

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

***PERFIL ONTOGENÉTICO DA CAPTAÇÃO BASAL DE
GLUTAMATO EM FATIAS DE ESTRUTURAS CEREBRAIS DE
RATOS E AVALIAÇÃO DE SUA SENSIBILIDADE À GUANOSINA***

Ana Paula Thomazi

Orientadora: Profa. Dra. Susana Tchernin Wofchuk

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2004

“O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar, o ressentimento, o desânimo e a lamentação. E por isto, de uma maneira especial, adquirimos sabedoria e conhecimento, e enxergamos e ouvimos e sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é amargo... E pelo mesmo órgão tornamo-nos loucos e delirantes, e medos e terrores nos assombram... Todas estas coisas suportamos do encéfalo quando não está sadio... Neste sentido sou da opinião de que o encéfalo exerce o maior poder sobre o homem.”

Hipócrates, Acerca das doenças sagradas (séc. IX a.C.)

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos, pessoas incríveis que sempre me apoiaram e respeitaram minhas decisões.

Ao meu irmão caçula, Daniel, que me acompanhou durante todo este período de muito estudo.

À Susana, minha orientadora e mentora, por ter me acolhido de braços abertos. Agradeço por todo o ensinamento, pela presença, por confiar em mim mais do que eu mesma e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

Ao Diogo Souza, pelos ensinamentos e entusiasmo contagiante.

Aos colegas do laboratório 35, Cíntia, Dioguinho, Beatriz, Verlaine e também a Trícia, pela amizade e pelo coleguismo.

Aos bolsistas, Joel, Aline e Thisa, e especialmente a minha bolsista e braço direito, Gracinha.

Ao pessoal dos laboratórios 31, 33 e 37.

Aos colegas do ratário.

Ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pela grande oportunidade.

À CAPES, pela bolsa cedida.

E, especialmente, ao amor da minha vida, Rogério, agradeço por seu amor, pelas palavras de incentivo, pela compreensão e por estar sempre ao meu lado durante toda esta trajetória.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
APRESENTAÇÃO	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	01
1.1.1. Receptores Glutamatérgicos	04
1.1.2. Transportadores de Glutamato	05
1.2. DESENVOLVIMENTO E ENVELHECIMENTO	10
1.3. GUANOSINA	11
1.4. OBJETIVOS	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. CURVAS DE PRÉ-INCUBAÇÃO	15
2.1.1. Animais e estruturas utilizadas	15
2.1.2. Tempos analisados	15
2.1.3. Resumo da técnica	16
2.1.4. Curvas de tempo de pré-incubação – resultados	16
3. ARTIGO CIENTÍFICO	18
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÕES	58
6. PERSPECTIVAS	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

O glutamato, quando em altas concentrações na fenda sináptica, é excitotóxico, podendo levar à morte celular devido à hiper-estimulação de seus receptores. Seu efeito neurotóxico tem sido relacionado a várias doenças agudas e crônicas do SNC, tais como isquemia, epilepsia, Alzheimer e Parkinson. A manutenção dos níveis de glutamato abaixo de seus níveis excitotóxicos é realizada através de um mecanismo de transporte de alta afinidade dependente de sódio. Os principais transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1, estão presentes nos astrócitos. Alguns estudos demonstram que a captação de glutamato parece variar de acordo com o período de desenvolvimento e envelhecimento; entretanto, poucos estudos avaliam este parâmetro em animais imaturos, maduros e velhos utilizando uma única metodologia.

Neste trabalho, nós traçamos um perfil ontogenético da captação de glutamato *in vitro*, durante o desenvolvimento e envelhecimento, usando fatias de estriado, hipocampo e córtex de ratos com 10, 21 e 60 dias, 15 e 26 meses. Também analisamos se a captação de glutamato era sensível à presença de guanosina. Em todas as estruturas a captação de glutamato foi maior em animais jovens decaindo então, até ratos velhos (15 meses) em estriado e hipocampo ou ratos adultos jovens (60 dias) em córtex. Em estriado e hipocampo observamos um aumento parcial e total, respectivamente, na captação em ratos muito velhos (26 meses). O efeito da guanosina parece ser idade e estrutura dependentes, visto que a mesma aumentou a captação basal de glutamato somente em fatias de córtex de ratos de 10 dias.

A diminuição da captação de glutamato observada em animais com 15 meses em estriado e hipocampo pode estar relacionada às diversas desordens neurodegenerativas que ocorrem em idosos, e a recuperação deste parâmetro em ratos muito velhos (26

meses), tanto parcial como total, parece ser um mecanismo de adaptação compensatório que pode estar ocorrendo durante o processo de envelhecimento.

ABSTRACT

When in high concentrations in the synaptic cleft, glutamate might act as an excitotoxin probably due to the hiperstimulation of its receptors. The neurotoxic effect of glutamate has been related with many acute and chronic diseases of the CNS as ischemia, epilepsy, Alzheimer and Parkinson. The maintenance of glutamate at low levels is made through high affinity sodium-dependent glutamate transporters localized mainly in astrocytes, having GLAST and GLT-1 as principal transporters. Some works have shown that glutamate uptake changes throughout development and ageing; however, only few studies analyze immature, young adults and old animals using the same methodology.

In this work, we drawn an ontogenetic profile of glutamate uptake *in vitro*, using slices of striatum, hippocampus and cortex of Wistar rats aged 10, 21 and 60 days, 15 and 26 months. We also analyzed its sensibility to guanosine. In all structures, glutamate uptake was higher in immature animals changing throughout development and ageing, more noteworthy in striatum and hippocampus. In 15 months-old rats, glutamate uptake was the lowest in striatum and hippocampus increasing afterwards. In cortex, the lowest value observed was in rats with 60 days. There was a total and a partial increase in glutamate uptake in hippocampus and striatum, respectively, in animals with 26 months. Guanosine effect seems to be age and structure dependent since the increase in glutamate uptake was just seen in slices of cortex from 10 days animals. The decrease in glutamate uptake in rats with 15 months in striatum and hippocampus could be related with chronic neurodegenerative processes and its partial or total recovery in very old rats could be a compensatory adaptative mechanism during the process of ageing.

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação é constituída por Introdução, Material e Métodos, Artigo Científico, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

O item **2. Material e Métodos** contém resultados de experimentos realizados para a padronização da técnica de captação de glutamato em fatias. São controles de curvas de pré-incubação, os quais não estão descritos no artigo submetido.

Os resultados que fazem parte desta Dissertação estão apresentados na forma de artigo submetido, o qual encontra-se no item **3. Artigo Científico**. Material e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se inseridos no próprio artigo submetido.

O item **4. Discussão** contém interpretações e comentários gerais, assim como as considerações finais que englobam o artigo científico e os resultados descritos em Material e Métodos.

O item **7. Referências Bibliográficas** refere-se somente às citações que aparecem na Introdução e na Discussão desta Dissertação.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Sinapse glutamatérgica	03
--	----

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 2A, B, C: Curvas de pré-incubação	17
--	----

ARTIGO

Figura 1A, B, C: Curvas de tempo	45, 46, 47
--	------------

Figura 2: Captação de glutamato em fatias estriado	48
--	----

Figura 3: Captação de glutamato em fatias de hipocampo	49
--	----

Figura 4: Captação de glutamato em fatias de córtex	50
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propiónico
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
Ca ²⁺	íon cálcio
EAAC	carreador de aminoácidos excitatórios
EAAT	transportador de aminoácidos excitatórios
GABA _A	ácido γ -aminobutírico subtipo A
GDP	guanosina difosfato
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLAST	transportador de glutamato e aspartato
GLT-1	transportador de glutamato 1
GMP	guanosina monofosfato
GTP	guanosina trifosfato
H ⁺	íon hidrogênio
K ⁺	íon potássio
<i>K_m</i>	coeficiente de afinidade
Na ⁺	íon sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
SNC	sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

Há aproximadamente 50 anos atrás, no final da década de 1950, Curtis e colaboradores demonstraram pela primeira vez que o ácido glutâmico tinha um efeito excitatório sobre o cérebro de mamíferos (Bennett e Balcar, 1999). Desde então, sabe-se que o L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, estando presente na maioria das sinapses (Ozawa et al., 1998).

O glutamato está envolvido em várias funções fisiológicas do cérebro como aprendizado e memória (Izquierdo e Medina, 1997), desenvolvimento e envelhecimento (Segovia et al., 2001) e no desenvolvimento de células nervosas, como proliferação, migração e plasticidade sináptica (McDonald e Johnston, 1990).

Este aminoácido é sintetizado nos terminais pré-sinápticos, principalmente a partir da glutamina pela ação da glutaminase (Schousboe et al., 1997) e estocado em vesículas onde sua concentração pode chegar a 100mM (Meldrum, 2000). O processo de captação vesicular é Na^+ -independente e sua incorporação vesicular é possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma H^+ -ATPase vacuolar, a qual media o transporte de H^+ para dentro da vesícula (Naito e Ueda, 1985; Tabb et al., 1992). Em situações fisiológicas, a liberação de glutamato das vesículas ocorre por exocitose e é Ca^{2+} -dependente. Sendo assim, quando ocorre despolarização dos terminais pré-sinápticos, há abertura de canais de cálcio e a entrada deste íon estimula a liberação de glutamato na fenda sináptica (Nicholls e Attwell, 1990). Uma vez liberado, o glutamato vai agir em receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos presentes nas membranas dos terminais pré e pós-sinápticos e também na membrana das

células gliais (Gallo e Russell, 1995; Bennett e Balcar, 1999; Gallo e Ghiani, 2000; Ozawa et al., 1998; Nedergaard et al., 2002). Após exercer sua ação nos receptores, o glutamato deve ser removido da fenda sináptica. Como não existe um mecanismo enzimático que degrade o glutamato na fenda sináptica, este é removido da mesma principalmente por um sistema de alta afinidade Na^+ -dependente (Anderson e Swanson, 2000; Attwell, 2000; Danbolt, 2001, Chen e Swanson, 2003).

O glutamato encontra-se em baixas concentrações na fenda sináptica (na ordem de μM) e em altas concentrações no terminal pré-sináptico (na ordem de mM) (Danbolt, 2001; Nedergaard, et al., 2002). Desta forma, sendo a concentração extracelular de glutamato menor que sua concentração intracelular e sendo o potencial de membrana interno negativo, assim como a carga do glutamato, o processo de captação ocorre contra gradiente de concentração, requerendo, por isso, gasto energético. Entretanto, este gasto não provém diretamente do ATP, mas sim de um sistema de co-transporte de íons a favor de seu gradiente de concentração, que levam consigo uma molécula de glutamato. Desta forma, 3 íons Na^+ e 1 íon H^+ são co-transportados para dentro da célula, juntamente com uma molécula de glutamato, contra a saída de um íon K^+ (Figura 1) (Brew e Attwell, 1987; Levy et al, 1998; Anderson e Swanson, 2000; Attwell, 2000). O gradiente transmembrana de Na^+/K^+ é mantido pela bomba Na^+/K^+ -ATPase e quando este gradiente encontra-se comprometido, o transporte de glutamato ocorre no sentido inverso (Nicholls e Attwell, 1990). É o que ocorre na isquemia, devido ao bloqueio do suprimento energético (Benveniste et al., 1984; Levy et al, 1998).

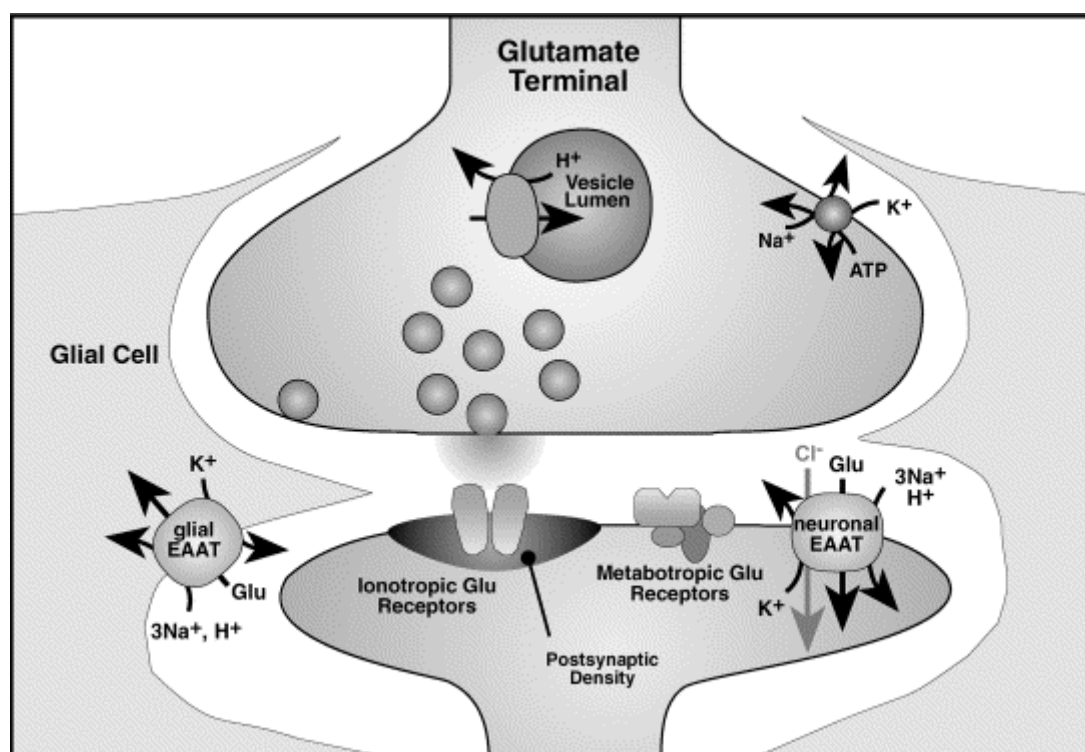


FIGURA 1 – Sinapse glutamatérgica. Mecanismo de transporte de glutamato e localização de seus transportadores nos astrócitos e neurônios. O transporte de glutamato é dependente de um gradiente de sódio gerado pela bomba Na^+/K^+ -ATPase. Os astrócitos são responsáveis pela maior parte da captação de glutamato no SNC. Os transportadores neuronais estão localizados, na sua maioria, fora da região do neuropil (Fonte: Amara e Fontana, 2002).

Quando em altas concentrações na fenda sináptica, o glutamato pode agir como uma excitotoxina devido à hiper-estimulação dos seus receptores (Anderson e Swanson, 2000; Meldrum, 2000; Danbolt, 2001; Maragakis e Rothstein, 2001). Sua excitotoxicidade tem sido relacionada a diversas doenças agudas e crônicas do SNC, tais como isquemia, hipoglicemia, hipóxia e trauma (Choi, 1988; Ikonomidou et al., 1989), e Huntington, Alzheimer e *status epilepticus*, respectivamente (Brewer, 2000; Danbolt, 2001; Ingram et al., 2001; Maragakis e Rothstein, 2001; Segovia et al., 2001).

1.1.1. Receptores Glutamatérgicos

Os receptores glutamatérgicos são classificados em dois grandes grupos, ionotrópicos e metabotrópicos, de acordo com suas características farmacológicas e moleculares, os quais geralmente coexistem em uma única sinapse (Ozawa et al., 1998; Pin e Duvoisin, 1995).

Os receptores ionotrópicos (iGluRs) são canais iônicos que quando ativos se tornam permeáveis a cátions como sódio, cálcio e potássio (Schoepp et al., 1995) e são classificados em NMDA, AMPA e cainato, sendo os dois últimos freqüentemente chamados de receptores não-NMDA (Ozawa et al., 1998). Os receptores NMDA medeiam a transmissão sináptica lenta, são altamente permeáveis a Ca^{2+} (Lipton e Rosemberg, 1994; Ozawa et al, 1998), são voltagem dependentes e possuem glicina como co-agonista (Johnson e Ascher, 1992). Em potenciais de repouso estão normalmente bloqueados por magnésio e a liberação do canal NMDA depende da despolarização da membrana (Edmonds et al., 1995). Os receptores AMPA, assim como os cainato, medeiam a transmissão sináptica excitatória rápida e estão associados primariamente a canais independentes de voltagem, sendo canais permeáveis principalmente ao sódio e potássio, com baixa permeabilidade ao Ca^{2+} (Cotman et al., 1995). A ativação destes receptores não-NMDA produz despolarização, a qual promove a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Este é o caso da despolarização mediada por AMPA estimulando receptores NMDA pelo deslocamento do Mg^{2+} (Cotman et al., 1981; Ozawa et al, 1998).

Os receptores metabotrópicos (mGluRs) são moléculas ligadas a sistemas de segundos mensageiros através de proteína G, modulando a atividade de diversas enzimas como adenilato ciclase, guanilato ciclase e fosfolipase C (Pin e Duvoisin, 1995;

Ozawa et al., 1998). Até o momento, oito subtipos de mGluRs foram clonados e caracterizados, os quais podem ser classificados da seguinte maneira: grupo I (mGluR1 e 5), grupo II (mGluR2 e 3) e grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8) (Ozawa et al., 1998). Os mGluRs do grupo I estão acoplados à hidrólise de fosfoinositídeos de membrana e os do grupo II e III estão ligados à modulação da adenilato ciclase e síntese de AMPc. Estes receptores estão localizados nos terminais pré e pós-sinápticos e nas células gliais e estão relacionados tanto a efeitos excitotóxicos quanto inibitórios (Ozawa et al., 1998).

A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos leva a um aumento da entrada de Ca^{2+} para dentro da célula podendo causar morte celular (Rothman e Olney, 1987; Meldrum e Garthwaite, 1990; Meldrum, 2000); sendo assim, o glutamato pode ser neurotóxico através da ativação excessiva de receptores ionotrópicos ou mGluRs do grupo I (Nicoletti et al., 1999; Henrich-Noack e Reymann, 1999; Meldrum, 2000). Os mGluRs do grupo II e III têm sido relacionados a situações de neuroproteção (Battaglia et al., 1998; Bruno et al., 1997; Nicoletti et al., 1996; Ghauri et al., 1996). Desordens neurológicas nas quais este mecanismo de excitotoxicidade pode estar envolvido incluem isquemia, hipoglicemia, trauma, epilepsia, Parkinson, Alzheimer e Huntington, entre outras (Choi, 1988; Ikonomidou et al., 1989; Lipton, 1999; Brewer, 2000; Danbolt, 2001; Ingram et al., 2001; Maragakis e Rothstein, 2001; Segovia et al., 2001).

1.1.2. Transportadores de Glutamato

Na década de 1970, diversos laboratórios demonstraram a presença de um sistema de captação de alta afinidade Na^{+} -dependente presente nas células gliais (Schousboe, 1981). Sabe-se hoje que os principais transportadores de glutamato estão

presentes nos astrócitos (Anderson e Swanson, 2000; Attwell, 2000; Danbolt, 2001, Chen e Swanson, 2003).

Até a presente data, já foram descritos cinco tipos de transportadores de glutamato, alguns neuronais e outros gliais, sendo sua distribuição região e idade dependentes. São eles: GLAST/EAAT1 (Storck et al., 1992), GLT-1/EAAT2 (Pines et al., 1992), EAAC1/EAAT3 (Kanai e Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) e EAAT5 (Arriza et al., 1997). Estes cinco transportadores de glutamato apresentam entre 50 e 60% de homologia na seqüência de aminoácidos entre si (Arriza et al., 1993; Hofmann et al, 1994).

GLAST e GLT-1 foram somente detectados em astrócitos (Rothstein et al., 1994; Lehre et al., 1995; Lehre e Danbolt, 1998), tanto no corpo celular (soma) quanto nos processos das células astrocíticas (Danbolt, 2001). Uma exceção é a expressão de GLT-1 em retina, onde é encontrado em diferentes tipos de células bipolares e em algumas células amácrinas, mas não em glia de Müller ou outras células gliais (Rauen e Kanner, 1994, Rauen et al., 1996). Estes dois transportadores são quantitativamente os principais transportadores de glutamato, sendo responsáveis pela maior parte da captação deste aminoácido no SNC (Anderson e Swanson, 2000; Danbolt, 2001). Estudos baseados em imunoprecipitação de transportadores solubilizados levaram os autores à conclusão de que o GLT-1 e o GLAST são responsáveis por 93% e 7%, respectivamente, do transporte total de glutamato no "forebrain" de ratos Wistar adultos (Haugeto et al., 1996). A distribuição e concentração do GLAST e GLT-1 no SNC variam de acordo com a região (Gegelashvili e Schousboe, 1998; Danbolt, 2001) e com o estágio de desenvolvimento cerebral (Furuta et al., 1997a; Ullensvang et al., 1997; Maragakis e Rothstein, 2001). GLAST e GLT-1 encontram-se em maiores concentrações nas membranas astrocíticas que circundam o neuropil (terminal nervoso,

axônios e espinhas dendríticas) do que nas demais partes da membrana plasmática que circunda a pia mater, o endotélio capilar, outros astrócitos e corpos celulares (Chaudhry et al., 1995; Danbolt et al., 1998) e ambos transportadores são expressos numa mesma célula, mas em proporções diferentes dependendo da região (Lehre et al., 1995).

O GLAST é encontrado em altas concentrações na glia de Bergmann do cerebelo e em níveis mais baixos no restante do SNC (Rothstein et al., 1994; Lehre e Danbolt, 1998). Seus níveis são maiores que os de GLT-1 no bulbo olfatório e está presente, ao contrário do GLT-1, nas células de Müller da retina (Lehre et al., 1997; Danbolt et al., 1998).

O GLT-1 é o maior transportador de glutamato em todas as regiões cerebrais, estando em maiores concentrações no hipocampo, septo lateral, estriado e córtex cerebral (Rothstein et al., 1994; Danbolt et al., 1998). Os níveis cerebrais de GLT-1 são aproximadamente quatro vezes maiores que os de GLAST em hipocampo e seis vezes menores no cerebelo (Lehre e Danbolt, 1998). Estudos demonstram a expressão de mRNA para GLT-1 em várias populações de neurônios, mas não a presença da proteína (Schmitt et al., 1996).

Os demais transportadores de glutamato, EAAC1, EAAT4 e EAAT5, são encontrados predominantemente em neurônios (Gegelashvili e Schousboe, 1998); entretanto, a expressão do EAAT4 foi recentemente descrita em astrócitos (Hu et al., 2003). O EAAC1 é encontrado na maioria dos neurônios do sistema glutamatérgico, assim como nos neurônios do sistema gabaérgico (células de Purkinje no cerebelo) (Danbolt et al., 1998; Nedergaard et al., 2002), mas quando comparado com GLAST e GLT-1 em astrócitos, sua expressão é insignificante (Haugeto et al., 1996). A proteína encontra-se no corpo celular dos neurônios e dendritos, evitando os terminais nervosos, e também está presente nos astrócitos corticais e matéria branca (Conti et al., 1998).

O EAAT4 está localizado nas células de Purkinje do cerebelo (camada molecular) de ratos e humanos (Tanaka et al, 1997; Furuta et al., 1997b), mas pode também ser encontrado em concentrações muito baixas no "forebrain" (Danbolt, 2001). Encontra-se em maiores concentrações na parte da membrana espinhal que defronta-se com a astróglia, desaparecendo gradualmente através do corpo celular (Tanaka et al., 1997; Dehnes et al, 1998). Além disso, é transitoriamente expresso durante o desenvolvimento, com pico em 10 dias pós-natal (Furuta et al., 1997a).

Poucos estudos sobre a localização do transportador de glutamato EAAT5 em mamíferos foram realizados até o presente momento; entretanto, alguns relatos têm demonstrado sua presença em células da retina (Arriza et al., 1997).

A afinidade (K_m) dos transportadores de glutamato varia de acordo com as preparações utilizadas. Estudos usando GLAST, GLT-1 e EAAC1 de humanos, clonados e expressos em células COS-7 (Arriza et al., 1994) mostram um K_m para GLAST, GLT-1 e EAAC1 de 48, 97 e 92 μM , respectivamente, e quando expressos em oocytos de *Xenopus laevis* (Arriza et al., 1994; Kanai et al., 1994) os valores são de 20, 18 e 28-30, respectivamente. GLAST de ratos expresso em oocytos de *Xenopus laevis* (Klöckner et al., 1993), e GLT-1 de ratos em células CHO (Levy et al., 1998) apresentam K_m de 11 e 17 μM , respectivamente; EAAC1 de coelho expresso em oocytos de *Xenopus laevis* apresenta K_m de 12 μM (Kanai e Hediger, 1992).

Estudos mostram que GLAST e GLT-1 estão presentes no SNC, em baixas concentrações, desde estágios precoces de desenvolvimento e que estas aumentam até a idade adulta (Furuta et al., 1997a; Ullensvang, et al., 1997). No cérebro imaturo ou em desenvolvimento, os níveis de GLAST predominam sobre os de GLT-1, o qual não é detectado ao nascimento (Levy et al., 1995; Ullensvang et al., 1997). Em contrapartida, o GLAST encontra-se presente em concentrações significantes tanto no "forebrain"

quanto no cerebelo em ratos recém-nascidos (Ullensvang et al., 1997). Após a primeira semana pós-natal, o GLT-1 pode ser detectado no "forebrain" e, após a segunda semana, no cerebelo, e ambos transportadores atingem níveis adultos a partir da quinta semana (Ullensvang, et al., 1997). As concentrações de GLAST e GLT-1 aumentam drasticamente no período de maior atividade de sinaptogênese (do final da segunda ao final da quarta semana pós-natal), atingindo níveis adultos após trinta e cinco dias de vida (Furuta et al., 1997a; Ullensvang, et al., 1997). EAAC1 está presente desde estágios iniciais de desenvolvimento e atinge seu pico de concentração no quinto dia pós-natal, enquanto o EAAT4 está presente desde o primeiro dia pós-natal atingindo níveis adultos na segunda semana de vida (Furuta et al., 1997a).

É indiscutível a importância dos transportadores de glutamato na manutenção dos níveis extracelulares deste aminoácido abaixo daqueles neurotóxicos, a fim de evitar excessiva ativação dos receptores glutamatérgicos e conseqüente dano ou morte neuronal. Tanaka e colaboradores (1997) demonstraram um aumento da suscetibilidade para injúria aguda cortical e convulsões letais espontâneas em camundongos knock-out para o GLT-1 devido, provavelmente, ao aumento extracelular de glutamato causado pela falta deste transportador. Paralelamente, animais com deficiência de GLAST demonstraram uma suscetibilidade aumentada à injúria cerebelar, assim como uma redução da coordenação motora (Watase et al., 1998). A ausência do transportador neuronal EAAC1 produziu neurotoxicidade moderada, resultando em epilepsia (Rothstein et al., 1996) e anormalidades de comportamento (Danbolt, 2001).

1.2. DESENVOLVIMENTO E ENVELHECIMENTO

O glutamato apresenta um importante papel durante o desenvolvimento do SNC (McDonald e Johnston, 1990), incluindo eliminação de sinapses, migração celular, diferenciação e morte celular (Pearce et al., 1987; Rabacchi et al., 1992; Komuro e Rakic, 1993; Oka et al., 1993). Durante o desenvolvimento, a expressão dos receptores se altera significativamente (Rema et al., 1996; Romano et al., 1996), e a captação de glutamato parece participar na regulação da diferenciação celular dos grânulos, na migração e na sinaptogênese do córtex cerebelar (Rossi e Slater, 1993). Estudos prévios demonstraram que a captação de glutamato é baixa ao nascimento, aumentando até níveis adultos nas primeiras semanas de vida no cérebro de ratos (Schousboe et al., 1976; Schmidt e Wolf, 1988), e esse aumento correlaciona-se ao aumento de captação vesicular e ao período de sinaptogênese (Christensen e Fonnum, 1992).

Inúmeras alterações moleculares, celulares, estruturais e funcionais ocorrem no cérebro durante o envelhecimento. As células neurais se adaptam a essas mudanças ou elas padecem frente a um processo de neurodegeneração que pode levar à instalação de doenças neurodegenerativas (Mattson et al., 2002). O glutamato está envolvido em várias funções cerebrais que se alteram com o processo de envelhecimento, como aprendizado e memória, emoção e motivação e funções motoras. Também parece estar envolvido no processo de neurodegeneração de diversas desordens decorrentes do processo de envelhecimento, como Parkinson e Alzheimer (Maragakis e Rothstein, 2001; Segovia et al., 2001; Mattson et al., 2002). A hiper-estimulação dos receptores glutamatérgicos pode levar à morte neuronal, particularmente quando associada a altos níveis de estresse oxidativo e estresse metabólico, o que pode ocorrer durante o envelhecimento, e em desordens neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento

(Meldrum, 2000; Mattson et al., 2002). Um dos fatos mais consistentes relacionando sistema glutamatérgico e envelhecimento é a diminuição da densidade e afinidade dos receptores NMDA (Segovia et al., 2001). Alterações dos transportadores de glutamato também têm sido descritas em desordens que afetam tanto o SNC em desenvolvimento quanto o adulto (Furuta et al., 1997a; Maragakis e Rothstein, 2001). Redução na expressão de vários subtipos de transportadores de glutamato levam a modelos de esclerose amiotrófica lateral e epilepsia (Maragakis e Rothstein, 2001).

1.3. GUANOSINA

Os derivados da guanina estão intimamente relacionados ao sistema de transdução de sinal via proteína G, através da modulação da atividade de efetores intracelulares (Gudermann et al., 1997). Recentemente, as bases púricas derivadas da guanina (GTP, GDP, GMP) e o nucleosídeo guanosina, têm sido relacionados a efeitos de sinalização extracelulares (Neary et al., 1996), e exercem efeitos tróficos tanto nos neurônios quanto nas células gliais, sendo importantes durante o desenvolvimento, na manutenção do sistema nervoso e em resposta a doenças ou injúria (Neary et al., 1996; Rathbone et al., 1999). Os efeitos tróficos incluem estimulação da proliferação astrocitária (Cicarelli et al., 2000), síntese e liberação de fatores tróficos a partir de culturas de astrócitos (Caciagli et al., 2000) e aumento da diferenciação de neurônios hipocámpais *in vitro* (Rathbone e Juurlink, 1993).

As concentrações extracelulares das purinas são dependentes de um balanço entre sua liberação celular, sua captação e seu metabolismo extracelular, sendo as ectonucleotidases responsáveis por sua metabolização extracelular (Rathbone et al.,

1999). Estudos recentes mostram que tanto os neurônios quanto as células gliais liberam guanosina e que bases púricas são liberadas a partir de astrócitos tanto em situações fisiológicas quanto patológicas (Ballerini et al., 1995). Astrócitos liberam nucleotídeos derivados da guanina e guanosina em situações de repouso e sua liberação é aumentada em situações de hipóxia/hipoglicemia (Ciccarelli et al. 1999), um processo que envolve excitotoxicidade glutamatérgica. Altas concentrações extracelulares de guanosina são encontradas após isquemia e seus níveis permanecem elevados por vários dias após o insulto (Uemura et al., 1991). A inibição da atividade da ecto-5'-nucleotidase em cultura de astrócitos mostrou uma redução significativa no acúmulo extracelular de guanosina, indicando que esta é derivada amplamente do metabolismo extracelular dos nucleotídeos da guanina (Caciagli et al., 2000). Sítios de ligação específicos para guanosina foram recentemente descritos (Traversa et al., 2002).

Trabalhos realizados neste departamento têm demonstrado um efeito neuroprotetor da guanosina em situações de injúria (Schmidt et al., 2000; Lara et al., 2001; Vinadé et al., 2003). Guanosina e GMP protegeram camundongos adultos de convulsões induzidas por ácido quinolínico (agonista glutamatérgico), mas não por picrotoxina (antagonista GABA_A) quando injetados intraperitonealmente (Schmidt et al., 2000), indicando, assim, uma certa especificidade destes derivados púricos pelo sistema glutamatérgico. Quando administrada oralmente, a guanosina protegeu de convulsões induzidas por ácido quinolínico, atenuou convulsões e morte induzidas por alfa-dendrotoxina, mas não protegeu de convulsões quando ácido cáinico foi utilizado (Lara et al., 2001). Este trabalho demonstrou que o efeito da guanosina na prevenção de convulsões induzidas por ácido quinolínico não é dependente da ação da adenosina na modulação do sistema glutamatérgico, visto que a cafeína (um antagonista de

receptores de adenosina) não alterou as convulsões induzidas pelo ácido quinolínico e nem o efeito neuroprotetor da guanosina.

Estudos *in vitro* mostram um aumento da captação de glutamato em situações fisiológicas. Usando cultura primária de astrócitos, Frizzo e colaboradores (2001) mostraram um aumento dose-dependente (63%) na captação basal de glutamato na presença de guanosina. Neste mesmo estudo, o uso de adenosina não teve efeitos similares ao causado pela guanosina e o uso de teofilina (antagonista de receptores A1/A2A de adenosina) e dipiridamole (inibidor de transporte de nucleosídeos) não inibiu o aumento da captação de glutamato causado pela presença de guanosina, levando à conclusão de que a guanosina tem efeitos extracelulares que não são mediados pelos receptores de adenosina (Frizzo et al., 2001). Em fatias de córtex parietal de ratos de 10 dias, submetidas ou não à isquemia, a guanosina aumentou a captação de glutamato em ambas situações (Frizzo et al., 2002). Além disto, o efeito da guanosina em relação à captação de glutamato parece variar de acordo com o período de cultivo celular, visto que Gottfried e colaboradores (2002) mostraram um aumento na captação de glutamato em cultura cortical de astrócitos com 10 dias de cultivo *in vitro*, mas não naquelas com 40 dias.

1.4. OBJETIVOS

- Padronizar a técnica de captação de glutamato *in vitro* para fatias de estriado e hipocampo de ratos verificando os seguintes parâmetros: (a) diferentes tempos de incubação; (b) diferentes tempos de pré-incubação, sendo este parâmetro também analisado em fatias de córtex;

- Traçar o perfil ontogenético da captação basal de glutamato usando fatias de estriado, hipocampo e córtex de ratos de diferentes idades, especificamente 10, 21 e 60 dias, 15 e 26 meses;
- Analisar o efeito da guanosina sobre a captação basal de glutamato nas diferentes idades e estruturas citadas acima.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material e a metodologia utilizados nesta Dissertação estão descritos no item 3 (artigo científico), assim como a análise estatística utilizada.

Estão descritos abaixo os controles feitos em diferentes tempos de pré-incubação, aspecto importante na padronização da metodologia em fatias pelo nosso laboratório.

2.1. CURVAS DE PRÉ-INCUBAÇÃO

Foram realizadas curvas de tempo de pré-incubação para analisar se a captação de glutamato sofria influência da variação de tempo de pré-incubação.

Os reagentes utilizados, a preparação das fatias, a metodologia de captação total e inespecífica de glutamato, a quantificação radioativa, o método de dosagem de proteínas e a análise estatística, estão descritos no item 3 (artigo científico).

2.1.1. Animais e estruturas utilizadas

Animais: foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias.

Estruturas: estriado, hipocampo e córtex.

2.1.2. Tempos analisados

Os tempos utilizados foram: zero (fatias não sofreram pré-incubação), 30 e 60 minutos de pré-incubação.

2.1.3. Resumo da técnica (ver item 3 para maiores detalhes)

Fatias de estriado, hipocampo e córtex de ratos machos de 60 dias foram lavadas e pré-incubadas em meio HBSS (Hank's balanced salt solution) por 30 ou 60 minutos a 35°C. Depois de decorrido este tempo, as mesmas eram incubadas com L-[³H]glutamato por 3, 5 ou 7 minutos, respectivamente para estriado, hipocampo ou córtex, para a realização da captação. As fatias denominadas “*tempo zero*” não sofreram pré-incubação, sendo o material radioativo adicionado imediatamente após a lavagem.

Os tempos de incubação de 3, 5 e 7 minutos para estriado, hipocampo e córtex, respectivamente, foram escolhidos com a finalidade de determinar um ponto de subida, ou seja, um tempo de incubação onde a captação não estivesse no platô e sim na linearidade, a fim de poder identificar possíveis alterações na captação. Para maiores detalhes, ver item 3, página 27 e figuras 1A, B e C, pág. 45, 46 e 47, respectivamente.

2.1.4. Curvas de pré-incubação - Resultados

A captação de glutamato em fatias de estriado, hipocampo e córtex de ratos de 60 dias submetidas a diferentes tempos de pré-incubação, não se altera estatisticamente segundo mostra a figura 2A, B e C. Entretanto, observamos um aumento tendencioso da captação em fatias de estriado e córtex quando pré-incubadas por 60 minutos, e em fatias de hipocampo quando pré-incubadas por 30 minutos.

Nos experimentos com guanosina (artigo científico), o tempo de pré-incubação utilizado foi 30 minutos, ou seja, as fatias eram pré-incubadas por 30 minutos com guanosina antes da incubação com L-[³H]glutamato, segundo Frizzo et al. (2002).

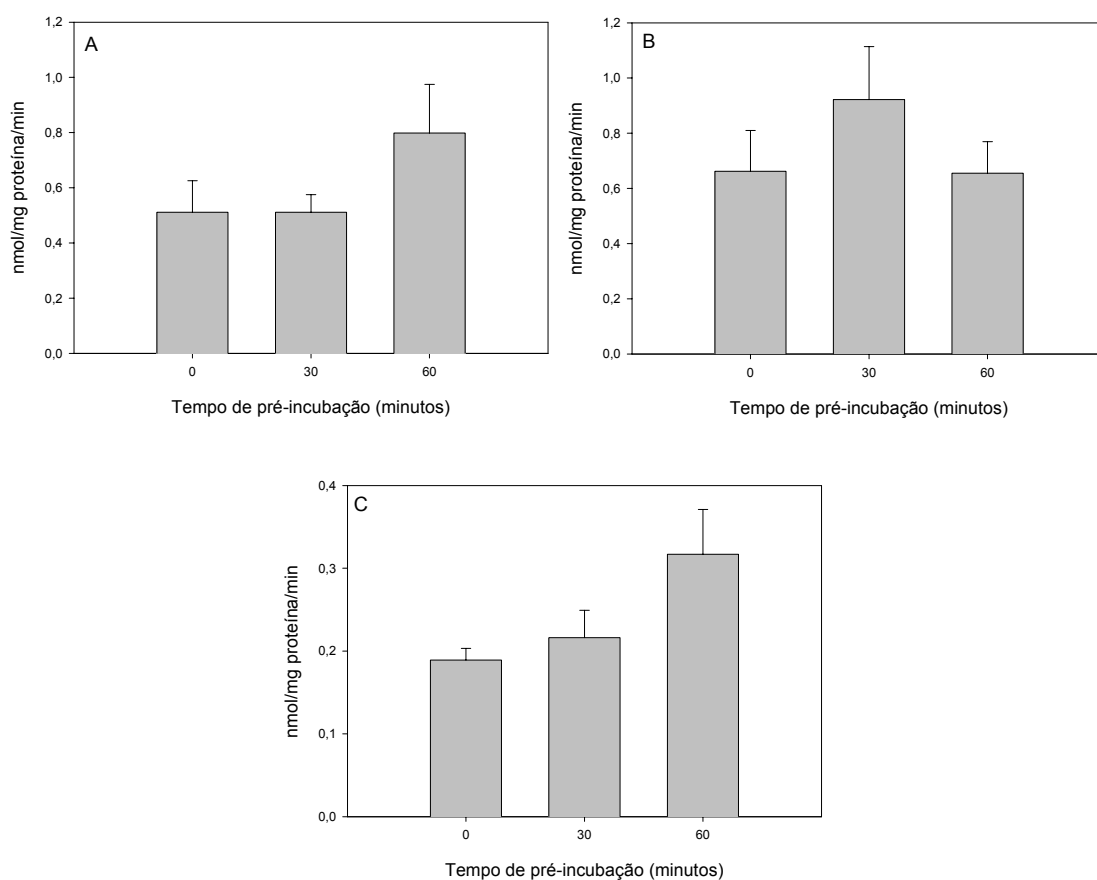


Figura 2. Curvas de pré-incubação: Fatias de estriado (A), hipocampo (B) e córtex (C) de ratos de 60 dias foram imediatamente incubadas ou submetidas a 30 e 60 minutos de pré-incubação seguidas de incubação com L- ^{3}H glutamato por 3, 5 e 7 minutos para estriado, hipocampo e córtex, respectivamente. Cada determinação é a média de 4 experimentos independentes ($n=4$), realizados em triplicata para cada tempo. As barras representam a média \pm S.E. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido ao periódico *Mechanisms of Ageing and Development*.

Número de submissão: MS#MAD/2003/K0290

Data da submissão: 11/11/2003.

Título: ***“Ontogenetic profile of glutamate uptake by slices from brain structures of rats: sensitivity to guanosine”***

Autores: Ana Paula Thomazi, Graça F. R. S. Godinho, Juliana M. Rodrigues, Fábio D. Schwalm, Marcos E. S. Frizzo, Emílio Moriguchi, Diogo O. Souza, Susana T. Wofchuk

**ONTOGENETIC PROFILE OF GLUTAMATE UPTAKE BY SLICES FROM
BRAIN STRUCTURES OF RATS: SENSITIVITY TO GUANOSINE**

Ana Paula Thomazi^a, Graça F. R. S. Godinho^a, Juliana M. Rodrigues^a, Fábio D. Schwalm^a, Marcos E. S. Frizzo^{a,b}, Emílio Moriguchi^c, Diogo O. Souza^a, Susana T. Wofchuk^{a,c,*}

^a *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Instituto de Geriatria e Gerontologia e Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Tel.: +55-51-3316-5567

Fax.: +55-51-3316-5540

E-mail address: swofchuk@ufrgs.br

Abstract

The excitotoxicity of the neurotransmitter glutamate has been related with many acute and chronic diseases of the CNS, and the maintenance of adequate extracellular glutamate levels is made through high affinity sodium-dependent glutamate transporters. To date, just few publications have related glutamate uptake and development and ageing. In the present study we described the profile *in vitro* of glutamate uptake during development and ageing and its sensitivity to guanosine using slices of striatum, hippocampus and cortex of rats with 10, 21 and 60 days-old, and 15 and 26 months-old. In all structures, glutamate uptake was higher in immature animals changing throughout development and ageing, more noteworthy in striatum and hippocampus. In 15 months-old rats, glutamate uptake was the lowest in striatum and hippocampus increasing afterwards. In cortex, the lowest value observed was in rats with 60 days-old. The decrease in glutamate uptake in rats with 15 months-old in hippocampus and striatum could be related with chronic neurodegenerative processes and its recovery in very old rats could be a compensatory adaptative mechanism during the process of ageing. Guanosine effect seems to be age and structure dependent since the increase in glutamate uptake with guanosine was just seen in slices of cortex from 10 days-old animals.

Key words: glutamate uptake; glutamate transporters; development; ageing; guanosine

1. Introduction

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). It is involved in most of brain functions (Ozawa et al., 1998; Anderson and Swanson, 2000; Meldrum, 2000; Danbolt, 2001) as memory and learning (Izquierdo and Medina, 1997), development and ageing (Segovia et al., 2001), and adaptation to the environment (Danbolt, 2001; Mattson et al., 2002; Warren, 2002). At high concentrations, glutamate may also act as an excitotoxin by providing excessive stimulation of glutamate receptors (Anderson and Swanson, 2000; Meldrum, 2000; Danbolt, 2001; Maragakis and Rothstein, 2001). Glutamate toxicity has been related to neuronal death in ischemia, hypoxia, hypoglycemia and trauma (Choi, 1988; Ikonomidou et al., 1989), and with many chronic neurodegenerative disorders of the CNS including Huntington's, Alzheimer's and *status epilepticus* (Brewer, 2000; Danbolt, 2001; Ingram et al., 2001; Maragakis and Rothstein, 2001; Segovia et al., 2001).

The maintenance of extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels is an essential role of glial cells and this is achieved through high affinity sodium-dependent glutamate transporters present mainly in astrocytes (Anderson and Swanson, 2000; Attwell, 2000; Danbolt, 2001, Chen and Swanson, 2003). To date, five different mammalian glutamate transporters have been cloned: GLAST (Storck et al., 1992) and GLT-1 (Pines et al., 1992) are localized predominantly in astrocytes (Rothstein et al., 1994; Lehre and Danbolt, 1998) while EAAC1 (Kanai and Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) and EAAT5 (Arriza et al., 1997) are localized in neurons (Gegelashvili and Schousboe, 1998); however, expression of EAAT4 was recently described in astrocytes (Hu et al., 2003). Astrocytic GLAST and GLT-1 are

quantitatively the main glutamate transporters, being responsible for most of the glutamate uptake activity (Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001). These two glial glutamate transporters have different regional distribution throughout the CNS (Gegelashvili and Schousboe, 1998; Danbolt, 2001) and also different distributions during development (Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997; Maragakis and Rothstein, 2001). GLAST is found mainly in cerebellar Bergmann glia (Rothstein et al., 1994; Lehre and Danbolt, 1998) and its expression predominates over GLT-1 in the forebrain at early stages of development (Ullensvang et al., 1997). GLT-1 is the major glutamate transporter throughout all brain regions (Rothstein et al., 1994; Danbolt et al., 1998) and is undetectable in newborn rats (Levy et al., 1995) reaching adult levels at the same time as GLAST, on the 5th week post-birth (Ullensvang et al., 1997).

Multiple molecular, cellular, structural and functional changes occur also in the brain during ageing. Neural cells may adapt to these changes or they may succumb to neurodegenerative cascades that result in chronic neurodegenerative diseases (Mattson et al., 2002). Neurotransmitters are involved in the neurodegenerative processes in brain disorders of ageing (Maragakis and Rothstein, 2001; Segovia et al., 2001; Mattson et al., 2002). Specifically, overstimulation of glutamate receptors can cause neuronal death, particularly under increased levels of oxidative and metabolic stress, which occurs during ageing and in age-related neurodegenerative disorders (Meldrum, 2000; Mattson et al., 2002). Alterations in glutamate transporters have also been described in neurodegenerative conditions that affect the immature and adult CNS (Furuta et al., 1997; Maragakis and Rothstein, 2001).

The guanine-based purines (GBP), namely the nucleotides GTP, GDP, GMP and the nucleoside guanosine have been traditionally viewed as having only intracellular roles, but recently its extracellular signaling effects have become recognized. GBP

present trophic effects on glial cells and neurons (Neary et al., 1996; Rathbone et al., 1999) and antagonistic effects on the glutamatergic system (Tasca et al., 1995; Burgos et al., 1998). GBP are released from astrocytes both in physiological and pathological conditions. Astrocyte cultures submitted to hypoxia, a process that involves glutamatergic excitotoxicity, release guanosine (Ciccarelli et al., 1999) and its level remains high for several days afterwards (Uemura et al., 1991). *In vivo* studies point to an important role of guanosine on neuroprotection (Schmidt et al., 2000; Lara et al., 2001; Vinadé et al., 2003). When evaluating the *in vivo* neuroprotective effect of guanosine, its oral (Lara et al., 2001) or intraperitoneal (Schmidt et al., 2000) administration protected the animals against seizures induced by overstimulation of the glutamatergic system (quinolinic acid and alfa-dendrotoxin). Furthermore, studies have shown that guanosine increases glutamate uptake in culture of astrocytes (Frizzo et al., 2001, 2003; Gottfried et al., 2002) and in slices of cortex (Frizzo et al., 2002).

The purpose of this study was describe the effect of development and ageing on basal glutamate uptake and then, determine if this parameter could be affected by guanosine, using slices of striatum, hippocampus and parietal cortex from P10 (days-postnatal) to 26 months-old rats.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats with P10, P21 and P60, and 15 and 26 months-old were obtained from our breeding colony. Animals were maintained under a 12 hours light/12 hours dark cycle in a constant $22 \pm 1^\circ\text{C}$ temperature. Water and a 20% (w/w) protein commercial chow were provided *ad libitum*. All procedures were done following the regulations of the local animal house authorities.

2.2. Reagents

Guanosine, N-methyl-D-glucamine and all the others reagents were purchased from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO). L-[^3H]glutamate (specific activity 30 Ci/mmol) was purchased from Amersham International, UK.

2.3. Glutamate Uptake

2.3.1. Slices preparation

The animals were decapitated, their brains immediately removed and humidified with Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl; 0.63 Na_2HPO_4 ; 4.17 NaHCO_3 ; 5.36 KCl; 0.44 KH_2PO_4 ; 1.26 CaCl_2 ; 0.41 MgSO_4 ; 0.49 MgCl_2 and 1.11 glucose, in pH 7.2. Striatum, hippocampus and cortex were dissected onto Petri dishes with HBSS and slices (0.4 mm) were obtained using a McIlwain tissue chopper (for cortex, coronal slices were obtained from the parietal area). Slices of striatum, hippocampus and cortex were separated with the help of a magnifying glass and transferred to 24 wells-culture plates; one plate was maintained at 35°C and the other on ice. The slices of the first plate was washed once with 1mL of 35°C HBSS and

the second with 1mL of 4°C HBSS sodium-free for the analyses of non specific uptake (see below).

2.3.2. Total glutamate uptake

Glutamate uptake was performed according to Frizzo et al. (2002) for cortical slices and then, adjusted for striatum and hippocampus concerning to incubation times. Slices were preincubated at 35°C for 30 min in the presence or absence of 100µM guanosine followed by addition of 0.66 µCi mL⁻¹ and 0.33 µCi mL⁻¹ L-[³H]glutamate for striatum/hippocampus and cortex respectively, and 100µM (final concentration) unlabeled glutamate. Incubation was stopped after 3, 5 or 7 minutes for striatum, hippocampus and cortex, respectively (showed in Fig. 1A, B and C), with two ice-cold washes of 1mL HBSS, immediately followed by addition of 0.5N NaOH, which was kept overnight.

2.3.3. Sodium-independent glutamate uptake (Nonspecific uptake)

To measure nonspecific uptake, it was used the same protocol described above, except for the temperature and the medium used. Sodium-independent uptake was determined on ice, using N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride, and the results were subtracted from the total uptake to obtain the specific one.

Both specific and nonspecific uptake were performed in triplicate and the mean was used for calculations.

2.3.4. Radioactivity quantification

Radioactivity incorporated was measured using a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

2.3.5. Protein measurement

Protein content was measured following the method described by Peterson (1977).

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using one-way ANOVA for multiple groups' comparison. Post hoc analysis was carried out by Tukey multiple range tests. Comparison between two means was made by Student's *t* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Time course of glutamate uptake

To evaluate the optimal time for assaying L-[³H]glutamate uptake, we carried out incubation time courses using slices of striatum, hippocampus and cortex (Fig. 1A, B and C). The times chosen were, respectively, 3, 5 and 7 minutes for striatum, hippocampus and cortex.

3.2. Effect of age on basal glutamate uptake

To analyze basal glutamate uptake changes throughout development and ageing, we used young (10 and 21 days-old), adult (60 days-old) and old rats (15 and 26 months-old). In summary, basal glutamate uptake changed throughout early development and ageing in all structures studied. In striatum and hippocampus (Fig. 2 and 3), we observed a decrease in glutamate uptake from P10 to 15 months-old, starting to increase at 26 months-old. In cortical slices (Fig. 4) we observed a decrease in glutamate uptake from P21 to P60, remaining unaltered up to 26 months-old.

In striatum, glutamate uptake (in $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) changed from 1.60 ± 0.09 (P10) to 0.52 ± 0.04 (15 months) (P21: 1.24 ± 0.08 and P60: 0.73 ± 0.14), increasing partially up to 26 months animals (0.92 ± 0.13).

In hippocampus it changed from 1.27 ± 0.09 (P10) to 0.53 ± 0.04 (15 months) (P21: 0.97 ± 0.15 and P60: 0.66 ± 0.07), increasing up to 26 months (0.99 ± 0.12).

In parietal cortex, the profile of the glutamate uptake was quite different from striatum and hippocampus, with the only significant changes being a decrease in uptake from P21 (0.30 ± 0.03) to P60 (0.17 ± 0.03). Although an increase was seen in animals with 15 and 26 months-old, this was not significant.

3. 3. Effect of guanosine on glutamate uptake

As previously showed by Frizzo et al. (2002), guanosine increased glutamate uptake in cortical slices of P10 rats from $0,24 \pm 0,04$ to $0,38 \pm 0,05$ $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (up to 50 %). However, guanosine did not exert any significant effect at any of the other ages and brain structures studied in this work (Fig. 2, 3 and 4).

4. DISCUSSION

Overstimulation of glutamate receptors can cause neuronal death, being essential to keep low extracellular glutamate concentrations (Anderson and Swanson, 2000; Meldrum, 2000; Danbolt, 2001). The diversity of EAATs subtypes during human brain development suggests multiple functional roles for glutamate transporters (Danbolt, 2001; Chen and Swanson, 2003). The maintenance of extracellular glutamate concentrations below excitotoxic levels is accomplished mainly by sodium-dependent glutamate transporters GLAST and GLT-1, present in astrocytes throughout the CNS (Ullensvang, et al., 1997; Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001). During the period of active synaptogenesis there is a strong increase in the levels of both GLT-1 and GLAST transporters (Danbolt et al, 2001). Astrocytes *in vivo* might also respond in its ability to control synaptic levels of glutamate differently to environmental or injurious stimuli during development and maturation (Stanimirovic et al., 1999).

The relevance of the glutamate transporters is more sophisticated than simply transmitter removal (Danbolt, 1994). It has been shown that the expression of GLAST in astrocyte cultures is increased by activation of glutamate receptors (Swanson et al., 1997; Duan et al., 1999). It is important to evaluate glutamate uptake during development and ageing and then understand their mechanism upon regulation. Glutamate uptake is regulated at multiple levels and the regulatory mechanisms may form future targets for therapeutic intervention (Danbolt et al., 1998).

Unfortunately, just few publications deal with glutamate uptake as a mechanism of neuroprotective process during development and ageing in the CNS. Furthermore, there are strong controversies in these results, probably due to the differences in methodological approaches, cerebral structures and animals utilized. It was not shown

changes in glutamate uptake in homogenates of hippocampus from Wistar rats aged 4 to 24 months (Najerahim et al., 1990), hippocampal slices from hybrid rats aged 3 to 37 months (Palmer et al., 1994) or synaptosomes from Wistar-Kyoto rats aged 3 and 20 months (Gilad et al., 1990). In neocortex of Wistar rats aged 4 to 24 months, Najerahim and coworkers (1990) demonstrated a decrease in glutamate uptake by aged rats when using tissue homogenate, while no variation was observed in slices from Hybrid rats aged 3 to 37 months (Palmer et al., 1994). Working with synaptosomes from whole cerebral cortex, Saransaari and Oja (1995) and Wheeler and Ondo (1986) showed a decrease in the velocity of glutamate uptake in old animals compared to 3 months-old rats, but an increase in its affinity using mice and rats, respectively. A similar situation was observed in synaptosomes of striatum from Sprague-Dawley rats aged 3 to 19 months (Price et al., 1981). However, no significance was observed when tissue homogenate (Najerahim et al., 1990) and slices (Palmer et al., 1994) were used. In striatum, glutamate uptake seems to be dependent of the region analyzed (Strong et al., 1984). Besides, too little is known about glutamate uptake in immature animals.

Several discrepancies are described *in vitro* and *in vivo* studies, in hippocampus, striatum and cortex, also for glutamate release in adult and aged animals (Freeman and Gibson, 1987; Dawson et al., 1989; Cobo et al., 1992; Dawson and Wallace, 1992; Meldrum et al., 1992; Palmer et al., 1994; Saransaari and Oja, 1995; Massieu and Tapia, 1997; Corsi et al., 1997, 1999).

It is important study some parameters during development, ageing and neurodegenerative processes using slices where connections between cells are preserved. Astrocytes do not express GLT-1 when cultured alone, but they do if they are cultured with neurons (Swanson et al., 1997). It has been estimated that the energy involved in the overall processes to clear glutamate from the external space is a large

fraction of total brain ATP turnover. It is not surprising that complete ischemia leads to abrupt cessation of glutamate uptake and massive increase in extracellular glutamate concentrations (Sibson et al., 1998). Besides, when membrane gradients (ATP dependent) are collapsed, there is an efflux of glutamate via reverse uptake (Chen and Swanson, 2003).

In the present study, we drawn an ontogenetic profile (from immature to old animals) of glutamate uptake, by using just one methodology for all structures and ages studied. This probably reduces the variation found in the literature, which seems to be due to a vast number of methodology used. Using slices, we showed in striatum and hippocampus a decrease in glutamate uptake from immature until 15 months-old rats and then, a significant increase afterwards. This enhancement could compensate the increment of glutamate release observed for Massieu and Tapia (1997) in 22-24 month-old rats. However, our data showed no significant change in glutamate uptake in parietal cortex of animals from P60 to 26 months-old, but a significant decrease between P21 and P60. Studies *in vitro* using slices of different regions of cortex (Dawson et al., 1989; Dawson and Wallace, 1992; Meldrum et al., 1992; Palmer et al., 1994; Saransaari and Oja, 1995), and *in vivo* studies using push-pull of several regions of cortex (Cobo et al., 1992, Porrás et al., 1997), demonstrated no significant difference in glutamate release when comparing old with young adult mice or rats. These results might explain why glutamate uptake did not change, in our study, with ageing in cortex. A study made by Saransaari and Oja (1995) mentioned that using immature, adult and old mice, from 3 and 7 days-old to 3-24 months-old, there was a markedly decrease at 24 months in the maximal velocity of glutamate uptake in cerebral cortex using synaptosomes and a reduction in the transport constant K_m both in 18 and 24 months. These findings might

indicate an age-related loss in the number of glutamate transport sites as well as a compensatory increase in the affinity of the remaining transport sites for glutamate.

Guanosine has demonstrated neuroprotective effects in *in vitro* studies (Frizzo et al., 2002) and was effective preventing seizures induced by quinolinic acid and alpha-dendrotoxin in adult animals (Schmidt et al., 2000; Lara et al., 2001; Vinadé et al., 2003). In our laboratory, we have also found that guanosine increases glutamate uptake in cortical astrocyte cultures and this increase was significant at 10 days *in vitro* but not at 40 days *in vitro* (Frizzo et al., 2001; Gottfried et al., 2002). Here, we showed that guanosine increased glutamate uptake only in slices of cortex; however, this effect seems to be age and structure dependent, since the increase was just seen in slices of cortex from P10 animals. It is reasonable to think that the mechanism of neuroprotection by guanosine described in some models in our laboratory for cortex might depend, in other structures and ages, on an injury process to be triggered; this point deserves further studies.

It is possible to hypothesize that the decrease in glutamate uptake in rats with 15 months-old in hippocampus and striatum could be related to many chronic neurodegenerative disorders that occur at old age and that its recovery in very old rats (26 months-old) could be a compensatory adaptive mechanism.

Acknowledgements: This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS.

References

- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1-14.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4155-4160.
- Attwell, D., 2000. Brain uptake of glutamate: food for thought. *Journal of Nutrition* 130, 1023S-1025S.
- Brewer, G.J., 2000. Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging. *Experimental Gerontology* 35, 1165-183.
- Burgos, J.S., Barat, A., Souza, D.O., Ramirez, G., 1998. Guanine nucleotides protect against toxicity in an *ex vivo* chick retinal preparation. *FEBS Letters* 430, 176-180.
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23, 137-149.
- Choi, D. W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.

Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., Dálimente, I., Ballerini, P., Caciagli, F., Rathbone, M.P., 1999. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia / hypoglycemia. *Glia* 25, 93-98.

Cobo, M., Expósito, I., Porrás, A, Mora, F., 1992. Release of amino acid neurotransmitters in different cortical áreas of conscious adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 13, 705-709.

Corsi, C., Pazzagli, M., Bianchi, L., Della Corte, L., Pepeu, G., Pedata, F., 1997. In vivo amino acid release from the striatum of aging rats: adenosine modulation. *Neurobiol. Aging* 18, 243-250.

Corsi, C., Melani, A., Bianchi, L., Pepeu, G., Pedata, F., 1999. Striatum A_{2A} adenosine receptors differently regulate spontaneous and K⁺-evoked glutamate release in vivo in Young and aged rats. *NeuroReport* 10, 687-691.

Danbolt, N. C., 1994. The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Progress in Neurobiology* 44, 377-396.

Danbolt, N.C., Chaudhry, F.A., Dehnes, Y., Lehre, K.P., Levy, L.M., Ullensvang, K., Storm-Mathisen, J., 1998. Properties and localization of glutamate transporters. *Progress in Brain Research* 116, 23-43.

Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65, 1-105.

Dawson R., Jr, Wallace D. R., Meldrum, M. J., 1989. Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 10, 665-668.

Dawson, R., Jr, Wallace, D. R., 1992. Kainic acid-induced seizure in aged rats: neurochemical correlates. *Brain Res. Bull.* 29, 459-468.

Duan, S., Anderson, C.M., Stein, B.A., Swanson, R.A.. 1999. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *Journal of Neurosciences* 19, 10193-10200.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599-603.

Freeman, G. B., Gibson, G. E., 1987. Selective alteration of mouse brain neurotransmitter release with age. *Neurobiol. Aging* 8, 147-152.

Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Dahm, K.C.S., Prokopiuk, A.S., Swanson, R., Souza, D.O., 2001. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 12(4), 1-3.

Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Prokopiuk, A.S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O., 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22(3), 353-363.

Frizzo, M.E.S., Soares, F.A.A., Dall'Onder, L.P., Lara, D.R., Swanson, R.A., Souza, D.O., 2003. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Research (article in press)*.

Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *The Journal of Neuroscience* 17(21), 8363-8375.

Gegelashvili, G., Schousboe, A., 1998. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Research Bulletin* 45(3), 233-238.

Gilad, G. M., Gilad, V. H., Tizabi, Y., 1990. Aging and stress-induced changes in choline and glutamate uptake in hippocampus and septum of two rat strains differing in longevity and reactivity to stressors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8, 709-713.

Gottfried, C., Tramontina, F., Gonçalves, D., Gonçalves, C.A., Moriguchi, E., Dias, R.D., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., 2002. Glutamate uptake in cultures astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 1333-1340.

Hu, W., Walters, W.M., Xia, X., Karmally, S.A., Bethea, J.R., 2003. Neuronal glutamate transporter EAAT₄ is expressed in astrocytes. *Glia* 44, 13-25.

Ingram, E.M., Wiseman, J. W., Shoshi, T., Emson, P.C., 2001. Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of EL mouse. *Journal of Neurochemistry* 79, 564-575.

Ikonomidou, C., Price, M. T., Mosinger, J. L., Frierdich, G., Labruyere, J., Salles, K. S., Olney, J. W., 1989. Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain. *J. Neurosci.* 9, 1693-1700.

Izquierdo, I., Medina, J. H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68, 285-316.

Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467-471.

Lara, D.R., Schmidt, A.P., Frizzo, M.E.S., Burgos, J.S., Ramirez, G., Souza, D.O., 2001. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Research* 912, 176-180.

Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *The Journal of Neuroscience* 18(21), 8751-8757.

Levy, L.M., Lehre, K.P., Walaas, S.I., Storm-Mathise, J., Danbolt, N.C., 1995. Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2036-2041.

Maragakis, N. J., Rothstein, J. D., 2001. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58 (3), 365-370.

Massieu, L., Tapia, R., 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in Young and aged rats in vivo. *Journal of Neurochemistry* 69, 1151-1160.

Mattson, M.P., Chan, S.L., Duan, W., 2002. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiology Rev.* 82, 637-672.

Meldrum, M. J., Glenton, P., Dawson, R., Jr, 1992. [3H]D-aspartic acid release in brain slices of adult and aged Fisher 344 rats. *Neurochem. Res.* 7, 151-156.

Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition* 130, 1007S-1015S.

Najerahim, A., Francis, P.T., Bowen, D.M. Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiol. Aging* 11: 155-158, 1990.

Neary, J.T., Rathbone, M.P., Cattabeni, F., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 1996. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends in Neuroscience* 19(1), 13-18.

Ozawa, A., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54, 581-618.

Palmer, A.M., Robichaud, P.J., Reiter, C.T., 1994. The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol. Aging* 15, 103-111.

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83, 346-356.

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.L., 1992. Cloning and expression of rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360, 464-467.

Porras, A., Sanz, B., Mora, F., 1997. Dopamine-glutamate interactions in the prefrontal cortex of the conscious rat: studies on aging. *Mech. Aging Dev.* 99, 9-17.

Price, M.T., Olney, J.W., Haft, R., 1981. Age-related changes in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life Sci.* 28, 1365-1370.

Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A.R., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology* 59(6), 663-690.

Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncic, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13, 713-725.

Saransaari, P., Oja, S.S., 1995. Age-related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mechanisms of Ageing and Development* 81, 61-71.

Schmidt, A.P., Lara, D.R., Maraschin, J.F., Perla, A.S., Souza, D.O., 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Research* 864, 40-43.

Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mechanisms of Ageing and Development* 122, 1-29.

Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G. 1998. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95, 316-321.

Stanimirovic, D. B., Ball, R., Small, D. L., Muruganandam, A., 1999. Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocyte cultures differentiated *in vitro*. *Int. J. Devl. Neuroscience* 17 (3): 173-184.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate / aspartate transporter from rat brain. *Neurobiology* 89, 10955-10959.

Strong, R., Samorajski, T., Gottesteld, Z., 1984. High-affinity uptake of neurotransmitters in rat neostriatum: effects of aging. *J. Neurochem.* 43, 1766-1768.

Swanson, R.A., Liu, J., Miller, J.W., Rothstein, J.D, Farrell, K., Stein, B.A., Longuemare, M.C., 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *Journal of Neurosciences* 17, 932-940.

Tasca, C.I., Wofchuk, S.T., Ramirez, G., Souza, D.O., Rodnigh, R., 1995. Glutamate-induced GFAP phosphorylation inhibited by guanine nucleotides in hippocampal slices of immature rats. *NeuroReport*, 6, 249-252.

Uemura, Y., Miller, J.M., Matson, W.R., Beal, M.F., 1991. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22, 1548-1553.

Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1997. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter protein GLAST and GLT. *European Journal of Neuroscience* 9, 1646-1655.

Vinade, E. R., Schmidt, A P., Frizzo, M. E., Izquierdo, I., Elisabetsky, E., Souza, D. O., 2003. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.* 977, 97-102.

Warren, I., 2002. Facilitating infant adaptation: the nursery environment. *Seminars of Neonatology* 7, 459-67.

Wheeler, D.D., Ondo, I.G., 1986. Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 21, 159-168.

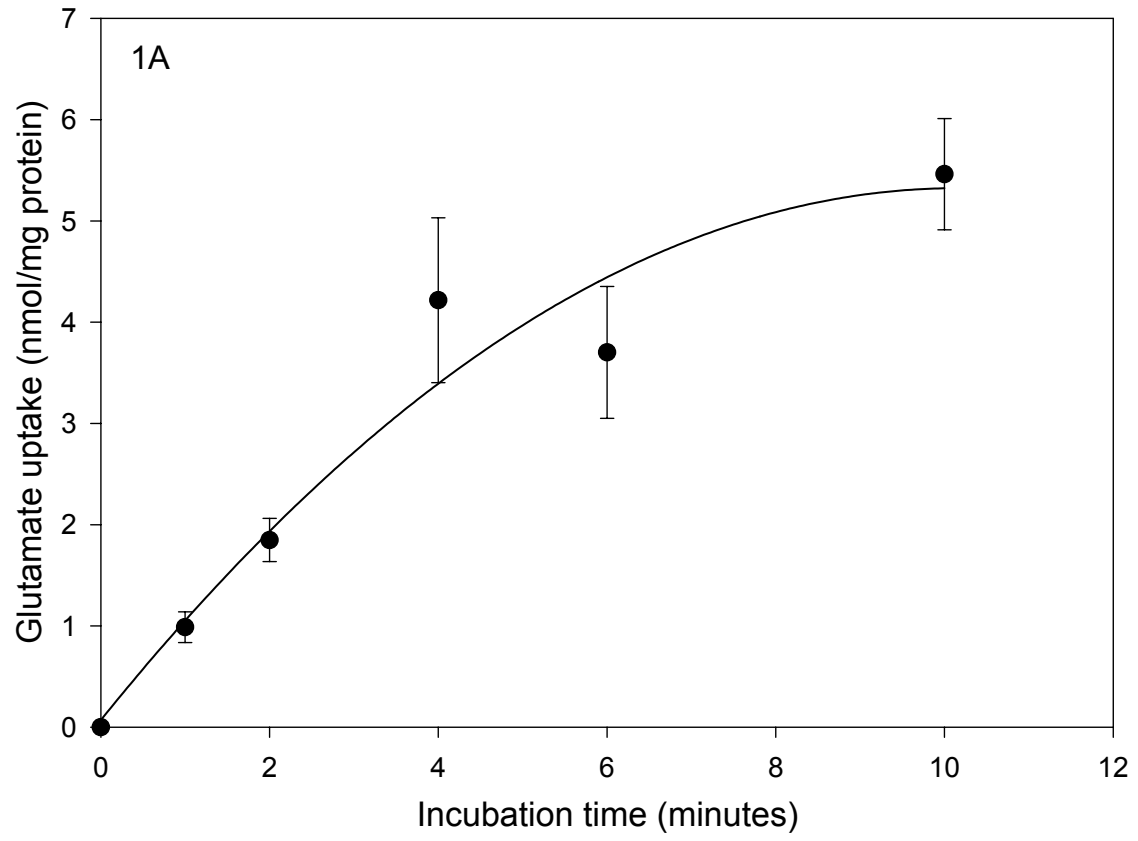
Figure legends:

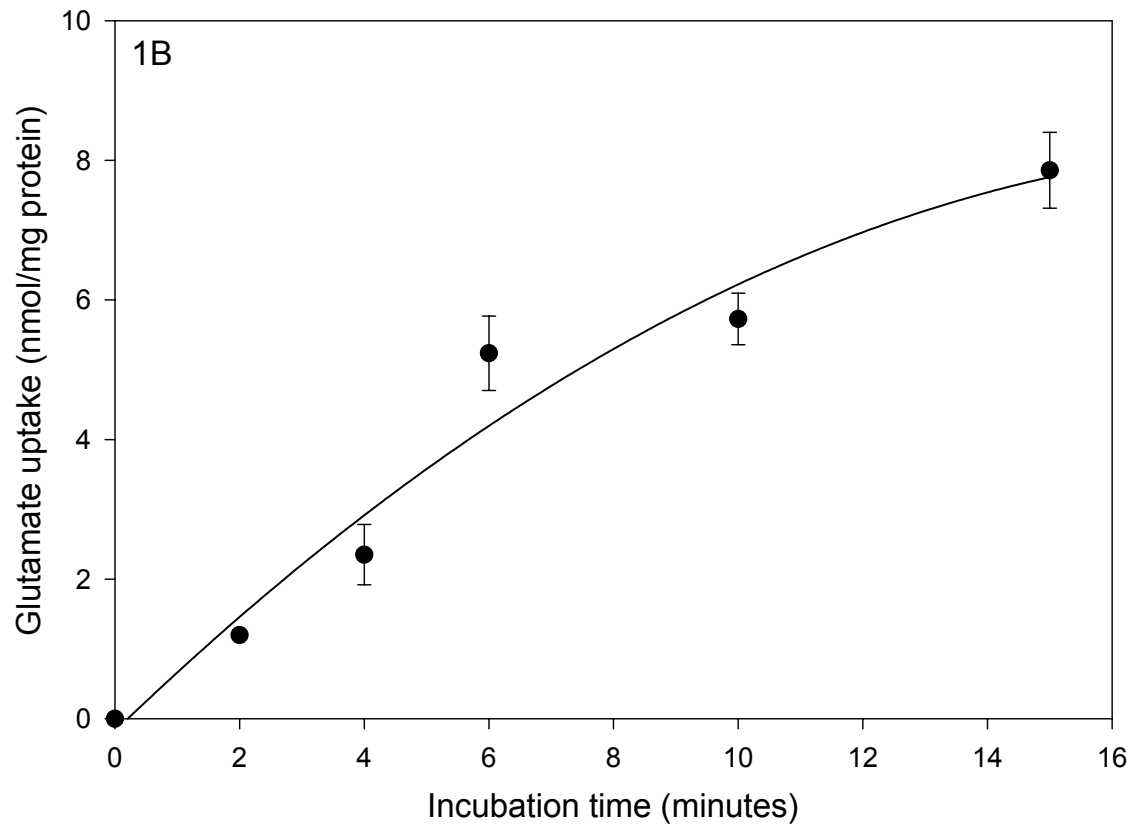
Fig.1. Time course for glutamate uptake. Slices of striatum (A), hippocampus (B) and cortex (C) of male adult rats (P60) were incubated with L-[³H]glutamate. Each determination is a mean of 4-6 independent experiments, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.

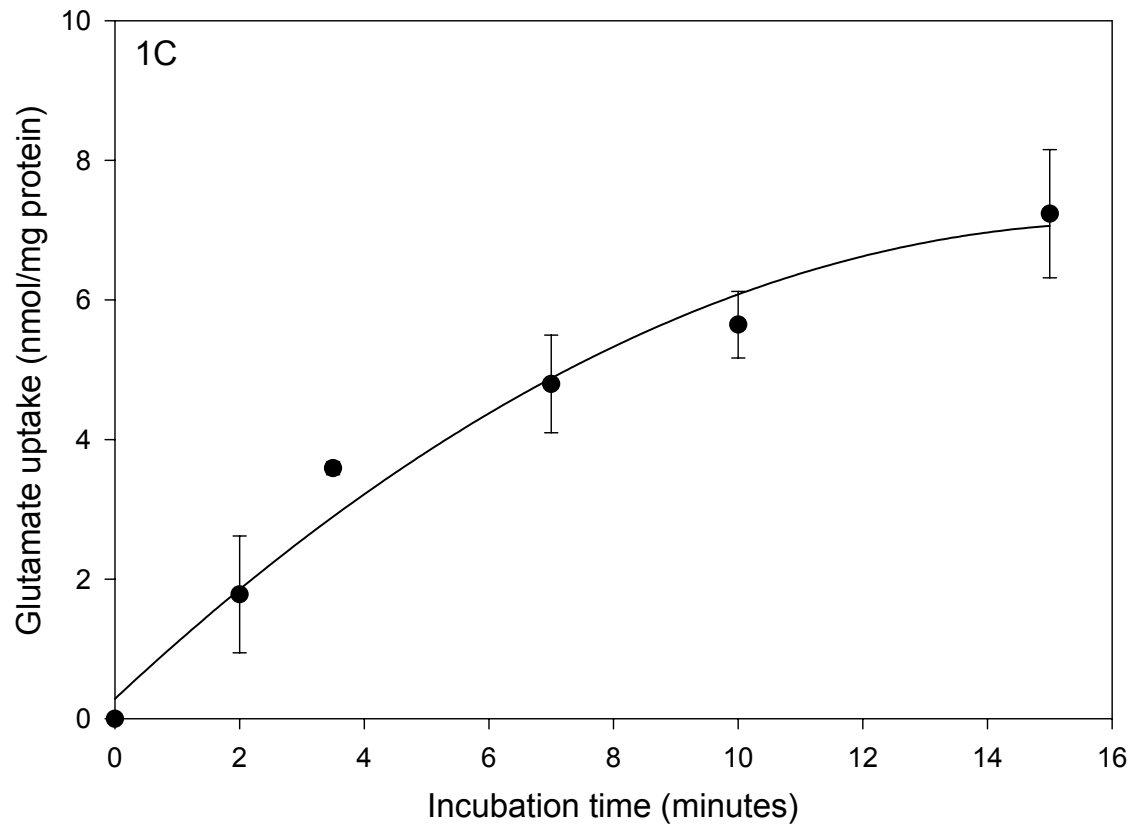
Fig.2. Glutamate uptake in the basal state and after treatment with guanosine in slices of striatum from rats with P10, P21 and P60, 15 and 26 months-old. Slices were previously incubated for 30 min with or without guanosine 100 μ M followed by 3 min of [³H]glutamate uptake. Each determination is a mean of 8-10 independent experiments for each age, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E. Statistical differences between ages were determined for basal uptake by ANOVA followed by Tukey's test. For guanosine effect it was used Student's *t* test. Same letter means statistical difference between ages; ^{a b c e} $p \leq 0,001$; ^{d f} $p \leq 0,05$.

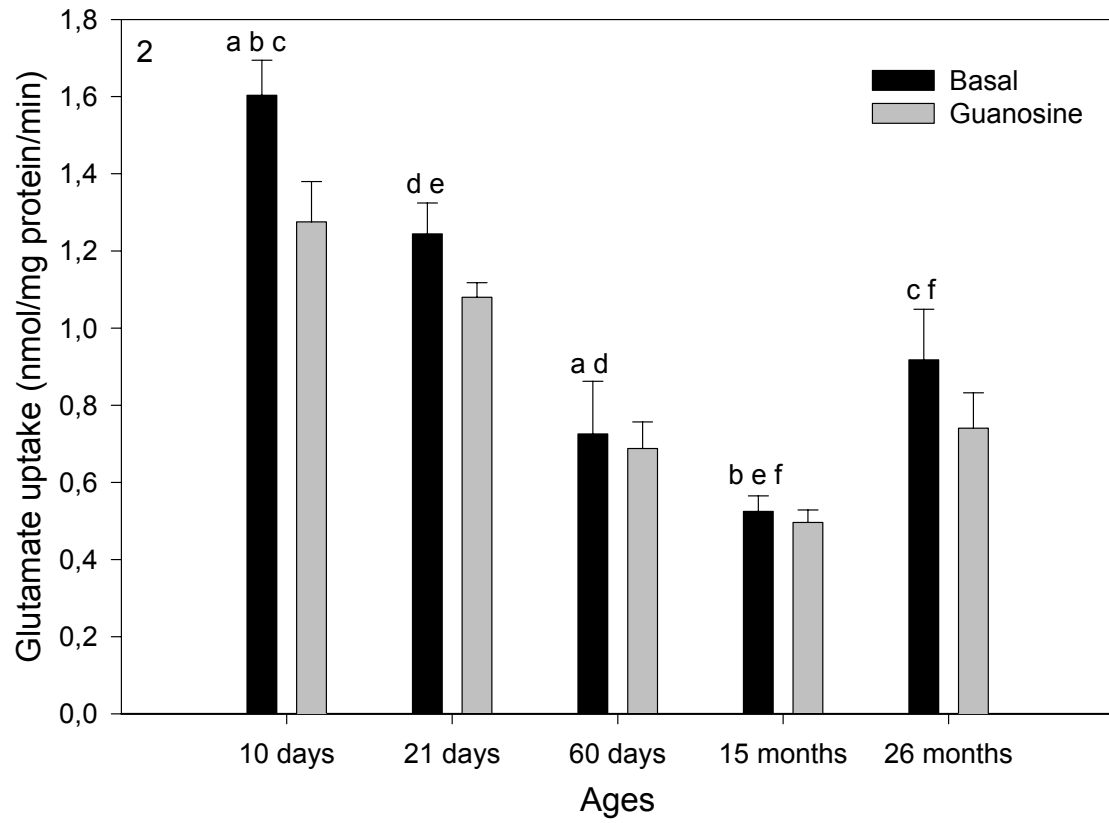
Fig.3. Glutamate uptake in the basal state and after treatment with guanosine in slices of hippocampus from rats with P10, P21 and P60, 15 and 26 months-old. Slices were previously incubated for 30 min with or without guanosine 100 μ M followed by 5 min of [³H]glutamate uptake. Each determination is a mean of 8-10 independent experiments for each age, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E. Statistical differences between ages were determined for basal uptake by ANOVA followed by Tukey's test. For guanosine effect it was used Student's *t* test. Same letter means statistical difference between ages; ^{a b} $p \leq 0,001$, ^{c d} $p \leq 0,05$.

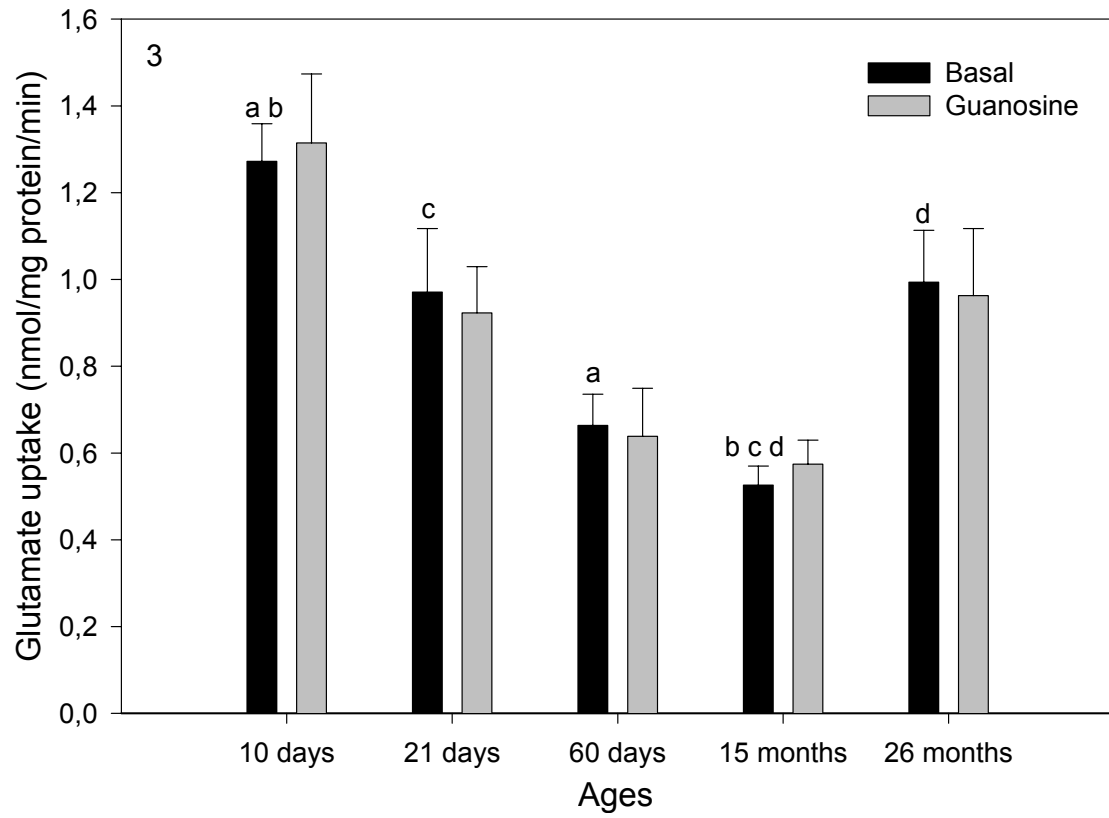
Fig.4. Glutamate uptake in the basal state and after treatment with guanosine in slices of cortex from rats with P10, P21 and P60, 15 and 26 months-old. Slices were previously incubated for 30 min with or without guanosine 100 μ M followed by 7 min of [3 H]glutamate uptake. Each determination is a mean of 7-8 independent experiments for each age, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E. Statistical differences between ages were determined for basal uptake by ANOVA followed by Tukey's test. For guanosine effect it was used Student's *t* test. ^a $p \leq 0,05$ mean difference between ages; * $p \leq 0,05$ mean different from the control.

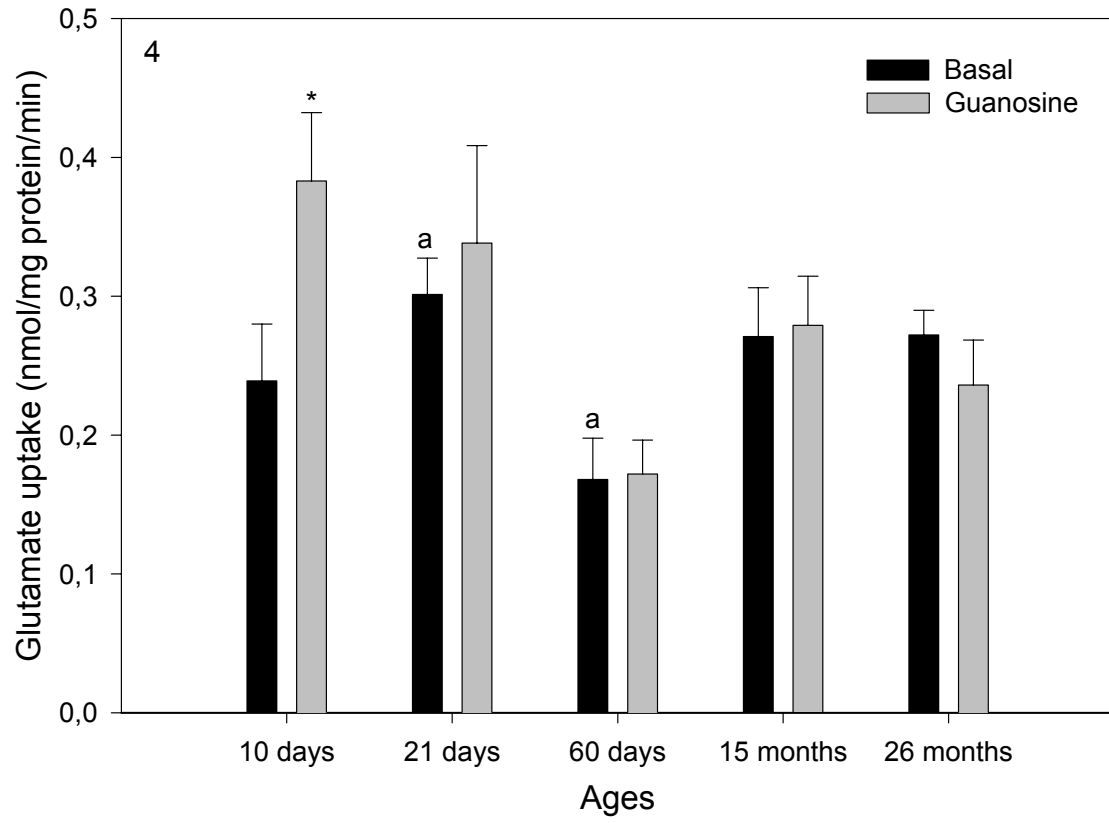












4. DISCUSSÃO

A hiper-estimulação dos receptores glutamatérgicos pode levar à morte neuronal, sendo desta forma essencial que as concentrações extracelulares de glutamato sejam mantidas abaixo de seus níveis neurotóxicos (Anderson e Swanson, 2000; Meldrum, 2000; Danbolt, 2001). Os principais transportadores responsáveis pelo sistema de captação de glutamato são o GLAST e o GLT-1, os quais são Na⁺-dependentes (Anderson e Swanson, 2000; Danbolt, 2001) e estão localizados nas células gliais, em particular nos astrócitos distribuídos por todo o SNC, sendo que o GLAST predomina no cerebelo e o GLT-1 nas demais regiões (Ullensvang, et al., 1997; Anderson e Swanson, 2000; Danbolt, 2001). As concentrações de GLAST e GLT-1 aumentam drasticamente no período mais ativo de sinaptogênese (a partir do final da segunda semana até o final da quarta semana pós-natal) (Danbolt, 2001). É possível que baixos níveis de GLAST sejam expressos ao nascimento com propostas metabólicas e, quando a liberação sináptica de aminoácidos excitatórios requer um aumento da capacidade de captação a fim de proteger neurônios, a expressão de GLAST é aumentada e a expressão de GLT-1 é ativada (Ullensvang et al., 1997).

A importância dos transportadores de glutamato na manutenção dos níveis extracelulares deste aminoácido abaixo de seus níveis neurotóxicos é indiscutível, assim como avaliar a sua captação durante o desenvolvimento e envelhecimento e então tentar compreender seu mecanismo de regulação. Além disso, os níveis de captação de glutamato também dependem de seus níveis de liberação e do estado funcional celular. Adicionalmente, o consumo de energia envolvido em todo o processo de retirada de glutamato do espaço extracelular, ou seja, de captação, consome uma grande parcela do ATP cerebral. Sendo assim, não é surpreendente que a isquemia leve a uma abrupta

interrupção da captação de glutamato e a um aumento massivo das concentrações extracelulares do mesmo (Sibson et al., 1998). Além disso, quando o gradiente de membrana de Na^+/K^+ (dependente de ATP) colapsa, ocorre liberação de glutamato através de transporte reverso (Chen e Swanson, 2003).

Infelizmente, não existem muitos trabalhos relacionando captação de glutamato com desenvolvimento e envelhecimento do SNC, e muitas controvérsias quanto a este parâmetro, provavelmente devido a diversidade de técnicas, animais e estruturas analisadas, têm sido relatadas. Estudos usando homogeneizado de hipocampo de ratos Wistar com idades de 4, 12 e 24 meses (Najerahim et al., 1990) ou fatias hipocâmpais de ratos híbridos com idades entre 3 e 37 meses (Palmer et al., 1994) ou, ainda, sinaptossomas de ratos Wistar-Kyoto de 3 e 20 meses (Gilad et al., 1990), não mostram diferença na captação de glutamato entre as idades estudadas. Em neocórtex de ratos Wistar com 4, 12 e 24 meses, Najerahim e colaboradores (1990) demonstraram uma diminuição na captação de glutamato em animais velhos, usando homogeneizado de tecido, enquanto nenhuma variação foi observada em fatias de neocórtex de ratos híbridos com idades entre 3 e 37 meses (Palmer et al., 1994). Usando sinaptossomas de córtex total de camundongos, observou-se uma diminuição na velocidade de captação em animais velhos (24 meses) comparado com animais de 3 meses, mas um aumento na afinidade dos sítios de transporte de glutamato em animais de 18 e 24 meses (Saransaari e Oja, 1995). Comparável com o que foi observado em córtex, Price e colaboradores (1981) demonstraram uma diminuição na velocidade de captação e um aumento na afinidade em ratos Sprague-Dawley de 10 e 19 meses comparado com 3, 4 e 6 meses, usando preparações sinaptossomais de estriado. Entretanto, nenhuma diferença foi observada usando homogeneizado de tecido em ratos de 24 meses (Najerahim et al., 1990) e fatias de ratos com 3, 12, 24 e 37 meses (Palmer et al., 1994). Quando analisado

separadamente por região, Strong e colaboradores (1984) demonstraram que usando sinaptossomas de ratos Sprague-Dawley com 7, 17 e 27 meses da região rostral do estriado, há um aumento na velocidade de captação em ratos velhos (17 e 27 meses) e uma diminuição na afinidade, quando comparado com ratos de 7 meses; na região caudal, não observaram diferença na velocidade de captação, mas uma diminuição da afinidade em ratos de 17 meses. Sendo assim, a captação de glutamato em estriado parece ser região dependente, visto que quando se analisa estriado total e quando se analisa uma região específica, os resultados observados na captação são diferentes.

Analisando a liberação de glutamato, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado várias discrepâncias entre si. A liberação de glutamato usando fatias de córtex de várias regiões (Danson e Wallace, 1992; Meldrum et al., 1992; Saransaari e Oja, 1995; Palmer et al., 1994) ou estudos *in vivo* com a técnica de push-pull, também em diferentes regiões corticais (Cobo et al., 1992; Porras et al., 1997), não têm mostrado diferença quando comparam ratos com idades variando de 3 a 37 meses. Em hipocampo, diminuição (Saransaari e Oja, 1995), aumento (Freeman e Gibson, 1987; Massieu e Tapia, 1997) ou nenhuma diferença (Meldrum et al., 1992) na liberação de glutamato têm sido relatado. No estriado, nenhuma diferença (Saransaari e Oja, 1995; Corsi et al., 1999; Segovia et al., 1999), aumento (Freeman e Gibson, 1987; Donzanti et al., 1993; Massieu e Tapia, 1997) ou diminuição (Corsi et al., 1999) na liberação também tem sido demonstrado, dependendo da região analisada.

É importante estudar alguns parâmetros durante o desenvolvimento, envelhecimento e processos neurodegenerativos usando um sistema íntegro, onde as conexões celulares estão preservadas; é o que acontece quando se usam fatias. Culturas puras de astrócitos, por exemplo, não expressam GLT-1, mas quando cultivadas juntamente com neurônios, sim (Swanson et al., 1997).

Neste trabalho de mestrado, traçamos um perfil ontogenético da captação de glutamato *in vitro*, usando desde ratos imaturos até ratos muito velhos, utilizando uma única metodologia, a qual mantém o sistema de interação celular íntegro, para todas as estruturas estudadas. Usar uma única metodologia provavelmente diminuiu a variação encontrada na literatura. Em fatias, mostramos que a captação de glutamato varia de acordo com a idade e a estrutura analisada. Em estriado e hipocampo, observamos uma diminuição na captação que inicia nos ratos após os 10 dias e segue até 15 meses, a partir de quando ocorre uma recuperação parcial ou total, respectivamente para estriado e hipocampo, em animais de 26 meses. Este aumento na captação em animais de 26 meses pode ser um mecanismo compensatório, visto que Massieu e Tapia (1997) demonstraram um aumento da liberação de glutamato em ratos velhos (22-24 meses).

Nossos resultados não mostram diferença significativa na captação de glutamato em córtex quando se comparam ratos adultos jovens (60 dias) com ratos velhos (15 e 26 meses), mas sim quando se comparam ratos de 21 dias com os de 60 dias, onde observamos uma diminuição significativa. Estudos *in vitro* usando fatias de diferentes regiões corticais (Dawson et al., 1989; Dawson e Wallace, 1992; Meldrum et al., 1992; Palmer et al., 1994; Saransaari e Oja, 1995) e estudos *in vivo* usando a técnica de push-pull em diferentes regiões do córtex (Cobo et al., 1992, Porrás et al., 1997), não demonstraram diferenças significativas na liberação de glutamato quando compararam ratos adultos jovens (2-6 meses) com ratos velhos (máximo 37 meses). Esses resultados poderiam explicar porque a captação de glutamato não variou entre ratos adultos jovens (60 dias) e ratos velhos (15 e 26 meses) no nosso estudo em fatias de córtex, apesar de haver um aumento não significativo. Um estudo feito por Saransaari e Oja (1995) usando preparados sinaptossomais de córtex de camundongos imaturos (3-7 dias), adultos e velhos (3-24 meses), demonstrou uma diminuição pronunciada na velocidade

de captação de alta afinidade em animais de 24 meses e uma redução no *K_m* nos camundongos de 18 e 24 meses. Isso pode indicar uma relação de envelhecimento *versus* número de sítios de alta afinidade dos transportadores de glutamato (perda com o envelhecimento), assim como, um aumento compensatório na afinidade dos sítios de transporte de glutamato remanescentes.

É possível inferir que a diminuição da captação de glutamato em ratos de 15 meses em hipocampo e estriado pode estar relacionada a várias desordens neurodegenerativas que ocorrem nesta idade e que a recuperação da captação, tanto total quanto parcial, por ratos de 26 meses pode ser um mecanismo de adaptação compensatório. Astrócitos velhos exibem um conteúdo elevado de GFAP (Nichols, 1999), a qual é detectada em altas proporções nas células cerebrais, sugerindo que o envelhecimento está associado com um aumento no número de células gliais (Cotrina e Nedergaard, 2002); desta forma, este fato pode estar relacionado com o aumento da captação de glutamato observado, neste trabalho, em ratos velhos. Além disso, gliose reativa ou astrogliose pode ser observada em diversas doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington, e numa variedade de condições que incluem isquemia cerebral (Schipper, 1996). Entretanto, envelhecimento não quer dizer doença, ou seja, o processo de envelhecimento não está obrigatoriamente associado a processos de neurodegeneração. Também vimos neste trabalho que os níveis de captação de glutamato em ratos imaturos (10 e 21 dias) são maiores que os níveis em ratos adultos jovens (60 dias) em todas as estruturas estudadas; tal fato pode ter alguma relação com o aumento da expressão dos transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1, em torno deste período de desenvolvimento (a partir do final da segunda semana até o final da quarta, onde atinge níveis adultos), o que coincide com o período mais ativo da sinaptogênese (Ullensvang et al., 1997).

A guanosina, um nucleosídeo derivado da guanina, tem demonstrado efeitos neuroprotetores em estudos *in vitro* (Frizzo et al., 2002). Em estudos *in vivo*, preveniu convulsões induzidas por ácido quinolínico e α -dendrotoxina em animais jovens e adultos (Schmidt et al., 2000; Lara et al., 2001; Oliveira et al., 2003). Seu efeito neuroprotetor parece não ter relação com ativação de receptores de adenosina (Lara et al., 2001) e nem com o sistema gabaérgico (Schmidt et al., 2000). A guanosina também foi capaz de aumentar a captação de glutamato em cultura cortical de astrócitos na presença de teofilina e dipiridamole, indicando um efeito extracelular da guanosina os quais não estão relacionados à ação em receptores de adenosina (Frizzo et al., 2001), assim como aumentar a captação em fatias de córtex de ratos de 10 dias submetidos ou não à isquemia (Frizzo et al., 2002). Cultura cortical de astrócitos cultivados por 10 dias tiveram um aumento na captação de glutamato na presença de guanosina quando comparado àqueles cultivados por 40 dias (Gottfried et al., 2002). Altos níveis de guanosina têm sido observados após situações isquêmicas, os quais podem manter-se elevados por dias e até semanas após o insulto (Uemura et al., 1991; Ciccarelli et al., 1999); isso é razoável, visto que a mesma exerce efeitos tróficos tanto em neurônios quanto em astrócitos (Neary et al., 1996; Rathbone et al., 1999).

Neste trabalho, nós mostramos um aumento na captação de glutamato somente em fatias de córtex de ratos de 10 dias; desta forma, o efeito da guanosina parece ser idade e estrutura dependentes. O aumento da captação de glutamato causado pelo uso de guanosina observado neste trabalho está de acordo com dados mostrados por Frizzo e colaboradores (2002), onde a guanosina aumentou significativamente a captação em fatias corticais de ratos de 10 dias. Pode ser que este resultado tenha alguma relação com o aumento da captação observado em cultura de astrócitos corticais com 10 dias de cultivo *in vitro* (Gottfried et al., 2002), apesar de células cultivadas por 10 dias não

serem comparáveis morfológicamente e, dependendo de alguns parâmetros, funcionalmente com fatias de ratos de 10 dias. Entretanto, é razoável pensar que o efeito neuroprotetor da guanosina descrito em alguns modelos neste departamento para córtex pode depender, para outras idades e estruturas, de um processo que desencadeie injúria celular, visto que neste trabalho avaliamos somente situações basais.

Além de representar o estabelecimento de valores de captação basais em diferentes idades, consideramos também que o trabalho desenvolvido nesta Dissertação é uma importante contribuição à padronização da metodologia de captação de glutamato em fatias provenientes de diferentes estruturas do SNC. Em relação aos resultados acrescentados em Material e Métodos (tempos de pré-incubação), que não estão presentes no artigo, sua importância diz respeito à perspectiva de usar a metodologia em diferentes modelos de injúria. Estes podem necessitar diferentes tempos para sua implantação e/ou pode haver necessidade de diferentes tempos de pré-incubação para avaliar neuroproteção.

5. CONCLUSÕES

- A captação de glutamato é idade e estrutura dependentes: diminui a partir de ratos de 10 dias até 15 meses em estriado e hipocampo, e de ratos de 21 até 60 dias em córtex; em animais de 26 meses, ocorre uma recuperação parcial e total na captação em estriado e hipocampo, respectivamente, e um aumento, o qual não é significativo, em ratos de 15 e 26 meses no córtex;
- A guanosina não interfere nos níveis de captação de glutamato em fatias de estriado e hipocampo de ratos com 10, 21 e 60 dias, 15 e 26 meses, e em fatias de córtex de ratos com 21 e 60 dias, 15 e 26 meses. Já em fatias de córtex de ratos com 10 dias, a guanosina aumenta a captação de glutamato. Este resultado confirmou estudos prévios realizados neste departamento;
- Fatias de estriado, hipocampo e córtex de ratos machos adultos (60 dias) submetidas a diferentes tempos de pré-incubação, não sofreram alterações significativas no parâmetro de captação de glutamato.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos dados de screening sobre captação basal de glutamato x desenvolvimento e ontogenia mostrados nesta Dissertação, abre-se um leque muito grande de possibilidades de pesquisa. Desta forma, os primeiros passos a serem seguidos serão:

- Analisar a captação de glutamato frente a uma situação de injúria celular (isquemia *in vitro*) utilizando fatias de hipocampo de ratos com 10, 21 e 60 dias, 15 e 26 meses.
- Testar o efeito neuroprotetor, principalmente da guanosina, e de alguns outros candidatos a neuroprotetores utilizados neste departamento, como o resveratrol e os agonistas metabotrópicos de grupo II, frente a esta situação de injúria.
- Quantificar e verificar a expressão dos transportadores de glutamato em diversos tempos após a isquemia e em diferentes idades, enfatizando ratos imaturos (10 dias), ratos adultos jovens (60 dias) e ratos muito velhos (26 meses), analisando um possível efeito neuroprotetor da guanosina.
- Usando PDC e DHK (inibidores de transporte de glutamato), verificar se há dano neuronal e se esse dano é semelhante àquele causado pela isquemia *in vitro*; verificar se a alta concentração de glutamato extracelular induzida por estes inibidores alteraria a quantidade e a expressão dos transportadores de glutamato; e ainda, verificar se a guanosina reverteria essas alterações.

- Comparar se há diferença na captação de glutamato quando se utiliza glicose ou outras fontes de energia como acetoacetato e lactato, por exemplo, no período de reperfusão pós-isquemia, e se estes substratos poderiam reverter a diminuição da captação causada pela isquemia *in vitro* analisando, também, o consumo destes substratos durante a reperfusão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amara, S. G., Fontana, A. C. K. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry International* 41: 313-318, 2002.

Anderson, C.M., Swanson, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14, 2000.

Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y. N., Murdoch, G. H., North, R. A., Amara, S. G. Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J. Biol. Chem.* 268: 15329-15332, 1993.

Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P., Amara, S. G. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* 14, 5559-5569, 1994.

Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P., Amara, S. G. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4155-4160, 1997.

Attwell, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. *Journal of Nutrition* 130: 1023S-1025S, 2000.

Ballerini, P., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., Caciagli, F. Influence of Ca²⁺ channel modulators on [³H]purine release from rat cultured glial cells. *Neurochem. Res.* 20: 627-634, 1995.

Battaglia, G., Bruno, V., Ngomba, R. T., Di Grezia, R., Copani, A., Nicoletti, F. Selective activation of group-II metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *European Journal of Pharmacology* 356: 271-274, 1998.

Bennett, M. R., Balcar, V. J. Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochemistry International* 35: 269-280, 1999.

Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., Diemer, N. H. Elevation of the extracellular concentration of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43: 1369-1374, 1984.

Brew, H., Attwell, D. Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axoloti retinal glial cells. *Nature* 327: 707-709, 1987.

Brewer, G.J. Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging. *Experimental Gerontology* 35: 1165-183, 2000.

Bruno, V., Sureda, F. X., Storto, M., Casabona, G., Caruso, A., Knopfel, T., Kuhn, R., Nicoletti, F. The neuroprotective activity of group-II metabotropic glutamate receptors requires new protein synthesis and involves a glial-neuronal signaling. *The Journal of Neuroscience* 17 (6): 1891-1897, 1997.

Caciagli, F., Di Iorio, P., Giuliani, P., Middlemiss, P. J., Rathbone, M. P. The neuroprotective activity of guanosine involves the production of trophic factors and the outflow of purines from astrocytes. *Drug Dev. Res.* 50: 32, 2000.

Chaudhry, F. A., Lehre, K. P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O. P., Danbolt, N. C., Strom-Mathisen, J. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15: 711-720, 1995.

Chen, Y., Swanson, R.A. Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23: 137-149, 2003.

Choi, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634, 1988.

Christensen, H., Fonnum, F. The ontogeny of the uptake systems for glutamate, GABA and glycine in synaptic vesicles isolated from rat brain. *Neurochem. Res.* 71: 457-462, 1992.

Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., Dálimente, I., Ballerini, P., Caciagli, F., Rathbone, M.P. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia / hypoglycemia. *Glia* 25: 93-98, 1999.

Ciccarelli, R., Di Iorio, P., D'Alimonte, I., Giuliani, P., Florio, T., Caciagli, F., Middlemiss, P. J., Rathbone, M. P. Cultured astrocytes proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 29: 202-211, 2000.

Cobo, M., Expósito, I., Porras, A, Mora, F. Release of amino acid neurotransmitters in different cortical áreas of conscious adult and aged rats. *Neurobio. Aging* 13: 705-709, 1992.

Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J. D., Meloni, M. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and GABAergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 8: 108-116, 1998.

Corsi, C., Melani, A., Bianchi, L., Pepeu, G., Pedata, F. Striatum A_{2A} adenosine receptors differently regulate spontaneous and K⁺-evoked glutamate release in vivo in Young and aged rats. *NeuroReport* 10: 687-691, 1999.

Cotman, C. W., Foster, A., Lanthorn, T. An overview of glutamate as a neurotransmitter. *Ad. Biochem. Psychopharmacol.* 27: 1-27, 1981.

Cotman. C. W., Kahle, J. S., Miller, S. E., Ulas, J., Bridges, R. J. Excitatory aminoacid neurotransmission. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*, Cap. 7, pp 75-85. Eds. Bloom & Kupfer, raven Press, New York, 1995.

Cotrina, M. L., Nedergaard, M. Astrocytes in the aging brain. *Journal of Neuroscience Research* 67: 1-10, 2002.

Danbolt, N.C., Chaudhry, F.A., Dehnes, Y., Lehre, K.P., Levy, L.M., Ullensvang, K., Storm-Mathisen, J. Properties and localization of glutamate transporters. *Progress in Brain Research* 116: 23-43, 1998.

Danbolt, N.C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1-105, 2001.

Dawson R., Jr, Wallace D. R., Meldrum, M. J. Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 10: 665-668, 1989.

Dawson, R., Jr, Wallace, D. R. Kainic acid-induced seizure in aged rats: neurochemical correlates. *Brain Res. Bull.* 29: 459-468, 1992.

Dehnes, Y., Chaudhry, F. A., Ullensvang, K., Lehre, K. P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N. C. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J. Neurosci.* 18: 3606-3619, 1998.

Donzanti, B. A., Hite, J. F., Yamamoto, B. K. Extracellular glutamate levels increase with age in the lateral striatum-potential involvement of presynaptic D-2 receptors. *Synapse* 13: 378-382, 1993.

Edmonds, B., Gibb, A. J., Colquhoun, D. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 495-519, 1995.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375: 599-603, 1995.

Freeman, G. B., Gibson, G. E. Selective alteration of mouse brain neurotransmitter release with age. *Neurobiol. Aging* 8: 147-152, 1987.

Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Dahm, K.C.S., Prokopiuk, A.S., Swanson, R., Souza, D.O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 12(4): 1-3, 2001.

Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Prokopiuk, A.S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22(3): 353-363, 2002.

Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *The Journal of Neuroscience* 17(21): 8363-8375, 1997a.

Furuta, A. Martin, L. J., Lin, C. L., Dykes-Hoberg, M., Rothstein, J. D. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* 81: 1031-1042, 1997b.

Gallo, V., Russell, J. T. Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions? *Journal Neurosci. Res.* 42 (1): 1-8, 1995.

Gallo, V., Ghiani, C. A. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends in Pharmacology* 21: 252-258, 2000.

Gegelashvili, G., Schousboe, A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Research Bulletin* 45(3): 233-238, 1998.

Ghauri, M., Chapman, A. G., Meldrum, B. S. Convulsant and anticonvulsant actions of agonists and antagonists of group III mGluRs. *Neuropharmacology and Neurotoxicology* 7 (9): 1469-1474, 1996.

Gilad, G. M., Gilad, V. H., Tizabi, Y. Aging and stress-induced changes in choline and glutamate uptake in hippocampus and septum of two rat strains differing in longevity and reactivity to stressors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8: 709-713, 1990.

Gottfried, C., Tramontina, F., Gonçalves, D., Gonçalves, C.A., Moriiguchi, E., Dias, R.D., Wofchuk, S.T., Souza, D.O. Glutamate uptake in cultures astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mechanisms of Ageing and Development* 123: 1333-1340, 2002.

Gudermann, T., Schöneberg, T., Schultz, G. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 20: 399-427, 1997.

Haugeto, Ø., Ullensvang, K., Levy, L. M., Chaudhry, F. A., Honoré, T., Nielsen, M. Lehre, K. P., Danbolt, N. C. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J. Biol. Chem.* 271: 27715-27722, 1996.

Henrich-Noack, P., Reymann, K. G. (1*S*,3*R*)-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist, enhances damage after global ischemia. *European Journal of Pharmacology* 365: 55-58, 1999.

Hofmann, K., Duker, M., Fink, T., Lichter, P., Stoffel, W. Human neutral amino acid transporter ASCT1: structure of the gene (SLC1a4) and localization to chromosome 2p13-p15. *Genomics* 24: 20-26, 1994.

Hu, W., Walters, W.M., Xia, X., Karmally, S.A., Bethea, J.R. Neuronal glutamate transporter EAAT4 is expressed in astrocytes. *Glia* 44: 13-25, 2003.

Ikonomidou, C., Price, M. T., Mosinger, J. L., Friedrich, G., Labruyere, J., Salles, K. S., Olney, J. W. Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain. *J. Neurosci.* 9: 1693-1700, 1989.

Ingram, E.M., Wiseman, J. W., Shoshi, T., Emson, P.C. Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of EL mouse. *Journal of Neurochemistry* 79: 564-575, 2001.

Izquierdo, I., Medina, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68: 285-316, 1997.

Johnson, J. W., Ascher, P. Equilibrium and kinetic study of glycine action on the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured mouse brain neurons *J. Physiol.* 455: 339-365, 1992.

Kanai, Y., Hediger, M. A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471, 1992.

Kanai, Y., Stelzner, M., Nussberger, S., Khawaja, S., Hebert, S. C., Smith, C. P., Hediger, M. A. The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter – insights into structure and mechanism of transport. *J. Biol. Chem.* 269: 20599-20606, 1994.

Klöckner, U., Storck, T., Conrath, M., Stoffel, W. Electrogenic L-glutamate uptake in *Xenopus laevis* oocytes expressing a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST-1). *J. Biol. Chem.* 268: 14594-14596, 1993.

Komuro, H., Rakic, P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260: 95-97, 1993.

Lara, D.R., Schmidt, A.P., Frizzo, M.E.S., Burgos, J.S., Ramirez, G., Souza, D.O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Research* 912: 176-180, 2001.

Lehre, K. P., Levt, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N. C. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15: 1835-1853, 1995.

Lehre, K. P., Davanger, S., Danbolt, N. C. Localization of the glutamate transporters protein GLAST in rat retina. *Brain Res.* 744: 129-137, 1997.

Lehre, K. P., Danbolt, N. C. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 18: 8751-8757, 1998.

Levy, L.M., Lehre, K.P., Walaas, S.I., Storm-Mathise, J., Danbolt, N.C. Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2036-2041, 1995.

Levy, L. M., Warr, O., Attwell, D. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J. Neurosci.* 19: 9620-9628, 1998.

Lipton, S. A., Rosemberg, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *The New Eng. J. Med.* 330: 613-622, 1994.

Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 79 (4): 1431-1568, 1999.

Maragakis, N. J., Rothstein, J. D. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58 (3): 365-370, 2001.

Massieu, L., Tapia, R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in Young and aged rats in vivo. *Journal of Neurochemistry* 69: 1151-1160, 1997.

Mattson, M.P., Chan, S.L., Duan, W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiology Rev.* 82: 637-672, 2002.

McDonald, J. W., Johnston, M. V. Physiological and patophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Progress in Neurobiology* 28: 197-276, 1990.

Meldrum, B., Garthwaite, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacology* 11: 379-387, 1990.

Meldrum, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition* 130: 1007S-1015S, 2000.

Meldrum, M. J., Glenton, P., Dawson, R., Jr. [³H]D-aspartic acid release in brain slices of adult and aged Fisher 344 rats. *Neurochem. Res.* 7: 151-156, 1992.

Naito, S., Ueda, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44: 99-109, 1985.

Najerahim, A., Francis, P.T., Bowen, D.M. Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiol. Aging* 11: 155-158, 1990.

Neary, J.T., Rathbone, M.P., Cattabeni, F., Abbracchio, M.P., Burnstock, G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends in Neuroscience* 19(1): 13-18, 1996.

Nedergaard, M. Takano, T., Hansen, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature* 3: 748-755, 2002.

Nicoletti, F., Bruno, V., Copani, A., Casabona, G., Knöpfel, T. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends in Neuroscience* 19 (7): 267-271, 1996.

Nicoletti, F., Bruno, V., Catania, M. V., Battaglia, G., Copani, A., Barbagallo, G., Cena, V., Sanchez-Pietro, J., Spano, P. F., Pizzi, M. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology* 38: 1477-1484, 1999.

Nicholls, D., Attwell, D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 462-468, 1990.

Nichols, N. R. Glial responses to steroids as markers of brain aging. *J. Neurobiol.* 40: 585-601, 1999.

Oka, A., Belliveau, M. J., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate – pharmacology, mechanisms, and prevention. *J. Neurosci.* 13: 1441-1453, 1993.

Oliveira, D. L., Horn, J. F., Rodrigues, J. M., Frizzo, M. E. S., Moriguchi, E., Souza, D. O., Wofchuk, S. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally-administered guanosine. *Artigo submetido à Brain Research*, 2003.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54: 581-618, 1998.

Palmer, A.M., Robichaud, P.J., Reiter, C.T. The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol. Aging* 15: 103-111, 1994.

Pearce, I. A., Cambray-Deakin, M. A., Bufgoyne, R. D. Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett.* 233: 143-147, 1987.

Pin, J. P., Duvoisin, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26, 1995.

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M. Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.L. Cloning and expression of rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360: 464-467. 1992.

Porras, A., Sanz, B., Mora, F. Dopamine-glutamate interactions in the prefrontal cortex of the conscious rat: studies on aging. *Mech. Aging Dev.* 99: 9-17, 1997.

Price, M.T., Olney, J.W., Haft, R. Age-related changes in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life Sci.* 28: 1365-1370, 1981.

Rabacchi, S., Bailly, Y., Delhay-Bouchaud, N., Mariani, J. Involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science* 256: 1823-1825, 1992.

Rathbone, M. P., Juurlink, B. H. Hippocampal neurons in vitro respond to extracellular guanosine and GTP with neurite outgrowth and branching. *Soc. Neurosci. 23rd Annual Meeting*, Washington, DC, Nov 7-12, 19:38 (Abstract 4.7), 1993.

Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A.R., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology* 59(6): 663-690, 1999.

Rauen, T., Kanner, B. I. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci. Lett.* 169: 137-140, 1994.

Rauen, T., Rothstein, J. D., Wassle, H. Defferential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res.* 286: 325-336, 1996.

Rema, V., Ebner, F. F. Postnatal changes in NMDAR1 subunit expression in the rat trigeminal pathway to barrel field cortex. *J. Comp. Neurol.* 367: 165-184, 1996.

Romano, C., Vandepol, A. N., O'Malley, K. L. Enhanced early developmental expression of the metabotropic glutamate receptor mglur5 in rat brain: protein, mRNA splice variants, and regional distribution. *J. Comp. Neurol.* 367: 403-412, 1996.

Rossi, D. J., Slater, N. T. The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology* 32: 1239-1248, 1993.

Rothman, S. M., Olney, J. W. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends in neuroscience* 10 (7): 299-302, 1987.

Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kunci, R.W. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725, 1994.

Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., Welty, D. F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686, 1996.

Saransaari, P., Oja, S.S. Age-related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mechanisms of Ageing and Development* 81: 61-71, 1995.

Schipper, H. M. Astrocytes, brain aging and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 17: 467-480, 1996.

Schmidt, W., Wolf, G. High-affinity uptake of L-[³H]glutamate and D-[³H]aspartate during postnatal development of the hippocampal formation: a quantitative autoradiographic study. *Exp. Brain Res.* 70: 50-54, 1988.

Schmitt, A., Asan, E. Puschel, B., Jons, T., Kugler, P. Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive *in situ* hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71: 989-1004, 1996.

Schmidt, A.P., Lara, D.R., Maraschin, J.F., Perla, A.S., Souza, D.O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Research* 864: 40-43, 2000.

Schoepp, D. D., Johnson, B. G., Salhoff, C. R., Wright, R. A., Goldsworthy, J. S., Baker, S. R. Second-messenger responses in brain slices to elucidate to novel glutamate receptors. *Journal Neuroscience Methods* 59: 105-110, 1995.

Schousboe, A., Lisy, V., Hertz, L. Postnatal alterations in effects of potassium on uptake and release of glutamate and GABA in rat brain cortex slices. *J. Neurochem.* 26: 1023-1027, 1976.

Schousboe, A. Transport and metabolism of glutamate and GBA in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* 22: 1-45, 1981.

Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H. S., Larsson, O. M., Bakken, I. J., Sonnewald, U. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21: 99-105, 1997.

Segovia, G., Del Arco, A., Mora, F. Effects of aging on the interaction between glutamate, dopamine and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *J. Neurochem.* 73: 2063-2072, 1999.

Segovia, G., Porrás, A., Del Arco, A., Mora, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mechanisms of Ageing and Development* 122: 1-29, 2001.

Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95: 316-321, 1998.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate / aspartate transporter from rat brain. *Neurobiology* 89: 10955-10959, 1992.

Strong, R., Samorajski, T., Gottesteld, Z. High-affinity uptake of neurotransmitters in rat neostriatum: effects of aging. *J. Neurochem.* 43: 1766-1768, 1984.

Swanson, R.A., Liu, J., Miller, J.W., Rothstein, J.D, Farrell, K., Stein, B.A., Longuemare, M.C. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *Journal of Neurosciences* 17: 932-940, 1997.

Tanaka, J., Ichikawa, R., Watanabe, M., Tanaka, K., Inoue, Y. Extra-junctional localization of glutamate transporter EAAT4 at excitatory Purkinje cell synapses. *Neuroreport* 8: 2461-2464, 1997.

Tabb, J. S., Kish, P. E., Vandyke, R., Ueda, T. Glutamate transport into synaptic vesicles – roles of membrane potential pH gradient, and intravesicular pH. *J. Biol. Chem.* 267: 15412-15418, 1992.

Traversa, U., Bombi, G., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Werstiuk, E. S., Rathbone, M. P. Specific [³H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *British Journal of Pharmacology* 135: 969-976, 2002.

Uemura, Y., Miller, J.M., Matson, W.R., Beal, M.F. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22: 1548-1553, 1991.

Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter protein GLAST and GLT. *European Journal of Neuroscience* 9: 1646-1655, 1997.

Vinadé, E. R., Schmidt, A P., Frizzo, M. E., Izquierdo, I., Elisabetsky, E., Souza, D. O. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.* 977: 97-102, 2003.

Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., Tanaka, K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10: 976-988, 1998.