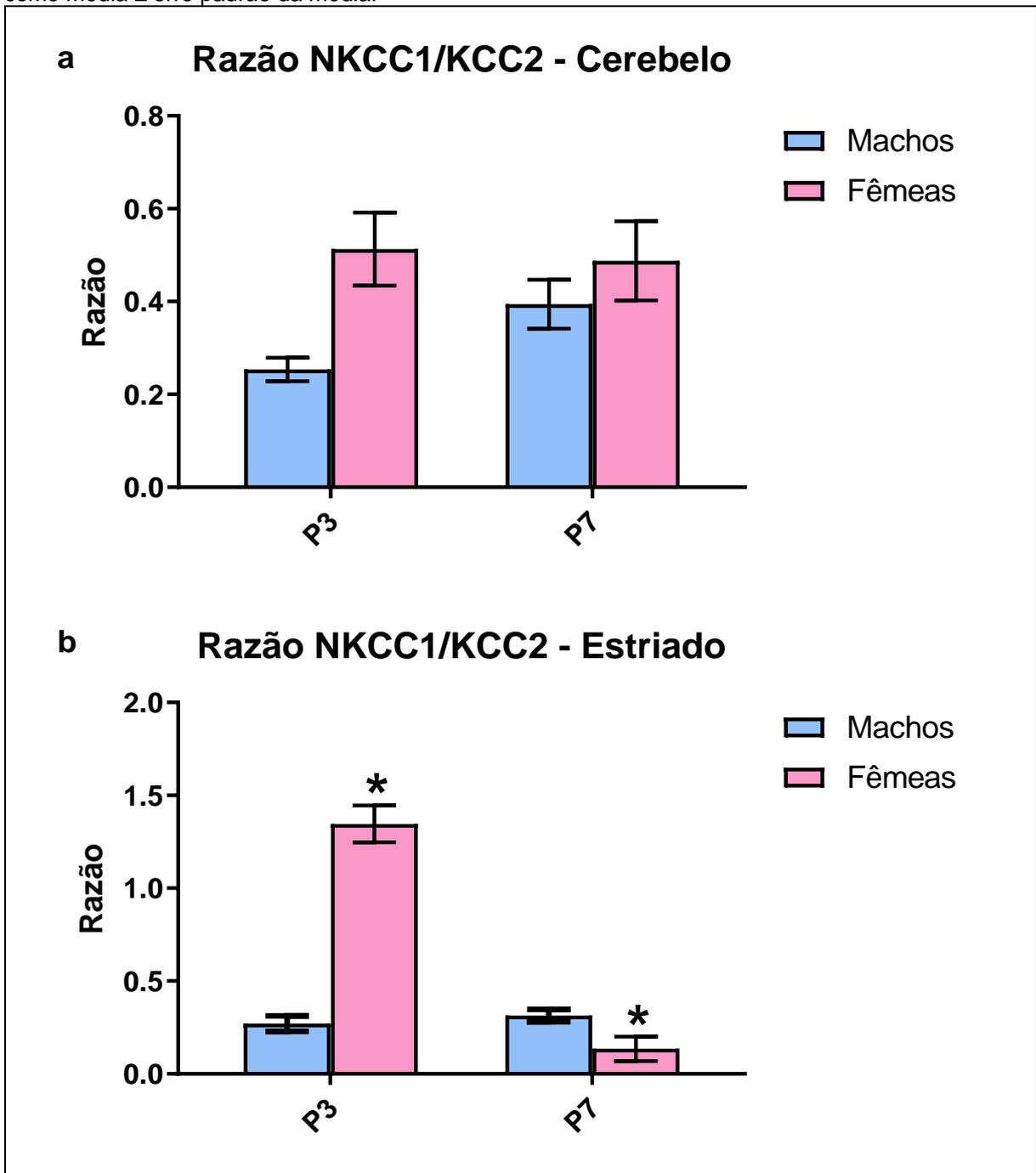


Figura 4 - Os gráficos a e b representam a razão NKCC1/KCC2 entre machos e fêmeas nas idades P3 e P7 no cerebelo e estriado, respectivamente. A razão NKCC1/KCC2 foi analisada através de ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni. No cerebelo (a), não foram verificadas diferenças significativas. Entretanto, a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito do fator sexo. O número amostral foi de 24. No estriado (b), foram verificadas diferenças significativas (*) nas comparações entre fêmeas de P3 e P7. Entretanto, a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito dos fatores sexo, idade e interação entre estes fatores. O número amostral foi de 24.

7. DISCUSSÃO

A conversão da ação do GABA de excitatória para inibitória está diretamente correlacionada com a presença do ânion cloreto dentro e fora da célula. Porém, a simples interação química da molécula de GABA com seu receptor correspondente na membrana plasmática não é o único fator responsável por seus efeitos excitatórios ou inibitórios nos neurônios. Para sofrer efeitos despolarizantes/excitatórios ou hiperpolarizantes/inibitórios pelo GABA, o neurônio conta com um sofisticado mecanismo homeostático de controle do cloreto realizado por duas classes de proteínas transmembrana: NKCC1 e KCC2 (Tzanoulinou et al., 2014; Ben-Ari et al., 2002, 2012; Ackerman e Cline, 2007; Galanopoulou, 2008). O NKCC1 transporta íons cloreto para dentro da célula, aumentando a concentração interna deste íon. Já o KCC2 transporta íons cloreto principalmente para fora da célula, reduzindo a concentração interna deste íon. A resposta fisiológica neuronal frente à sinalização GABAérgica é dependente da presença e da função destes cotransportadores de cloreto, ou seja, depende da quantidade de Cl^- que sai ou entra na célula em resposta à abertura do poro do canal do receptor GABAérgico (Yamada et al., 2004).

De fato, neurônios imaturos em condições normais sofrem despolarização pelo GABA, uma vez que a $[\text{Cl}^-]_i$ é alta em virtude da atividade dominante de NKCC1 em relação ao KCC2 (Ben-Ari et al., 2012). Em contraste, neurônios maduros em condições normais sofrem hiperpolarização pelo GABA, uma vez que a $[\text{Cl}^-]_i$ é baixa em virtude da atividade dominante de KCC2 em relação ao NKCC1 (Ben-Ari et al., 2012; 2014). O GABA contribui no aumento dos níveis de expressão de mRNA do KCC2 em neurônios imaturos (Ganguly et al., 2001), suportando a ideia de que o KCC2 é elemento chave por trás da inversão da função GABAérgica (Lee et al., 2005). De modo geral, durante as primeiras duas semanas pós-natais ocorre a troca funcional excitatória-inibitória do GABA (Han et al., 2015). O momento dessa troca funcional foi descrito como estando em torno do dia P13,5 em neurônios hipocampais de ratos machos (Rivera et al., 1999; Khazipov et al., 2004). Análises de biópsias de tecido nervoso epiléptico revelaram uma atividade excitatória do GABA devido ao déficit de expressão do KCC2 e o subsequente aumento de $[\text{Cl}^-]_i$ (Cohen et al., 2002; D'Antuono et al., 2004; Huberfeld et al., 2007). Em roedores adultos com doença de Huntington, a ação GABAérgica

tornou-se excitatória em virtude da super-expressão de NKCC1 e do déficit de KCC2 (Dargaei et al., 2018).

Conforme a proposta do presente estudo, nós avaliamos a expressão dos cotransportadores de cloreto NKCC1 e KCC2 no cerebelo e no estriado em ratos Wistar machos e fêmeas neonatos de diferentes idades (P3 e P7) através da técnica de *Western blot*. Estas são as idades mais utilizadas em trabalhos que usam o modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Millar et al., 2017; Pae et al., 2011; Wang et al., 2011), incluindo trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Fabres et al., 2018). Assim, entender a função GABAérgica nessas idades seria importante para a formulação de estratégias neuroprotetoras para o tratamento da hipóxia-isquemia neonatal. Além disso, compreender o dimorfismo sexual no papel do GABA (Perrot-Sinal et al., 2007; Galanopoulou, 2005, 2008; Castillo et al., 2013) também contribuiria para que as estratégias neuroprotetoras pudessem ser focadas para cada um dos sexos.

Nossos resultados sugerem que machos de ratos Wistar expressam mais NKCC1 no cerebelo em P3 do que em P7, isto é, há uma redução detectável de expressão deste cotransportador de cloreto entre essas idades. Em machos, essa redução foi significativa (Fig. 2a). Em contraste com as nossas expectativas, machos expressaram mais KCC2 no cerebelo em P3 em relação à P7, de modo que houve uma redução de expressão de KCC2 significativa (Fig. 2b). Já no estriado, os machos não apresentaram alteração significativa em NKCC1 nem em KCC2 (Fig. 3a e 3b).

Pouca alteração houve nas fêmeas em relação aos cotransportadores de cloreto. Não houve mudanças estatisticamente significativas em NKCC1 de neurônios cerebelares femininos (Fig. 2c e 2d). Porém, nos neurônios estriatais, fêmeas expressam mais NKCC1 em P3 do que em P7, tendo uma redução estatisticamente significativa (Fig. 3c), em contraste com a proteína KCC2, que não teve alterações expressivas significativas (Fig. 3d). A Tabela 1 resume os resultados discutidos acima.

Embora esse padrão de expressão dos cotransportadores de cloreto nas populações neuronais cerebelares e estriatais pareça ser distinto em relação às demais estruturas do SNC, estamos lidando com um intervalo de tempo muito curto e com uma idade ainda pouco explorada e conhecida nas pesquisas de neurodesenvolvimento, como P3. De fato, vários trabalhos relatam as mudanças temporais na expressão isolada ou de NKCC1 (Luo et al., 2018; Wang et al., 2015) ou então de KCC2 (Friedel et al., 2017; Jantizie et al., 2015; Kelley et al., 2018), mas poucos relatam a expressão temporal de ambos os cotransportadores de cloreto (Ben-

Ari et al., 2014; Dzhala et al., 2005). Além disso, há uma grande escassez de trabalhos que avaliam a expressão de NKCC1 e KCC2 em ambos os sexos em idades inferiores a P7 (Perrot-Sinal et al., 2007), principalmente em regiões do SNC como o cerebelo e o estriado em que não há trabalhos até o momento. Esse conhecimento é de extrema importância para trabalhos que avaliam os efeitos neonatais da hipóxia-isquemia (como os trabalhos do nosso próprio grupo de pesquisa), os quais normalmente utilizam as idades de P3 e P7 (Fabres et al., 2018; Durán-Carabali et al., 2018; Netto et al., 2011).

Com base nos nossos resultados, parece que avaliar a expressão isolada de um único transportador de cloreto não é suficiente para concluir que a ação excitatória do GABA tenha se modificado ao longo do tempo. Parece que o mais importante seria justamente acompanhar e avaliar a relação (razão) entre a expressão de NKCC1 e KCC2. Essa razão nos indicaria se a função global do GABA está mais direcionada para um papel excitatório ou inibitório, independentemente do imunoconteúdo absoluto de um único transportador de cloreto.

Outra constatação que tivemos, foi a relação entre NKCC1 e KCC2 nas populações neuronais do cerebelo e do estriado em ambos os sexos nas duas idades. No cerebelo não aconteceu nenhuma variação significativa da razão NKCC1/KCC2 nem entre machos e fêmeas e nem entre P3 e P7 (Fig. 4a). Contudo, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do sexo no cerebelo. Por outro lado, no estriado, a razão NKCC1/KCC2 apresentou uma variação mais marcante em fêmeas do que em machos, sendo que em fêmeas houve significância estatística nas comparações múltiplas, mas em machos, não (Fig. 4b). Porém, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do sexo e da idade, além de interação entre estes fatores.

O significado dessas relações incide diretamente no potencial papel do GABA sobre os neurônios alvo. Quanto menor esta relação, maior será o papel funcional de KCC2. Quanto mais próximo de 1 esta relação estiver, maior a tendência ao equilíbrio entre o NKCC1 e KCC2. A prevalência funcional do cotransportador de cloreto é determinante para a ação do GABA, de modo que o aumento gradativo da atividade de KCC2 sobre NKCC1 com o tempo aumenta a probabilidade de hiperpolarização e/ou inibição neuronal. Por outro lado, o fato de NKCC1 ter uma concentração e atividade maior em neurônios imaturos torna a probabilidade de despolarização e/ou excitação neuronal mais elevada (Ben-Ari et al.; 2012).

Uma maturação GABAérgica cerebelar e estriatal mais cedo em fêmeas do

que os machos, através da presença desigual dos cotransportadores de cloreto NKCC1 e KCC2 entre os sexos, suporta, em parte, a ideia de que a expressão dos cotransportadores de cloreto é sexo-específica (Damborsky e Winzer-Serhan, 2012). Além disso, nossos dados reforçam que a maturação GABAérgica também é região-específica. Níveis de KCC2 são superiores nos neurônios do hipocampo de fêmeas P7 em relação aos neurônios hipocámpais de machos com a mesma idade, enquanto que a taxa de NKCC1 é maior no hipocampo masculino entre P0 e P7 em relação às fêmeas da mesma idade (Nunez e McCarthy, 2007; Galanopoulou et al., 2008). No hipocampo de ratos machos P5, o aumento da expressão de NKCC1 está associado à despolarização GABAérgica (Pfeffer et al., 2009). Perrot-Sinal et al. (2007), demonstraram que a expressão de NKCC1 foi maior no cérebro perinatal (entre E20 e P0), diminuindo para níveis baixos em P5 e níveis pouco detectáveis em P11. Os níveis de mRNA de NKCC1 em machos foram significativamente maiores do que fêmeas em P0 e a expressão de NKCC1 foi significativamente maior em machos em relação às fêmeas em E20 e P0; em contraste, os níveis de mRNA do KCC2 foram significativamente menores nos machos em relação às fêmeas em P0. Em P5, essa proteína foi significativamente menos expressa nos machos em relação às fêmeas.

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos.

P3 P7				
ESTRUTURA	SEXO	NKCC1	KCC2	NKCC1/KCC2
Cerebelo	Machos	P3 > P7	P3 > P7	-
	Fêmeas	-	-	-
Estriado	Machos	-	-	-
	Fêmeas	P3 > P7	-	Redução

O cerebelo e o estriado são subcentros neuronais do SNC importantes na atividade motora dos animais vertebrados. O cerebelo é uma estrutura complexa que atua na modulação dos movimentos, atuando na manutenção e equilíbrio da postura, coordenação dos movimentos voluntários, aprendizagem motora e algumas funções cognitivas. Já o estriado, é um núcleo da base especializado em aspectos cognitivos (planejamento e ação motora), tomada de decisão, motivação e recompensa (Purves et al., 2018; Kandel et al., 2013). Apesar de ambas as estruturas apresentarem funções com finalidades convergentes, cada uma tem peculiaridades em seu neurodesenvolvimento. As diferenças tangíveis no perfil de expressão dos cotransportadores de cloreto e a maturação GABAérgica podem refletir aspectos da vida importantes para a compreensão de mecanismos naturais diferentes entre indivíduos mais jovens e mais velhos e entre machos e fêmeas.

Embora a razão NKCC1/KCC2 não difira significativamente em neurônios cerebelares de ratas e ratos na primeira semana de vida em nossos resultados, a ANOVA mostrou efeitos importantes do sexo no estriado e no cerebelo. Contudo, devemos esperar diferenças expressivas em idades inferiores (na vida intrauterina) ou superiores, de modo que se analisarmos uma janela temporal maior, constataremos variações fenotípicas entre machos e fêmeas em características comportamentais, fisiológicas, bioquímicas e morfológicas.

Observamos diferença estatisticamente significativa na relação entre os dois cotransportadores de cloreto no estriado de fêmeas, mas não no estriado de machos. Em fêmeas, a razão entre NKCC1 e KCC2 cai drasticamente entre as idades P3 e P7, sugerindo que a primeira semana de vida é crucial para aspectos concernentes do estriado, ao passo que em machos é necessário um tempo maior para o desenvolvimento pleno deste núcleo da base.

Além disso, observamos a existência importante de dimorfismo sexual no cerebelo e estriado de ratos Wistar neonatos. As fêmeas apresentaram um resultado distinto e mais marcante em relação aos machos.

8. CONCLUSÃO

Concluimos, por meio deste trabalho de pesquisa, que há características sexualmente dimórficas no cerebelo e no estriado de ratos neonatos. Verificamos que o dimorfismo sexual, no período de neurodesenvolvimento em questão, é mais acentuado no estriado do que no cerebelo. Sendo assim, nesta janela de tempo o estriado experimenta alterações mais marcantes da troca de papel do GABA, de excitatório para inibitório. Ainda assim, torna-se necessário mais estudos sobre o padrão de expressão dos cotransportadores de cloreto NKCC1 e KCC2 em machos e fêmeas e expandir o número de idades analisadas, de modo que se possa verificar possíveis mudanças em idades inferiores e superiores em relação às analisadas neste trabalho. A partir disso, buscar novas alternativas de intervenções e tratamentos especiais para distúrbios fisiopatológicos adequados para fêmeas e para machos. Este trabalho é um dos únicos, e talvez o pioneiro, em avaliar o perfil de expressão de NKCC1 e KCC2 no estriado de ratos machos e fêmeas neonatos.

9. REFERÊNCIAS

- AKERMAN, C. J.; CLINE, H. T. Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 8, p. 382–389, 2007.
- ARAI, Y.; SEKINE, Y.; MURAKAMI, S. Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. **Neuroscience Research**, v. 25, n. 4, p. 403–407, 1996.
- ARAKI, T.; KIYAMA, H.; TOHYAMA, M. GABAA Receptor subunit messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain. **Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 583–591, 1992.
- ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for glutamatergic signalling in grey matter of the rat cerebral cortex. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 21, p. 1133–1145, 2001.
- AUGOOD, S. J.; HERBISON, A. E.; EMSON, P. C. Localization of GAT-1 GABA transporter mRNA in rat striatum: cellular coexpression with GAD67 mRNA, GAD67 immunoreactivity, and parvalbumin mRNA. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 1 Pt 2, p. 865–74, 1995.
- BALCOMBE, J. P.; BARNARD, N. D.; SANDUSKY, C. Laboratory routines cause animal stress. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 42–51, 2004.
- BARBIN, G. et al. Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**, v. 152, n. 1–2, p. 150–154, 1993.
- BARRY, P. H.; SCHOFIELD, P. R.; MOORHOUSE, A. J. Proceedings of the Australian Neuroscience Society Symposium GABA and Glycine Receptors: From Neurochemistry to Neural Networks GLYCINE RECEPTORS: WHAT GETS IN AND WHY? n. February, p. 935– 936, 1999.
- BAYER, S. A. Neurogenesis in the rat neostriatum. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 163–175, 1984.
- BEHAR, T. et al. Many spinal cord cells transiently express low molecular weight forms of glutamic acid decarboxylase during embryonic development. **Developmental Brain Research**, v. 72, n. 2, p. 203–218, 1993.
- BEN-ARI, Y. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. **Neuroscience**, v. 279, p. 187–219, 2014.

BEN-ARI, Y. et al. γ -Aminobutyric acid (GABA): A fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. **Progress in Brain Research**, v. 102, n. C, p. 261–273, 1994.

BEN-ARI, Y. Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 728–739, 2002.

BEN-ARI, Y. et al. GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1215–1284, 2007.

BEN-ARI, Y. Khalilov, I., Kahle, K. T., & Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, 18(5), 467–486. <https://doi.org/10.1177/1073858412438697ABA> excitatory/inhibitory sh. **Neuroscientist**, v. 18, n. 5, p. 467–486, 2012.

BENNETT, B. D.; BOLAM, J. P. Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. **Neuroscience**, v. 62, n. 3, p. 707–19, 1994.

BODZON-KULAKOWSKA, A.; BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; JARZEBINSKA, J.; SILBERRING, J. Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography*. Amsterdam. v.849, p.1-31, 2007.

BOLAM, J. P. et al. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [3H] γ -aminobutyric acid: Combination of golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. **Journal of Comparative Neurology**, v. 213, n. 2, p. 121–134, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAND, S.; RAKIC, P. Cyto differentiation and synaptogenesis in the neostriatum of fetal and neonatal rhesus monkeys. **Anatomy and Embryology**, v. 169, n. 1, p. 21–34, 1984.

BRANDT, C. et al. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 25, p. 8602–8612, 2010.

BUTLER, A. K.; URYU, K.; CHESSELET, M. F. A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum. **Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 2–3, p. 253–262, 1998.

BUZSÁKI, G.; KAILA, K.; RAICHLE, M. Inhibition and Brain Work. **Neuron**, v. 56, n. 5, p. 771–783, 2007.

CALABRESI, P.; DE MURTAS, M.; BERNARDI, G. The neostriatum beyond the motor function: Experimental and clinical evidence. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 39–60, 1997.

CASTILLO, J. et al. NKCC1 and KCC2 protein expression is sexually dimorphic in the hippocampus and entorhinal cortex of neonatal rats. **Neuroscience Letters**, v. 552, p. 52–57, 2013.

CHALAK, L. F. et al. Perinatal acidosis and hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants of 33 to 35 weeks' gestation. **Journal of Pediatrics**, v. 160, n. 3, p. 388–394, 2012.

CHEN, F. et al. Vortioxetine promotes early changes in dendritic morphology compared to fluoxetine in rat hippocampus. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 234–245, 2016.

CHERUBINI, E. et al. GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 481–490, 1990.

CHERUBINI, E.; GAIARSA, J. L.; BEN-ARI, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. **Trends in Neurosciences**, v. 14, n. 12, p. 515–519, 1991.

CHESSELET, M. F.; ROBBINS, E. Characterization of striatal neurons expressing high levels of glutamic acid decarboxylase messenger RNA. **Brain Research**, v. 492, n. 1–2, p. 237–244, 1989.

CLAYTON, G. H. et al. Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. **Developmental Brain Research**, v. 109, n. 2, p. 281–292, 1998.

COHEN, I. et al. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. **Science**, v. 298, n. 5597, p. 1418–1421, 2002.

COLWELL, C. S.; LEVINE, M. S. Postnatal Development of Responses in the Neostriatum. v. 1759, n. 310, p. 154–163, 1998.

CONNOR, J.; TSENG, H.; HOCKBERGER, P. Depolarization- and transmitter-

induced changes in intracellular Ca²⁺ of rat cerebellar granule cells in explant cultures. **The Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 1384–1400, 2018.

COWAN, R. L. et al. Parvalbumin-containing gabaergic interneurons in the rat neostriatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 302, n. 2, p. 197–205, 1990.

D'ANTUONO, M. et al. GABA A receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. **Brain**, v. 127, n. 7, p. 1626–1640, 2004.

DARGAEI, Z. et al. Restoring GABAergic inhibition rescues memory deficits in a Huntington's disease mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 7, p. E1618–E1626, 2018.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 244, n. 1, p. 2–8, 2006.

DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Prenatal and Early Postnatal Environmental Enrichment Reduce Acute Cell Death and Prevent Neurodevelopment and Memory Impairments in Rats Submitted to Neonatal Hypoxia Ischemia. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 3627–3641, 2018.

DZHALA, V. I. et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. **Nature Medicine**, v. 11, n. 11, p. 1205–1213, 2005.

EDWARDS, A. B. et al. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy and neuroprotective peptide therapies: A case for cationic arginine-rich peptides (CARPs). **Brain Sciences**, v. 8, n. 8, p. 15–20, 2018.

FABRES, R. B. et al. Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 3, p. 813–821, 2018.

FRIEDEL, P. et al. A novel view on the role of intracellular tails in surface delivery of the potassium-chloride cotransporter KCC2. **eNeuro**, v. 4, n. 4, p. 1–19, 2017.

FURUKAWA, M. et al. Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 493, n. 3, p. 1243–1249, 2017.

GALANOPOULOU, A. S. Dissociated Gender-Specific Effects of Recurrent Seizures on GABA Signaling in CA1 Pyramidal Neurons: Role of GABA_A Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 1557–1567, 2008.

GALANOPOULOU, A. S. Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. **Epilepsy Research**, v. 80, n. 2–3, p. 99–113, 2008.

GALANOPOULOU, A. S.; MOSHÉ, S. L. Role of sex hormones in the sexually dimorphic expression of KCC2 in rat substantia nigra. **Experimental Neurology**, v. 184, n. 2, p. 1003–1009, 2003.

GANGULY, K. et al. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. **Cell**, v. 105, n. 4, p. 521–532, 2001.

GOREN, B. et al. Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy. **Brain Research**, v. 1659, p. 81–87, 2017.

HAGBERG, H. et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 4, p. 192–208, 2015.

HAIDER, B. Neocortical Network Activity In Vivo Is Generated through a Dynamic Balance of Excitation and Inhibition. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 17, p. 4535–4545, 2006.

HALLONET, M. E. R.; TEILLET, M.-A.; LE DOUARIN, N. M. A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. **Development**, v. 108, p. 19–31, 1990.

HÁMORI, J.; SOMOGYI, J. Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: A quantitative electron microscope study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 220, n. 4, p. 365–377, 1983.

HAN, B.; BELLEMER, A.; KOELLE, M. R. An evolutionarily conserved switch in response to GABA affects development and behavior of the locomotor circuit of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 1159–1172, 2015.

HEK, T. H. E. et al. Comparison of Na-K-Cl Cotransporters. v. 273, n. 18, p. 11295–11301, 1998.

HUANG, Z. J.; DI CRISTO, G.; ANGO, F. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 9, p. 673–686, 2007.

HUBERFELD, G. et al. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 37, p. 9866–

9873, 2007.

HURST, R. S. et al. Delayed postnatal development of NMDA receptor function in medium- sized neurons of the rat striatum. **Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2, p. 122–134, 2001.

HYDE, T. M. et al. Expression of GABA Signaling Molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in Cortical Development and Schizophrenia. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 30, p. 11088– 11095, 2011. IN, A. (Accepted June 30th, 1977). v. 142, n. 1978, p. 505–513, 1978.

JAENISCH, N.; WITTE, O. W.; FRAHM, C. Downregulation of potassium chloride cotransporter KCC2 after transient focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 41, n. 3, 2010.

JAKAB, R. L.; HÁMORI, J. Quantitative morphology and synaptology of cerebellar glomeruli in the rat. **Anatomy and Embryology**, v. 179, n. 1, p. 81–88, 1988.

JANTZIE, L. L. et al. Prenatal hypoxia–ischemia induces abnormalities in CA3 microstructure, potassium chloride co-transporter 2 expression and inhibitory tone. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. september, p. 1–10, 2015.

JEFFREY L. CUMMINGS. Frontal-Subcortical Circuits and Human Behavior. **Archives of neurology**, v. 50, p. 873–880, 1993.

JELITAI, M.; MADARASZ, E. The Role of GABA in the Early Neuronal Development. **International Review of Neurobiology**, v. 71, n. 05, p. 27–62, 2005.

K., U.; A.K., B.; M.-F., C. Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 405, n. 2, p. 216–232, 1999.

KAHLE, K. T. et al. Roles of the cation - Chloride cotransporters in neurological disease. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 4, n. 9, p. 490–503, 2008.

KAILA, K. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 251–255, 1999.

KALENKA, A. et al. Isoflurane anesthesia elicits protein pattern changes in rat hippocampus. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v. 22, n. 2, p. 144–154, 2010.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. **Principles of Neural Science**. 4th edition. New York: McGrawHill Medical, 2013.

KATAYAMA, Y.; MIYAZAKI, S.; TSUBOKAWA, T. Electrophysiological evidence favoring intracaudate axon collaterals of GABAergic caudate output neurons in the cat. **Brain Research**, v. 216, n. 1, p. 180–186, 1981.

KAWAGUCHI, Y. et al. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 12, p. 527–535, 1995.

KELLEY, M. R. et al. Locally Reducing KCC2 Activity in the Hippocampus is Sufficient to Induce Temporal Lobe Epilepsy. **EBioMedicine**, v. 32, p. 62–71, 2018.

KHAZIPOV, R. et al. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 590–600, 2004.

KITA, H.; KOSAKA, T.; HEIZMANN, C. W. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. **Brain Research**, v. 536, n. 1–2, p. 1–15, 1990.

KURINCZUK, J. J.; WHITE-KONING, M.; BADAWI, N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Early Human Development**, v. 86, n. 6, p. 329–338, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAURIE, D. J.; SEEBURG, P. H.; WISDEN, W. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 1063–76, 1992.

LEE, H. et al. KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2593–2599, 2005.

LI, H. et al. Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 12, p.

2358–2370, 2002.

LIU, F. et al. Expression of Na-K-Cl cotransporter and edema formation are age dependent after ischemic stroke. **Experimental Neurology**, v. 224, n. 2, p. 356–361, 2010.

LOTURCO, J. J. et al. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. **Neuron**, v. 15, n. 6, p. 1287–1298, 1995.

LOVINGER, D. M. Ethanol Potentiates GABAergic Synaptic Transmission in a Postsynaptic Neuron/Synaptic Bouton Preparation From Basolateral Amygdala. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 1, p. 433–441, 2006.

LUK, K. C.; SADIKOT, A. F. GABA promotes survival but not proliferation of parvalbumin- immunoreactive interneurons in rodent neostriatum: An in vivo study with stereology. **Neuroscience**, v. 104, n. 1, p. 93–103, 2001.

LUO, W. et al. Vitexin reduces epilepsy after hypoxic ischemia in the neonatal brain via inhibition of NKCC1. p. 1–15, 2018.

MANENT, J.-B. A Noncanonical Release of GABA and Glutamate Modulates Neuronal Migration. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 19, p. 4755–4765, 2005.

MANLEY, G. Public Access NIH Public Access. v. 71, n. 2, p. 233–236, 2013.

MAZZANTI, L.; PASTUSZKO, A.; LENAZ, G. Effects of ketamine anesthesia on rat-brain membranes: fluidity changes and kinetics of acetylcholinesterase. **BBA - Biomembranes**, v. 861, n. C, p. 105–110, 1986.

MICHLER, A. Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 463–472, 1990.

MIGHELI, A. et al. Detection of apoptosis in weaver cerebellum by electron microscopic *in situ* end-labeling of fragmented DNA. **Neuroscience Letters**, v. 199, n. 1, p. 53–56, 1995.

MIKAWA, S. et al. Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. **Developmental Brain Research**, v. 136, n. 2, p. 93–100, 2002.

MILLAR, L. J. et al. Neonatal hypoxia ischaemia: Mechanisms, models, and therapeutic challenges. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–36,

2017.

NAKAJIMA, W. et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 21, p. 7994–8004, 2000.

NUÑEZ, J. L.; MCCARTHY, M. M. Evidence for an extended duration of GABA-mediated excitation in the developing male versus female hippocampus. **Developmental Neurobiology**, v. 67, n. 14, p. 1879–1890, 2007.

OBRIETAN, K.; VAN DEN POL, A. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 5065–5077, 2018.

OWENS, D. F. et al. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 20, p. 6414–23, 1996.

OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715–727, 2002.

PAE, E. K. et al. Perinatal intermittent hypoxia alters γ -aminobutyric acid: A receptor levels in rat cerebellum. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 819–826, 2011.

PAGANO, M. Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam. v.383, p.119-125, 1999.

PAPER, O. Effect of Increased Brain GABA Concentrations on Breathing in. v. 6, p. 168–180, 1999.

PEÑA, F.; RAMIREZ, J. M. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. **Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 3, p. 251–283, 2005.

PÉREZ-PINZÓN, M. A. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning in brain mitochondria following cerebral ischemia. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 36, n. 4 SPEC.ISS., p. 323–327, 2004.

PERROT-SINAL, T. S. et al. Sex differences in the chloride cotransporters, NKCC1 and KCC2, in the developing hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 302–308, 2007.

PLENZ, D.; AERTSEN, A. Neural dynamics in cortex-striatum co-cultures. II. **Neuroscience**, v. 70, n. 4, p. 893–924, 1996.

PLOTKIN, M. D. et al. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: A possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. **Journal of Neurobiology**, v. 33, n. 6, p. 781–795, 1997.

PÖLTL, A. et al. Subunit composition and quantitative importance of GABA(A) receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. **Journal of neurochemistry**, v. 87, n. 6, p. 1444– 55, 2003.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A.; MOONEY, R. D.; PLATT, M. L.; WHITE, L. E. **Neuroscience**. 6th edition. New York: Sinauer Associates, 2018.

RAIMONDO, J. V.; RICHARDS, B. A.; WOODIN, M. A. Neuronal chloride and excitability — the big impact of small changes. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 43, p. 35–42, 2017.

RAMAMOORTHY, K.; LIN, Y. The contribution of GABAergic dysfunction to neurodevelopmental disorders. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 8, p. 452–462, 2011.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 2, p. 131–141, 1981.

ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Antimicrobial peptides and complement in neonatal hypoxia-ischemia induced brain damage. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. FEB, p. 1–14, 2015.

ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

RUFFIN, V. A. et al. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. **Frontiers in Physiology**, v. 5 FEB, n. February, p. 1–11, 2014.

RUMAJOGEE, P. et al. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. APR, 2016.

SADIKOT, A. F.; SASSEVILLE, R. Neurogenesis in the mammalian neostriatum

and nucleus accumbens: Parvalbumin-immunoreactive GABAergic interneurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 389, n. 2, p. 193–211, 1997.

SAITSU, H. et al. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–5, 2016.

SANCHES, E. F. et al. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. **Brain Research**, v. 1438, p. 85–92, 2012.

SARDINI, A. et al. Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1618, n. 2, p. 153–162, 2003.

SCHLÖSSER, B. et al. Postnatal development of calretinin- and parvalbumin-positive interneurons in the rat neostriatum: An immunohistochemical study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 405, n. 2, p. 185–198, 1999.

SERAFINI, R. et al. Depolarizing GABA-activated Cl-channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. **The Journal of Physiology**, v. 488, n. 2, p. 371–386, 1995.

SILVA, F.B.; SOUSA, S.M.G. Aplicações da biologia molecular na odontologia: conceitos e técnicas. FOL • Faculdade de Odontologia de Lins / UNIMEP. Lins. v.14, n.2, p.7-14, 2002.

SMITH, A. D.; BOLAM, J. P. Trends Neurosci 1990 Smith.pdf. p. 259–265, 1990.

SOMOGYI, P. et al. Subcellular localization of benzodiazepine/GABAA receptors in the cerebellum of rat, cat, and monkey using monoclonal antibodies. **The Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 2197–2209, 1989.

STEIN, V. et al. Expression of the KCl Cotransporter KCC2 Parallels Neuronal Maturation and the Emergence of Low Intracellular Chloride. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 1, p. 57–64, 2004.

STÖDBERG, T. et al. Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

SUCCOL, F. et al. Intracellular chloride concentration influences the GABA A receptor subunit composition. **Nature Communications**, v. 3, 2012.

SUNG, K. W. et al. Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. **The Journal**

of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, v. 20, n. 20, p. 7531–8, 2000.

SZELE, F. G. et al. Pattern of expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing and adult rat striatum. **Neuroscience**, v. 60, n. 1, p. 133–144, 1994.

TAKAYAMA, C. GABAergic Signaling In The Developing Cerebellum. **International Review of Neurobiology**, v. 71, p. 63–94, 2005.

TAKAYAMA, C. Formation of GABAergic synapses in the cerebellum. **Cerebellum**, v. 4, n. 3, p. 171–177, 2005.

TAKAYAMA, C.; INOUE, Y. Morphological development and maturation of the GABAergic synapses in the mouse cerebellar granular layer. **Developmental Brain Research**, v. 150, n. 2, p. 177–190, 2004.

TEPPER, J. M.; KOÓS, T. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 467–472, 1999.

TSUKAHARA, T. et al. Repeated stress-induced expression pattern alterations of the hippocampal chloride transporters KCC2 and NKCC1 associated with behavioral abnormalities in female mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 465, n. 1, p. 145–151, 2015.

TUNSTALL, M. J. et al. Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. **Journal of neurophysiology**, v. 88, n. 3, p. 1263–9, 2002.

TZANOULINO, S. et al. Long-term behavioral programming induced by peripuberty stress in rats is accompanied by gabaergic- related alterations in the amygdala. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

VALDIVIESO, Á. G. et al. The Chloride Anion Acts as a Second Messenger in Mammalian Cells - Modifying the Expression of Specific Genes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 49–64, 2016.

VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 18, p. 3149–54, 2004.

VEERAWATANANAN, B.; SURAKUL, P.; CHUTABHAKDIKUL, N. Maternal restraint stress delays maturation of cation-chloride cotransporters and GABAA receptor subunits in the hippocampus of rat pups at puberty. **Neurobiology of Stress**, v. 3, p. 1–7, 2016.

VESTERBERG, O. History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography*. Amsterdam. v.20, n.480, p.3-19, 1989.

VOLPE, J. J. Perinatal brain injury: From pathogenesis to neuroprotection. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 7, n. 1, p. 56–64, 2001.

WANG, C. et al. KCC REPRINT.pdf. v. 139, p. 59–66, 2002.

WANG, D. D.; KRIEGSTEIN, A. R. Defining the role of GABA in cortical development. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 9, p. 1873–1879, 2009.

WANG, Y. et al. Downregulation of hippocampal GABA after hypoxia-induced seizures in neonatal rats. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 12, p. 2409–2416, 2011.

WANG, F. et al. NKCC1 up-regulation contributes to early post-traumatic seizures and increased post-traumatic seizure susceptibility. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 3, p. 1543–1556, 2017.

WANG, G. et al. Bumetanide protects focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rat. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 4, p. 1487–94, 2014.

WATANABE, M. et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs . PubMed Commons. v. 213, p. 11837891, 2002.

WILSON, C. J.; CHANG, H. T.; KITAI, S. T. Disfacilitation and long-lasting inhibition of neostriatal neurons in the rat. **Experimental Brain Research**, v. 51, n. 2, p. 227–235, 1983.

WILSON, C. et al. Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. **The Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 383–388, 2018.

WOO, N. S. et al. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. **Hippocampus**, v. 12, n. 2, p. 258–268, 2002.

WU, H. et al. Melatonin attenuates neuronal apoptosis through up-regulation of K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 expression following traumatic brain injury in rats. **Journal of Pineal Research**, n. May, p. 241–250, 2016.

YAMADA, H.; FUJIMOTO, K. ICHI; YOSHIDA, M. Neuronal mechanism underlying dystonia induced by bicuculline injection into the putamen of the cat.

Brain Research, v. 677, n. 2, p. 333–336, 1995.

YAN, Y.; DEMPSEY, R. J.; SUN, D. Expression of Na⁺ -K⁺ -Cl⁻ cotransporter in rat brain during development and its localization in mature astrocytes. **Brain Research**, v. 911, n. 1, p. 43–55, 2001.

YOSHIDA, M. et al. Differential roles of the caudate nucleus and putamen in cat motor behavior investigated with local GABA antagonist injection. **Neuroscience Research Supplements**, v. 9, p. 103, 2003.

YUSTE, R.; KATZ, L. C. Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. **Neuron**, v. 6, n. 3, p. 333–344, 1991.