

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

Joel Felipe Horn

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTE DE GLUTAMATO Na⁺-
DEPENDENTE EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA ADULTO**

Porto Alegre

2023

Joel Felipe Horn

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTE DE GLUTAMATO Na⁺-
DEPENDENTE EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA ADULTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Horn, Joel Felipe
AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTE DE GLUTAMATO
Na⁺DEPENDENTE EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA ADULTO / Joel
Felipe Horn. -- 2023.
31 f.
Orientador: Diogo Losch de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Captação de glutamato. 2. Peixe-zebra. 3. EAATs.
I. de Oliveira, Diogo Losch, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

À companheira da vida, minha esposa Lúcia e aos frutos
deste amor, nossos filhos Natália, Isadora e Heitor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jair (in memorian) e Dulce por todo auxílio, cuidado e amor dedicados a mim e a Carina.

À minha irmã Carina por toda torcida e apoio.

Aos colegas do Laboratório 24, pelo companheirismo e aprendizado compartilhado, em especial a Kamila, Suelen e Thainá, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador e amigo Diogo, pelo incentivo, confiança, paciência e conselhos prestados na realização desta dissertação.

Aos meus filhos Natália, Isadora e Heitor por serem o motivo de eu buscar ser sempre a minha melhor versão.

À minha esposa Lúcia, pela cumplicidade, compreensão, auxílio e amor dedicados à nossa família.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório em cérebro de mamíferos e está envolvido em inúmeros eventos fisiológicos e patológicos. Um dos papéis mais importantes dos astrócitos é a remoção deste neurotransmissor através de transportadores específicos para glutamato (os EAATs), prevenindo a excitotoxicidade. A descoberta de novos fármacos capazes de exercer efeitos modulatórios sobre a atividade e/ou expressão dos EAATs ainda é emergente, visando condições nas quais os EAATs desempenham papel regulador chave no processo de patogênese (como déficit de atenção e hiperatividade, depressão, epilepsia, Alzheimer). Neste contexto, o peixe-zebra emergiu como um novo modelo animal para descoberta de novos fármacos, bem como modelo para doenças neurodegenerativas, complementando os estudos em roedores principalmente pela praticidade de tiragens em larga escala. Apesar dos avanços no estudo da sinalização glutamatérgica em peixe-zebra, a avaliação da funcionalidade dos transportadores ainda carece de literatura científica. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil da captação de glutamato e a funcionalidade dos EAATs nas diferentes estruturas cerebrais de peixe-zebra. Foram obtidas as regiões encefálicas por dissecação (telencéfalo, teto óptico e cerebelo), que foram incubadas com substrato (0,1, 1, 10, 100 e 1000 μM), ou ouabaína 0,1 μM , ou PDC (0,01, 0,1, 1, 10, 50 e 100 μM), ou TBOA (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 μM). O telencéfalo apresentou um valor de $V_{\text{máx}}$ de 2,324 nmol de glu/min.mg de proteína e um K_m aparente de 539,7 μM . O teto óptico apresentou um valor de $V_{\text{máx}}$ de 2,210 nmol de glu/min.mg de proteína e um K_m aparente de 740,5 μM , enquanto o cerebelo apresentou um valor de $V_{\text{máx}}$ de 2,241 nmol de glu/min.mg de proteína e o valor de K_m aparente de 763,4 μM . A inibição da captação de glutamato na presença de 0,1 μM de ouabaína foi de 86% em telencéfalo, 89% em teto óptico e 91% em cerebelo. O inibidor PDC apresentou um IC_{50} de 5,287 μM para telencéfalo, 18,99 μM para teto óptico e 15,30 μM para cerebelo. Já o TBOA apresentou um IC_{50} de 4,53 μM para telencéfalo, 16,06 μM para teto óptico e 0,1 μM para cerebelo. Conclui-se que a captação sódio dependente apresenta particularidades de acordo com a região avaliada e que telencéfalo e cerebelo são regiões que podem ser estudadas com enfoque mais translacional por mimetizarem a diferença de potência dos inibidores observada em roedores.

ABSTRACT

The glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the mammalian brain and is involved in several physiological and pathological events. One of the most important roles of astrocytes is the removal of this neurotransmitter through specific transporters (the EAATs), preventing excitotoxicity. The discovery of new drugs capable of modulating the activity and/or expression of EAATs is still emerging, targeting conditions in which EAATs play a key regulatory role in the pathogenesis process (such as attention deficit hyperactivity disorder, depression, epilepsy, Alzheimer's disease). In this context, the zebrafish has emerged as a new animal model for drug discovery and neurodegenerative diseases, complementing studies in rodents, due to the practicality of large-scale experiments. Despite advances in the study of glutamatergic signaling in zebrafish, the evaluation of transporter functionality still lacks scientific literature. Therefore, the aim of this study was to assess the glutamate uptake profile and the functionality of EAATs in different zebrafish brain structures. Brain regions (telencephalon, optic tectum, and cerebellum) were obtained by dissection and incubated with substrate (0.1, 1, 10, 100, and 1000 μM), ouabain 0.1 μM , PDC (0.01, 0.1, 1, 10, 50, and 100 μM), or TBOA (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 μM). The telencephalon showed a V_{max} value of 2.324 nmol of glu/min.mg of protein and an apparent K_m of 539.7 μM . The optic tectum showed a V_{max} value of 2.210 nmol of glu/min.mg of protein and an apparent K_m of 740.5 μM , while the cerebellum showed a V_{max} value of 2.241 nmol of glu/min.mg of protein and an apparent K_m of 763.4 μM . The inhibition of glutamate uptake in the presence of 0.1 μM ouabain was 86% in the telencephalon, 89% in the optic tectum, and 91% in the cerebellum. The PDC inhibitor had an IC_{50} of 5.287 μM for the telencephalon, 18.99 μM for the optic tectum, and 15.30 μM for the cerebellum. TBOA showed an IC_{50} of 4.53 μM for the telencephalon, 16.06 μM for the optic tectum, and 0.1 μM for the cerebellum. In conclusion, sodium-dependent uptake has peculiarities depending on the evaluated region, and the telencephalon and cerebellum are regions that can be studied with a more translational focus, mimicking the potency difference of inhibitors observed in rodents.

Lista de abreviaturas

AMPARs – receptores amino-3-hidroxi-S-metil-isoxazol-4-propionato

EAATs – transportadores de aminoácidos excitatórios

GABA – ácido γ -aminobutírico

iGluRs – receptores glutamatérgicos ionotrópicos

KARs – receptores kainato

mGluRs – receptores glutamatérgicos metabotrópicos

NMDARs – receptores N-metil-D-aspartato

PDC – ácido pirrolidínico dicarboxílico

SNC – Sistema Nervoso Central

TBOA - theo-beta-benziloxiaspartato

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1. Neurotransmissão glutamatérgica | 9 |
| 1.2. Expressão, distribuição e propriedades dos transportadores de glutamato | 10 |
| 1.3. Modulação da atividade dos EAATs | 11 |
| 1.4. O peixe-zebra como modelo experimental em neurociência | 12 |
| 1.5. Neurotransmissão glutamatérgica em peixe-zebra | 13 |
| 1.5.1. Transportadores de glutamato Na⁺-dependentes (EAATs) em peixe-zebra | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1. Objetivo geral | 16 |
| 2.2. Objetivos específicos | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 3.1. Animais | 17 |
| 3.2. Captação de glutamato | 17 |
| 3.3. Curva de substrato | 17 |
| 3.4. Efeito do bloqueio da Na⁺/K⁺ ATPase sobre a atividade dos transportadores de glutamato | 18 |
| 3.5. Efeito de bloqueadores de EAATs sobre a captação de glutamato | 18 |
| 3.6. Análise dos dados | 18 |
| 4. RESULTADOS | 19 |
| 5. DISCUSSÃO | 22 |
| 6. CONCLUSÕES | 24 |
| 7. REFERÊNCIAS | 25 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neurotransmissão glutamatérgica

O sistema glutamatérgico é o principal sistema de neurotransmissão excitatório no cérebro de mamíferos e está envolvido em inúmeros eventos fisiológicos, tais como memória e aprendizado (Izquierdo and Medina, 1997), desenvolvimento e envelhecimento (Segovia et al., 2001), proliferação e migração celular (McDonald and Johnston, 1990). Além disso, o glutamato está envolvido em diversas patologias do sistema nervoso central (SNC), sendo responsável por eventos de excitotoxicidade e morte celular (Hoffmann et al., 2004; Matsui et al., 2005; Nedergaard et al., 2002; Pal, 2018).

A síntese do glutamato é realizada a partir de precursores locais, uma vez que este neurotransmissor não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Schousboe et al., 1997). Seu principal precursor é o aminoácido glutamina, sintetizado nos astrócitos e transportado para os neurônios através de um sistema de transporte de aminoácidos neutros. A glutamina é então desaminada pela ação da enzima glutaminase e seu produto, o glutamato, é posteriormente estocado em vesículas, onde sua concentração pode chegar a 100 mM (Nedergaard et al., 2002). A outra forma de síntese do glutamato é a partir da transaminação do intermediário do ciclo de Krebs α -cetoglutarato (Schousboe et al., 1997).

A neurotransmissão glutamatérgica é decorrente da interação precisa entre o neurotransmissor e seus receptores pré e pós-sinápticos. Assim, para que a neurotransmissão glutamatérgica ocorra, as vesículas de glutamato liberam o seu conteúdo na fenda sináptica e o neurotransmissor se liga aos receptores expressos especificamente na superfície celular, os quais podem ser de dois tipos: receptores ionotrópicos (iGluRs) e/ou metabotrópicos (mGluRs). Existem três tipos de receptores ionotrópicos já identificados: kainato (KARs), amino-3-hidroxi-S-metil-isoxazol-4-propionato (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDARs). Os KAR têm funções diversas que dependem da localização subcelular e da composição das subunidades, o que resulta em distintos mecanismos de sinalização (Perrais et al., 2010). Já os iGluRs do tipo AMPA e NMDA medeiam a maior parte da transmissão glutamatérgica cerebral. Os AMPARs são os principais mediadores da transmissão excitatória rápida e são, na maioria das sinapses, co-expressos com os NMDARs (Cotman et al., 1988; Fan et al., 2014).

Para encerrar a neurotransmissão glutamatérgica, bem como manter os níveis extracelulares de glutamato abaixo daqueles considerados tóxicos (entre 1 e 10 μM), este neurotransmissor necessita ser removido da fenda sináptica por um mecanismo de transporte de alta afinidade dependente de sódio. Tanto astrócitos quanto neurônios expressam proteínas denominadas de transportadores de aminoácidos excitatórios – EAATs (Excitatory Amino Acid Transporters), as quais removem o glutamato da fenda sináptica de forma rápida e eficiente (Danbolt, 2001; McKenna, 2007; McKenna, 2013). Uma disfunção neste sistema pode causar um acúmulo de neurotransmissor na fenda sináptica e conseqüentemente uma excessiva ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (principalmente do tipo NMDA), levando o neurônio a morte por excitotoxicidade.

1.2. Expressão, distribuição e propriedades dos transportadores de glutamato

Os transportadores de glutamato são proteínas de membrana pertencentes à família SLC1, consensualmente denominadas de transportadores de aminoácidos excitatórios – EAATs (Arriza et al., 1993). Os EAATs são proteínas integrais de membrana e estão localizados na superfície celular de astrócitos e neurônios. Foram identificados até o presente momento 5 subtipos de EAATs, denominados de EAAT 1-5 (Arriza et al., 1994; Fairman et al., 1995; Pines et al., 1992). Estes transportadores diferem entre si pela sua estrutura, capacidade de transporte, afinidade pelo substrato, níveis de expressão, distribuição e localização subcelular no SNC (Rose et al., 2018; Zhou and Danbolt, 2014).

EAAT1 é seletivamente expresso em astrócitos ao longo de todo o SNC de mamíferos (Lehre et al., 1995) (Rothstein et al., 1994; Schmitt et al., 1997). O *knockout* para EAAT1 em camundongos não impede o desenvolvimento dos animais, porém resulta em alterações no comportamento social e na coordenação motora (Karlsson et al., 2009; Watase et al., 1998). Além disso, menores níveis deste transportador estão associados com o aumento na duração e severidade de crises convulsivas, apesar de não serem os causadores destas (Danbolt, 2001).

O EAAT2 é predominantemente expresso em astrócitos e é o único transportador essencial para a sobrevivência e desenvolvimento dos animais (Danbolt, 2001). Este transportador representa cerca de 1% do total de proteínas no cérebro maduro, sendo em torno de 4 vezes mais expresso que o EAAT1 no hipocampo e 6 vezes no cerebelo. Além disso, o EAAT2 é responsável por 95% de toda a captação de glutamato em cérebro de rato adulto (Danbolt et al., 1993; Lehre and Danbolt, 1998).

O EAAT3 é um transportador encontrado exclusivamente em neurônios, sendo expresso em maiores níveis no hipocampo e no neocórtex (Holmseth et al., 2012; Rothstein et al., 1994). O EAAT4 é predominantemente encontrado em células de Purkinje no cerebelo e o EAAT5 em células da retina, os quais não são muito eficientes como transportadores, mas sim como canais de cloreto, atribuindo-se a eles uma importante função inibitória em sinapses glutamatérgicas (Arriza et al., 1997; Dehnes et al., 1998).

O transporte de glutamato mediado pelos EAAT1-3 é acoplado ao co-transporte de 3 íons Na^+ e 1 H^+ e ao contra-transporte de 1 K^+ (Levy et al., 1998; Owe et al., 2006; Zerangue and Kavanaugh, 1996). Adicionalmente, a ligação do substrato aos EAATs induz um fluxo de Cl^- através do transportador (Vandenberg et al., 1995), o qual é particularmente importante para os EAATs expressos em neurônios. A ativação desta propriedade de canal de Cl^- gera uma hiperpolarização na membrana neuronal, reduzindo assim a liberação de glutamato pré-sináptico. Além do L-glutamato, os EAATs transportam D- ou L-aspartato com afinidade similar; porém não são capazes de transportar D-glutamato.

1.3. Modulação da atividade dos EAATs

A atividade dos EAATs pode ser modulada por inúmeros agentes endógenos ou exógenos, os quais podem ser classificados em dois principais grupos: os substratos inibidores e os bloqueadores. Os substratos inibidores mimetizam a estrutura do substrato endógeno e podem ser transportados pelos EAATs, prevenindo assim que o glutamato seja transportado. Por outro lado, os bloqueadores se ligam ao transportador, evitando que o glutamato se ligue, porém não podem ser eficientemente transportados (Vandenberg and Ryan, 2013).

O primeiro e mais estudado substrato inibidor é o D-aspartato. Ele é transportado pelos EAATs com eficácia similar aos substratos endógenos L-glutamato e L-aspartato (Fairman et al., 1995). Posteriormente, outros substratos inibidores não seletivos foram descobertos, como o treo- β -hidroxi aspartato, ácido cisteico e os derivados metilados do glutamato (4-metil-glutamato e treo-e-metil-glutamato) (Arriza et al., 1994; Balcar and Johnston, 1972). Além disso, compostos ácidos pirrolidínicos dicarboxílicos (PDCs) também são capazes de modular seletivamente os EAATs. Diferente dos derivados metilados do glutamato, os PDCs não apresentam atividade sobre os receptores glutamatérgicos, e podem ser eficientemente usados para o estudo dos EAATs. Especificamente o *L-trans-2,4-PDC* atua como substrato para EAAT1-4 e como

bloqueador de EAAT5 (Griffiths et al., 1994). Já o L-*trans*-2,3-PDC é cerca de 10 vezes mais potente em sua ação para EAAT2 atuando também como bloqueador deste transportador (Koch et al., 1999). Apesar de permitirem a avaliação da atividade dos EAATs, os substratos inibidores podem interagir com alguns receptores ou acumularem-se dentro da célula. Isto pode levar a inúmeras implicações, inclusive liberação de outros neurotransmissores.

A necessidade de aumentar a seletividade do bloqueio levou ao desenvolvimento do composto denominado DL-TBOA (DL-treo-beta-benziloxiaspartato). Este foi o primeiro composto capaz de bloquear todos os EAATs com pequena reatividade cruzada com receptores (Shimamoto et al., 1998; Shimamoto et al., 2007). Posteriormente, outros bloqueadores foram descobertos a fim de estudar cada um dos subtipos de EAATs: UCPH-101 (bloqueador de EAAT1), WAY-855 e WAY-213613 (bloqueadores de EAAT2), HIP-B (bloqueador de EAAT3), dentre outros (Dunlop et al., 2005; Dunlop, 2006; Funicello et al., 2004).

A descoberta de novos fármacos capazes de exercer efeitos sobre a atividade e/ou expressão dos EAATs ainda é emergente. Isto ocorre pelo seu potencial terapêutico como moduladores da neurotransmissão glutamatérgica, especialmente em déficit de atenção e hiperatividade, depressão, epilepsia, Alzheimer, dentre outras desordens do SNC (Jensen et al., 2015).

1.4. O peixe-zebra como modelo experimental em neurociência

O *Danio rerio*, conhecido no Brasil como paulistinha ou peixe-zebra, vem sendo amplamente utilizado como ferramenta para avaliação farmacológica e toxicológica (Baxendale et al., 2012). Este pequeno teleosteo, pertencente à família Cyprinidae, foi primeiramente utilizado para estudos de desenvolvimento embrionário na década de 60 (Grunwald and Eisen, 2002).

Algumas vantagens como o pequeno espaço requerido, o baixo custo de manutenção dos animais, a praticidade de obtenção de proles em larga escala e o fato de seus genes serem evolutivamente conservados (apresentando alto grau de similaridade com mamíferos), fizeram este modelo se difundir facilmente em outras áreas do conhecimento (Dahm and Geisler, 2006). Além disso, o peixe-zebra compartilha dos principais sistemas de neurotransmissores presentes nos outros vertebrados e, portanto, pode ser utilizado como um modelo para estudos envolvendo a fisiologia e patologia do SNC (Lieschke and Currie, 2007).

Entre os principais sistemas de neurotransmissores já estudados no peixe-zebra e parcialmente caracterizados, podemos citar os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, purinérgico, histaminérgico, nitrérgico, glutamatérgico, glicinérgico e gabaérgico (Horzmann and Freeman, 2016; Rico et al., 2011).

A figura abaixo ilustra uma linha do tempo com as principais descobertas em relação aos sistemas neurotransmissores em peixe-zebra (adaptado de Rico e al., 2011).

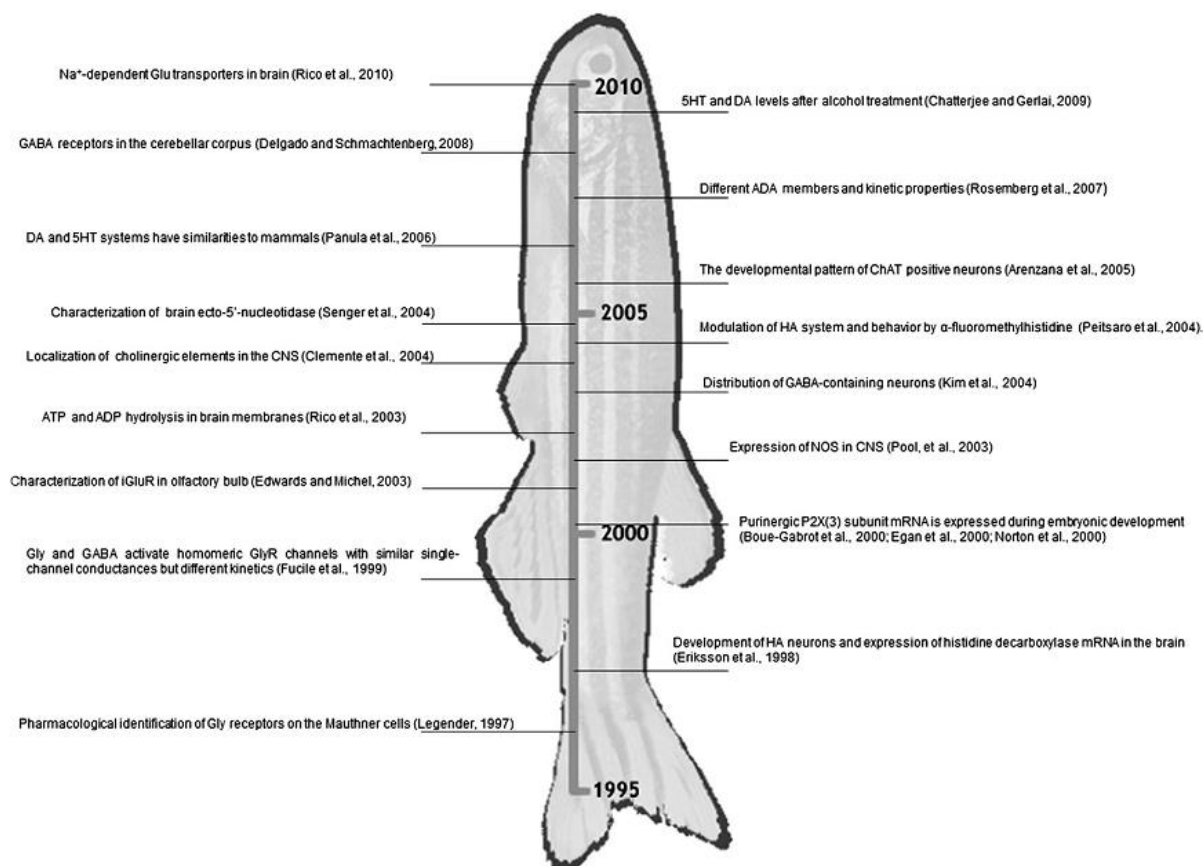


Fig. 1. Research hallmarks regarding neurotransmission in zebrafish. The timeline shows important studies related to proteins (enzymes, receptors, transporters) involved in neurotransmitter systems over the last few decades. Abbreviations: ADA, adenosine deaminase; ChAT, choline acetyltransferase; CNS, central nervous system; DA, dopamine; GABA, Gamma amino butyric acid; Gly, glycine; GlyR, glycine receptor; Glu, glutamate; HA, histamine; iGluR, ionotropic glutamate receptor; NOS, nitric oxide synthase; P2X(3), ionotropic purinergic receptor 3; 5HT, serotonin.

1.5. Neurotransmissão glutamatérgica em peixe-zebra

Existem inúmeros genes humanos importantes para a síntese, metabolismo e sinalização do glutamato, os quais apresentam genes parálogos e ortólogos em peixe-zebra. Existem dois parálogos para os transportadores vesiculares de glutamato SLC17A7 e SLC17A6 (*slc17a7a* e *slc17a7b*, e *slc17a6a* e *slc17a6b*, respectivamente), com apenas um ortólogo para SLC17A8 (*slc17a8*) (Dhanasiri et al., 2012). O peixe-zebra possui 8 genes parálogos que codificam subunidades de receptores do tipo AMPA, 6 genes que codificam subunidades do tipo KA e 13 genes que codificam subunidades de receptores NMDA (Cox et al., 2005; Hoppmann et al., 2008; Lin et al., 2006). A identificação de

neurônios glutamatérgicos em cérebros adultos de peixe-zebra é frequentemente feita com base na presença de proteínas relacionadas aos genes SLC17A6 e SLC17A7, embora as células gliais também expressem esses transportadores (Bezzi et al., 2004; Liguz-Leczna and Skangiel-Kramska, 2007).

Com relação aos transportadores de glutamato de alta afinidade Na⁺-dependentes (EAATs), até o presente momento 13 membros foram identificados em peixe-zebra (Gesemann et al., 2010; Rico et al., 2010).

1.5.1. Transportadores de glutamato Na⁺-dependentes (EAATs) em peixe-zebra

Poucos estudos até hoje visaram analisar os EAATs em peixe-zebra. Os genes da família SLC1 já foram investigados em peixe-zebra, e a maioria dos 7 ortólogos humanos tem um ou dois ortólogos em teleósteos. No entanto, para duas subfamílias SLC1 dos teleósteos, não foi encontrado nenhum correspondente em vertebrado terrestre. Isto indica que os vertebrados terrestres devem ter perdido estas duas subfamílias, agora denominadas SLC1A8/EAAT6 e SLC1A9/EAAT7. Estas duas subfamílias não são específicas do teleósteo, mas podem ser encontradas em diferentes vertebrados. Uma análise das principais linhagens de vertebrados revelou um padrão de perdas genéticas específicas da linhagem, moldando a história filogenética dos genes SLC1. Em todas as espécies de vertebrados não-humanos, foram encontrados pelo menos um membro das subfamílias SLC1A8/9 (por exemplo, os anfíbios não perderam o SLC1A8 nem o SLC1A9, enquanto as aves perderam o SLC1A9) (Gesemann et al., 2010). Análises como esta são úteis para guiar a interpretação dos dados sobre a funcionalidade destes genes e fornecem um cenário para estudar a evolução das famílias de genes em vertebrados.

Embora a identificação da família EAAT esteja bem estabelecida no SNC de mamíferos, e os genes relacionados com os EAAT em peixe-zebra tenham sido brevemente elucidados por (Gesemann et al., 2010), o perfil de expressão destes genes e a sua funcionalidade ainda não estão totalmente esclarecidos. Assim, o estudo de Rico et al., 2010 auxiliou na identificação e descrição do perfil de expressão dos genes relacionados com os EAATs, bem como avaliou algumas propriedades funcionais da captação de glutamato nas três principais estruturas cerebrais de peixe-zebra: telencéfalo, teto óptico e cerebelo.

Além da confirmação de sequências relacionadas com EAATs por uma análise filogenética, este foi o primeiro estudo a demonstrar o perfil de expressão de RNA mensageiro dos membros EAAT1, EAAT2, EAAT3 e EAAT5 em SNC de peixe-zebra.

EAAT2 e EAAT3 foram os transportadores de glutamato mais abundantemente expressos em todas as estruturas cerebrais estudadas. Uma expressão uniforme foi observada para EAAT1A, enquanto maiores níveis de transcrição de EAAT1B foram detectados no telencéfalo. Quantidades mais baixas de transcritos de EAAT1C foram observadas no cerebelo quando comparadas com outras estruturas. Nenhuma sequência relacionada com EAAT4 foi encontrada no genoma do peixe-zebra. A expressão de EAAT5A foi semelhante ao EAAT5B no telencéfalo, enquanto o EAAT5B foi menos expresso que o EAAT5A no teto óptico e no cerebelo. Além disso, a captação de glutamato foi significativamente maior no teto óptico, o que indica diferenças funcionais dentro das estruturas cerebrais do peixe-zebra. Além disso, foi demonstrado que as estruturas do cérebro do peixe-zebra têm a capacidade de transportar o glutamato de uma forma dependente do Na^+ , similar ao que ocorre em mamíferos terrestres (Rico et al., 2010).

Apesar dos avanços no estudo da sinalização glutamatérgica em peixe-zebra, as propriedades funcionais e farmacológicas dos transportadores de glutamato em cérebro de peixe-zebra ainda são desconhecidas. Além disso, o conhecimento mais aprofundado do perfil da captação de glutamato nas diferentes regiões encefálicas pode contribuir para a criação de novos modelos de doenças do SNC utilizando o peixe-zebra como organismo modelo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as propriedades funcionais e farmacológicas dos EAATs nas diferentes estruturas cerebrais de peixe-zebra adulto.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a captação de glutamato em diferentes concentrações de substrato.
- Avaliar se a captação de glutamato em cérebro de peixe-zebra é dependente da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase.
- Avaliar a captação de glutamato na presença de inibidores de transportadores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Peixe-zebra adultos de 3 a 6 meses de idade, de ambos os sexos, foram obtidos do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica e mantidos em tanques de 3 L (densidade de 5 animais/L) em sistemas recirculantes ActiveBlue® (Tecniplast, IT). A água foi mantida a $26 \pm 1^\circ \text{C}$, pH $7,0 \pm 1$ e condutividade $500 \pm 100 \text{ uS/cm}$. O ciclo claro/escuro foi de 10/14 h (luzes acendendo às 8h). Os animais foram alimentados com ração Zebrafeed® (Sparos, PT) quatro vezes ao dia (às 09:00, 12:00, 15:00 e 18:00h) até a saciedade. Todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes estipuladas nas Resoluções Normativas 34 (de 27 de julho de 2017) e 44 (de 01 agosto de 2019) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRGS; projeto nº 31720).

3.2. Captação de glutamato

Os animais foram eutanasiados por decapitação e o encéfalo foi removido. Foram utilizados o telencéfalo, teto óptico e cerebelo separadamente, de acordo com o protocolo previamente descrito por nosso grupo de pesquisa (Rico et al., 2010; Zenki et al., 2014). A captação total de glutamato foi realizada a 37°C em meio HBSS-Hepes. A captação não-dependente de Na^+ foi realizada em meio HBSS-HEPES livre de Na^+ , o qual foi substituído por N-metil-D-glucamina. As amostras foram pré-incubadas por 30 minutos e após foi adicionado L-glutamato (100 μM) + 0,33 uCi/mL de L-[H^3] glutamato. Após o período de incubação (5-7 minutos), as amostras foram duplamente lavadas com HBSS gelado e a captação foi interrompida com a adição de NaOH 0,5 N. O conteúdo intracelular de L-[H^3] glutamato foi determinado por cintilação. A captação de glutamato Na^+ -dependente foi calculada pela diferença entre a captação total e a captação em meio livre de Na^+ e foi expressa em $\text{nmol } [\text{H}^3]/\text{min.mg}$ de proteína. O conteúdo de proteína total foi determinado pelo método de Lowry modificado (Peterson (1977)).

3.3. Curva de substrato

As regiões encefálicas foram dissecadas e pré-incubadas durante 15 min com meio HBSS-Hepes. Posteriormente esse meio foi removido e foi adicionado HBSS-Hepes contendo glutamato não radioativo nas seguintes concentrações (0,1, 1, 10, 100 e 1000 μM) e L-[H^3] glutamato 0,33 $\mu\text{Ci/mL}$. Após o período de incubação (5-7 minutos), as amostras foram duplamente lavadas com HBSS gelado e a captação de glutamato foi

interrompida com a adição de NaOH 0,5 N. A captação de glutamato Na⁺-dependente foi determinada conforme descrito no item anterior.

3.4. Efeito do bloqueio da Na⁺/K⁺ ATPase sobre a atividade dos transportadores de glutamato

As regiões encefálicas foram dissecadas e pré-incubadas durante 15 min com meio HBSS-Hepes. Posteriormente esse meio foi removido e foi adicionado HBSS-Hepes contendo Ouabaína (0,1 µM). Quinze minutos após, o meio foi removido e foi adicionado HBSS-Hepes contendo glutamato não radioativo (100 µM), L-[H³] glutamato 0,33 Ci/mL e Ouabaína (0,1 µM). Após o período de incubação (5-7 minutos), as amostras foram duplamente lavadas com HBSS gelado e a captação de glutamato foi interrompida com a adição de NaOH 0,5 N. A captação de glutamato Na⁺-dependente foi determinada conforme descrito no item anterior.

3.5. Efeito de bloqueadores de EAATs sobre a captação de glutamato

As regiões encefálicas foram dissecadas e pré-incubadas durante 15 min com meio HBSS-Hepes. Posteriormente esse meio foi removido e foi adicionado HBSS-Hepes contendo PDC (0,01, 0,1, 1, 10, 50 e 100 µM) ou TBOA (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µM). Quinze minutos após, este meio foi removido e foi adicionado HBSS-Hepes contendo glutamato não radioativo (100 µM), L-[H³] glutamato 0,33 Ci/mL e PDC ou TBOA nas mesmas concentrações mencionadas acima. Após o período de incubação (5-7 minutos), as amostras foram duplamente lavadas com HBSS gelado e a captação de glutamato foi interrompida com a adição de NaOH 0,5 N. A captação de glutamato Na⁺-dependente foi determinada conforme descrito no item anterior.

3.6. Análise dos dados

Todos os resultados foram expressos como média seguido do intervalo de confiança 95% (CI 95%).

4. RESULTADOS

A Fig. 1 mostra o perfil da captação de glutamato Na^+ -dependente em telencéfalo, teto óptico e cerebelo de peixe-zebra adulto. A faixa de linearidade se estende de 0,1 a 100 μM de glutamato nas três regiões avaliadas, apresentando uma tendência à saturação em concentrações maiores. A captação de glutamato na concentração de 100 μM em telencéfalo foi de 0,361 nmol de glu/min.mg de proteína, 0,262 nmol de glu/min.mg para teto óptico e 0,258 nmol de glu/min.mg para cerebelo (Tabela 1).

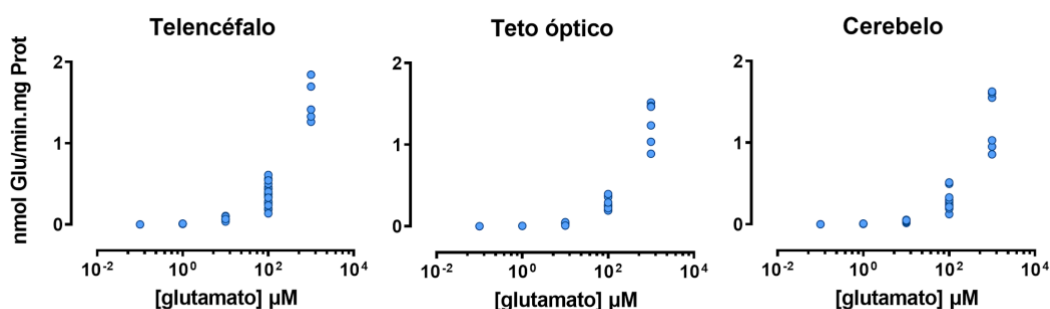


Fig. 1. Efeito de diferentes concentrações de substrato sobre a captação de glutamato nas diferentes regiões cerebrais de peixe-zebra adulto. (A) telencéfalo, (B) teto óptico e (C) cerebelo. $n = 9$ animais/concentração em 3 experimentos independentes.

Tabela 1. Estatística descritiva: valores de média, desvio padrão e intervalo de confiança (95%) do perfil de captação de glutamato nas diferentes regiões encefálicas de peixe-zebra adulto.

| [glutamato] μM | Telencéfalo | | | Teto óptico | | | Cerebelo | | |
|------------------------------|-------------|--------|--------------------|-------------|--------|--------------------|----------|--------|--------------------|
| | Média | sd | CI | média | sd | CI | média | sd | CI |
| 0,1 | 0,0007 | 0,0002 | 0,0005 a 0,0008 | 0,0004 | 0,0001 | 0,0002 a 0,0005 | 0,0007 | 0,0003 | 0,0005 a 0,0009 |
| 1 | 0,0064 | 0,0024 | 0,0044 a 0,0082 | 0,0045 | 0,0013 | 0,0035 a 0,0056 | 0,0066 | 0,0030 | 0,0043 a 0,0089 |
| 10 | 0,0742 | 0,0242 | 0,0556 a 0,0928 | 0,0316 | 0,0115 | 0,0227 a 0,0404 | 0,0421 | 0,0144 | 0,0310 a 0,0532 |
| 100 | 0,3614 | 0,1325 | 0,3026 a 4202 | 0,2629 | 0,0614 | 0,2356 a 0,2901 | 0,2588 | 0,0976 | 0,2131 a 0,3044 |
| 1000 | 1,5100 | 0,2499 | 1,1997 a 1,8204 | 1,2700 | 0,2616 | 0,9955 a 1,5446 | 1,2712 | 0,3610 | 0,8923 a 1,6501 |

A Tabela 2 mostra a análise da cinética michaeliana (velocidade vs concentração de substrato) da captação de glutamato Na^+ -dependente nas três regiões avaliadas. O telencéfalo apresentou um valor de $V_{\text{máx}}$ de 2,324 nmol de glu/min.mg de proteína e K_m aparente de 539,7 μM . Já para teto óptico, observamos um valor de $V_{\text{máx}}$ de 2,210 nmol de glu/min.mg de proteína e um K_m aparente de 740,5 μM . Em cerebelo o valor de $V_{\text{máx}}$ foi de 2,241 nmol de glu/min.mg de proteína e o valor de K_m aparente de 763,4 μM .

Tabela 2. Estatística descritiva: valores de média e intervalo de confiança (95%) dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m aparente nas diferentes regiões encefálicas de peixe-zebra. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando o GraphPad Prism 9.0.

| | $V_{m\acute{a}x}$ (nmol Glu/min.mg Prot) | CI | K_m aparente (μ M) | CI |
|--------------|--|---------------|---------------------------|---------------|
| Telencéfalo | 2,324 | 2,027 a 2,727 | 539,7 | 409,1 a 743,5 |
| Tecto óptico | 2,210 | 1,891 a 2,722 | 740,5 | 542,7 a 1092 |
| Cerebelo | 2,241 | 1,791 a 3,229 | 763,4 | 484,7 a 1470 |

A Fig. 2 mostra que a captação de glutamato é dependente do gradiente de sódio gerado pela atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase. A redução da captação de glutamato na presença de 0,1 μ M de ouabaína foi de 86% em telencéfalo, 89% em teto óptico e 91% em cerebelo.

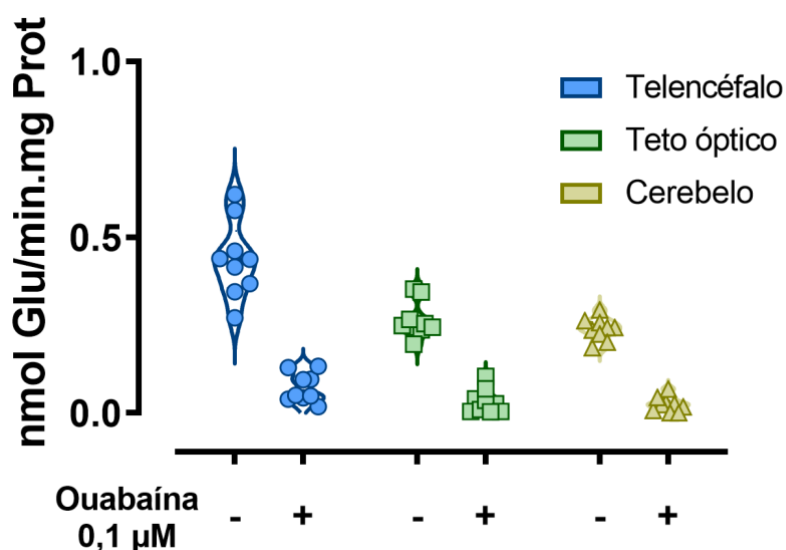


Fig. 2. Efeito do bloqueio da bomba Na^+/K^+ ATPase sobre a captação de glutamato nas diferentes regiões encefálicas de peixe-zebra adulto. n = 9 em 3 experimentos independentes.

Tabela 3. Estatística descritiva: valores de média, desvio padrão e intervalo de confiança (95%) da captação de glutamato na presença ou ausência de ouabaína.

| | Telencéfalo | | | Tecto óptico | | | Cerebelo | | |
|------------|-------------|-------|---------------|--------------|--------|---------------|----------|-------|---------------|
| | média | sd | CI | média | sd | CI | média | sd | CI |
| - ouabaína | 0,437 | 0,109 | 0,353 a 0,521 | 0,2652 | 0,0507 | 0,226 a 0,304 | 0,239 | 0,032 | 0,214 a 0,263 |
| + ouabaína | 0,072 | 0,042 | 0,040 a 0,105 | 0,0329 | 0,0346 | 0,006 a 0,059 | 0,024 | 0,022 | 0,007 a 0,041 |

A Fig. 3 mostra o efeito de diferentes inibidores (PDC e TBOA) sobre a captação de glutamato nas diferentes regiões cerebrais de peixe-zebra. O PDC reduziu, de forma expressiva, a captação de glutamato em telencéfalo a partir da concentração de 1 μ M. Já em teto óptico e cerebelo, a redução ocorreu a partir das concentrações de 100 e 50 μ M, respectivamente. A partir destas curvas de inibição, foi possível calcular os valores de IC_{50} para as diferentes regiões cerebrais (Tabela 4). Em telencéfalo, o IC_{50} para PDC

foi 5,287 μM (CI 95% = 0,394 a 30,96); para tecto óptico, o IC₅₀ foi de 18,99 μM (CI 95% = 11,91 a 36,83); e 15,30 μM (CI 95% = 4,49 a 74,62) para cerebelo.

Para o inibidor TBOA, houve uma redução expressiva da captação de glutamato a partir de 10 μM em telencéfalo, tecto óptico e cerebelo. O TBOA apresentou os seguintes valores de IC₅₀: 4,53 μM para telencéfalo (CI 95% = 0,341 a 16,15), 16,06 μM para tecto óptico (não foi possível calcular o CI 95% devido à grande variabilidade) e 0,1 μM para cerebelo (não foi possível calcular o CI 95% devido à grande variabilidade).

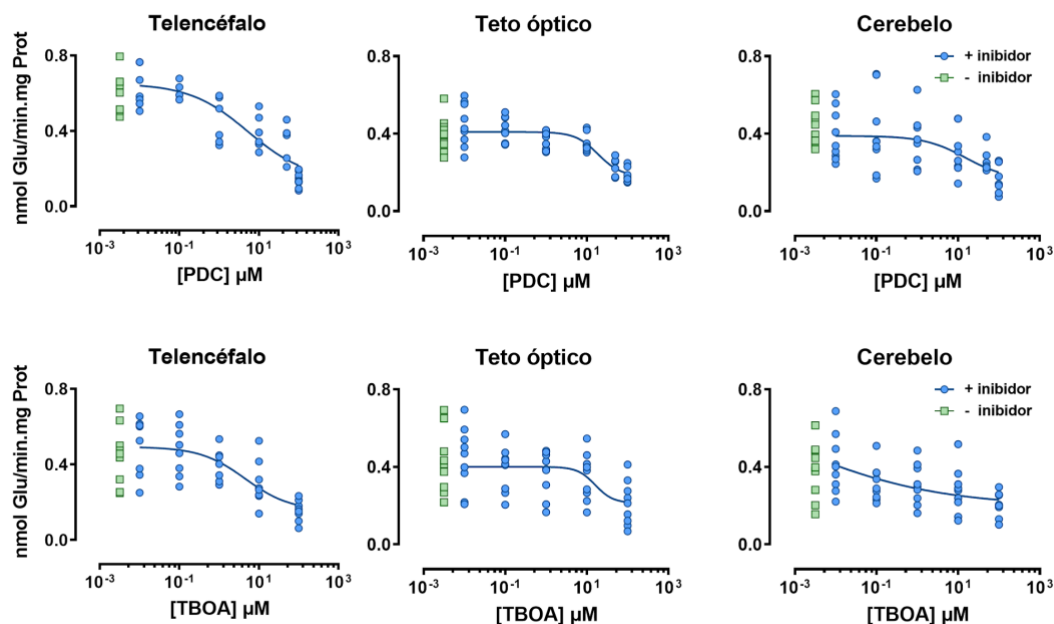


Fig. 3. Captação de glutamato na ausência (verde) ou presença (azul) dos inibidores PDC e TBOA nas regiões encefálicas de peixe-zebra. N = 9 em 3 experimentos independentes.

Tabela 4. IC₅₀ dos inibidores de EAATs nas diferentes regiões encefálicas.

| Região encefálica | PDC (μM) | TBOA (μM) |
|-------------------|-----------------------|------------------------|
| Telencéfalo | 5,287 | 4,53 |
| Tecto óptico | 18,99 | 16,06 |
| Cerebelo | 15,30 | 0,1 |

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o cérebro de peixe-zebra possui EAATs funcionais que realizam o transporte de glutamato de maneira sódio-dependente (Fig. 1). As três regiões cerebrais avaliadas apresentam a capacidade de captar o glutamato, demonstrando a distribuição extensiva dos EAATs e a importância do glutamato como neurotransmissor no cérebro de peixe-zebra. No cérebro de mamíferos, está bem esclarecido que a atividade dos EAATs é crucial para a manutenção do tônus fisiológico do sistema glutamatérgico, o qual desempenha um papel central em diversas funções cerebrais (Danbolt, 2001; Maragakis and Rothstein, 2006). O estudo de Rico *et al.* (2010) avaliou o perfil de expressão dos EAATs no cérebro de peixe-zebra e observou que existem genes diversos genes ortólogos aqueles encontrados em mamíferos. Os genes ortólogos EAAT1A, EAAT1B, EAAT1C e EAAT2 são amplamente expressos e distribuídos no cérebro do peixe-zebra, apresentando níveis consideráveis de transcritos para esses genes (Rico et al., 2010). Com base nestes resultados, estes autores também realizaram um ensaio preliminar para avaliar o perfil da captação de glutamato, a qual indicou a presença de proteínas funcionais nas diferentes regiões cerebrais de peixe-zebra.

A análise da cinética dos transportadores (Tabela 1) demonstrou que não há grandes variações no valor de $V_{\text{máx}}$ entre as diferentes regiões. Tendo em vista que o $V_{\text{máx}}$ pode refletir a quantidade total de proteínas funcionais, podemos inferir que não há grandes variações no número absoluto de EAATs funcionais entre as regiões estudadas. Em relação ao K_m aparente, nós observamos que o telencéfalo apresenta maior afinidade por glutamato, o qual foi seguido por teto óptico e cerebelo. Nestas duas últimas regiões, o K_m aparente se aproxima muito da última concentração de substrato utilizada nos ensaios, indicando sua baixa afinidade por glutamato frente ao telencéfalo. Na literatura, medições da captação de glutamato mediadas pelos diferentes subtipos de EAATs em células transfectadas produziram valores de K_m que variaram entre 48 e 97 μM (Arriza et al., 1994). Outros estudos mostram que o K_m dos EAATs em mamíferos pode variar de 5 μM a 5 mM, dependendo do tecido estudado, da técnica empregada e de outros fatores (Kanai and Hediger, 1992; O'Kane et al., 1999). Diferenças nos valores de K_m podem ser atribuídas ao sistema de estudo e ao método de quantificação empregado (K_m ou K_m aparente), diferenças na composição lipídica, modificações pós-traducionais e diferenças na expressão dos diferentes subtipos de EAATs (Arriza et al., 1994). Além disso, parece explícito que os transportadores de glutamato possam ter diferenças em suas propriedades cinéticas de acordo com a espécie estudada.

A terminação da sinalização glutamatérgica no cérebro é mediada pela captação de alta afinidade de glutamato, a qual é realizada principalmente por astrócitos, mas também neurônios. Os EAATs são proteínas transmembrana que, para exercerem sua função, dependem do gradiente de íons Na^+ gerado pela bomba Na^+/K^+ -ATPase (Rose et al., 2009). Nossos resultados mostraram que os EAATs de peixe-zebra têm sua atividade diretamente acoplada ao gradiente iônico deste íon, uma vez que o bloqueio da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase por ouabaína, reduziu drasticamente o transporte de glutamato (Fig. 2).

Neste estudo, mostramos também que os EAATs em cérebro de peixe-zebra podem ser farmacologicamente modulados por PDC e TBOA, inibidores competitivos do transporte de glutamato (Fig. 3). Ambos os inibidores reduziram a captação de glutamato nas 3 regiões estudadas. O inibidor PDC apresentou maior potência em telencéfalo, com ação semelhante em tecto óptico e cerebelo (Tabela 3). Já para o inibidor TBOA, o IC_{50} foi menor quando comparado ao PDC. Em telencéfalo e cerebelo, os valores de IC_{50} foram bastante baixos, demonstrando a maior potência do inibidor. Em cultura de astrócitos de mamíferos, ambos inibidores mostraram ser menos potentes do que em cérebro de peixe-zebra, sendo seus IC_{50} de 74,1 μM (PDC) e 40,6 μM (TBOA) (Anderson et al., 2001). A discrepância entre os valores pode ser em decorrência de que nossos valores foram obtidos em amostras de tecido, os quais apresentam maior diversidade de transportadores, o que levaria a uma ação farmacológica distinta. Apesar das diferenças nos valores absolutos de IC_{50} , é importante destacar que o TBOA é um inibidor mais potente que o PDC, conforme já descrito e relatado na literatura (Waagepetersen et al., 2001). Estas discrepâncias na farmacologia observadas de acordo com a região encefálica avaliada têm sido sugeridas como determinantes para existência de diferentes subtipos de transportadores de glutamato (Robinson et al., 1993), o que também estaria relacionado às diferentes propriedades cinéticas de cada região encefálica. Assim, estes resultados podem sugerir diferenças na expressão dos subtipos de EAATs ao longo das três regiões estudadas, refletindo-se em particularidades cinéticas e diferentes respostas farmacológicas na inibição do transporte de glutamato. Estes nossos achados contribuem para uma melhor compreensão do papel da sinalização glutamatérgica no encéfalo de peixe-zebra adulto, possibilitando novos desenhos experimentais e melhoria dos modelos com foco em excitotoxicidade e neuroproteção.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados desta dissertação foi possível concluir que os transportadores de glutamato presentes no cérebro de peixe-zebra apresentam a sua atividade dependentes do íon sódio, o qual é gerado pela atividade da bomba Na/K-ATPase.

Portanto, a atividade dos transportadores de glutamato no peixe-zebra é similar a dos mamíferos, demonstrando que eles operam como uma unidade funcional para regular a captação deste neurotransmissor, e conseqüentemente a sua neurotransmissão.

7. REFERÊNCIAS

- Anderson, C.M., Bridges, R.J., Chamberlin, A.R., Shimamoto, K., Yasuda-Kamatani, Y., Swanson, R.A., 2001. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J Neurochem.* 79, 1207-16.
- Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Fairman, W.A., Wu, Y.N., Murdoch, G.H., North, R.A., Amara, S.G., 1993. Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem.* 268, 15329-32.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci.* 14, 5559-69.
- 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, 4155-60.
- Baggio, S., Mussulini, B.H., de Oliveira, D.L., Zenki, K.C., Santos da Silva, E., Rico, E.P., 2017. Embryonic alcohol exposure promotes long-term effects on cerebral glutamate transport of adult peixe-zebra. *Neurosci Lett.* 636, 265-269.
- Bak, L.K., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem.* 98, 641-53.
- Balcar, V.J., Johnston, G.A., 1972. The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J Neurochem.* 19, 2657-66.
- Baraban, S.C., Taylor, M.R., Castro, P.A., Baier, H., 2005. Pentylentetrazole induced changes in peixe-zebra behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience.* 131, 759-68.
- Baxendale, S., Holdsworth, C.J., Meza Santoscoy, P.L., Harrison, M.R., Fox, J., Parkin, C.A., Ingham, P.W., Cunliffe, V.T., 2012. Identification of compounds with anti-convulsant properties in a peixe-zebra model of epileptic seizures. *Dis Model Mech.* 5, 773-84.
- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., Goldsmith, P., 2007. Peixe-zebra offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28.
- Bergles, D.E., Diamond, J.S., Jahr, C.E., 1999. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol.* 9, 293-8.
- Bezzi, P., Gunderson, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E., Volterra, A., 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 7, 613-20.
- Bridges, R.J., Esslinger, C.S., 2005. The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol Ther.* 107, 271-85.

- Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ganong, A.H., 1988. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 11, 61-80.
- Cox, J.A., Kucenas, S., Voigt, M.M., 2005. Molecular characterization and embryonic expression of the family of N-methyl-D-aspartate receptor subunit genes in the peixe-zebra. *Dev Dyn.* 234, 756-66.
- Dahm, R., Geisler, R., 2006. Learning from small fry: the peixe-zebra as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol (NY).* 8, 329-45.
- Danbolt, N.C., Hansen, T.W., Oyasoeter, S., Storm-Mathisen, J., Bratlid, D., 1993. In vitro binding of [3H]bilirubin to neurons in rat brain sections. *Biol Neonate.* 63, 35-9.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65, 1-105.
- Dehnes, Y., Chaudhry, F.A., Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1998. 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, 3606-19.
- Dhanasiri, A.K., Fernandes, J.M., Kiron, V., 2012. Glutamine synthetase activity and the expression of three glutamate paralogues in peixe-zebra during transport. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 163, 274-84.
- Dunlop, J., McIlvain, H.B., Carrick, T.A., Jow, B., Lu, Q., Kowal, D., Lin, S., Greenfield, A., Grosanu, C., Fan, K., Petroski, R., Williams, J., Foster, A., Butera, J., 2005. Characterization of novel aryl-ether, biaryl, and fluorene aspartic acid and diaminopropionic acid analogs as potent inhibitors of the high-affinity glutamate transporter EAAT2. *Mol Pharmacol.* 68, 974-82.
- Dunlop, J., 2006. Glutamate-based therapeutic approaches: targeting the glutamate transport system. *Curr Opin Pharmacol.* 6, 103-7.
- 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.
- Fan, X., Jin, W.Y., Wang, Y.T., 2014. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front Cell Neurosci.* 8, 160.
- Ferkany, J., Coyle, J.T., 1986. Heterogeneity of sodium-dependent excitatory amino acid uptake mechanisms in rat brain. *J Neurosci Res.* 16, 491-503.
- Funicello, M., Conti, P., De Amici, M., De Micheli, C., Mennini, T., Gobbi, M., 2004. Dissociation of [3H]L-glutamate uptake from L-glutamate-induced [3H]D-aspartate release by 3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-4-carboxylic acid and 3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-6-carboxylic acid, two conformationally constrained aspartate and glutamate analogs. *Mol Pharmacol.* 66, 522-9.
- Gesemann, M., Lesslauer, A., Maurer, C.M., Schonhaler, H.B., Neuhauss, S.C., 2010. Phylogenetic analysis of the vertebrate excitatory/neutral amino acid transporter (SLC1/EAAT) family reveals lineage specific subfamilies. *BMC Evol Biol.* 10, 117.

- Goldsmith, P., 2004. Peixe-zebra as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 4, 504-12.
- Griffiths, R., Dunlop, J., Gorman, A., Senior, J., Grieve, A., 1994. L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate and cis-1-aminocyclobutane-1,3-dicarboxylate behave as transportable, competitive inhibitors of the high-affinity glutamate transporters. *Biochem Pharmacol.* 47, 267-74.
- Grunwald, D.J., Eisen, J.S., 2002. Headwaters of the peixe-zebra -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet.* 3, 717-24.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Peixe-zebra as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 86, 6-19.
- Hoffmann, A.F., Zhao, Q., Holmes, G.L., 2004. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". *Epilepsy Behav.* 5, 873-7.
- Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y.H., Follin-Arbelet, V.V., Grutle, N.J., Mylonakou, M.N., Plachez, C., Zhou, Y., Furness, D.N., Bergles, D.E., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 2012. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J Neurosci.* 32, 6000-13.
- Hoppmann, V., Wu, J.J., Soviknes, A.M., Helvik, J.V., Becker, T.S., 2008. Expression of the eight AMPA receptor subunit genes in the developing central nervous system and sensory organs of peixe-zebra. *Dev Dyn.* 237, 788-99.
- Horzmann, K.A., Freeman, J.L., 2016. Peixe-zebra Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. *Toxics.* 4.
- Ingham, P.W., 2009. The power of the peixe-zebra for disease analysis. *Hum Mol Genet.* 18, R107-12.
- 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.
- Jensen, A.A., Fahlke, C., Bjorn-Yoshimoto, W.E., Bunch, L., 2015. Excitatory amino acid transporters: recent insights into molecular mechanisms, novel modes of modulation and new therapeutic possibilities. *Curr Opin Pharmacol.* 20, 116-23.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360, 467-71.
- Kari, G., Rodeck, U., Dicker, A.P., 2007. Peixe-zebra: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther.* 82, 70-80.
- Karlsson, R.M., Tanaka, K., Saksida, L.M., Bussey, T.J., Heilig, M., Holmes, A., 2009. Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1)-deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 34, 1578-89.

- Koch, H.P., Kavanaugh, M.P., Esslinger, C.S., Zerangue, N., Humphrey, J.M., Amara, S.G., Chamberlin, A.R., Bridges, R.J., 1999. Differentiation of substrate and nonsubstrate inhibitors of the high-affinity, sodium-dependent glutamate transporters. *Mol Pharmacol.* 56, 1095-104.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci.* 15, 1835-53.
- 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. *J Neurosci.* 18, 8751-7.
- Levy, L.M., Lehre, K.P., Walaas, S.I., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 7, 2036-41.
- Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998. 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.* 18, 9620-8.
- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: peixe-zebra swim into view. *Nat Rev Genet.* 8, 353-67.
- Liguz-Leczna, M., Skangiel-Kramska, J., 2007. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 67, 207-18.
- Lin, W.H., Wu, C.H., Chen, Y.C., Chow, W.Y., 2006. Embryonic expression of peixe-zebra AMPA receptor genes: zygotic *gria2alpha* expression initiates at the midblastula transition. *Brain Res.* 1110, 46-54.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2, 679-89.
- Matsui, K., Jahr, C.E., Rubio, M.E., 2005. High-concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *J Neurosci.* 25, 7538-47.
- McDonald, J.W., Johnston, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev.* 15, 41-70.
- McKenna, M.C., 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res.* 85, 3347-58.
- McKenna, M.C., 2013. Glutamate pays its own way in astrocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4, 191.
- Mussulini, B.H., Leite, C.E., Zenki, K.C., Moro, L., Baggio, S., Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Dias, R.D., Souza, T.M., Calcagnotto, M.E., Campos, M.M., Battastini, A.M., de Oliveira, D.L., 2013. Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult peixe-zebra: a detailed behavioral characterization. *PLoS One.* 8, e54515.

- Mussulini, B.H.M., Vizuete, A.F.K., Braga, M., Moro, L., Baggio, S., Santos, E., Lazzarotto, G., Zenki, K.C., Pettenuzzo, L., Rocha, J., de Oliveira, D.L., Calcagnotto, M.E., Zuanazzi, J.A.S., Burgos, J.S., Rico, E.P., 2018. Forebrain glutamate uptake and behavioral parameters are altered in adult peixe-zebra after the induction of Status Epilepticus by kainic acid. *Neurotoxicology*. 67, 305-312.
- Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J., 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 3, 748-55.
- Neuhaus, S.C., Rico, E.P., Gesemann, M., 2010. Nomenclature of glutamate transporters in peixe-zebra and other vertebrates. *Brain Res Bull*. 83, 297.
- O'Kane, R.L., Martinez-Lopez, I., DeJoseph, M.R., Vina, J.R., Hawkins, R.A., 1999. Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem*. 274, 31891-5.
- Owe, S.G., Marcaggi, P., Attwell, D., 2006. The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. *J Physiol*. 577, 591-9.
- Pal, B., 2018. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cell Mol Life Sci*. 75, 2917-2949.
- Penberthy, W.T., Shafizadeh, E., Lin, S., 2002. The peixe-zebra as a model for human disease. *Front Biosci*. 7, d1439-53.
- Perrais, D., Veran, J., Mulle, C., 2010. Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled. *Trends Pharmacol Sci*. 31, 516-22.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 83, 346-56.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 360, 464-7.
- Rico, E.P., de Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., Mussulini, B.H., Bonan, C.D., Dias, R.D., Wofchuk, S., Souza, D.O., Bogo, M.R., 2010. Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from peixe-zebra brain. *Brain Res Bull*. 81, 517-23.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Seibt, K.J., Capiotti, K.M., Da Silva, R.S., Bonan, C.D., 2011. Peixe-zebra neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol*. 33, 608-17.
- Robinson, M.B., Sinor, J.D., Dowd, L.A., Kerwin, J.F., Jr., 1993. Subtypes of sodium-dependent high-affinity L-[3H]glutamate transport activity: pharmacologic specificity and regulation by sodium and potassium. *J Neurochem*. 60, 167-79.
- Rose, C.R., Ziemens, D., Untiet, V., Fahlke, C., 2018. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain Res Bull*. 136, 3-16.
- Rose, E.M., Koo, J.C., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., Hampson, D.R., 2009. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci*. 29, 8143-55.

- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 13, 713-25.
- Sanacora, G., Zarate, C.A., Krystal, J.H., Manji, H.K., 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 7, 426-37.
- Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B., Kugler, P., 1997. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci*. 17, 1-10.
- Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H.S., Larsson, O.M., Bakken, I.J., Sonnewald, U., 1997. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia*. 21, 99-105.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev*. 122, 1-29.
- Shimamoto, K., Lebrun, B., Yasuda-Kamatani, Y., Sakaitani, M., Shigeri, Y., Yumoto, N., Nakajima, T., 1998. DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol*. 53, 195-201.
- Shimamoto, K., Otsubo, Y., Shigeri, Y., Yasuda-Kamatani, Y., Satoh, M., Kaneko, S., Nakagawa, T., 2007. Characterization of the tritium-labeled analog of L-threo-beta-benzyloxyaspartate binding to glutamate transporters. *Mol Pharmacol*. 71, 294-302.
- Sukardi, H., Ung, C.Y., Gong, Z., Lam, S.H., 2010. Incorporating peixe-zebra omics into chemical biology and toxicology. *Peixe-zebra*. 7, 41-52.
- Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Amara, S.G., Kavanaugh, M.P., 1995. Constitutive ion fluxes and substrate binding domains of human glutamate transporters. *J Biol Chem*. 270, 17668-71.
- Vandenberg, R.J., Ryan, R.M., 2013. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev*. 93, 1621-57.
- Veruki, M.L., Morkve, S.H., Hartveit, E., 2006. Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling. *Nat Neurosci*. 9, 1388-96.
- Waagepetersen, H.S., Shimamoto, K., Schousboe, A., 2001. Comparison of effects of DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [3h]D-aspartate in astrocytes and glutamatergic neurons. *Neurochem Res*. 26, 661-6.
- 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., 1998. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci*. 10, 976-88.
- Yin, S., Niswender, C.M., 2014. Progress toward advanced understanding of metabotropic glutamate receptors: structure, signaling and therapeutic indications. *Cell Signal*. 26, 2284-97.

Zenki, K.C., Mussulini, B.H., Rico, E.P., de Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., 2014. Effects of ethanol and acetaldehyde in peixe-zebra brain structures: an in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. *Toxicol In Vitro*. 28, 822-8.

Zerangue, N., Kavanaugh, M.P., 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*. 383, 634-7.

Zhou, Y., Danbolt, N.C., 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 121, 799-817.