

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

DIOGO LÖSCH DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA EM MODELOS DE
CONVULSÃO EM RATOS JOVENS.**

Porto Alegre, 2004.

DIOGO LÖSCH DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA EM MODELOS DE
CONVULSÃO EM RATOS JOVENS.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica,
como requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas – Bioquímica.**

Orientador: Prof^ª.Susana Tchernin Wofchuk

**Co-Orientador: Prof. Diogo Onofre Gomes de
Souza**

Porto Alegre, 2004.

***"...fragmentação do pensamento, mudança para outros anos,
estados de sonho, pensamentos meditativos, culpa..."***

***Sim, eu tenho a doença das quedas, a qual não é causa de
vergonha para ninguém. E a doença das quedas não impede a vida".***

Fyodor Mikhailovitch Dostoiévski (1821-1881).

Às duas pessoas mais importantes da minha vida,

meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, um singelo, mas profundamente grato, muito obrigado.

À Cris, minha grande companheira, fonte de AMOR e INSPIRAÇÃO.

Às minhas queridas irmãs, Lú e Neca (carinhosamente), belas rosas temporãs que coloreem e enfeitam o jardim da minha vida.

Aos meus orientadores, Susana (Suca) e Diogo, de forma muito especial, pela orientação e inestimável contribuição na minha formação como pesquisador e, sobretudo, como pessoa.

Ao André (Andrezinho), pelo conhecimento e, principalmente, a amizade e companheirismo compartilhados ao longo deste trabalho.

Ao Joel, meu braço-direito, pela amizade e auxílio nas etapas mais decisivas deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Graça, Ana, Cíntia, Aline e Thisa, pela convivência transformadora de um simples contato profissional em uma estreita relação afetiva.

Aos meus grandes amigos, Fábio (pequeno “Lobatinho”), Rodrigo e Otemar (o “Nego Véio”), pela amizade e companheirismo no dia-a-dia dentro e fora do laboratório.

Aos grupos do Prof^o. C.A. e do Prof^o Perry, pelas agradáveis e frutíferas interações realizadas ao longo deste trabalho.

Ao todos os colegas do antigo e saudoso grupo FPC.

Ao Valeri, e à todos os funcionários do Biotério, pela competência e profissionalismo.

Às demais pessoas e amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica pelo acolhimento e oportunidade de realizar este trabalho.

À Capes pela Bolsa cedida.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
APRESENTAÇÃO	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	2
1.1.1 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	7
1.1.2 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO	10
1.2 EPILEPSIAS.....	16
1.2.1 EPILEPSIAS E O CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO.....	16
1.2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA	21
1.3 GUANOSINA.....	23
1.4 OBJETIVOS	25
1.4.1 OBJETIVO GERAL	25
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
2. ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
3. DISCUSSÃO	50
4. CONCLUSÕES	53
5. PERSPECTIVAS	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

O ácido quinolínico (AQ) tem sido usado como modelo farmacológico de hiperestimulação do sistema glutamatérgico. A captação de glutamato é o principal mecanismo envolvido na manutenção do glutamato extracelular abaixo dos níveis tóxicos. A guanosina sistemicamente administrada previne convulsões induzidas pela hiperestimulação do sistema glutamatérgico em ratos adultos e aumenta a captação basal de glutamato em culturas primárias de astrócitos e em fatias corticais de ratos jovens. Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da guanosina p.o. sobre convulsões induzidas por ácido quinolínico e sobre a captação de glutamato em fatias corticais de ratos jovens (12-14 dias pós-natal). A infusão i.c.v. de 250nmol AQ induziu convulsões em todos os animais testados e diminuiu a captação de glutamato. A administração de MK-801 e fenobarbital i.p. 30 min antes preveniu as convulsões em todos os animais. Guanosina (7.5 mg/kg) 75 min antes, preveniu em 50% as convulsões induzidas por AQ bem como reverteu a captação de glutamato aos níveis do controle. No intuito de investigar se o efeito anticonvulsivo da guanosina é específico para convulsões induzidas por ácido quinolínico, testamos também o efeito da guanosina em convulsões induzidas por picrotoxina. O pré-tratamento com fenobarbital i.p. (60 mg/kg – 30 min) preveniu as convulsões em todos os animais, visto que guanosina p.o. (7.5 mg/kg – 75 min) e MK-801 i.p. (0.5 mg/kg – 30 min) não tiveram efeito. Desta forma, nossos resultados indicam que a guanosina pode ser considerado para o tratamento das epilepsias e possíveis transtornos neurológicos associados com excitotoxicidade mediada por AQ.

ABSTRACT

Quinolinic acid (QA) has been used as a model for experimental over stimulation of the glutamatergic system. Glutamate uptake is the main mechanism involved in the maintenance of extracellular glutamate below toxic levels. Guanosine systemically administered prevents seizures induced by overstimulation of the glutamatergic system in adult mice and *in vitro* increases basal glutamate uptake by cortical astrocyte culture and slices from young rats. Here we investigated the effect of guanosine p.o. on QA-induced seizures in young rats (12-14 days old) and upon *ex vivo* glutamate uptake by cortical slices. I.c.v. infusion of 250nmol QA induced seizures in all animals and decreased glutamate uptake. I.p. injection of MK-801 and phenobarbital 30 min before QA administration prevented seizures in all animals. Guanosine (7.5 mg/kg) 75 min before QA prevented seizures in 50% of animals as well as reversed glutamate uptake to control levels. To investigate if the anticonvulsive effect of guanosine was specific for QA-induced seizures, the picrotoxin-induced seizures model was also performed. Pretreatment with phenobarbital i.p. (60 mg/kg – 30 min) prevented picrotoxin-induced seizures in all animals, whereas guanosine p.o. (7.5 mg/kg – 75 min) and MK-801 i.p. (0.5 mg/kg – 30 min) had no effect. Thus, guanosine reversed the QA-induced seizures in young rats and the decrease of glutamate uptake, showing some specificity degree towards the QA-induced seizures. This points that guanosine could be considered for treatments of epilepsy, and possibly other neurological disorders associated with QA excitotoxicity.

APRESENTAÇÃO

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

O item **1. Introdução** refere-se aos aspectos que embasam os objetivos e a metodologia deste trabalho.

Os Resultados que fazem parte desta Dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico submetido, o qual está organizado no item **2. Artigo Científico**. Os Resultados, Material e Métodos, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo científico.

O item **3. Discussão** refere-se as interpretações e comentários acerca dos resultados obtidos neste trabalho.

O item **4. Conclusões** aborda as conclusões gerais baseando-se nos objetivos e resultados desta Dissertação.

O item **5. Perspectivas** contém os principais projetos a serem desenvolvidos na seqüência deste trabalho.

O item **6. Referências Bibliográficas** refere-se somente às citações que aparecem na Introdução e na Discussão desta Dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema geral do metabolismo do glutamato no SNC

Figura 1.2: Receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos

Figura 1.3: Tipos de transportadores de glutamato e sua localização na sinapse glutamatérgica.

Figura 1.4: Representação esquemática da estrutura de dois transportadores de glutamato (GLT-1 e EAAC-1).

Figura 1.5: Localização dos transportadores de glutamato em cérebro de camundongos.

Figura 1.6: Incidência das epilepsias em crianças.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Incidência anual das epilepsias em crianças.

Tabela 1.2: Modelos experimentais de epilepsia.

LISTA DE ABREVIATURAS

1S, 3R-ACPD	1S, 3R-1-aminociclopentano-1-3-dicarboxílico
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
AMPc	adenosina monofosfato ciclíco
AQ	Ácido quinolíno
AVE	Acidente vascular encefálico
DCG-IV	2,3-dicarboxiciclopropil-glicina
DHPG	(S)-3,5-dihidroxifenilglicina
EAAC 1	carreador de aminoácidos excitatórios 1
EAAT 1	transportador de aminoácidos excitatórios 1
EAAT 2	transportador de aminoácidos excitatórios 2
EAAT 3	transportador de aminoácidos excitatórios 3
EAAT 4	transportador de aminoácidos excitatórios 4
EAAT 5	transportador de aminoácidos excitatórios 5
GBPs	derivados da guanina
GMP	guanosina monofosfato
GLAST	transportador de glutamato e aspartato
Gln	glutamina
GLT 1	transportador glial 1
Glu	glutamato

GluRs	receptores glutamatérgicos
iGluRs	receptores glutamatérgicos ionotrópicos
i.c.v.	intracerebroventricular
i.p.	intraperitonal
IP₃	inositol trifosfato
KA 1 e 2	subunidade de receptores cainato 1 e 2
L-AP4	ácido 2-amino-4-fosfonobutírico
L-CCG I	2-Carboxiciclopropil-Glicina
LTD	Depressão de Longa Duração
LTP	Potenciação de Longa Duração
M1-4	domínios transmembrana dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos
mGluRs	receptores glutamatérgicos metabotrópicos
NR_{1, 2A-D}	subunidades dos receptores N-metil-D-aspartato
NMDA	N-metil-D-aspartato
p.o.	via oral
TMI-IV	domínios transmembrana I-IV
SNC	sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O glutamato é o aminoácido encontrado em maior concentração no SNC de mamíferos onde desempenha um importante papel metabólico (Krebs, 1935).

Curtis et al. (1959a; 1959b) e Curtis e Watkins (1960) mostraram que o glutamato exerce uma potente ação excitatória sobre neurônios da medula espinhal. Este efeito, no entanto, foi atribuído a uma ação inespecífica e não relacionada à excitação sináptica (Curtis et al., 1960). Somente a partir de 1970, com inúmeros estudos demonstrando que o glutamato: (1) é estocado na pré-sinapse em neurônios específicos; (2) é liberado por estímulo fisiológico em concentrações suficientes para gerar uma resposta pós-sináptica; (3) mostra identidade de ação com neurotransmissores naturais, incluindo resposta a antagonistas e (4) está sujeito a mecanismos que acabam com a ação do transmissor rapidamente, é que foi reconhecido como neurotransmissor (Fonnum, 1984).

Atualmente, o glutamato é considerado o principal aminoácido excitatório do SNC de mamíferos, onde participa de inúmeros eventos fisiológicos e plásticos tais como: memória e aprendizado (Izquierdo e Medina, 1997), desenvolvimento e envelhecimento (Segovia et al., 2001), adaptação ambiental (Ozawa et al., 1998), proliferação e migração celular (McDonald e Johnston, 1990). No entanto, quando presente em altas concentrações na fenda sináptica por um longo período, pode ser uma potente neurotoxina (Obrenovitch et al., 2000) e sua excitotoxicidade tem sido implicada na patogênese de inúmeros transtornos agudos e crônicos do SNC (Carlson et al., 1992; During e Spencer, 1993; Lipton e Rosenberg, 1994; Meldrum, 1994; Bradford, 1995; Price, 1999; Meldrum, 2000; Chapman, 2000; Maragakis e Rothstein, 2001).

O glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir principalmente da glutamina, pela ação da glutaminase (Schousboe et al., 1997) e estocado em vesículas onde sua concentração pode chegar a 100mM (Fig. 1.1) (Nedergaard, 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). Em situações fisiológicas, a liberação de glutamato das vesículas ocorre por exocitose e é Ca²⁺-dependente.

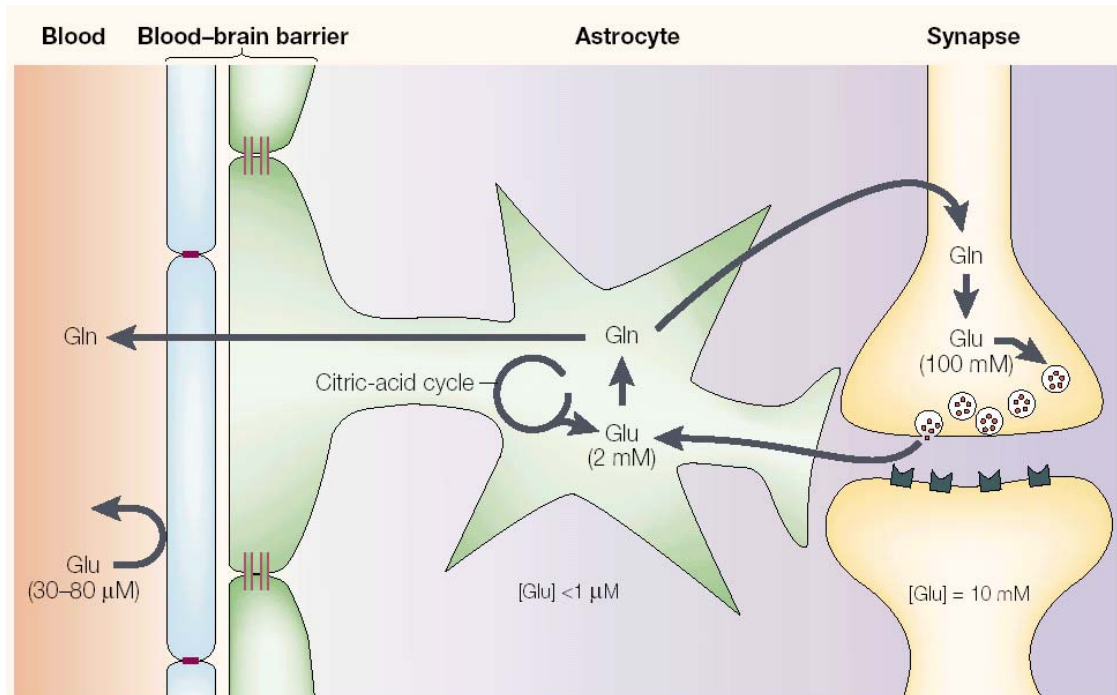


Fig. 1.1 Esquema geral do metabolismo do glutamato no SNC. A barreira hematoencefálica possui uma baixa permeabilidade ao glutamato (Glu). Portanto, praticamente todo o glutamato presente no cérebro é sintetizado a partir da transaminação do α -cetoglutarato tanto em neurônios como na glia. Nas células gliais o glutamato é convertido a glutamina (Gln) pela glutamina sintetase e então liberado no meio extracelular. A glutamina é captada pelos neurônios e convertida a glutamato antes de ser armazenado nas vesículas pré-sinápticas. A glutamina serve também como um transportador do excesso de amônia, sendo transportada através da barreira hematoencefálica e liberado na corrente sanguínea. Em animais jovens, a barreira hematoencefálica possui alta permeabilidade ao glutamato e excessiva ingestão de glutamato através da dieta pode levar a excitotoxicidade. A concentração de glutamato no fluído cerebroespinal (líquor) é ao redor de $1 \mu M$, podendo chegar a $20 \mu M$ em situações patológicas como acidente vascular encefálico (AVE), esclerose múltipla e meningite. (Adaptado de Nedergaard et al., 2002).

As diversas ações do glutamato, tanto fisiológicas quanto patológicas, resultam da presença de receptores glutamatérgicos (GluRs), tanto neuronais como gliais (Fig 2) (Ozawa et al., 1998). Os GluRs são divididos em duas classes: ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs) (Tanabe et al., 1992). Os iGluRs contêm um canal iônico cátion-específico e são subdivididos em três subtipos: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), cainato and N-metil-D-aspartato (NMDA). Por outro lado, os mGluRs são acoplados a proteínas G e estão subdivididos em 8 subtipos (mGluR₁₋₈).

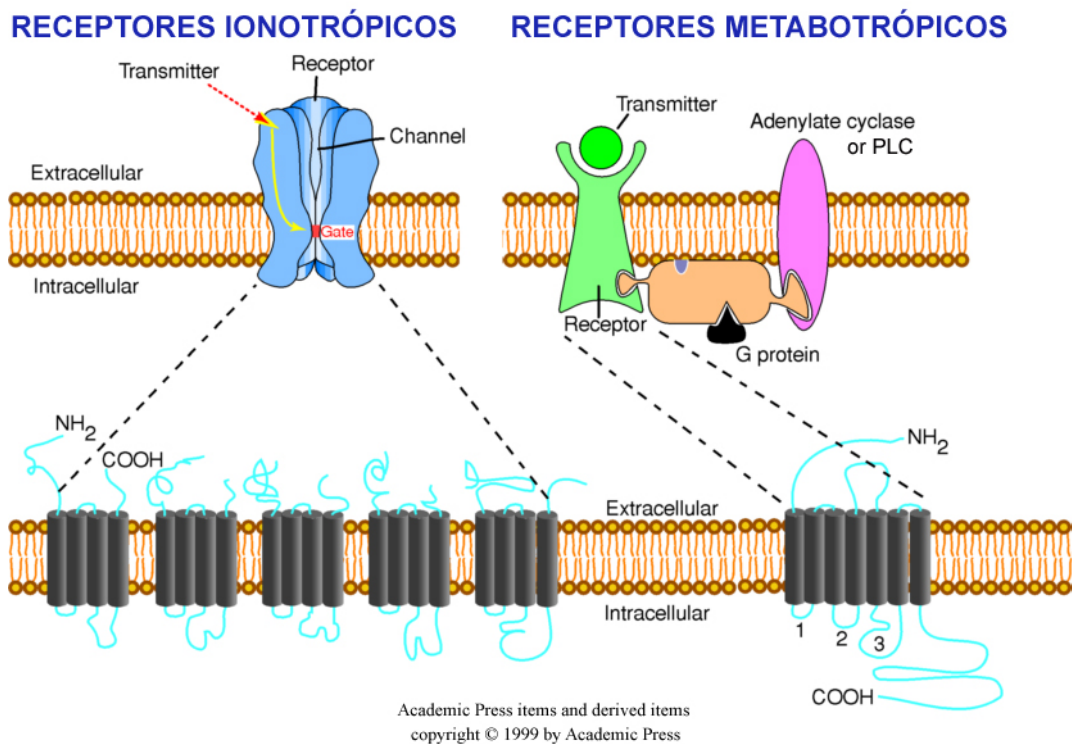


Fig. 2. Receptores glutamatergicos. Os receptores glutamatergicos ionotrópicos (*iGluRs*) contêm um canal iônico cátion-específico e são subdivididos em três subtipos: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), cainato and *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA). Os receptores glutamatergicos metabotrópicos (*mGluRs*) são acoplados ao sistema de transdução de sinal via adenilato ciclase ou fosfolipase C (PLC) e estão subdivididos em 8 subtipos (*mGluR*₁₋₈). (Adaptado de Zigmond, *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, 1999).

Uma terceira classe de proteínas, igualmente importantes para a função glutamatergica, são os transportadores de glutamato. Sua principal atividade é recaptar o glutamato liberado na fenda a fim de terminar a transmissão sináptica (Danbolt, 2001). Os transportadores, portanto, desempenham importante papel na manutenção dos níveis

extracelulares de glutamato abaixo daqueles considerados tóxicos (Anderson e Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Amara e Fontana, 2002; Chen e Swanson, 2003). Atualmente, cinco tipos de transportadores foram identificados, clonados e caracterizados: 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).

1.1.1 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Ionotrópicos - Cronologicamente, os iGluRs foram os primeiros receptores de aminoácidos a serem identificados (Bennett e Balcar, 1999). São responsáveis pela iniciação, propagação e ampliação do sinal glutamatérgico (Cotman et al., 1995). Quando estimulados permitem a passagem de íons através de seu canal, induzindo um potencial de ação no neurônio pós-sináptico. São divididos em três grupos: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA), sendo os dois primeiros denominados coletivamente de receptores não-NMDA. Com o advento das técnicas de clonagem molecular e de expressão heteróloga em oócitos de *Xenopus laevis*, constatou-se que a diversidade genética entre os iGluRs é muito maior do que aquela prevista pelos estudos farmacológicos e fisiológicos (Ozawa et al., 1998). Estruturalmente, possuem um grande domínio N-terminal extracelular e quatro segmentos hidrofóbicos de membrana (M1 – M4).

Os receptores NMDA são dependentes de voltagem, altamente permeáveis a Ca^{+2} e possuem como co-agonistas glicina e D-serina (Johnson e Ascher, 1987; Kemp e Leeson, 1993). Estes receptores parecem ter um papel central em eventos de plasticidade sináptica, tais como na potenciação de longa duração (LTP) e na depressão de longa duração (LTD). Quando superativados podem levar a um evento patofisiológico

denominado de excitotoxicidade neurodegenerativa (Nicoletti et al., 1996). Em potenciais de repouso, os canais acoplados ao receptor NMDA estão normalmente bloqueados por íons Mg^{+2} , sendo a liberação do canal dependente de despolarização de membrana.

A expressão das diferentes subunidades do receptor NMDA varia muito no SNC sendo hipocampo e córtex as estruturas cerebrais particularmente ricas neste tipo de receptor (Watkins et al., 1990). São expressos tanto em células neuronais como gliais; no entanto, nestas últimas sua função ainda está pouco estudada (Conti et al., 1996; 1997).

Tanto AMPA quanto cainato estão associados primariamente a canais independentes de voltagem. São permeáveis a Na^+ e K^+ , mas algumas subunidades têm permeabilidade a Ca^{+2} (Cotman et al., 1995). Ambos estão distribuídos amplamente no SNC; entretanto, a expressão de suas subunidades é muito heterogênea entre as diferentes estruturas e tipos celulares (Ozawa et al., 1998). A distribuição de receptores AMPA acompanha aquela apresentada pelos receptores NMDA. Por outro lado, os receptores cainato estão mais concentrados em poucas áreas do SNC: região CA3 do hipocampo, estriado e tálamo (Cotman et al., 1995).

Metabotrópicos - O glutamato ativa também outra classe de receptores, os quais são funcional e farmacologicamente distintos dos ionotrópicos. Estes estão acoplados ao mecanismo de transdução de sinal via proteínas G, modulando a produção intracelular de segundos mensageiros.

A estimulação da síntese de inositolfosfatos por glutamato foi inicialmente mostrada em cultura de neurônios estriatais por Sladeczek et al. (1985). Esta ação foi reproduzida em culturas de neurônios cerebelares e também em fatias de hipocampo (Nicoletti et al., 1986a; 1986b; 1988). Posteriormente, Sugiyama et al. (1987)

demonstraram que oócitos de *Xenopus laevis*, injetados com mRNA cerebral, sob estimulação glutamatérgica, apresentavam correntes oscilatórias de Cl^- e isto se deve à liberação intracelular de cálcio mediado por IP_3 (Murphy e Miller, 1988). Winder e Conn (1992) mostraram que ACPD, um análogo rígido do glutamato, aumenta de forma dependente de concentração a formação de AMPc intracelular em fatias de hipocampo de ratos adultos. Estes pesquisadores concluíram que se tratava de um novo subtipo de mGluR, diferente daquele ligado à hidrólise de fosfoinosítídeos (Tanabe et al., 1992).

Atualmente, uma família de 8 subtipos de receptores (mGluR₁₋₈), subdivida em três grupos (mGluRs I, II e III), está descrita (Ozawa et al., 1998). Apesar da sua relação estrutural, os mGluRs compõem uma família heterogênea em sua farmacologia (seletividade a agonistas e antagonistas), mecanismo de transdução de sinal e homologia genética. Todos os mGLURs são proteínas grandes, caracterizados por sete domínios transmembrana (Nakanishi, 1992; Hollmann and Heinemann, 1994; Pin and Duvoisin, 1995). Inúmeras evidências sugerem que o domínio N-terminal contém os sítios para glutamato e que metade deste domínio é responsável pela seletividade a agonistas (Takahashi et al., 1993). Tem sido proposto que o domínio C-terminal desempenha um importante papel em determinar a potência dos agonistas (Flor et al., 1996).

O Grupo I compreende os subtipos mGluR₁ (Houamed et al., 1991; Masu et al., 1991) e mGluR₅ (Abe et al., 1992), os quais estão acoplados à hidrólise de fosfoinosítídeos e são potentemente ativados por (1S, 3R)-1-aminociclopentano-1-3-dicarboxílico (1S, 3R-ACPD) e 3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) (Ito et al., 1992).

O Grupo II inclui os subtipos mGluR₂ e mGluR₃ (Tanabe et al., 1992), que são ligados à adenilato ciclase e à formação de AMPc e potencialmente estimulados por 2S, 3S, 4S)- α -(carboxiciclopropil)-glicina (L-CCG I) e por DCG IV (Ishida et al., 1993).

O Grupo III compreende os subtipos mGluR₄ e mGluR₆₋₈ e, assim como os receptores do Grupo II, estão ligados à modulação da adenilato ciclase. São ativados seletivamente pelo ácido L-2-amino-4-fosfanobutírico (L-AP4) (Schoepp, 1994).

1.1.2 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

A captação de glutamato é o principal mecanismo responsável pela manutenção dos níveis extracelulares de glutamato abaixo dos níveis tóxicos (Anderson e Swanson, 2000; Danbolt, 2001), sendo realizada por transportadores de glutamato presentes na membrana plasmática de neurônios e células gliais, principalmente em astrócitos (Rothstein et al., 1994).

Atualmente, já foram descritos 5 tipos de transportadores: 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) (Fig 3). Estes cinco transportadores de glutamato apresentam entre 50 e 60% de semelhança na seqüência de aminoácidos (Amara e Arriza, 1993) (Fig 4).

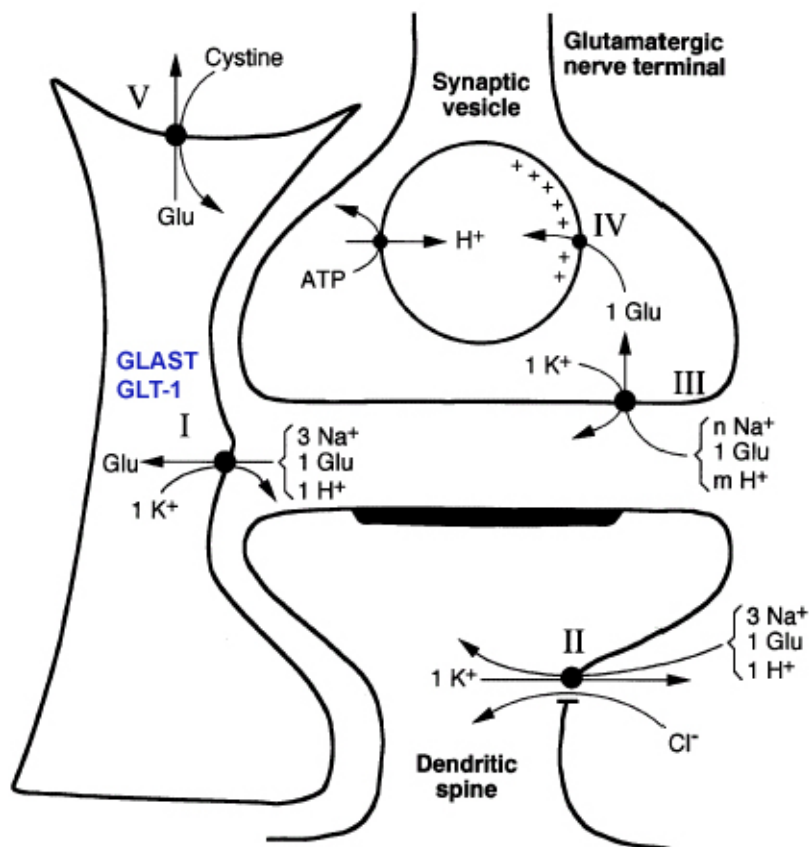


Fig. 3. Tipos de transportadores de glutamato e sua localização na sinapse glutamatérgica. **I.** Transportadores de glutamato presentes na membrana celular de células gliais (GLT-1 e GLAST). **II.** Transportadores de glutamato presentes na membrana celular pós-sináptica de neurônios (EAAC-1 – em todo o cérebro; EAAT-4 – somente nos dendritos das células de Purkinge). **III.** Transportadores de glutamato presentes na membrana celular pré-sináptica de neurônios. A identidade molecular e a estequiometria destes transportadores não são conhecidos. (Adaptado de Danbolt, 2001).

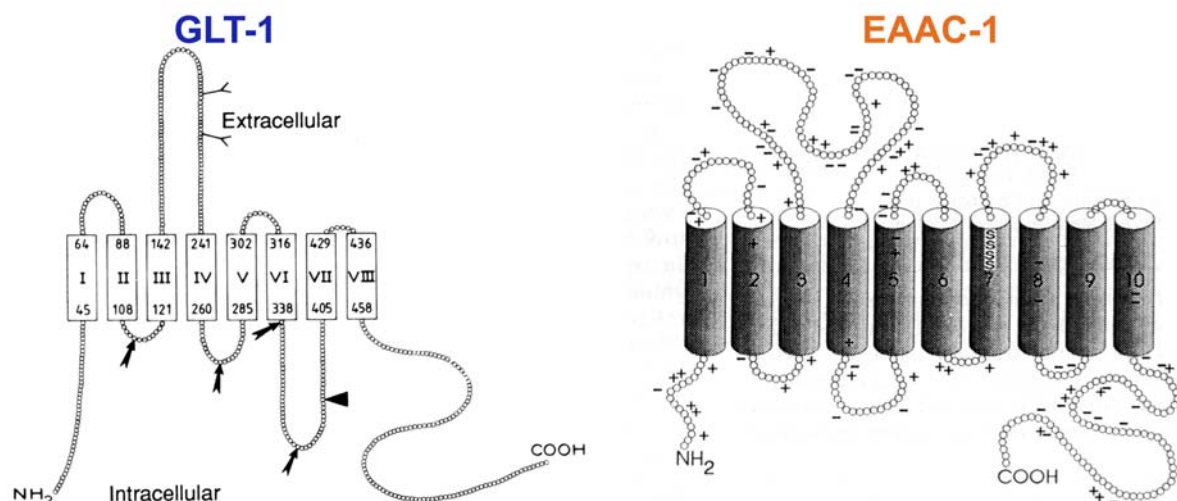


Fig. 4. Representação esquemática da estrutura de dois transportadores de glutamato (GLT-1 e EAAC-1). **GLT-1.** Os aminoácidos estão representados como círculos e os domínios transmembrana como retângulos. As setas indicam possíveis sítios de fosforilação pela proteína quinase C e a cabeça de seta indica um sítio de fosforilação para proteína quinase A. Dois possíveis sítios de glicosilação estão demonstrados na porção extracelular na forma de “Y”. (Adaptado de Pines et al., 1992). **EAAC-1.** Os aminoácidos estão representados como círculos e os domínios transmembrana como cilindros. Os aminoácidos Glu⁻, Arg⁺, Lys⁺ e Asp⁻ estão representados pelas suas cargas. (Adaptado de: Kanai e Hediger, 1992).

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 quanto nos processos das células astrocíticas (Danbolt, 2001). Uma exceção é a expressão do GLT-1 em retina, onde é encontrado em diferentes tipos de células bipolares, mas não na 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 de sua captação no SNC (Anderson e Swanson, 2000; Danbolt, 2001) (Fig 5). Sua distribuição e concentração no SNC é região dependente (Gegelashvili e Schousboe, 1998; Danbolt, 2001) e varia conforme 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 astrocitárias que circundam o neuropilo (terminal nervoso, axônios e espinhas dendríticas) 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).

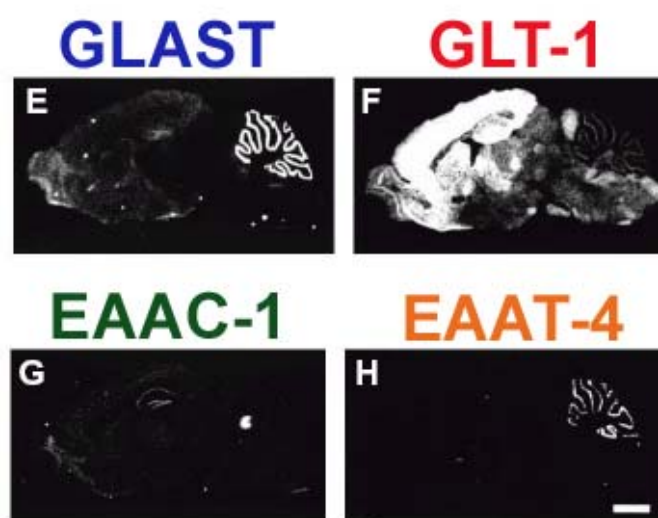


Fig. 5. Localização, por hibridização "in situ", dos transportadores de glutamato em cortes parasagittais de cérebro de camundongos. (Adaptado de Tanaka et al., 1999).

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, sua expressão é insignificante (Tanaka et al., 1997). A proteína encontra-se no corpo celular dos neurônios (soma) e dendritos, evitando os terminais nervosos, e também está presente nos astrócitos corticais (Conti et al., 1998).

O EAAT4 está localizado nas células de Purkinje no cerebelo (Tanaka et al., 1997; Furuta et al., 1997b), mas pode também ser encontrado em concentrações muito baixas no telencéfalo (Danbolt, 2001). Encontra-se em maiores concentrações na parte da membrana espinhal que defronta-se com a astroglia, 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 constante de afinidade (Kd) dos transportadores de glutamato varia de acordo com as preparações utilizadas. O Km para GLAST, GLT e EAAC de humanos, clonados e expressos em células COS-7 (Arriza et al., 1994) é de 48, 97 e 92 μM , respectivamente, e para os expressos em oocytos de *Xenopus laevis* (Arriza et al., 1994; Kanai et al., 1994) é 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 Kd de 11 e 17 μM , respectivamente, enquanto o Km de EAAC de coelho expresso em oocytos de *Xenopus laevis* é 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 no nascimento (Ullensvang et al., 1997). Em contrapartida, o GLAST encontra-se presente em concentrações significantes tanto no telencéfalo quanto no cerebelo de ratos recém-nascidos (Ullensvang et al., 1997). Após a primeira semana pós-natal, o GLT-1 pode ser detectado no telencéfalo e após a segunda semana no cerebelo, e ambos transportadores atingem níveis adultos a partir da quinta semana pós-natal (Ullensvang, et al., 1997). As concentrações de ambos GLAST e GLT-1 aumentam dramaticamente 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 excitotoxicidade. Recentes estudos em humanos (Maragakis e Rothstein, 1994) e em ratos transgênicos (Meldrum et al., 1999) indicaram que alterações nos transportadores de glutamato podem

resultar em fenótipos epilépticos. Ratos knock-out para o GLT-1 apresentam convulsões letais nas primeiras horas de vida (Tanaka et al., 1997). Paralelamente, estes animais apresentam uma maior suscetibilidade à injúria cerebelar e cortical, assim como uma redução da coordenação motora (Watase et al., 1998). A perda do transportador neuronal EAAC1 produziu neurotoxicidade moderada, resultando em epilepsia (Rothstein et al., 1996) e anormalidades de comportamento (Danbolt, 2001). Animais epilépticos (Ingram et al., 2001) e ratos com epilepsia crônica induzida por ácido caínico (Ueda et al., 2001) apresentaram uma redução na expressão de transportadores gliais (GLT-1 and GLAST). Estes resultados indicam que disfunções na captação de glutamato podem desempenhar um importante papel no processo epileptogênico.

1.2 EPILEPSIAS

As epilepsias referem-se a um grupo diverso de transtornos neurológicos, etiológica e clinicamente, caracterizados por crises epilépticas recorrentes, as quais resultam da atividade neuronal excessiva, anormal e hipersincrônica (Engel Jr, 2001).

Apesar da utilização do método científico para a elucidação dos fenômenos envolvidos nas epilepsias e dos importantes avanços na área, obtidos nos últimos 30 anos, aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia, sendo que 40 milhões estão em países subdesenvolvidos. A importância médica desta patologia acentua-se ainda mais pelo fato de que ela tende a durar por toda a vida, podendo acarretar profundas conseqüências psicopatológicas e sociais.

1.2.1 EPILEPSIAS E O CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO

Em crianças, os tipos de epilepsias podem ser altamente variáveis, desde simples crises de ausência até convulsões tônico-clônicas e crises parciais complexas. Múltiplos

tipos de crises, evolução de um tipo a outro e remissão espontânea das crises são características marcantes das epilepsias em crianças (Cowan, 2002).

A incidência das epilepsias é extremamente alta nos primeiros anos de vida, declinando conforme a criança chega à adolescência (Fig 6) (Sidenvall et al., 1993). Alguns estudos demonstram que há uma maior incidência de epilepsias em crianças do sexo masculino do que naquelas do sexo feminino (Sidenvall et al., 1993; Hauser et al., 1993; Jallon et al., 1997; Kurtz et al., 1998). No entanto, esta diferença sexo-específica varia com a idade e com o tipo de síndrome. Aos cinco anos, as taxas de incidência são 30%-60% maiores em indivíduos do sexo feminino, enquanto que na adolescência tendem a ser 10%-20% maiores em indivíduos do sexo masculino (Hauser et al., 1993; Annegers et al., 1999). Estas flutuações refletem, principalmente, diferenças na predominância de um ou outro tipo de epilepsia, diferenças na exposição a fatores de risco, diferenças de susceptibilidade sexo-específicas e também variações no diagnóstico (Cowan, 2002).

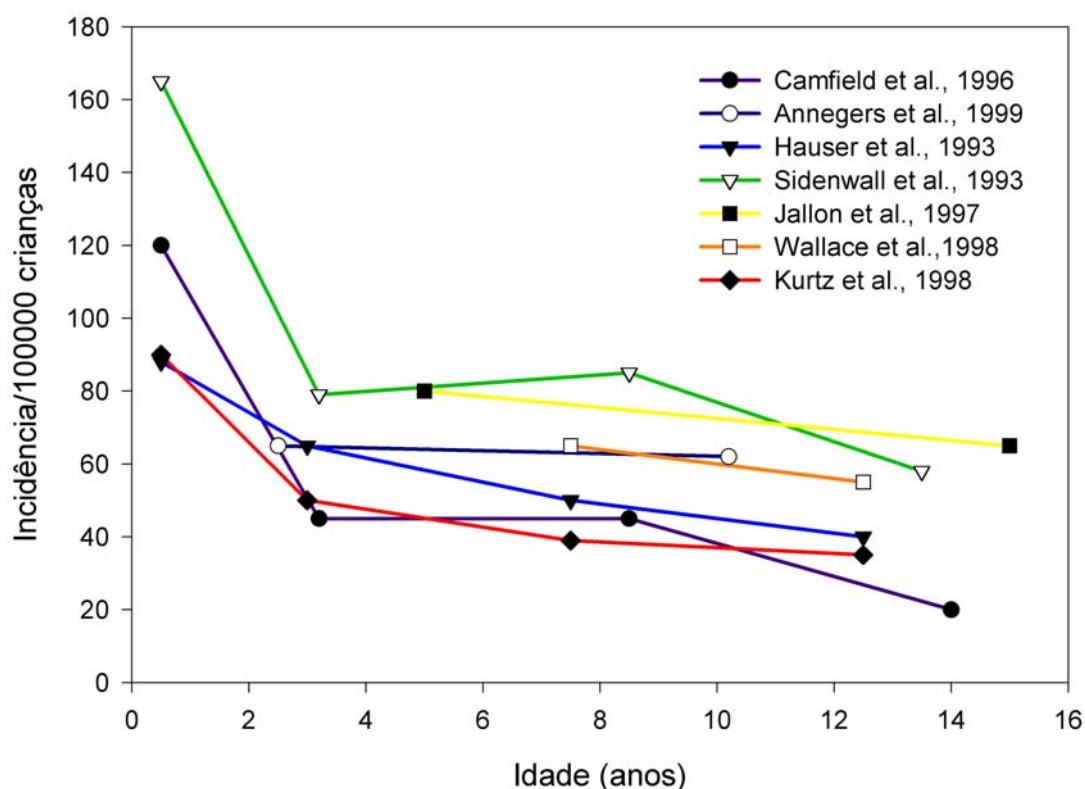


Fig. 6. Variação da incidência das epilepsias por 100.000 crianças. (Adaptado de Cowan, 2002).

A prevalência das epilepsias em crianças é estimada, na média, em 4 a 5 casos a cada 1000 crianças (0,5%) (Cowan et al., 1989; Hauser et al., 1991; Cockerell et al., 1995; Sidenwal et al., 1996; Eriksson e Koivikko, 1997; Wallace et al., 1998; Kurtz et al., 1998). As taxas de prevalência aumentam com a idade, variando de 2-3/1000, aos 7 anos (Hauser et al., 1991; Eriksson e Koivikko, 1997; Kurtz et al., 1998), para 4-6/1000, aos 11-14 anos (Sidenwal et al., 1996; Eriksson e Koivikko, 1997; Wallace et al., 1998; Kurtz et al., 1998).

A distribuição das taxas de incidência e de prevalência variam de acordo com o tipo de convulsão ou síndrome epiléptica apresentada (Tabela 1) (Cowan et al., 1989;

Murphy et al., 1995; Sidenvall et al., 1996; Eriksson e Koivikko, 1997; Kramer et al., 1998; Kurtz et al., 1998; Berg et al., 1999b; Waaler et al., 2000). Nestes estudos, 1,5% (Waaler et al., 2000) a 40% (Cowan et al., 1989) das crises são consideradas sem classificação (Tabela 1). No restante, há um predomínio das crises parciais sobre as crises generalizadas, embora ambas variem com a idade (Sidenvall et al., 1996; Eriksson e Koivikko, 1997). Crises epiléticas do tipo ausência, espasmos infantis e Lennox-Gastaut, que ocorrem exclusivamente em crianças, são menos freqüentes. No entanto, cerca de 90% dos pacientes que apresentam a síndrome de Lennox-Gastaut são refratários às terapias antiepiléticas disponíveis atualmente, apresentando, portanto, um alto grau de morbidade (Stables et al., 2002).

Tabela 1. Incidência anual das epilepsias por 100.000 crianças. (Adaptado de Cowan, 2002).

Tipos de Convulsão/Síndrome	Waalder et al., 2000	Eriksson et al., 1997	Cowan et al., 1989	Sidenwall et al., 1996	Murphy et al., 1995*	Berg et al., 1999	Kramer et al., 1998
Parcial (%)	57	43	22	52	58	55	42
Parcial Simples (%)	12	10	6	12	2	9	9
Parcial Complexa (%)	31	23	8	10	30	26	12
Generalizada Secundária (%)	14	9	7	23	23	29	21
Generalizada (%)	41	44	37	46	35	45	33
Ausência (%)	9	5	2	3	5	16	7
Ausência Atípica (%)	13	2	3			3	< 1
Tônica, Clônica e Tônico-Clônica ^a (%)	14	27	24	17	23	23	12
Mioclônica (%)	5	9	1	5	3	8	2
Atônica (%)	< 1	3	2		< 1	2	< 1
Síndrome de West (%)	< 1	8	2	2	1	4	9
Síndrome de Lennox-Gastaut (%)	4	2	2	6		< 1	2
Epilepsias Juvenis Mioclônicas (%)	5	2		1		2	1
Tipos Mistos (%)		9	1				2
Tipos Sem Classificação (%)	1,5	4	40	5	7	3	12
Total nº de casos	198	329	1159	155	538	613	440

^a - inclui todos os tipos

* - prevalência baseada no estudo de crianças até 10 anos de idade

Somente 25% a 45% das epilepsias pediátricas são atribuídas a fatores de risco específicos, o restante possui etiologia desconhecida (Berg et al., 1999a; Waalder et al., 2000). Os fatores, com consistente associação ao aumento do risco de epilepsia em crianças, são: malformações congênitas e desordens metabólicas, convulsões febris, convulsões nos primeiros 28 dias de vida (convulsões neonatais), trauma encefálico moderado ou severo, infecções do SNC e história familiar de epilepsias (Cowan, 2002).

O prognóstico das epilepsias infantis depende principalmente de sua etiologia e da presença de outras patologias neurológicas (Annegers et al., 1979; Berg e Shinnar, 1994b; Sillanpaa, 2000), sendo que a maioria das crianças com epilepsia na infância poderão apresentar remissão total das crises quando atingirem a idade adulta (Sillanpaa, 2000).

1.2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

Para entender as epilepsias, inúmeras abordagens têm sido feitas, tanto pelo estudo do tecido epiléptico humano, obtido após remoção cirúrgica do foco epiléptico, como através do estudo de tecidos cerebrais, provenientes de animais submetidos a diferentes modelos de epilepsia. A relevância de um modelo experimental é determinada pelo grau em que o modelo serve como testemunha do fenômeno natural. O *screening* farmacológico de drogas antiepilépticas e o entendimento dos mecanismos envolvidos na epileptogênese baseiam-se em grande parte nos modelos animais de epilepsia (Mody e Schwartzkroin, 1997).

Os modelos experimentais de epilepsia são denominados agudos, quando o animal apresenta crises convulsivas somente durante a vigência do agente indutor. Estes modelos incluem a aplicação tópica ou injeção sistêmica de compostos que interferem no balanço neuroquímico responsável pela excitabilidade neuronal (Mody e Schwartzkroin, 1997). Os modelos mais comumente usados são: bloqueadores dos sistemas inibitórios de neurotransmissão (por exemplo antagonistas de receptores GABA_A); estimulantes dos sistemas excitatórios (por exemplo agonistas de receptores glutamatérgicos e colinérgicos); estimulação elétrica direta ou indireta (por exemplo eletrochoque) (Tabela 2).

Os modelos de epilepsia são ditos crônicos quando as crises ocorrem a intervalos variados de tempo, não sendo necessário o estímulo precipitante exógeno para desencadear cada crise. Estes modelos caracterizam-se por apresentar um fator causal conhecido, que induz o processo de epileptogênese, o qual, após determinada latência, culmina com crises epiléticas espontâneas (Naffah-Mazzacoratti, 1998). Os modelos mais utilizados são aqueles que mimetizam a epilepsia do lobo temporal, o tipo mais

freqüente de epilepsia encontrado na população humana adulta. São exemplos: o modelo da pilocarpina (Turski et al., 1983), o modelo do ácido caínico (Ben-Ari, 1985) e o abrasamento (*kindling*) (Goddard, 1967).

No entanto, a maioria dos modelos descritos e dos projetos de pesquisa acerca de novas drogas antiepilépticas objetivam o desenvolvimento de terapias para a população adulta. Além disso, a maioria das drogas antiepilépticas disponíveis comercialmente não possuem indicações nem informações sobre sua farmacocinética e efeitos colaterais em crianças (Stables et al., 2002).

Tabela 2. Modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas das epilepsias no ser humano. Ao lado do modelo, entre parênteses, encontra-se o ano de sua descrição (Adaptado de Mello et al., 1986).

MODELO EXPERIMENTAL	TIPO DE EPILEPSIA	MECANISMO DE AÇÃO
Estimulação química		
Pentilenotetrazol (1960)	Pequeno mal e crises generalizadas	Antagonista de receptores GABA _A
Picrotoxina (1960)	Epilepsias do lobo temporal	Antagonista de receptores GABA _A
Bicuculina (1970)	Epilepsia de longa duração	Antagonista de receptores GABA _A
Pilocarpina (1983)	Epilepsias focais e do lobo temporal	Agonista de receptores muscarínicos
Ácido caínico (1985)	Epilepsia do lobo temporal	Agonista de iGluRs do tipo cainato
Ácido ibotênico (1979)	Epilepsia do lobo temporal	Agonista de iGluRs do tipo NMDA e de mGluRs
Ácido quinolínic	Crises tônico-clônicas	Agonista de iGluRs do tipo NMDA
Ácido domóico (1987)	Epilepsia do lobo temporal	Agonista de iGluRs do tipo cainato
Modelos com predisposição genética		
Crise audiogênica em camundongo (1924)	Crises tônico-clônicas	
Fotossensibilidade genética (1966)	Crises centro-encefálicas	
Estimulação elétrica		
Eletrochoque (1870)	Epilepsia focal	
Abrasamento (1967)	Crises parciais e generalizadas, pequeno mal e auras	

As epilepsias pediátricas são exclusivas em alguns aspectos. Primeiro, não é conhecido como o cérebro em desenvolvimento é afetado pelos processos epileptogênicos e como a epileptogênese é modificada pelo cérebro em desenvolvimento. Sem esta informação, torna-se difícil desenvolver novas terapias antiepilépticas utilizando uma aplicação mecanística (Stables et al., 2002). Além disso, não conhecemos o impacto de uma determinada terapia sobre o SNC, quando introduzida durante um determinado período de desenvolvimento. Estes fatores, juntamente com estudos epidemiológicos humanos que demonstram características idade-específicas para as epilepsias (Fig 6), apontam para a importância do desenvolvimento de modelos experimentais específicos para animais jovens (Stables et al., 2002).

1.3 GUANOSINA

Os derivados da guanina (GBPs) estão intimamente relacionados à modulação da atividade intracelular do mecanismo de transdução de sinal via proteínas G (Gudermann et al., 1997). Mais recentemente, foi demonstrado que GMP e guanosina exercem efeitos não diretamente relacionados à modulação de proteínas G, tais como efeitos tróficos sobre células neurais (Rathbone et al., 1999) que incluem estimulação da proliferação astrocitária, síntese e liberação de fatores tróficos a partir de culturas de astrócitos e aumento da diferenciação de neurônios hipocámpais *in vitro* (Ciccarelli et al., 2000).

Estudos *in vitro* demonstraram que a guanosina exerce um importante papel modulatório sobre o sistema glutamatérgico. Em tecto óptico de pintos, GMP inibe o *binding* de [3H]cainato através de um mecanismo não relacionado à ativação de proteínas G (Paz et al., 1994). Além disso, preveniu excitotoxicidade induzida por ácido caínico em

preparações de retina de pinto (Burgos et al., 1998). Porciúncula et al. (2002) demonstrou que GppNp e GMP inibem o *binding* de [3H]glutamato e [3H]AMPA em densidades pós-sináptica de córtex de ratos adultos.

Usando cultura primária de astrócitos, Frizzo et al. (2001) mostraram um aumento de 63% na captação basal de glutamato na presença de guanosina. Em fatias de córtex parietal de ratos de 10 dias, submetidas ou não a 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 pode ser idade dependente, visto que Gottfried et al. (2002) mostraram um aumento na captação de glutamato em cultura cortical de astrócitos com 10 dias de cultivo, mas não naquelas com 40 dias.

Estudos *in vivo* relacionados com o papel modulatório dos derivados da guanina sobre a hiperestimulação do sistema glutamatérgico têm demonstrado que GMP e guanosina, quando administrados i.p. ou p.o. em ratos adultos, previnem convulsões induzidas por ácido quinolínico e α -dendrotoxina (Schmidt et al, 2000). No entanto, em convulsões induzidas por ácido cáinico ou picrotoxina em animais adultos, tanto GMP como guanosina não tem efeito (Lara et al, 2001).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da guanosina em modelos de convulsão induzida por ácido quinolínico e picrotoxina em ratos jovens.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia de cirurgia estereotáxica em animais jovens (P12-P14);
- padronizar o modelo de convulsão induzida por ácido quinolínico e picrotoxina em animais jovens;
- Identificar doses anticonvulsivas de guanosina, MK-801 e fenobarbital em convulsões induzidas por ácido quinolínico e picrotoxina em animais jovens;
- Investigar o mecanismo de ação envolvido no possível efeito anticonvulsivo da guanosina em modelos de convulsão induzida por ácido quinolínico e picrotoxina em animais jovens.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido ao Brain Research em Julho de 2003.

Título: QUINOLINIC ACID PROMOTES SEIZURES AND DECREASES GLUTAMATE UPTAKE IN YOUNG RATS: REVERSAL BY ORALLY-ADMINISTERED GUANOSINE.

Autores: Diogo Losch de Oliveira, Joel Felipe Horn, Juliana Moura Rodrigues, Marcos E. S. Frizzo, Emílio Moriguchi, Diogo Onofre Souza e Susana Wofchuk.

**QUINOLINIC ACID PROMOTES SEIZURES AND DECREASES GLUTAMATE UPTAKE IN YOUNG
RATS: REVERSAL BY ORALLY-ADMINISTERED GUANOSINE**

Diogo Losch de Oliveira^a, Joel Felipe Horn^a, Juliana Moura Rodrigues^a, Marcos E. S. Frizzo^{a,b}, Emílio Moriguchi^c, Diogo Onofre Souza^a and Susana Wofchuk^{a,c,d}.

^aDepartamento de Bioquímica and ^bDepartamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre; ^cInstituto de Geriatria e Gerontologia and ^dFaculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Number of Pages: 17.

Number of Figures: 3.

Address for correspondence:

Susana Tchernin Wofchuk

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo

90.035.003 Porto Alegre, RS, BRAZIL

Tel: +55 51 3316-5565

Fax: +55 51 3316-5540

E-mail: swofchuk@ufrgs.br

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by the Brazilian fundings agencies, CNPq, FINEP/PRONEX and FAPERGS.

ABSTRACT

Quinolinic acid (QA) has been used as a model for experimental over stimulation of the glutamatergic system. Glutamate uptake is the main mechanism involved in the maintenance of extracellular glutamate below toxic levels. Guanosine systemically administered prevents seizures induced by overstimulation of the glutamatergic system in adult mice and increases basal glutamate uptake by cortical astrocyte culture and slices from young rats. Here we investigated the effect of guanosine p.o. on QA-induced seizures in young rats (P12-14) and upon *ex vivo* glutamate uptake by cortical slices. I.c.v. infusion of 250nmol QA induced seizures in all animals and decreased glutamate uptake. I.p. injection of MK-801 and phenobarbital 30 min before QA administration prevented seizures in all animals. Guanosine (7.5 mg/kg) 75 min before QA prevented seizures in 50% of animals as well as reversed glutamate uptake to control levels. To investigate if the anticonvulsive effect of guanosine was specific for QA-induced seizures, the picrotoxin-induced seizures model was also performed. Pretreatment with phenobarbital i.p. (60 mg/kg – 30 min) prevented picrotoxin-induced seizures in all animals, whereas guanosine p.o. (7.5 mg/kg – 75 min) and MK-801 i.p. (0.5 mg/kg – 30 min) had no effect. Thus, guanosine reversed the QA-induced seizures in young rats and the decrease of glutamate uptake, showing some specificity degree towards the QA-induced seizures. This points that guanosine could be considered for treatments of epilepsy, and possibly other neurological disorders associated with QA excitotoxicity.

Theme : Neurotransmitters, Modulators, Transporters, and Receptors

Topic: Excitatory amino acids: excitotoxicity

Key Words: Seizures, glutamate uptake, guanosine, excitotoxicity, anticonvulsant, cortical slices.

1. INTRODUCTION

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS), participating in plastic processes, which underlie memory and learning [26], development and aging [56] and environmental adaptation [43]. However, glutamate may also be a potent neurotoxin and glutamatergic excitotoxicity has been implicated in the pathogenesis of various acute and chronic CNS disorders [6,9,10,15,30,32,34,36,49]. Consequently, the equilibrium between the physiological/pathological glutamatergic tonus is essential for brain function. Glutamate uptake mainly by astrocytes is the most important mechanism involved in the maintenance of extracellular glutamate below toxic levels [1,2,11,14]. Studies in humans [32] and in transgenic mice [35] indicate that alterations in glutamate transporters can lead to epileptic phenotypes. "Knock-out" mice lacking astroglial transporters exhibit lethal spontaneous seizures [53,61]. Epileptic mice [25] and rats with chronic seizures induced by kainic acid [65] showed a reduction in astrocytic protein transporters (GLT-1 and GLAST). These studies indicate that impairment in glutamate uptake may play an important role in epileptogenesis. Recently, our laboratory showed that guanosine increases basal glutamate uptake by cultured astrocytes [17,19] and proposed that this effect may be involved in neuroprotection against toxicity caused by *in vitro* ischemia in rat brain slices [20].

Quinolinic acid (QA), an endogenous compound produced during the metabolism of tryptophan, which may interfere with the glutamatergic system, is involved in the pathogenesis of various CNS disorders [57] including the etiology of epilepsy [23,41,57]. Increased amounts of QA and enzymes participating of its synthesis have been reported in brain of epileptic EL mice [16,39,40,57,58]. These findings suggest a contribution of QA in the epileptic state. Accordingly, it is used as a model for experimental over stimulation of the glutamatergic system [29,55,57].

Although QA has been used as a pharmacological tool mostly in studies involving adult animals, epilepsy is one of the most common, yet frightening neurological conditions to occur in children [24]. Prolonged seizures in the early developmental period can cause brain damage and lead to serious consequences later in life [4,8,13,21,37], which motivates the development of new animal models for early-life seizures [59].

Guanine-based purines (GBPs) modulate transmembrane signal transduction via G-proteins [22]. However, extracellular GBPs exert effects not directly related to G-proteins; these effects include: i) trophic

effects on neural cells [51] and ii) *in vitro* and *in vivo* antagonism of the glutamatergic system [5,7,31,44,46,48,50,52,54,62]. Regarding the anticonvulsant role of GBPs against overstimulation of the glutamatergic system in adult animals, it has been shown that guanosine and/or GMP administered intraperitoneally (i.p.) or orally (p.o.) in adult mice prevented QA-induced seizures [29,55].

Accordingly, the aim of the present study was to characterize the action of guanosine against QA-induced seizures in young rats and to investigate if this effect is related to glutamate uptake. With these purposes for the first time: i) it was investigated the QA *in vivo* effect in young rats (as compared to previous studies with adult animals); and ii) it was compared the *in vivo* relationship among seizures, guanosine and glutamate uptake. Additionally, we preliminary searched for some degree of specificity of the QA effect towards the glutamatergic overstimulation.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. ANIMALS

Young Wistar rats (P12-14) of both sexes were obtained from a local breeding colony. All procedures were according to the regulations of the local Animal House authorities.

2.2. CHEMICALS

Quinolinic acid, guanosine, phenobarbital, picrotoxin and N-methyl-D-glucamine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 5-methyl-10-11-dihydro-5H-dibenzo[*a,b*]cyclohepta-5-10-imine maleate (MK-801 or dizocilpine) was obtained from RBI Research Biochemicals (Natick, MA, USA) and L-[2,3-³H] glutamate (45Ci/mmol) was purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). The anaesthetic ether was obtained from Nuclear (Diadema, SP, Brazil).

2.3. SURGERY AND INDUCED SEIZURE MODELS

Surgery and intracerebroventricular (i.c.v.) infusion techniques were adapted from Folbergrová et al. [18]. Briefly, the pups were removed from dams 30 min before the experiments. They were placed in plastic chambers at 34°C (temperature of the nest). The animals were anesthetized with ether and the skin of the skull was removed. In a stereotaxic apparatus adapted for pups, a 27-gauge 6-mm guide cannula was placed unilaterally at 1 mm above the lateral ventricle (AP: – 0.2-0.3 mm; L: – 1.6 mm; V: – 3.2 mm from the skull surface). The cannula was fixed with jeweler acrylic cement, xylocain was applied around the cut and pups were allowed to recover for about 90 min. The animals were then pretreated with vehicle (saline solution) i.p. or p.o., Phenobarbital (GABAergic agonist) i.p. (30min – 60 mg/kg), MK-801 (NMDA non-competitive antagonist) i.p. (30min – 0.5 mg/kg) or guanosine p.o. (75 min – 0.75, 2.5 and 7.5 mg/kg; higher guanosine doses were hindered by its solubility). Quinolinic acid or picrotoxin was then administered i.c.v. (0.5 µl) or subcutaneously (s.c.), respectively. For i.c.v. QA administration, a 30-gauge 7-mm cannula was fitted into the guide cannula and connected by a polyethylene tube to a 5 µl Hamilton micro syringe. The tip of the infusion cannula protruded 1.0 mm beyond the guide cannula towards the lateral brain ventricle. In the QA seizures model, the pups were observed for 10 min in plexiglas chambers for the occurrence of tonic-clonic seizures. In the picrotoxin (a GABAergic antagonist) seizures model, the pups were observed for 60 min and seizures were classified as: (1) minimal seizures characterized by clonuses of head muscles and forelimbs, with righting ability preserved, and (2) major seizures usually beginning with running followed by a

loss of posture, followed by the tonic phase and, after some seconds, occurrence of long-lasting (*status epilepticus*) clonic seizures of all limbs [67]. Only major seizures were considered. All i.p. s.c. and p.o. injections were performed at 1 mL/kg. All solutions were diluted in the saline solution and buffered with 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl to pH 7.4. After observations, methylene blue (0.5 μ l) was injected and the animals without dye in the lateral brain ventricle were discarded.

2.4. GLUTAMATE UPTAKE

The pups were divided in four groups for glutamate uptake experiments: (1) vehicle-vehicle, (2) vehicle-QA, (3) Guanosine-vehicle and (4) Guanosine-QA. The animals were killed by decapitation 10 min after i.c.v. QA or vehicle administration and the brains were immediately removed and submerged in Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.2. Cortices were dissected and coronal slices (0.4mm) were obtained from the parietal area using a McIlwain tissue chopper. Cortical slices were transferred to multiwell dishes and washed with 300 μ L HBSS followed by 280 μ L HBSS per well. Glutamate uptake was performed according to our previous reports [20]. The uptake assay was assessed by adding 0.33 μ Ci mL⁻¹ L-[2,3-³H] glutamate with 100 μ M unlabeled glutamate [60] in 20 μ L HBSS, at 37°C. Incubation was stopped after 7min by two ice-cold washes with 1mL HBSS immediately followed by addition of 0.5N NaOH, which was kept overnight. Aliquots of lysates were taken for determination of intracellular content of L-[2,3-³H] glutamate by scintillation counting. Sodium-independent uptake (0.027 ± 0.003 nmol mg⁻¹ min⁻¹) was determined using N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride, which was subtracted from the total uptake to obtain the sodium-dependent uptake. Determination of protein was assessed using the method of Peterson [47]. Experiments were performed in triplicate.

2.5. STATISTICAL ANALYSIS

Seizure data were expressed as % of animals presenting seizures. Glutamate uptake data were expressed as mean \pm standard error of mean. Statistical analysis of the data was performed by (i) Fisher's exact test for comparison of occurrence seizures and (ii) by ANOVA for multiple groups comparison, followed by the Tukey post hoc test for glutamate uptake. $P < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1. QUINOLINIC ACID-INDUCED SEIZURES

In order to establish the lowest dose of QA that caused tonic-clonic seizures in 100% of the immature rats, i.c.v. QA was injected in a range of doses (25, 50, 100, 200, 250, 300 and 400 nmol), as shown in Fig.1A. The lowest QA dose (25 nmol) induced seizures in 30% of animals. 50 and 100 nmol QA induced seizures in 50% of the animals, whereas 200 nmol QA induced seizures in 75% of the animals. Doses of 250 nmol QA or more induced seizures in all animals and 400 nmol QA induced death in 40% of pups. The lowest dose that caused seizures in all animals was 250 nmol. This dose was used in further experiments and the rats displayed tonic-clonic seizures within 60-80 seconds after infusion of QA. A typical behavioral pattern usually began with hyperactivity followed by wild running that resulted in tonic-clonic seizures. The ictus period was 100-120 seconds accompanied by hypoactivity with akinesia (data not shown).

Based on our previous findings with adult mice [29,55,70], three doses of guanosine p.o. were used to evaluate its anticonvulsant efficacy in young rats. Guanosine administered orally 75 min before 250nmol i.c.v. QA protected against seizures in a dose-dependent manner (Fig. 2) with 7.5 mg/kg guanosine (the maximum dose dissolved) protecting 52% of the pups ($p < 0.001$, compared with control group). MK-801 (0.5 mg/kg) and phenobarbital (60 mg/kg) protected all rats against QA-induced seizures.

3.2. PICROTOXIN-INDUCED SEIZURE

In order to preliminary investigate if the anticonvulsant effect of guanosine could had some putative degree of specificity towards the quinolinic acid-induced seizures, the picrotoxin-induced seizures model was also performed. The lowest dose of picrotoxin (GABAergic antagonist) that caused seizures in all pups was 2.4 mg/kg (established). Picrotoxin was injected s.c. in a dose range (0.8, 1.6, 2.0, 2.4 and 3.2 mg/kg), as shown in Fig. 2A. Higher doses (2.4 and 3.2 mg/kg) induced major seizures in all animals. Lower doses (0.8, 1.6 and 2.0 mg/kg) caused major seizures in 43, 67 and 80% of pups, respectively. Seizures induced by 2.4 mg/kg picrotoxin were prevented by the GABA_A agonist, phenobarbital, in a dose-response manner (Fig. 2B). Phenobarbital (60 mg/kg) inhibited 100% of seizures ($p < 0.001$ by Fisher exact test), whereas guanosine (7.5 mg/kg) and MK-801 (0.5 mg/kg) had no effect.

3.3. GLUTAMATE UPTAKE

In order to verify if the protection by guanosine against QA-induced seizures involved glutamate uptake modulation, cortical brain slices were prepared 10 min after i.c.v. administration and assayed for 100 μ M glutamate uptake. QA administration (250 nmol) significantly decreased glutamate uptake (0.106 ± 0.007 nmol mg^{-1} min^{-1} ; $p < 0.05$), compared with the control group (0.134 ± 0.005 nmol mg^{-1} min^{-1}). Pretreatment (75 min) with 7.5 mg/kg guanosine p.o. reversed this QA effect (0.136 ± 0.008 nmol mg^{-1} min^{-1} ; $p < 0.05$) (Fig 3). Guanosine administered alone had no effect on glutamate uptake (data not shown).

4. DISCUSSION

The QA-induced seizures model has been used as a pharmacological strategy used for inducing over stimulation of the glutamatergic system in adult animals [29,55]. Here we used the same strategy, adapting to using young rats. We observed a dose-dependent convulsing activity following i.c.v. QA administration (Fig.1A), with the same potency and characteristics as previously observed with adult rats [55].

Recent studies from our group have shown that QA decreases glutamate uptake by cultured astrocytes [64]. Additionally, it has been shown that QA affects other parameters of the glutamatergic system: decreases glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain [63] and stimulates synaptosomal glutamate release [57,64]. Moreover, we herein demonstrated a decrease in glutamate uptake by cortical slices obtained from brain of young rats presenting QA-induced seizures (Fig. 3). Taken together, these findings suggest multiple targets for QA on the glutamatergic system.

In vivo studies showed that GBPs affect the glutamatergic system [17,19,20,29,31,52,54,55,70]. GMP antagonizes the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task [54] and protects against chronically QA-induced striatal lesions [31]. It was recently shown that not only GMP, but also guanosine i.p., prevents seizures induced by QA in adult mice [55]. Finally, orally administered guanosine prevents seizures induced by overstimulation of the glutamatergic system (by QA and alpha-dendrotoxin) in adult mice [29,70]. Since nucleoside transport has been observed in intestinal cells [45], in cerebral micro vessels and in the blood-brain-barrier [27], we may expect that guanosine, administered systemically, is effective. As it has been shown that guanosine induces release of adenosine from brain, the role of adenine derivatives in this anticonvulsant effect cannot to be rule out. However, it is important to notice that previous works from our group seems indicate that guanosine effects, including anticonvulsant activity, on the glutamatergic system do not involve the adenosinergic system [19,70].

In the present work, by investigating the relevance of the ontogenetic development on the interactions between glutamate and guanine based purines, we extended previous results with adult animals, showing that orally-administered guanosine was protective in a dose-dependent manner against QA-induced seizures also in young rats (Fig. 1B), when MK-801 and phenobarbital totally prevented the QA-induced seizures (Fig. 1B). However, in the GABAergic seizures model (depicted in Fig.2A and B),

guanosine and MK-801 were ineffective (Fig. 2B), pointing to some degree of specificity of these two compounds towards the glutamatergic system. Phenobarbital is a specific agonist for GABA_A receptors and is used as an anticonvulsant in some gabaergic-induced animal seizure models. This drug, however, may indirectly reverse seizures induced by excitatory neurotransmitters, since it acts as an anticonvulsive agent in rats submitted to intrastriatal [33], intrahippocampal [69] and i.c.v. administration of QA [28].

Reports from the literature on the effect of *in vivo* QA on extracellular glutamate levels are controversial. Mena et al. [38] showed that intrahippocampal injection of QA increases up to 3-fold the extracellular glutamate concentration in this structure 10 min after administration and this effect persists for 24h, although Vezzani et al. [68] reported lack of this effect after hippocampal QA injection. The sources of extracellular glutamate released after QA-induced seizures are not completely characterized, but include glutamate efflux subsequent to cell swelling, a possible reversal of glutamate uptake and exocytotic release [14,42]. Another possibility for this increase in extracellular glutamate is our finding that QA i.c.v. administration decreased glutamate uptake by cortical slices from young rats (Fig. 3). Accordingly, It has been reported that guanosine increases basal glutamate uptake both in cortical astrocyte culture [17,19] and in neonatal cortical slices from rats [20]. As here guanosine *in vivo* reversed the QA-induced glutamate uptake decrease, our results point that the anticonvulsive effect of guanosine could involve at least partially the enhancement of glutamate uptake up to physiological levels, and that these effects are present in young rats. A more detailed ontogenetic aspect of these relationships is under current investigation in our group.

Most classical antiepileptic drugs have age-dependent anticonvulsant activity in various seizures models, being ineffective in some infant human epileptic syndromes [3,66]. Moreover, as most epileptic syndromes are related to dysfunctions of the glutamatergic system, including glutamate uptake [12,25,32,35,65], the present work point that guanosine could be considered in studies investigating treatments for epilepsy in young people, and possibly other neurological disorders associated with glutamatergic excitotoxicity.

REFERENCES

- [1] S. G. Amara and A. C. Fontana, Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate, *Neurochem.Int.* 41 (2002) 313-318.
- [2] C. M. Anderson and R. A. Swanson, Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions, *Glia* 32 (2000) 1-14.
- [3] J. J. Asconape, Some common issues in the use of antiepileptic drugs, *Semin.Neurol.* 22 (2002) 27-39.
- [4] J. K. Austin and D. W. Dunn, Progressive behavioral changes in children with epilepsy, *Prog.Brain Res.* 135 (2002) 419-427.
- [5] B. M. Baron, M. W. Dudley, D. R. McCarty, F. P. Miller, I. J. Reynolds, and C. J. Schmidt, Guanine nucleotides are competitive inhibitors of N-methyl-D-aspartate at its receptor site both in vitro and in vivo, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 250 (1989) 162-169.
- [6] H. F. Bradford, Glutamate, GABA and epilepsy, *Prog.Neurobiol.* 47 (1995) 477-511.
- [7] J. S. Burgos, A. Barat, D. O. Souza, and G. Ramirez, Guanine nucleotides protect against kainate toxicity in an ex vivo chick retinal preparation, *FEBS Lett.* 430 (1998) 176-180.
- [8] P. Camfield and C. Camfield, Epileptic syndromes in childhood: clinical features, outcomes, and treatment, *Epilepsia* 43 Suppl 3 (2002) 27-32.
- [9] H. Carlson, E. Ronne-Engstrom, U. Ungerstedt, and L. Hillered, Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy, *Neurosci.Lett.* 140 (1992) 30-32.
- [10] A. G. Chapman, Glutamate and epilepsy, *J.Nutr.* 130 (2000) 1043S-1045S.
- [11] Y. Chen and R. A. Swanson, Astrocytes and brain injury, *J.Cereb.Blood Flow Metab* 23 (2003) 137-149.

- [12] O. I. Claudio, P. Ferchmin, L. Velisek, E. F. Sperber, S. L. Moshe, and J. G. Ortiz, Plasticity of excitatory amino acid transporters in experimental epilepsy, *Epilepsia* 41 Suppl 6 (2000) S104-S110.
- [13] L. D. Cowan, The epidemiology of the epilepsies in children, *Ment.Retard.Dev.Disabil.Res.Rev.* 8 (2002) 171-181.
- [14] N. C. Danbolt, Glutamate uptake, *Prog.Neurobiol.* 65 (2001) 1-105.
- [15] M. J. During and D. D. Spencer, Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain, *Lancet* 341 (1993) 1607-1610.
- [16] C. L. Eastman, E. M. Urbanska, A. G. Chapman, and R. Schwarcz, Differential expression of the astrocytic enzymes 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase, kynurenine aminotransferase and glutamine synthetase in seizure-prone and non-epileptic mice, *Epilepsy Res.* 18 (1994) 185-194.
- [17] M. Farina, K. C. Dahm, F. D. Schwalm, A. M. Brusque, M. E. Frizzo, G. Zeni, D. O. Souza, and J. B. Rocha, Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen, *Toxicol.Sci.* 73 (2003) 135-140.
- [18] J. Folbergrova, R. Haugvicova, and P. Mares, Attenuation of seizures induced by homocysteic acid in immature rats by metabotropic glutamate group II and group III receptor agonists, *Brain Res.* 908 (2001) 120-129.
- [19] M. E. Frizzo, D. R. Lara, K. C. Dahm, A. S. Prokopiuk, R. A. Swanson, and D. O. Souza, Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures, *Neuroreport* 12 (2001) 879-881.
- [20] M. E. Frizzo, D. R. Lara, A. S. Prokopiuk, C. R. Vargas, C. G. Salbego, M. Wajner, and D. O. Souza, Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions, *Cell Mol.Neurobiol.* 22 (2002) 353-363.
- [21] R. Grunewald, Childhood seizures and their consequences for the hippocampus, *Brain* 125 (2002) 1935-1936.

- [22] T. Gudermann, T. Schoneberg, and G. Schultz, Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors, *Annu.Rev.Neurosci.* 20 (1997) 399-427.
- [23] M. P. Heyes, A. R. Wyler, O. Devinsky, J. A. Yergey, S. P. Markey, and N. S. Nadi, Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures, *Epilepsia* 31 (1990) 172-177.
- [24] G. L. Holmes, Overtreatment in children with epilepsy, *Epilepsy Res.* 52 (2002) 35-42.
- [25] E. M. Ingram, J. W. Wiseman, S. Tessler, and P. C. Emson, Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of the EL mouse, *J.Neurochem.* 79 (2001) 564-575.
- [26] I. Izquierdo and J. H. Medina, Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures, *Neurobiol.Learn.Mem.* 68 (1997) 285-316.
- [27] R. N. Kalaria and S. I. Harik, Adenosine receptors and the nucleoside transporter in human brain vasculature, *J.Cereb.Blood Flow Metab* 8 (1988) 32-39.
- [28] I. P. Lapin, I. B. Prakhie, and I. P. Kiseleva, Antagonism of seizures induced by the administration of the endogenous convulsant quinolinic acid into rat brain ventricles, *J.Neural Transm.* 65 (1986) 177-185.
- [29] D. R. Lara, A. P. Schmidt, M. E. Frizzo, J. S. Burgos, G. Ramirez, and D. O. Souza, Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents, *Brain Res.* 912 (2001) 176-180.
- [30] S. A. Lipton and P. A. Rosenberg, Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N.Engl.J.Med.* 330 (1994) 613-622.
- [31] C. Malcon, M. Achaval, F. Komlos, W. Partata, M. Sauregg, G. Ramirez, and D. O. Souza, GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum, *Neurosci.Lett.* 225 (1997) 145-148.

- [32] N. J. Maragakis and J. D. Rothstein, Glutamate transporters in neurologic disease, *Arch.Neurol.* 58 (2001) 365-370.
- [33] R. Marrannes and A. Wauquier, Episodic barrel rotations induced by intrastriatal injection of quinolinic acid in rats. Inhibition by anticonvulsants, *Pharmacol.Biochem.Behav.* 31 (1988) 153-162.
- [34] B. S. Meldrum, The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders, *Neurology* 44 (1994) S14-S23.
- [35] B. S. Meldrum, M. T. Akbar, and A. G. Chapman, Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy, *Epilepsy Res.* 36 (1999) 189-204.
- [36] B. S. Meldrum, Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology, *J.Nutr.* 130 (2000) 1007S-1015S.
- [37] B. S. Meldrum, Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives, *Prog.Brain Res.* 135 (2002) 3-11.
- [38] F. V. Mena, P. J. Baab, C. L. Zielke, and H. R. Zielke, In vivo glutamine hydrolysis in the formation of extracellular glutamate in the injured rat brain, *J.Neurosci.Res.* 60 (2000) 632-641.
- [39] Y. Nakagawa, H. Asai, T. Miura, J. Kitoh, H. Mori, and K. Nakano, Increased expression of 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase gene in brain of epilepsy-prone EI mice, *Brain Res.Mol.Brain Res.* 58 (1998) 132-137.
- [40] K. Nakano, H. Asai, and J. Kitoh, Abnormally high activity of 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase in brain of epilepsy-prone EI mice, *Brain Res.* 572 (1992) 1-4.
- [41] K. Nakano, S. Takahashi, M. Mizobuchi, T. Kuroda, K. Masuda, and J. Kitoh, High levels of quinolinic acid in brain of epilepsy-prone E1 mice, *Brain Res.* 619 (1993) 195-198.
- [42] T. P. Obrenovitch and J. Urenjak, Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy, *Prog.Neurobiol.* 51 (1997) 39-87.

- [43] S. Ozawa, H. Kamiya, and K. Tsuzuki, Glutamate receptors in the mammalian central nervous system, *Prog.Neurobiol.* 54 (1998) 581-618.
- [44] Y. Paas, A. Devillers-Thiery, J. P. Changeux, F. Medevielle, and V. I. Teichberg, Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor, *EMBO J.* 15 (1996) 1548-1556.
- [45] S. D. Patil and J. D. Unadkat, Sodium-dependent nucleoside transport in the human intestinal brush-border membrane, *Am.J.Physiol* 272 (1997) G1314-G1320.
- [46] M. M. Paz, M. Ramos, G. Ramirez, and D. Souza, Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum, *FEBS Lett.* 355 (1994) 205-208.
- [47] G. L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal.Biochem.* 83 (1977) 346-356.
- [48] L. O. Porciuncula, L. Vinade, S. Wofchuk, and D. O. Souza, Guanine based purines inhibit [(3)H]glutamate and [(3)H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats, *Brain Res.* 928 (2002) 106-112.
- [49] L. P. Price, New order from neurological disorders., *Nature* 399 (1999) A3-A5.
- [50] M. Ramos, D. O. Souza, and G. Ramirez, Specific binding of [3H]GppNHp to extracellular membrane receptors in chick cerebellum: possible involvement of kainic acid receptors, *FEBS Lett.* 406 (1997) 114-118.
- [51] M. P. Rathbone, P. J. Middlemiss, J. W. Gysbers, C. Andrew, M. A. Herman, J. K. Reed, R. Ciccarelli, P. Di Iorio, and F. Caciagli, Trophic effects of purines in neurons and glial cells, *Prog.Neurobiol.* 59 (1999) 663-690.
- [52] R. Roesler, M. R. Vianna, F. De Paris, C. Rodrigues, M. K. Sant'Anna, J. Quevedo, and M. B. Ferreira, NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats, *Behav.Brain Res.* 112 (2000) 99-105.

- [53] J. D. Rothstein, M. Dykes-Hoberg, C. A. Pardo, L. A. Bristol, L. Jin, R. W. Kuncl, Y. Kanai, M. A. Hediger, Y. Wang, J. P. Schielke, and D. F. Welty, Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate, *Neuron* 16 (1996) 675-686.
- [54] M. A. Rubin, A. Jurach, E. M. Costa Junior, T. T. Lima, R. E. Jimenez-Bernal, J. Begnini, D. O. Souza, and C. F. de Mello, GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats, *Neuroreport* 7 (1996) 2078-2080.
- [55] A. P. Schmidt, D. R. Lara, M. J. de Faria, P. A. da Silveira, and S. D. Onofre, Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice, *Brain Res.* 864 (2000) 40-43.
- [56] G. Segovia, A. Porras, A. Del Arco, and F. Mora, Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective, *Mech.Ageing Dev.* 122 (2001) 1-29.
- [57] T. W. Stone, Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance, *Prog.Neurobiol.* 64 (2001) 185-218.
- [58] S. Suzuki and A. Mori, Regional distribution of tyrosine, tryptophan, and their metabolites in the brain of epileptic EI mice, *Neurochem.Res.* 17 (1992) 693-698.
- [59] J. W. Swann, Recent experimental studies of the effects of seizures on brain development, *Prog.Brain Res.* 135 (2002) 391-393.
- [60] R. A. Swanson, J. Liu, J. W. Miller, J. D. Rothstein, K. Farrell, B. A. Stein, and M. C. Longuemare, Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes, *J.Neurosci.* 17 (1997) 932-940.
- [61] K. Tanaka, K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, and K. Wada, Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1, *Science* 276 (1997) 1699-1702.

[62] C. I. Tasca, L. F. Cardoso, L. H. Martini, G. Ramirez, and D. O. Souza, Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptor activation, *Neurochem.Res.* 23 (1998) 183-188.

[63] R. G. Tavares, C. I. Tasca, C. E. Santos, M. Wajner, D. O. Souza, and C. S. Dutra-Filho, Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain, *Neuroreport* 11 (2000) 249-253.

[64] R. G. Tavares, C. I. Tasca, C. E. Santos, L. B. Alves, L. O. Porciuncula, T. Emanuelli, and D. O. Souza, Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes, *Neurochem.Int.* 40 (2002) 621-627.

[65] Y. Ueda, T. Doi, J. Tokumaru, H. Yokoyama, A. Nakajima, Y. Mitsuyama, H. Ohya-Nishiguchi, H. Kamada, and L. J. Willmore, Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid, *J.Neurochem.* 76 (2001) 892-900.

[66] J. A. Ure and M. Perassolo, Update on the pathophysiology of the epilepsies, *J.Neurol.Sci.* 177 (2000) 1-17.

[67] L. Velisek and P. Mares, Age-dependent anticonvulsant action of clonazepam in the N-methyl-D-aspartate model of seizures, *Pharmacol.Biochem.Behav.* 52 (1995) 291-296.

[68] A. Vezzani, U. Ungerstedt, E. D. French, and R. Schwarcz, In vivo brain dialysis of amino acids and simultaneous EEG measurements following intrahippocampal quinolinic acid injection: evidence for a dissociation between neurochemical changes and seizures, *J.Neurochem.* 45 (1985) 335-344.

[69] A. Vezzani, H. Q. Wu, M. Tullii, and R. Samanin, Anticonvulsant drugs effective against human temporal lobe epilepsy prevent seizures but not neurotoxicity induced in rats by quinolinic acid: electroencephalographic, behavioral and histological assessments, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 239 (1986) 256-263.

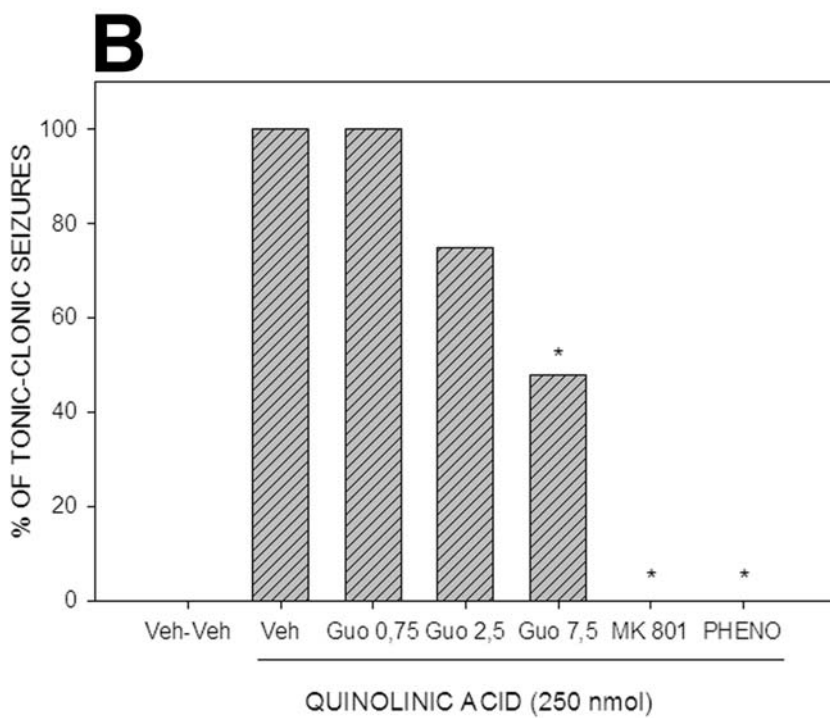
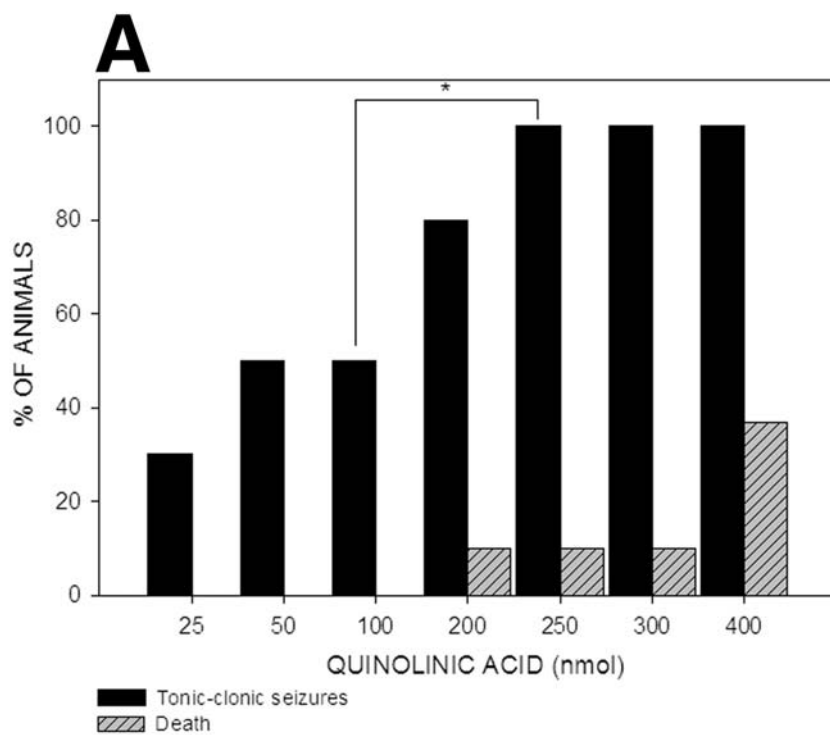
[70] E.R. Vinadé, A. P. Schmidt, M. E. S. Frizzo, I. Izquierdo, E. Elisabetsky, Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice, *Brain Res.* 977 (2003) 97-102.

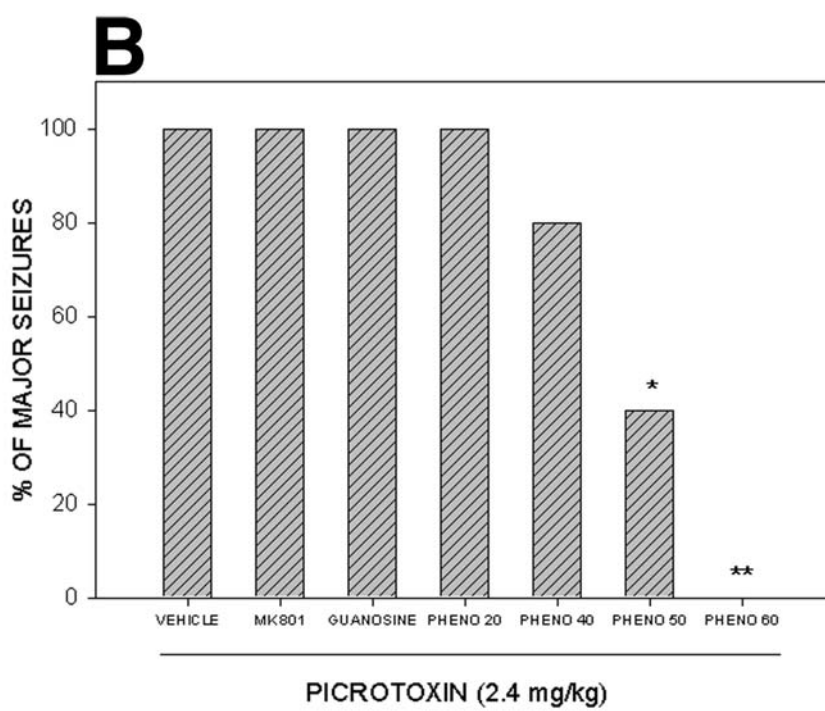
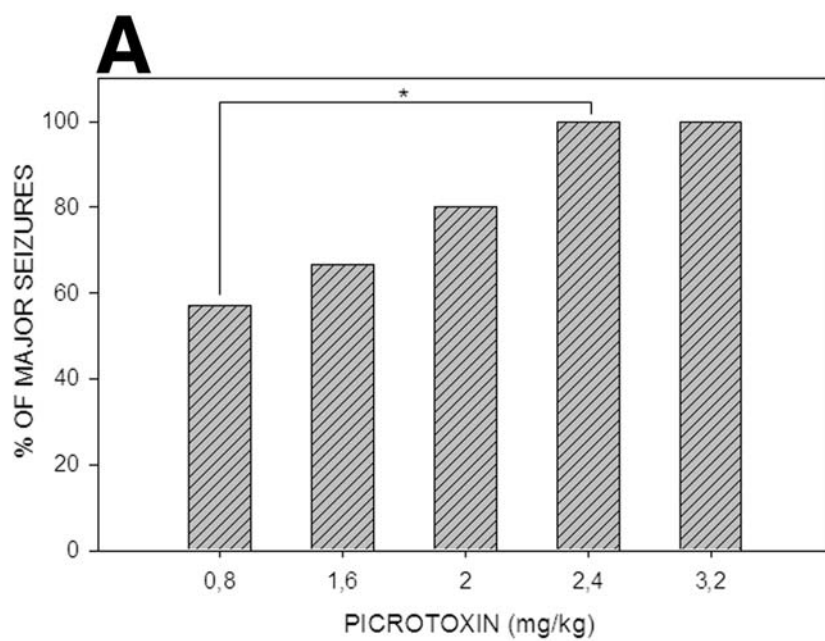
FIGURE LEGENDS

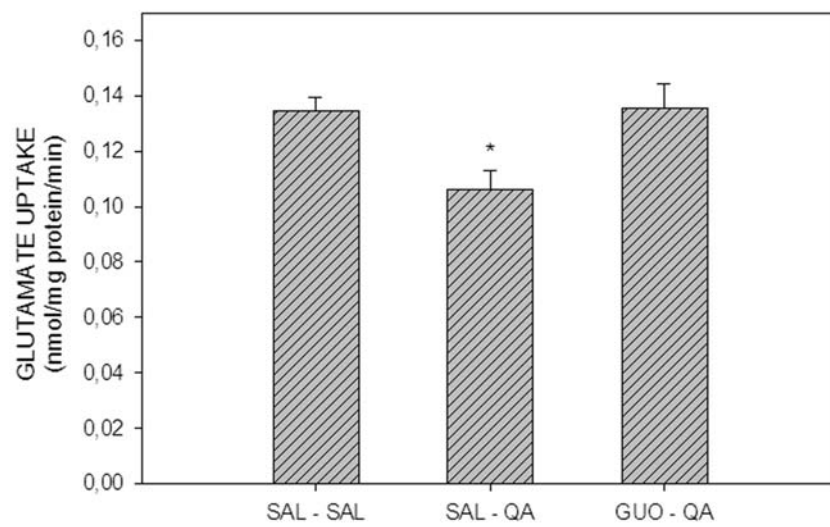
Fig. 1 (A) Dose response curve of Quinolinic acid-induced seizures and death. Pups were injected i.c.v. (0.5µl) with Quinolinic acid in indicated doses and observed for 10 min for the presence of tonic-clonic seizures and death. **(B)** Anticonvulsant activities of guanosine, MK-801 and phenobarbital against quinolinic acid-induced seizures. Pups were pretreated with Guanosine p.o. (0.75, 2.5 or 7.5 mg/kg – 75 min), MK-801 i.p. (0.5 mg/kg – 30 min), Phenobarbital i.p. (60 mg/kg – 30 min) before i.c.v. QA (250 nmol). The pups were observed for 10 min for the occurrence of tonic-clonic seizures. n = 10 animals/group. * = p < 0.001 (Fisher exact test), as compared with vehicle-quinolinic acid group. Data are expressed as percentage of pups that presented seizures.

Fig. 2 (A) Picrotoxin-induced seizures. Pups were injected s.c. (1 mL/kg) with picrotoxin in indicated concentrations. **(B)** Anticonvulsant activities against Picrotoxin-induced seizures. Pups were pretreated with MK-801 i.p. (0.5 mg/kg – 30 min), phenobarbital i.p. (20, 40, 50 and 60 mg/kg – 30 min) or guanosine p.o. (7.5 mg/kg – 75 min) before picrotoxin s.c. (2.4 mg/kg) and observed for 60 min for the presence of major seizures. 7.5 mg/kg Guanosine was selected due its anticonvulsant effect on the Quinolinic acid seizures model. n = 10 animals/group. * = p < 0.05 and ** = p < 0.001 (Fisher exact test) as compared with vehicle-picrotoxin group. Data are expressed as percentage of pups that presented major seizures.

Fig. 3 Glutamate uptake from cortical slices obtained 10 min after i.c.v. QA administration. Groups: vehicle – vehicle (VEH - VEH); vehicle – quinolinic acid (VEH - QA); guanosine – quinolinic acid (GUO - QA). Data are means ± SEM, n =10 animals/group. * = p < 0.05 (ANOVA followed by Tukey post hoc test) as compared with the other groups.







3. DISCUSSÃO

3. DISCUSSÃO

O ácido quinolínico (AQ) tem sido usado como uma estratégia farmacológica para indução da hiperestimulação do sistema glutamatérgico, visto que, além da ação agonística sobre receptores NMDA (Stone, 2001) atua em vários outros parâmetros do sistema glutamatérgico. Tavares et al. (2000) demonstraram que o ácido quinolínico diminui a captação de glutamato em vesículas sinápticas. Além disso, também diminui a captação de glutamato em culturas primárias de astrócitos e estimula a liberação sinaptossomal de glutamato (Tavares et al., 2002). *In vivo*, mostramos neste trabalho que o AQ possui um efeito convulsivo dose-dependente com a mesma potência e características daquelas observadas anteriormente em ratos adultos (Schmidt et al., 2000). Observamos também uma diminuição na captação de glutamato em fatias corticais de ratos jovens submetidos a convulsão por ácido quinolínico.

Inúmeros estudos têm demonstrado que os nucleotídeos derivados da guanina afetam o sistema glutamatérgico (Rubin et al., 1996; Roesler et al., 2000; Schimidt et al., 2000; Frizzo et al., 2001; Lara et al., 2001; Malcon et al., 2001; Frizzo et al., 2002; Farina et al., 2003; Vinadé et al., 2003). GMP antagoniza o efeito facilitatório do glutamato sobre a tarefa de esQUIVA inibitória (Rubin et al., 1996) e protege contra lesões estriatais induzidas por ácido quinolínico (Malcon et al., 2001). Schmidt et al. (2000) demonstraram que GMP e guanosina administradas intraperitonealmente previnem convulsões induzidas em camundongos adultos. Além disso, a administração oral de guanosina em camundongos adultos reverte convulsões induzidas por AQ e α -dendrotoxina (Lara et al., 2001; Vinadé et al., 2003).

No presente trabalho, com o objetivo de investigar a relevância da interação entre o sistema glutamatérgico e os derivados da guanina durante o desenvolvimento,

ampliamos os resultados obtidos com animais adultos e demonstramos que, quando administrada oralmente, a guanosina reverte, de forma dose-dependente, 50% das convulsões induzidas por AQ em animais jovens (Fig. 1B). Além disso, demonstramos também que a diminuição da captação de glutamato observada nos animais submetidos à convulsão por AQ foi revertida aos níveis do controle pelo tratamento com guanosina. Portanto, a modulação da captação de glutamato parece estar envolvida tanto no desencadeamento de convulsão por ácido quinolínico quanto no efeito anticonvulsivo da guanosina. Esta interpretação está de acordo com o observado por Mena et al. (2000) de que a injeção i.c.v. de ácido quinolínico aumenta a concentração extracelular de glutamato em hipocampo 10 min após a administração e que este efeito persiste por 24 horas. No entanto, em convulsões induzidas por picrotoxina (Fig.2A and B), a guanosina foi inefetiva (Fig. 2B), apontando para um certo grau de especificidade em relação ao sistema glutamatérgico.

A maioria das drogas antiepilépticas disponíveis atualmente apresentam efeitos idade-dependentes, sendo inefetivas em algumas síndromes epilépticas infantis como a síndrome de Lennox-Gastaut (Stables et al., 2002). Desta forma, nosso trabalho mostra que os derivados da guanina, principalmente guanosina, são importantes moduladores do sistema glutamatérgicos podendo, portanto, serem considerados em estudos envolvendo a investigação de novas terapias anticonvulsivas e/ou transtornos neurológicos envolvendo excitotoxicidade glutamatérgica.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

- Ácido quinolínico, administrado i.c.v. em animais jovens, induziu de forma dose-dependente convulsões do tipo tônico-clônicas, sendo a dose de 250 nmol a menor dose que convulsionou todos os animais;
- ácido quinolínico, administrado i.c.v. na dose de 250 nmol, diminuiu significativamente a captação de glutamato em fatias de córtex de ratos jovens;
- guanosina administrada oralmente reverteu, de forma dose-dependente, das convulsões induzidas por ácido quinolínico em ratos jovens;
- guanosina, na dose de 7,5 mg/kg, reverteu aos níveis do controle a diminuição da captação de glutamato induzida por AQ;
- MK-801 e fenobarbital, nas doses de 0,5 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente, reverteram totalmente as convulsões induzidas por AQ;
- picrotoxina, administrada s.c. em animais jovens, induziu *status epilepticus* de forma dose-dependente, sendo a dose de 2,4 mg/kg a menor dose que induziu *status* em 100% dos animais;
- fenobarbital reverteu o *status epilepticus* induzido por picrotoxina de forma dose-dependente em animais jovens;
- guanosina e MK-801, na dose de 7,5 mg/kg, não tiveram efeito sobre convulsões induzidas por picrotoxina em ratos jovens.

5. PERSPECTIVAS

5. PERSPECTIVAS

- padronizar os modelos de convulsão induzida por ácido caínico e pilocarpina em animais jovens (P12-P14);
- avaliar o efeito da guanosina e de agonistas de mGluRs II sobre convulsões induzidas por ácido caínico e pilocarpina em animais jovens;
- avaliar como crises convulsivas induzidas por ácido caínico e pilocarpina em períodos iniciais do desenvolvimento cerebral (P12-P14) alteram o processo de epileptogênese no cérebro adulto;
- avaliar o efeito da guanosina e de agonistas de mGluRs II sobre o processo epileptogênico em animais adultos submetidos, quando jovens, aos modelos do ácido caínico e pilocarpina;
- avaliar o perfil da captação de glutamato em córtex, hipocampo e estriado de animais jovens submetidos aos modelos do ácido caínico e pilocarpina;
- avaliar o efeito da guanosina e de agonistas de mGluRs II sobre a captação de glutamato em córtex, hipocampo e estriado de animais jovens submetidos aos modelos do ácido caínico e pilocarpina;
- avaliar o perfil da captação de glutamato em animais adultos submetidos, quando jovens, aos modelos do ácido caínico e pilocarpina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; SUGIHARA, H.; NAWA, H.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N. and NAKANISHI, S. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. **Journal of Biological Chemistry** **267**: 13361-13368, 1992.
- AMARA, S.G. and ARRIZA, J.L. Neurotransmitter transporters: three distinct gene families. **Current Opinion in Neurobiology** **3**: 337-344, 1993.
- AMARA, S.G. and FONTANA, A.C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochemistry International** **41**: 313-318, 2002.
- ANDERSON, C.M. and SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia** **32**: 1-14, 2000.
- ANNEGERS, J.F.; HAUSER, W.A. and ELVEBACK, L.R. Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. **Epilepsia** **20**: 729-737, 1979.
- ANNEGERS, J.F.; DUBINSKY, S.; COAN, S.P.; NEWMARK, M.E. and ROHT, L. The incidence of epilepsy and unprovoked seizures in multiethnic, urban health maintenance organizations. **Epilepsia** **40**: 502-506, 1999.
- ARRIZA, J.L.; FAIRMAN, W.A.; WADICHE, J.I.; MURDOCH, G.H.; KAVANAUGH, M.P. and AMARA, S.G. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. **Journal of Neuroscience** **14**: 5559-5569, 1994.
- ARRIZA, J.L.; ELIASOF, S.; KAVANAUGH, M.P. and AMARA, S.G. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94: 4155-4160, 1997.

BEN ARI, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. **Neuroscience 14:** 375-403, 1985.

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

BERG, A.T. and SHINNAR, S. The contributions of epidemiology to the understanding of childhood seizures and epilepsy. **Journal of Child Neurology 9 Suppl 2:** 19-26, 1994.

BERG, A.T.; SHINNAR, S.; LEVY, S.R. and TESTA, F.M. Newly diagnosed epilepsy in children: presentation at diagnosis. **Epilepsia 40:** 445-452, 1999.

BERG, A.T.; LEVY, S.R.; TESTA, F.M. and SHINNAR, S. Classification of childhood epilepsy syndromes in newly diagnosed epilepsy: interrater agreement and reasons for disagreement. **Epilepsia 40:** 439-444, 1999.

BRADFORD, H.F. Glutamate, GABA and epilepsy. **Progress in Neurobiology 47:** 477-511, 1995.

CARLSON, H.; RONNE-ENGSTROM, E.; UNGERSTEDT, U. and HILLERED, L. Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. **Neuroscience Letters 140:** 30-32, 1992.

CHAPMAN, A.G. Glutamate and epilepsy. **Journal of Nutrition 130:** 1043S-1045S, 00.

- CHAUDHRY, F.A.; LEHRE, K.P.; VAN LOOKEREN, C.M.; OTTERSEN, O.P.; DANBOLT, N.C. and STORM-MATHISEN, J. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. **Neuron** **15**: 711-720, 1995.
- CHEN, Y. and SWANSON, R.A. Astrocytes and brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** **23**: 137-149, 2003.
- CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; D'ALIMONTE, I.; GIULIANI, P.; FLORIO, T.; CACIAGLI, F.; MIDDLEMISS, P.J. and RATHBONE, M.P. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. **Glia** **29**: 202-211, 2000.
- COCKERELL, O.C.; ECKLE, I.; GOODRIDGE, D.M.; SANDER, J.W. and SHORVON, S.D. Epilepsy in a population of 6000 re-examined: secular trends in first attendance rates, prevalence, and prognosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry** **58**: 570-576, 1995.
- CONTI, F.; DEBIASI, S.; MINELLI, A. and MELONE, M. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. **Glia** **17**: 254-258, 1996.
- CONTI, F.; MINELLI, A.; DEBIASI, S. and MELONE, M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. **Molecular Neurobiology** **14**: 1-18, 1997.
- CONTI, F.; DEBIASI, S.; MINELLI, A.; ROTHSTEIN, J.D. and MELONE, M. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. **Cerebral Cortex** **8**: 108-116, 1998.

COTMAN, C.W.; KAHLE, J.S.; MILLER, S.E.; ULAS, J. AND BRIDGES, R.J. Excitatory aminoacid neurotransmission. *Psychopharmacology*, 7: 75-85, 1995.

COWAN, L.D.; BODENSTEINER, J.B.; LEVITON, A. and DOHERTY, L. Prevalence of the epilepsies in children and adolescents. ***Epilepsia* 30**: 94-106, 1989.

COWAN, L.D. The epidemiology of the epilepsies in children. ***Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 8**: 171-181, 2002.

CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W. and WATKINS, J.C. The depression of spinal neurones by gamma-amino-n-butyric acid and beta-alanine. ***Journal of Physiology* 146**: 185-203, 1959.

CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W. and WATKINS, J.C. Chemical excitation of spinal neurones. ***Nature* 183**: 611-612, 1959.

CURTIS, D.R. and WATKINS, J.C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. ***Journal of Neurochemistry* 6**: 117-141, 1960.

CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W. and WATKINS, J.C. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. ***Journal of Physiology* 150**: 656-682, 1960.

DANBOLT, N.C.; CHAUDHRY, F.A.; DEHNES, Y.; LEHRE, K.P.; LEVY, L.M.; ULLENSVANG, K. and 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, 01.

- DEHNES, Y.; CHAUDHRY, F.A.; ULLENSVANG, K.; LEHRE, K.P.; STORM-MATHISEN, J. and 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. **Journal of Neuroscience** **18**: 3606-3619, 1998.
- DURING, M.J. and SPENCER, D.D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. **Lancet** **341**: 1607-1610, 1993.
- ENGEL JR, J. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6): 796-803, 2001.
- ERIKSSON, K.J. and KOIVIKKO, M.J. Prevalence, classification, and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. **Epilepsia** **38**: 1275-1282, 1997.
- FAIRMAN, W.A.; VANDENBERG, R.J.; ARRIZA, J.L.; KAVANAUGH, M.P. and AMARA, S.G. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. **Nature** **375** : 599-603, 1995.
- FARINA, M.; DAHM, K.C.; SCHWALM, F.D.; BRUSQUE, A.M.; FRIZZO, M.E.; ZENI, G.; SOUZA, D.O. and ROCHA, J.B. Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. **Toxicological Science** **73**: 135-140, 2003.
- FLOR, P.J.; GOMEZA, J.; TONES, M.A.; KUHN, R.; PIN, J.P. and KNOPFEL, T. The C-terminal domain of the mGluR1 metabotropic glutamate receptor affects sensitivity to agonists. **Journal of Neurochemistry** **67**: 58-63, 1996.

- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **Journal of Neurochemistry** **42**: 1-11, 1984.
- FRIZZO, M.E.; LARA, D.R.; DAHM, K.C.; PROKOPIUK, A.S.; SWANSON, R.A. and SOUZA, D.O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **Neuroreport** **12**: 879-881, 2001.
- FRIZZO, M.E.; LARA, D.R.; PROKOPIUK, A.S.; VARGAS, C.R.; SALBEGO, C.G.; WAJNER, M. and SOUZA, D.O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cellular and Molecular Neurobiology** **22**: 353-363, 2002.
- FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J.D. and MARTIN, L.J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. **Journal of Neuroscience** **17**: 8363-8375, 1997.
- FURUTA, A.; MARTIN, L.J.; LIN, C.L.; DYKES-HOBERG, M. and ROTHSTEIN, J.D. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. **Neuroscience** **81**: 1031-1042, 1997.
- GEGELASHVILI, G. and SCHOUSBOE, A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. **Brain Research Bulletin** **45**: 233-238, 1998.
- GEGELASHVILI, G. and SCHOUSBOE, A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. **Brain Research Bulletin** **45**: 233-238, 1998.
- GODDARD, G.V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature** **214**: 1020-1021, 1967.

- GOTTFRIED, C.; TRAMONTINA, F.; GONCALVES, D.; GONCALVES, C.A.; MORIGUCHI, E.; DIAS, R.D.; WOFCHUK, S.T. and SOUZA, D.O. Glutamate uptake in cultured 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.; SCHONEBERG, T. and SCHULTZ, G. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. **Annual Review of Neuroscience** **20**: 399-427, 1997.
- HAUSER, W.A.; ANNEGERS, J.F. and KURLAND, L.T. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. **Epilepsia** **32**: 429-445, 1991.
- HAUSER, W.A.; ANNEGERS, J.F. and KURLAND, L.T. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. **Epilepsia** **34**: 453-468, 1993.
- HOLLMANN, M. and HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annual Review of Neuroscience** **17**: 31-108, 1994.
- HOUAMED, K.M.; KUIJPER, J.L.; GILBERT, T.L.; HALDEMAN, B.A.; O'HARA, P.J.; MULVIHILL, E.R.; ALMERS, W. and HAGEN, F.S. Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. **Science** **252**: 1318-1321, 1991.
- HU, W.H.; WALTERS, W.M.; XIA, X.M.; KARMALLY, S.A. and BETHEA, J.R. Neuronal glutamate transporter EAAT4 is expressed in astrocytes. **Glia** **44**: 13-25, 2003.

- INGRAM, E.M.; WISEMAN, J.W.; TESSLER, S. and EMSON, P.C. Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of the EL mouse. **Journal of Neurochemistry** **79**: 564-575, 2001.
- ISHIDA, M.; SAITOH, T. and SHINOZAKI, H. A new metabotropic glutamate receptor agonist: developmental change of its sensitivity to receptors in the newborn rat spinal cord. **Neuroscience Letters** **160**: 156-158, 1993.
- ITO, I.; KOHDA, A.; TANABE, S.; HIROSE, E.; HAYASHI, M.; MITSUNAGA, S. and SUGIYAMA, H. 3,5-Dihydroxyphenyl-glycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. **Neuroreport** **3**: 1013-1016, 1992.
- IZQUIERDO, I. and MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory** **68**: 285-316, 1997.
- JALLON, P.; GOUMAZ, M.; HAENGGELI, C. and MORABIA, A. Incidence of first epileptic seizures in the canton of Geneva, Switzerland. **Epilepsia** **38**: 547-552, 1997.
- JOHNSON, J. W. and ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature** **325**: 529-531, 1987.
- KANAI, Y. and 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. and HEDIGER, M.A. The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport. **Journal of Biological Chemistry** **269**: 20599-20606, 1994.

KEMP, J. A. and LEESON, P. D. The glycine site of the NMDA receptor - five years on. **Trends Pharmacological Science** **14**: 20-25, 1993.

KLOCKNER, U.; STORCK, T.; CONRADT, M. and STOFFEL, W. Electrogenic L-glutamate uptake in *Xenopus laevis* oocytes expressing a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST-1). **Journal of Biological Chemistry** **268**: 14594-14596, 1993.

KOMMERS, T.; RODNIGHT, R.; BOECK, C.; VENDITE, D.; OLIVEIRA, D.; HORN, J.; OPPELT, D. and WOFCHUK, S. Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein is stimulated by glutamate via NMDA receptors in cortical microslices and in mixed neuronal/glia cell cultures prepared from the cerebellum. **Developmental Brain Research** **137**: 139-148, 2002.

KRAMER, U.; NEVO, Y.; NEUFELD, M.Y.; FATAL, A.; LEITNER, Y. and HAREL, S. Epidemiology of epilepsy in childhood: a cohort of 440 consecutive patients. **Pediatric Neurology** **18**: 46-50, 1998.

KREBS, H.A. Metabolism of aminoacids. IV. Syntesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymatic hydrolisis of glutamine in animal tissue. **Biochemical Journal** **19**: 1951-1969, 1935.

KURTZ, Z.; TOOKEY, P. and ROSS, E. Epilepsy in young people: 23 year follow up of the British national child development study. **BMJ** **316**: 339-342, 1998.

- LARA, D.R.; SCHMIDT, A.P.; FRIZZO, M.E.; BURGOS, J.S.; RAMIREZ, G. and 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.; LEVY, L.M.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. and DANBOLT, N.C. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. **Journal of Neuroscience 15**: 1835-1853, 1995.
- LEHRE, K.P. and DANBOLT, N.C. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. **Journal of Neuroscience 18**: 8751-8757, 1998.
- LEVY, L.M.; ATTWELL, D.; HOOVER, F.; ASH, J.F.; BJORAS, M. and DANBOLT, N.C. Inducible expression of the GLT-1 glutamate transporter in a CHO cell line selected for low endogenous glutamate uptake. **FEBS Letters 422**: 339-342, 1998.
- LIPTON, S.A. and ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New England Journal of Medicine 330**: 613-622, 1994.
- MALCON, C.; ACHAVAL, M.; KOMLOS, F.; PARTATA, W.; SAURESSIG, M.; RAMIREZ, G. and SOUZA, D.O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum. **Neurosci Letters 225**: 145-148, 1997.
- MARAGAKIS, N.J. and ROTHSTEIN, J.D. Glutamate transporters in neurologic disease. **Archives of Neurology 58**: 365-370, 2001.

- MASU, M.; TANABE, Y.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R. and NAKANISHI, S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. **Nature** **349**: 760-765, 1991.
- MCDONALD, J.W. and JOHNSTON, M.V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Research Reviews** **15**: 41-70, 1990.
- MELDRUM, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology** **44**: S14-S23, 1994.
- MELDRUM, B.S.; AKBAR, M.T. and CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Research** **36**: 189-204, 1999.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition** **130**: 1007S-1015S, 2000.
- MELLO, L. E. A. M., BORTOLOTTI, Z.A. e CAVALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. *Neurobiologia*, 49: 231-268, 1986.
- MENA, F.V.; BAAB, P.J.; ZIELKE, C.L. and ZIELKE, H.R. In vivo glutamine hydrolysis in the formation of extracellular glutamate in the injured rat brain. **Journal of Neuroscience Research** **60**: 632-641, 2000.
- MODY, I and SCHWARTZKROIN, P. A. Acute seizures models (intact animals). IN: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, eds. J. Engel Jr., TA Pedley, pp. 397-404, Lippincott-Raven Publishers, 1997.

MURPHY, C.C.; TREVATHAN, E. and YEARGIN-ALLSOPP, M. Prevalence of epilepsy and epileptic seizures in 10-year-old children: results from the Metropolitan Atlanta Developmental Disabilities Study. **Epilepsia** **36**: 866-872, 1995.

MURPHY, S.N. and MILLER, R.J. A glutamate receptor regulates Ca²⁺ mobilization in hippocampal neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **85**: 8737-8741, 1988.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Alterações neuroquímicas associadas às epilepsias do lobo temporal. IN: Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos, eds. Da Costa, J. C.; Palmini, A.; Yacubian, E. M. T., Cavalheiro, E. A., pp 75-100, São Paulo, 1998.

NAITO, S. and UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. **Journal of Neurochemistry** **44**: 99-109, 1985.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science** **258**: 597-603, 1992.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T. and HANSEN, A.J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Reviews: Neuroscience** **3**: 748-755, 2002.

NICOLETTI, F.; MEEK, J.L.; IADAROLA, M.J.; CHUANG, D.M.; ROTH, B.L. and COSTA, E. Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry** **46**: 40-46, 1986.

NICOLETTI, F.; WROBLEWSKI, J.T.; NOVELLI, A.; ALHO, H.; GUIDOTTI, A. and COSTA, E. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing

system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells.

Journal of Neuroscience **6**: 1905-1911, 1986.

NICOLETTI, F.; WROBLEWSKI, J.T.; FADDA, E. and COSTA, E. Pertussis toxin inhibits signal transduction at a specific metabotropic glutamate receptor in primary cultures of cerebellar granule cells. **Neuropharmacology** **27**: 551-556, 1988.

NICOLETTI, F.; BRUNO, V.; COPANI, A.; CASABONA, G. and KNOPFEL, T. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? **Trends in Neuroscience** **19**: 267-271, 1996.

OBRENOVITCH, T.P.; URENJAK, J.; ZILKHA, E. and JAY, T.M. Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox. **International Journal of Developmental Neuroscience** **18**: 281-287, 2000.

OZAWA, S.; KAMIYA, H. and TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology** **54**: 581-618, 1998.

PAZ, M.M.; RAMOS, M.; RAMIREZ, G. and SOUZA, D. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. **FEBS Letter** **355**: 205-208, 1994.

PIN, J.P. and 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.; KOEPESELL, H.; STORM-MATHISEN, J.; SEEBERG, E. and KANNER, B.I. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature** **360**: 464-467, 1992.

- PORCIUNCULA, L.O.; VINADE, L.; WOFCHUK, S. and SOUZA, D.O. Guanine based purines inhibit [(3)H]glutamate and [(3)H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. **Brain Research 928**: 106-112, 2002.
- PRICE, L.P. New order from neurological disorders. **Nature 399**: A3-A5, 99.
- RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P. and CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology 59**: 663-690, 1999.
- RAUEN, T.; JESERICH, G.; DANBOLT, N.C. and KANNER, B.I. Comparative analysis of sodium-dependent L-glutamate transport of synaptosomal and astroglial membrane vesicles from mouse cortex. **FEBS Letter 312**: 15-20, 1992.
- RAUEN, T. and KANNER, B.I. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. **Neurosci Letter 169**: 137-140, 1994.
- ROESLER, R.; VIANNA, M.R.; DE PARIS, F.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M.K.; QUEVEDO, J. and FERREIRA, M.B. NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats. **Behavioural Brain Research 112**: 99-105, 2000.
- ROTHSTEIN, J.D.; MARTIN, L.; LEVEY, A.I.; DYKES-HOBERG, M.; JIN, L.; WU, D.; NASH, N. and KUNCL, 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. and 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.

RUBIN, M.A.; JURACH, A.; COSTA JUNIOR, E.M.; LIMA, T.T.; JIMENEZ-BERNAL, R.E.; BEGNINI, J.; SOUZA, D.O. and DE MELLO, C.F. GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats. **Neuroreport** **7**: 2078-2080, 1996.

SCHMIDT, A.P.; LARA, D.R.; DE FARIA, M.J.; DA SILVEIRA, P.A. and ONOFRE, S.D. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Research** **864**: 40-43, 00.

SCHOEPP, D.D. Novel functions for subtypes of metabotropic glutamate receptors. **Neurochemistry International** **24**: 439-449, 1994.

SCHOUSBOE, A.; WESTERGAARD, N.; WAAGEPETERSEN, H.S.; LARSSON, O.M.; BAKKEN, I.J. and SONNEWALD, U. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. **Glia** **21**: 99-105, 1997.

SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A. and MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mechanisms of Ageing and Development** **122**: 1-29, 2001.

SIDENVALL, R.; FORSGREN, L.; BLOMQUIST, H.K. and HEIJBEL, J. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. **Acta Paediatrica** **82**: 60-65, 1993.

SIDENVALL, R.; FORSGREN, L. and HEIJBEL, J. Prevalence and characteristics of epilepsy in children in northern Sweden. **Seizure** **5**: 139-146, 1996.

- SILLANPAA, M. Long-term outcome of epilepsy. **Epileptic Disorders 2**: 79-88, 2000.
- SLADDECZEK, F.; PIN, J.P.; RECASENS, M.; BOCKAERT, J. and WEISS, S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. **Nature 317**: 717-719, 1985.
- STABLES, J.P.; BERTRAM, E.H.; WHITE, H.S.; COULTER, D.A.; DICHTER, M.A.; JACOBS, M.P.; LOSCHER, W.; LOWENSTEIN, D.H.; MOSHE, S.L.; NOEBELS, J.L. and DAVIS, M. Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland. **Epilepsia 43**: 1410-1420, 2002.
- STONE, T.W. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. **Progress in Neurobiology 64**: 185-218, 2001.
- STORCK, T.; SCHULTE, S.; HOFMANN, K. and STOFFEL, W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89**: 10955-10959, 1992.
- SUGIYAMA, H.; ITO, I. and HIRONO, C. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. **Nature 325**: 531-533, 1987.
- TAKAHASHI, K.; TSUCHIDA, K.; TANABE, Y.; MASU, M. and NAKANISHI, S. Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. **Journal of Biological Chemistry 268**: 19341-19345, 1993.
- TANABE, Y.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R. and NAKANISHI, S. A family of metabotropic glutamate receptors. **Neuron 8**: 169-179, 1992.

TANAKA, K.; WATASE, K.; MANABE, T.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, K.; IWAMA, H.; NISHIKAWA, T.; ICHIHARA, N.; KIKUCHI, T.; OKUYAMA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M. and WADA, K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science** **276**: 1699-1702, 1997.

TAVARES, R.G.; TASCA, C.I.; SANTOS, C.E.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O. and DUTRA-FILHO, C.S. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. **Neuroreport** **11**: 249-253, 2000.

TAVARES, R.G.; TASCA, C.I.; SANTOS, C.E.; ALVES, L.B.; PORCIUNCULA, L.O.; EMANUELLI, T. and SOUZA, D.O. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. **Neurochemistry International** **40**: 621-627, 2002.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z. and TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research** **9**: 315-335, 1983.

UEDA, Y.; DOI, T.; TOKUMARU, J.; YOKOYAMA, H.; NAKAJIMA, A.; MITSUYAMA, Y.; OHYA-NISHIGUCHI, H.; KAMADA, H. and WILLMORE, L.J. Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid. **Journal of Neurochemistry** **76**: 892-900, 2001.

ULLENSVANG, K.; LEHRE, K.P.; STORM-MATHISEN, J. and DANBOLT, N.C. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. **European Journal of Neuroscience** **9**: 1646-1655, 1997.

WAALER, P.E.; BLOM, B.H.; SKEIDSVOLL, H. and MYKLETUN, A. Prevalence, classification, and severity of epilepsy in children in western Norway. **Epilepsia** **41**: 802-810, 2000.

WALLACE, H.; SHORVON, S. and TALLIS, R. Age-specific incidence and prevalence rates of treated epilepsy in an unselected population of 2,052,922 and age-specific fertility rates of women with epilepsy. **Lancet** **352**: 1970-1973, 1998.

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. and TANAKA, K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. **European Journal of Neuroscience** **10**: 976-988, 1998.

WATKINS, J. and COLLINGRIDGE, G. Phenyglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors. **Trends in Pharmacological Sciences** **15**: 333-342, 1994.

WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P. and HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends in Pharmacological Sciences** **11**: 25-33, 1990.

WINDER, D.G. and CONN, P.J. Activation of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus increases cyclic AMP accumulation. **Journal of Neurochemistry** **59**: 375-378, 1992.