

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

EFEITO DO ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE PARÂMETROS DO
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EM CÉREBRO DE RATOS AO
LONGO DO DESENVOLVIMENTO

KARINA BORGES DALCIN

ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

Porto Alegre, 2006.

“A felicidade não está
no fim da jornada,
e sim em cada curva do caminho
que percorremos para
encontrá-la.”
(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar aos seus alunos um ensino gratuito e de qualidade.

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS pelo espaço e pela infraestrutura cedida para realização deste trabalho.

A todos os meus colegas do grupo de Erros Inatos do Metabolismo.

Ao professor Dutra e à professora Ângela pelo convívio e ajuda.

Ao professor Clóvis por toda a sabedoria e exemplo de vida.

Ao professor Diogo e às professoras Suzana e Lisiane que estavam sempre prontos a ajudar em qualquer dificuldade.

Às minhas super amigas Carolzinha, Cuca e Fran pela amizade e carinho.

Às minhas irmãs de coração Bá, Carlinha, Karina e Ana, por toda convivência, amizade, carinho e amor que temos uma pela outra.

À grande Ritinha pela amizade e pela alegria de viver.

A todos bolsistas do lab Anelise, Vanessa, Bianca, Alexandre, Paula, Laís e Josué por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao Dênis e à Letícia, que são grandes amigos e vão sempre estar guardados em meu coração.

Aos meus colegas de pós-graduação Lali, Patrícia, Gustavo, Fabrício e aos quase colegas Karina, Carol e Alexandre pelo grande convívio, pelo carinho, pela amizade.

Ao papai César que foi sempre um grande amigo e muito prestativo a toda hora.

Às minhas queridas bolsistas Anna e Ju, por toda a ajuda e pela grande amizade.

Ao Rafa, pelo interesse e dedicação por este trabalho, pelas alegrias e tristezas compartilhadas e principalmente pela grande amizade e carinho.

Ao Professor Moacir pela orientação, ajuda, compreensão, paciência, carinho, e em particular pela eterna preocupação de pai, interessado sempre em ver os seus alunos bem, tanto no profissional, quanto no pessoal.

A todos os familiares do Gui, que sempre me acolheram tão bem.

A todos os meus familiares, tios, primos, avós...

Em especial aos meus pais, que são meus exemplos de vida, e aos meus irmãos por toda compreensão, amor e carinho.

Ao bebê mais manhoso que existe, à pessoa mais importante da minha vida, o Gui, que sempre está disposto a me ajudar e me apoiar em tudo. Me dá carinho e atenção em todos os momentos e me faz a pessoa mais feliz do mundo.

A Deus, pois acredito que nada nesta vida é por acaso e que sempre existe um dedinho Dele nos guiando.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVEATURAS.....	4
I. INTRODUÇÃO.....	5
I.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	5
I.2 Acidemias Orgânicas.....	5
I.3 Acidemia Glutárica tipo I.....	7
I.3.1 Achados Clínicos.....	8
I.3.2 Achados Neurológicos.....	9
I.3.3 Aspectos Moleculares.....	11
I.3.4 Diagnóstico.....	11
I.3.5 Tratamento.....	13
I.3.6 Fisiopatogenia.....	14
I.4 Sistema Glutamatérgico.....	18
I.4.1 A neurotoxocidade do glutamato.....	22
I.4.2 Ontogenia dos receptores glutamatérgicos em córtex cerebral e em estriado.....	23
I.4.3 Ontogenia dos transportadores glutamatérgicos no sistema nervoso central.....	24
II. OBJETIVOS.....	26
II.1 Objetivo Geral.....	26
II.2 Objetivos Específicos.....	26
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
III.1 Reagentes.....	28
III.1.1 Reagentes utilizados.....	28
III.1.2 Equipamentos e outros matérias.....	30
III.2 Animais.....	31
III.3 Preparação de membranas plasmáticas sinápticas.....	31
III.4 União de L-[³ H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas....	32

III.5 Preparação das fatias para a medida da captação de L-[³ H]glutamato.....	33
III.6 Captação de L-[³ H]glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado.....	34
III.7 Preparação da fração sinaptossomal para avaliação da liberação de L-[³ H]glutamato.....	35
III.8 Ensaio da enzima lactato desidrogenase em sinaptossomas.....	36
III.9 Liberação de L-[³ H]glutamato pela fração sinaptossomal.....	36
III.10 Determinação da quantidade de proteína.....	37
III.11 Análise estatística.....	37
IV. RESULTADOS.....	38
IV.1 Efeito do ácido glutárico sobre a união de L-[³ H]glutamato na ausência de sódio em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias, e córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade.....	38
IV.2 Efeito do ácido glutárico sobre a união de L-[³ H]glutamato na ausência de sódio em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias na presença de antagonistas glutamatérgicos.....	43
IV.3 Efeito do ácido glutárico sobre a união de L-[³ H]glutamato na presença de sódio em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias, e córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade.....	47
IV.4 Efeito do ácido glutárico sobre a captação de L-[³ H]glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 7 e 15 dias de vida.....	51
IV.5 Efeitos da creatina e da N-acetilcisteína sobre a inibição da captação de L-[³ H]glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida.....	56
IV.6 Efeito do ácido glutárico sobre a liberação de L-[³ H]glutamato por sinaptossomas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias de vida.....	60

V. DISCUSSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
LISTA DE FIGURAS.....	95

RESUMO

A acidemia glutárica do tipo I (AG I) é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), uma enzima responsável pelo catabolismo da lisina, hidroxilisina e triptofano. A deficiência da atividade da GCDH leva ao acúmulo nos fluidos corporais e no cérebro predominantemente de ácido glutárico (AG) e em menor grau do ácido 3-hidroxi-glutárico e do ácido glutacônico. Clinicamente, os pacientes apresentam macrocefalia ao nascimento e uma hipomielinização ou desmielinização progressiva do córtex cerebral. Crises de descompensação metabólica ocorrem usualmente entre 6 e 24 meses de vida, resultando numa destruição irreversível de regiões cerebrais suscetíveis, em particular o estriado, e subsequente alterações severas dos movimentos, como distonia e discinesia. Apesar dos sintomas neurológicos severos e alterações neuropatológicas cerebrais importantes (atrofia cerebral), os mecanismos que levam ao dano cerebral na AG I são pouco conhecidos. No presente estudo, investigamos o efeito *in vitro* do AG sobre vários parâmetros do sistema glutamatérgico, tais como a união de glutamato a membranas plasmáticas sinápticas na presença e ausência de sódio, a captação de glutamato por fatias cerebrais e a liberação de glutamato induzida por potássio por preparações sinaptossomais de córtex cerebral e estriado ou cérebro médio de ratos ao longo do desenvolvimento. Primeiro, observamos que o AG diminui a união de glutamato Na⁺-independente a membranas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias de vida, evidenciando uma possível competição entre o glutamato e o AG por sítios de receptores glutamatérgicos. Visto que uma diminuição da união de glutamato Na⁺-independente pode representar uma interação do AG com receptores glutamatérgicos, investigamos se AG interage com receptores glutamatérgicos pela adição de antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA. Verificamos que, em córtex cerebral de ratos de 15 dias de vida, o AG e o CNQX (antagonista de receptores não-NMDA) diminuem a união de glutamato em 20 e 40 %, respectivamente, e que a co-incubação desses compostos não provoca um efeito aditivo, sugerindo que a união do AG e do CNQX ao receptor não-NMDA ocorre provavelmente através do mesmo sítio. Resultados semelhantes foram encontrados em cérebro médio de ratos de 15 dias de vida. Por outro lado, o AG não alterou a união de glutamato na presença de sódio tanto em córtex cerebral como em cérebro médio e/ou estriado, sugerindo que o AG não compete pelos transportadores de glutamato. Também observamos que o AG diminui a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida, o que pode provavelmente resultar num excesso de glutamato na fenda sináptica levando à excitotoxicidade, o que pode ser relacionado com o dano cerebral característico dos pacientes com AG I. A inibição da captação de glutamato por fatias não foi prevenida pela pré-incubação com creatina e N-acetilcisteína, sugerindo que essa ação do AG provavelmente não se deva a um efeito indireto reduzindo o metabolismo energético ou aumentando a produção de radicais livres. Finalmente, verificamos que o AG não alterou a liberação de glutamato estimulada por

potássio por sinaptossomas. Assim, concluímos que o AG pode alterar o sistema glutamatérgico durante o desenvolvimento cerebral, resultando em possíveis ações deletérias sobre o SNC que podem explicar ao menos em parte a neuropatogenia da AG I.

ABSTRACT

Glutaric acidemia type I (GA I) is an inborn error of metabolism due to the deficiency of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH), an enzyme responsible for the catabolism of lysine, hydroxylysine and tryptophan. The defective enzyme leads to the accumulation predominantly glutaric acid (GA), and to a lesser extent of 3-hydroxyglutaric and glutaconic acids in body fluids and in brain. Clinically, the affected patients present macrocephaly and progressive hypomyelination or demyelination of cerebral cortex. Metabolic decompensation crises occur usually between 6 and 24 months of life, resulting in an irreversible destruction of susceptible brain regions, in particular of the striatum, and subsequently in a severe dystonic-dyskinetic movement disorder. Despite the severe neurological symptoms and neuropathological features, the mechanisms leading to cerebral damage are poorly known. In the present study, we investigated the *in vitro* effect of GA on various parameters of the glutamatergic system, such as sodium-dependent and independent glutamate binding to synaptic plasma membranes, glutamate uptake by slices and potassium-induced release of glutamate by synaptosomes from cerebral cortex and striatum or midbrain of developing rats. First, we observed that GA decreased Na⁺-independent glutamate binding to synaptic membranes from cerebral cortex and midbrain of 7- and 15-day-old rats, reflecting a possible competition between glutamate and GA for the glutamate receptor sites. Since a decrease in Na⁺-independent glutamate binding might represent an interaction of GA with glutamate receptors, we next investigated whether GA interacts with glutamate receptors by adding antagonist of NMDA and non-NMDA receptors. We verified that GA and CNQX (antagonist of non-NMDA receptor) decreased glutamate binding by up to 20 and 40 %, respectively, and that the simultaneous addition of both substances did not provoke any additive effect in cerebral cortex from 15-day-old rats. These data imply that these compounds bind to non-NMDA receptors and at the same site of these receptors. Similar results were found in midbrain from 15-day-old rats. On the other hand, GA did not alter glutamate binding in the presence of sodium in cerebral cortex, midbrain and/or striatum, indicating that GA does not compete for glutamate transporters. We also observed that GA decreased glutamate uptake in slices from cerebral cortex of 7-day-old rats, which may probably result in excess glutamate in the synaptic cleft, potentially causing excitotoxicity to neural cells, a fact that may be related to the brain damage characteristic of GA I. The glutamate uptake inhibition found in slices was not prevented by the addition of creatine and N-acetylcysteine, indicating that GA does not exert an indirect effect that would lead to alterations in energy metabolism or to an increased free radicals generation. Finally, we verified that GA did not modify glutamate release stimulated by potassium in synaptosomes. Therefore, we conclude that GA may alter glutamatergic system during cerebral development, leading to deleterious actions on the central nervous system that could explain, at least in part, the pathophysiology of GA I.

LISTA DE ABREVIATURAS

3OHGA - Ácido 3-hidroxi-glutárico

AG - Ácido glutárico

AG I - Acidemia glutárica tipo I

AMPA - Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

ATP - Adenosina trifosfato

CoA - Coenzima A

EIM - Erros inatos do metabolismo

FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

GABA - Ácido δ -aminobutírico

iGluR - Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

KA - Ácido caínico

mGluR - Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

MS/MS - Espectrometria de massa em tandem

NMDA - N-metil-D-aspartato

R - Arginina

SNC - Sistema nervoso central

W - Triptofano

I. INTRODUÇÃO

I.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi usado pela primeira vez em 1902 pelo inglês Sir Archibald E. Garrod, baseado em suas investigações sobre consangüinidade e distribuição de casos de alcaptonúria em famílias (Garrod, 1902). Hoje, o termo é usado para designar cerca de 500 defeitos genéticos, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver et al., 2001).

Dessa forma, os EIM são alterações genéticas que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, ou por uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese. Como consequência pode ocorrer o acúmulo de substâncias nocivas anteriores ao bloqueio metabólico enzimático ou de produtos de vias metabólicas acessórias, bem como a deficiência de produtos intermediários ou finais críticos à função celular (Bickel, 1987).

Embora individualmente raras, essas doenças afetam aproximadamente 1 a 2% da população, constituindo-se em um importante problema de saúde pública (Baric et al., 2001).

I.2 ACIDEMIAS ORGÂNICAS

As acidemias ou acidúrias orgânicas são erros inatos do metabolismo nos quais um ou mais ácidos orgânicos acumulam-se nos tecidos dos pacientes afetados devido à deficiência da atividade de uma enzima do metabolismo de

aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (Chalmers & Lawson, 1982). Vários ácidos orgânicos estão presentes no sangue e na urina de indivíduos normais, porém em concentrações reduzidas. Nos pacientes com estes distúrbios, estes ácidos encontram-se em altas concentrações no sangue e, principalmente, na urina, devido à sua levada depuração renal.

A freqüência destas doenças na população em geral é pouco conhecida. Na Holanda, essa incidência é estimada em 1:2.200 habitantes, enquanto que na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1:6.000 – 1:9.000 recém-nascidos (Hoffmann et al., 2004). Na Arábia Saudita, onde a taxa de consangüinidade é elevada, a freqüência é de 1:740 nascidos vivos (Rashed et al., 1994).

Clinicamente os pacientes afetados apresentam, predominantemente, sintomas neurológicos, como convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, tremores, movimentos coreatetóticos, atraso no desenvolvimento psicomotor e outros. As mais freqüentes manifestações laboratoriais são cetose, cetonúria, neutropenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperglicinúria, hiperaminemia, hipo/hiperglicemia, acidemia láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres, bem como cheiro peculiar na urina e/ou suor (Scriver et al., 2001). Com a utilização da tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear, foi possível verificar alterações de substância branca (hipomielização e/ou desmielização) com atrofia cerebral generalizada ou de gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e atrofia cerebelar em pacientes afetados por estas doenças (Mayatepek et al., 1996).

I.3 ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I

A acidemia glutárica tipo I (AG I) (MIM 231670) é um erro inato do metabolismo descrito inicialmente por Goodman e colaboradores (1975) quando observaram que dois irmãos apresentavam alterações severas dos movimentos e acidose metabólica intermitente. Caracterizada bioquimicamente pela deficiência severa da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH) (EC 1.3.99.7) da via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano (Christensen & Brabdt, 1978), enquadra-se no grupo das acidemias orgânicas cerebrais, pois os sintomas são quase exclusivamente neurológicos (Hoffman et al., 1993, 1994). A reação catalisada por esta enzima ocorre em duas etapas: primeiro, uma desidrogenação de glutaril-CoA formando o composto intermediário glutaconil-CoA e, na seqüência, uma descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA e CO₂ (Härtel et al., 1993). O composto intermediário glutaconil-CoA, pode ser clivado e excretado como ácido glutacônico ou hidratado para 3-hidroxi-glutaril-CoA (Figural.1) (Hoffmann & Zschocke, 1999).

Em indivíduos com AG I, tanto a desidrogenação de glutaril-CoA como a descarboxilação de glutaconil-CoA para crotonil-CoA estão bloqueadas (Christensen, 1993; Liesert et al., 1999). Este bloqueio causa um acúmulo de ácido glutárico (AG) e ácido 3-hidroxi-glutárico (3OHAG) e, algumas vezes, de ácido glutacônico nos tecidos e líquidos corporais (plasma, urina e líquido) dos pacientes afetados (Goodman et al., 1977; Baric et al., 1998), assim como de glutaril-CoA e dos conjugados de carnitina. As concentrações séricas destes ácidos orgânicos usualmente encontradas na doença ficam entre 5 e 400 µM

(Hoffmann et al., 1991, 1996; Merinero et al., 1995) mas podem alcançar valores consideravelmente maiores no cérebro (até 8 mM) durante as crises encefalopáticas (Funk et al., 2005).

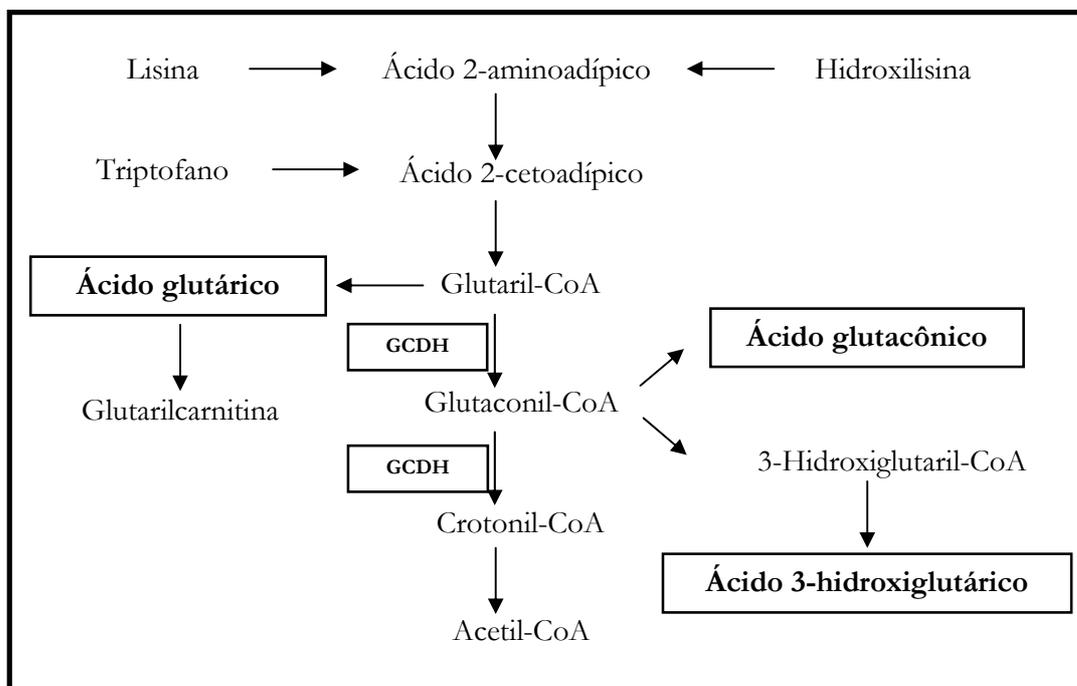


Figura I.1. Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano.

A AG I é uma das mais freqüentes desordens do metabolismo dos ácidos orgânicos (Kölker et al., 2000b), tendo sua prevalência estimada em 1:30.000 recém-nascidos vivos (Scriver et al., 2001) e podendo estar bastante aumentada (1:3.000) em algumas comunidades, como ocorre na Pensilvânia (Biery et al., 1996) ou nos índios de Salteaux/Ojibway no Canadá (Haworth et al., 1991; Greenberg et al., 1995).

I.3.1 Achados Clínicos

O quadro clínico dos pacientes com AG I é heterogêneo e o curso da doença parece ser seguido por diferentes padrões em diferentes idades. Durante

os primeiros meses de vida, os sintomas geralmente são leves. Alguns pacientes desenvolvem-se normalmente, enquanto outros podem apresentar hipotonia e atraso progressivo no desenvolvimento. Antes das crises encefalopáticas, o mais importante achado clínico dos pacientes é a macrocefalia (Hoffmann et al., 1995). Se não tratados, o curso da doença é complicado pelo desenvolvimento de crises encefalopáticas agudas entre as idades de 6 e 24 meses, resultando em degeneração estriatal (em particular o putâmen é afetado) e causando o aparecimento de movimentos distônicos e discinéticos. A maioria das crianças afetadas apresenta os sintomas antes dos 24 meses de idade e ainda não se tem descrito crises depois dos 6 anos, sugerindo que a vulnerabilidade é restrita a um período limitado do desenvolvimento cerebral (Hoffmann et al., 1996; Strauss et al., 2003; Kyllerman et al., 2004). Estas crises podem ser desencadeadas por imunizações de rotina, doenças intercorrentes, como infecções, ou cirurgias (Hoffmann et al., 1991, 1996; Greenberg et al., 1994; Superti-Furga & Hoffmann, 1997).

I.3.2 Achados Neurológicos

A AG I pode ser vista como uma síndrome de malformação cerebral tanto quanto uma desordem metabólica. O prejuízo no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) já se inicia no útero e pode, em alguns pacientes, resultar em malformação ao nascimento. Após a trigésima semana de gestação, a maior parte das crianças afetadas mostra desenvolvimento de hidrocefalia e são freqüentemente macrocefálicas ao nascimento. O desenvolvimento dos lobos

frontal e particularmente dos lobos temporais é atrasado (Hoffmann & Zschocke, 1999).

Achados neuroradiológicos mostram também um alargamento dos espaços subaracnóides da região frontotemporal e uma difusão atenuada da substância branca periventricular (Drigo et al., 1996; Pineda et al., 1998). Estes espaços são atravessados por uma sutil rede de veias, o que as tornam mais propensas a sofrerem hemorragias agudas subdurais, incluindo hemorragias após traumas de pequena intensidade na cabeça (Hoffmann & Zschocke, 1999).

Os núcleos da base, além dos lobos temporais e frontal, são as estruturas mais afetadas e que, quando atingidas, causam alterações motoras permanentes nos pacientes, como distonia e discinesia (Kölker et al., 2000b). Esses pacientes apresentam perda neuronal aguda e severa, fibrose dos núcleos do caudado e putâmen e degeneração do globo pálido.

Sucedendo o dano nos gânglios da base, os pacientes seguem um curso pseudo-estacionário da doença. Através dos anos que seguem, eles freqüentemente sofrem envolvimento progressivo da substância branca (hipomielinização ou desmielinização) com regressão na freqüência de episódios encefalopáticos adicionais, principalmente quando associados a eventos catabólicos. O intelecto é inicialmente poupado, mas pode tornar-se progressivamente comprometido. Sinais do trato piramidal e espasticidade também podem ocorrer (Hoffmann & Zschocke, 1999).

As concentrações do ácido δ -aminobutírico (GABA) apresentam-se extremamente baixas no caudado ($0,60\mu\text{mol/g}$ de peso seco, normal= $3,03\mu\text{mol/g}$)

e também no putâmen (0,87 μ mol/g de peso seco, normal=5,69 μ mol/g), e a atividade da enzima responsável pela biossíntese de GABA (glutamato descarboxilase) encontra-se diminuída nestes tecidos (Leibel et al., 1980).

I.3.3 Aspectos Moleculares

O gene da GCDH está localizado no cromossomo 19p13.2, contém 11 éxons e mede 7 kb. Codifica uma proteína de 438 aminoácidos que inclui uma seqüência alvo N-terminal de 44 aminoácidos, que é clivada depois de importada para a matriz mitocondrial. A proteína madura de 43.3 kD forma um homotetrâmero, com cada subunidade contendo uma simples molécula de flavina adenina dinucleotídio (FAD) (Goodmann et al., 1995). A maioria das mutações conhecidas causadoras da doença (aproximadamente 100) são mudanças simples de bases que, freqüentemente, estão localizadas no sítio hipermutável CpG do gene GCDH. A deficiência de GCDH é bastante heterogênea, e a maior parte dos pacientes é heterozigoto para duas diferentes mutações. A mais freqüente das mutações em caucasianos é a R402W, que acomete entre 10 e 20% dos alelos (Goodmann et al., 1998; Busquets et al., 2000; Zschocke et al., 2000).

I.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico precoce de AG I é extremamente importante, pois a possibilidade de um tratamento eficaz, que possa retardar ou até mesmo evitar manifestações neurológicas irreversíveis, está intimamente ligada à rapidez do diagnóstico. Tal procedimento pode permitir que o afetado pela doença

permaneça com um quadro clínico estável e, algumas vezes, em condições normais de vida.

Na maioria dos casos, o diagnóstico de AG I é obtido através do aumento da excreção urinária do AG e do 3OHAG e, algumas vezes, do ácido glutacônico pelos pacientes. A identificação destes compostos é feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (Hoffmann et al., 1993; Hoffmann, 1994, Kölker et al., 2006).

Outros importantes achados complementares de diagnóstico são a elevação de glutarilcarnitina pela análise do perfil de acilcarnitinas através de espectrometria de massa em tandem (MS/MS) nos líquidos biológicos e uma diminuição dos níveis de carnitina livre (Ziadeh et al., 1995). Esta tecnologia aplicada a sangue seco em papel filtro tem sido recentemente implementada em programas de triagem neonatal. Outro método que pode auxiliar no diagnóstico de AG I é a análise mutacional, porém, devido ao grande número de mutações conhecidas, este método tem um melhor aproveitamento em comunidades com altas taxas de consangüinidade, onde poucas mutações têm alta prevalência.

Em alguns casos, pacientes com AG I podem apresentar excreção pouco elevada ou intermitente, ou até mesmo excreção normal do AG (Bergman et al., 1989; Campistol et al., 1992; Merinero et al., 1995; Hoffmann, 1996). Pacientes com níveis normais de AG (não excretadores) tendem também a ter níveis normais de glutarilcarnitina (Baric et al., 1998) e, nestes casos, a atividade da enzima GCDH em fibroblastos (ou leucócitos) serve como diagnóstico e deve ser medida sempre que a condição for fortemente suspeita por achados clínicos e/ou neuro-radiológicos (Scriver et al., 2001).

Não há, até o momento, nenhuma correlação positiva entre genótipo e fenótipo clínico na AG I, de forma que a determinação da mutação alterada não orienta o prognóstico dos pacientes afetados (Goodmann et al., 1998; Hoffmann & Zschocke, 1999), bem como a severidade dos sintomas nem sempre está correlacionada com a atividade residual da enzima.

I.3.5 Tratamento

O tratamento dos pacientes com AG I baseia-se na restrição de lisina, hidroxilisina e triptofano da dieta e administração de L-carnitina e riboflavina, com o objetivo de normalizar o metabolismo e prevenir as crises encefalopáticas agudas e, conseqüentemente, o dano cerebral. Além disso, o tratamento nas crises agudas, após as infecções, consiste na administração de líquidos para evitar desidratação, ingesta hipercalórica para controlar o catabolismo e outras medidas gerais.

Muitos agentes farmacológicos têm sido usados na tentativa de amenizar os sintomas neurológicos dos pacientes com AG I (Hoffmann et al., 1996), como bacoflen e benzodiazepínicos que podem aumentar a função motora, reduzindo o tônus muscular (Merinero et al., 1995). O ácido valpróico também tem sido testado, mas geralmente tem resposta clínica fraca (Yamaguchi et al., 1987; Hoffmann et al., 1996).

Em 2004, Burlina e colaboradores propuseram um tratamento com drogas anticolinérgicas (como triexifenidil) e com toxina botulínica para minimizar a discinesia e distonia encontradas em pacientes após as crises encefalopáticas. Os

resultados foram aparentemente satisfatórios, porém mais estudos são necessários para usá-los como medida terapêutica auxiliar em pacientes afetados pela AG I.

I.3.6 Fisiopatogenia

Em pacientes afetados por AG I, a atividade da GCDH varia de 0 a 10% da atividade normal em fibroblastos cultivados, amniócitos, leucócitos periféricos, fígado, rins e cérebro. Como mencionado anteriormente, o grau de deficiência na atividade da enzima nem sempre está correlacionado com a severidade dos sintomas. Ainda hoje, os mecanismos da disfunção estriatal e degeneração neuronal, principalmente dos gânglios da base, permanecem desconhecidos.

Entranto, muitos trabalhos têm demonstrado efeitos neurotóxicos do AG e do 3OHAG. Inicialmente, foi demonstrado que o AG é tóxico em cultura de células estriatais (Whetsell, 1984), porém imagina-se que o 3OHAG seja a principal neurotoxina acumulada na AG I (Kölker et al., 2000a; 2006), atuando como excitotoxina principalmente por interação com receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Esta interação seria especificamente com as subunidades NR1/NR2B destes receptores e a extensão da neurotoxicidade seria dependente da expressão destas subunidades durante a maturação neural ao longo do desenvolvimento. Posteriormente, foi demonstrado que o 3OHAG atuaria como um agonista de receptores NMDA (Rosa et al., 2004). Tais estudos reforçam a hipótese de que o dano neuronal observado na AG I pode ocorrer por uma alta expressão dos receptores NR1/NR2B no cérebro anterior (córtex e estriado)

durante um período vulnerável do desenvolvimento cerebral (Standaert et al., 1994; Kosinski et al., 1998).

Por outro lado, também tem sido atribuído ao AG um papel na excitotoxicidade ao SNC. Foi visto que este ácido provocou dano celular a culturas organotípicas cortico-estriais (Whetsell & Schwarcz, 1983), inibição da captação de glutamato por sinaptossomas de ratos e da união de glutamato a seus transportadores em cérebro de ratos jovens, sugerindo que o ácido se uniria aos sítios transportadores de glutamato (Porciúncula et al., 2000). Foi também verificado que o AG em baixas concentrações estimula receptores de glutamato metabotrópicos e ionotrópicos do tipo AMPA, não alterando a união a receptores do tipo NMDA e cainato (Porciúncula et al., 2004). Este resultado explicaria as convulsões tônico-clônicas provocadas por injeções intraestriais deste ácido e a prevenção por DNQX, um antagonista de receptores AMPA, mas não por MK-801, um antagonista de receptores NMDA (Lima et al., 1998). Por último, foi demonstrado que AG inibe a captação de glutamato em vesículas sinápticas de córtex cerebral, indicando que poderia estar havendo um prejuízo no *turnover* de glutamato da fenda sináptica e no ciclo glutamato-glutamina entre astrócitos e neurônios (Porciúncula et al., 2004). Essas alterações podem resultar em um aumento nos níveis de glutamato na fenda sináptica e diminuição dos níveis de GABA, possivelmente levando à excitotoxicidade. Neste sentido, convém enfatizar que concentrações reduzidas de GABA foram detectadas nos gânglios da base de pacientes afetados por AG I (Leibel et al., 1980), o que reforça os achados de Stokke e colaboradores (1976) que demonstraram uma inibição competitiva da

glutamato descarboxilase, enzima responsável pela biossíntese de GABA, causada por AG, 3OHAG e ácido glutacônico.

No entanto, dois trabalhos recentes demonstraram que o 3OHAG não mostrou excitotoxicidade em cultura primária de neurônios de cérebro de ratos (Bjugstad et al., 2001; Lund et al., 2004). Estes trabalhos preconizam que o 3OHAG deva ser neurotóxico através de outros mecanismos que não a excitotoxicidade. Portanto, em busca de outros mecanismos neurotóxicos, foi investigado o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia desta doença. Foi demonstrado que o tratamento *in vitro* com 3OHAG em cultura neuronal cerebral de pinto induz a produção de espécies reativas de oxigênio, a qual foi prevenida pela co-incubação com MK-801, um antagonista de receptores NMDA, ou pelos seqüestradores de radicais livres (antioxidantes) α -tocoferol ou melatonina (Kölker et al., 2001). Também foi demonstrada uma maior produção de óxido nítrico, porém o tratamento com L-NAME, que é um inibidor da óxido nítrico sintase, não evitou a morte neuronal, indicando que outros mecanismos além do óxido nítrico são responsáveis pela mesma. Outros estudos demonstraram que o 3OHAG e o AG diminuem as defesas antioxidantes, induzem peroxidação lipídica e formação de espécies reativas, particularmente de óxido nítrico, em córtex cerebral e estriado de ratos jovens (Latini et al., 2002, 2005a; de Oliveira Marques et al., 2003). Em conjunto, estes achados sugerem que um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes deve estar envolvidos na fisiopatogenia da AG I.

Os efeitos dos metabólitos acumulados na AG I sobre o metabolismo energético, principalmente o AG e o 3OHAG, também têm sido alvo de estudos.

Foi demonstrado que altas concentrações de 3OHAG (4 mM) inibem as atividades dos complexos II e V da cadeia respiratória e a concentração de fosfocreatina *in vitro* (Ullrich et al., 1999; Das et al., 2003). Entretanto foi demonstrado que mesmo concentrações maiores que 5 mM do 3OHAG não alteram o conteúdo de ATP de fatias cortico-estriatais (Flott-Rhamel et al., 1997). Além disso, este ácido não teve efeito sobre as atividades dos complexos I a V da cadeia respiratória em partículas submitocondriais purificada de coração bovino (Kölker et al., 2002b). Por outro lado Latini e colaboradores (2005b) demonstraram uma inibição significativa provocado por 1 mM do 3OHAG no complexo II da cadeia respiratória em homogeneizado de córtex cerebral e células C6, mas não em preparações mitocondriais de córtex cerebral e estriado. Os mesmos investigadores observaram que o 3OHAG atua como um desacoplador da fosforilação oxidativa, devido a um aumento no consumo de oxigênio no estado IV e uma reduzida da síntese de ATP. Em relação ao AG foi demonstrada uma inibição dos complexos I-III e II-III da cadeia respiratória, bem como uma diminuição da produção de CO₂ e dos níveis de ATP em córtex cerebral de ratos jovens (Silva et al., 2000). Ferreira e colaboradores também demonstraram inibição no complexo I-III em cérebro médio (onde está contido o estriado) tanto *in vivo* (2005a) quanto *in vitro* (2005b). Tais resultados, porém, são diferentes de outros trabalhos realizados que não encontraram nenhum efeito deste ácido sobre as atividades isoladas dos complexos I-V da cadeia respiratória em partículas submitocondriais coração bovino (Kölker et al, 2002a). Também foi descrita uma redução da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase (Kölker et al., 2002a) e da enzima creatina quinase

(Ferreira et al., 2005b) por este ácido em córtex cerebral e cérebro médio de ratos, respectivamente.

Acredita-se ser também possível que outros metabólitos acumulados na AG I, como glutarilcarnitina e ácido glutacônico, bem como o envolvimento do ácido quinolínico, um metabólito da via catabólica do triptofano, possam estar envolvidos na fisiopatogenia desta doença (Heyes, 1987; Varadkar & Surtees, 2004). Porém, até o momento, ainda não foi confirmado um aumento das concentrações do ácido quinolínico e de outros metabólitos da via das quinureninas em cérebro de pacientes afetados por esta doença.

Concluindo, a fisiopatogenia das alterações neurológicas características de pacientes afetados pela AG I parece ser explicada, ao menos em parte, por um desequilíbrio entre os sistemas glutamatérgico e GABAérgico no SNC, especificamente nas áreas mais afetadas nesta doença como córtex cerebral e núcleos da base (Wajner et al., 2004), bem como pela indução de radicais livres e pela alteração do metabolismo energético.

I.4 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, estando presente na maioria das sinapses centrais (Ozawa et al., 1998; Meldrum, 2000). O glutamato atua em várias funções cerebrais, tais como aprendizado e memória, bem como na formação de redes neurais durante o desenvolvimento e o envelhecimento (Collingridge & Lester, 1989; Izquierdo & Medina, 1997; Ozawa et al., 1998; Castellano et al., 2001; Segovia et al., 2001).

O glutamato é sintetizado a partir de diversos precursores, tais como a glutamina, o oxalacetato e outros aminoácidos por transaminação (Fonnum, 1984). O armazenamento de glutamato no SNC é realizado pelas vesículas sinápticas que se encontram nos terminais pré-sinápticos. Essas vesículas podem concentrar 10 vezes mais glutamato do que os níveis encontrados normalmente no citosol destes terminais (Maycox et al., 1990). Quando ocorre a despolarização dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, o glutamato que se encontra nas vesículas é liberado para a fenda sináptica por exocitose dependente da concentração de cálcio citosólico (Nicholls & Atwell, 1990; Vesce et al., 1999). O glutamato, uma vez liberado na fenda sináptica, vai interagir com seus receptores (proteínas) localizados nas membranas pré- e pós-sinápticas e também nas membranas gliais para realizar as suas ações no SNC (Gallo & Ghiani, 2000; Scannevin & Huganir, 2000; Danbolt, 2001). Esses receptores por sua vez estão divididos em duas classes: ionotrópicos e metabotrópicos, classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e funcionais (Conn & Pinn, 1997; Ozawa et al., 1998). Os receptores ionotrópicos (iGluR) são canais iônicos que permeiam cátions quando ativados e que provocam a despolarização da membrana sináptica, desencadeando uma resposta excitatória. São subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido cáinico (KA), de acordo com a sensibilidade a agonistas específicos. Os receptores NMDA são canais com grande permeabilidade a Ca^{2+} , baixa permeabilidade a Na^+ e K^+ . Alguns eventos neurotóxicos do glutamato são mediados por um grande influxo de Ca^{2+} , o que faz o receptor NMDA um alvo para

estudos referentes à excitotoxicidade (Ozawa et al., 1998). Os receptores AMPA são canais com alta permeabilidade ao Na^+ e K^+ e com menor permeabilidade ao Ca^{2+} , enquanto os receptores do tipo KA são bastante permeáveis ao Ca^{2+} (Cotman et al., 1995). Os receptores metabotrópicos (mGluR) pertencem a uma família de receptores que interagem com proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G) que modulam a produção de efetores intracelulares, através, por exemplo, da adenilato ciclase e da fosfolipase C, responsáveis pela produção de segundos mensageiros (AMPc, diacilglicerol e inositol-3-fosfato), que por sua vez ativam e/ou inibem diversos eventos celulares (Conn & Pin, 1997; Ozawa et al., 1998). Os receptores mGluR estão subdivididos em subgrupos de acordo com a semelhança na sua seqüência de aminoácidos (Pin & Duvoisin, 1995) e sua sensibilidade a agonistas e respostas celulares envolvidas. Esses receptores estão localizados em ambos os terminais pré- e pós-sinápticos, bem como em células gliais, sendo que sua ativação pode promover efeitos inibitórios ou excitatórios (Ozawa et al., 1998).

A captação de glutamato é o mecanismo responsável pela manutenção de baixos níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica, uma vez que não existe um sistema enzimático extracelular que possa significativamente metabolizar o glutamato (Danbolt, 2001; Chen e Swanson, 2003; Maragakis & Rothstein, 2004). Até o presente momento, cinco diferentes transportadores de glutamato, de alta afinidade e dependentes de Na^+ , foram identificados em mamíferos: GLAST/EAAT1, GLT-1/EAAT2 (transportadores astrocitários), EAAC1/EAAT3 (transportador neuronal), EAAT4 (transportador predominante em células de Purkinje no cerebelo) e EAAT5 (transportador encontrado na retina) (Kanai &

Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Storck et al., 1992; Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1997; Danbolt, 2001; Maragakis & Rothstein, 2001, 2004; Chen e Swanson, 2003). Após a captação astrocitária, o glutamato pode ser metabolizado por duas diferentes vias, formando glutamina (realizada pela ação da glutamina sintetase) ou sendo convertido a α -cetoglutarato (realizado através da glutamato desidrogenase ou por transaminases). A glutamina e o α -cetoglutarato são liberados no fluido extracelular e podem ser captados pelos terminais pré-sinápticos neuronais. A glutamina é transportada para os neurônios, sendo convertida pela glutaminase a glutamato. Este por sua vez é captado pelas vesículas sinápticas e liberado novamente para a fenda sináptica, recomeçando o processo. Esse caminho do glutamato é conhecido como ciclo glutamato/glutamina (figura I.2) (Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Amara & Fontana, 2002).

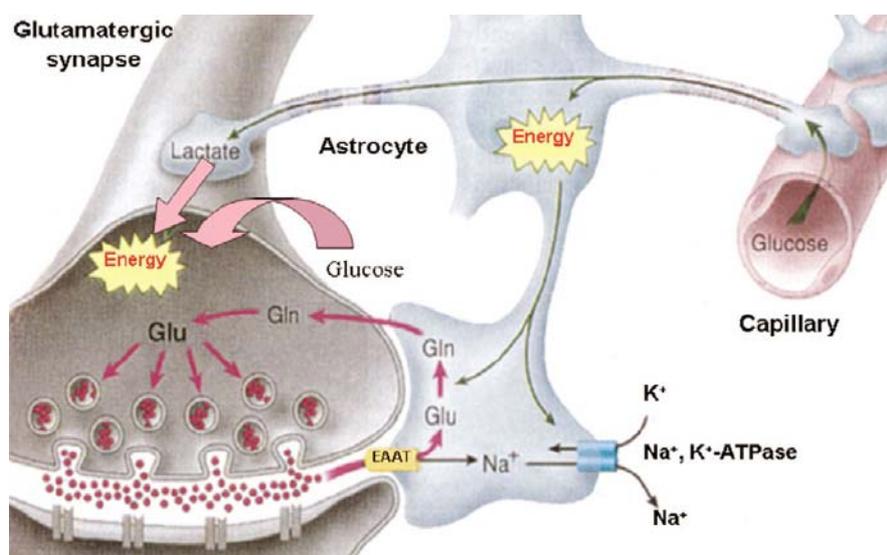


Figura I.2. Ciclo glutamato-glutamina (Magistretti, 2006).

I.4.1 A neurotoxicidade do glutamato

Olney e colaboradores (1970, 1978) observaram que altas doses de glutamato e seus agonistas provocavam dano e até mesmo morte celular no SNC. Desta forma introduziram na literatura o termo excitotoxicidade para expressar a morte neuronal provocada pela estimulação excessiva do glutamato em seus receptores. O papel do glutamato como mediador de excitotoxicidade parece estar relacionado ao aumento de Ca^{2+} intracelular causado pela estimulação excessiva de seus receptores e a subsequente perda da homeostase do Ca^{2+} intracelular (Meldrum, 1994; Sattler & Tymianski, 2000). O aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular leva ao desencadeamento de uma série de eventos que incluem um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, maior influxo de Ca^{2+} e Na^+ e aumento do consumo de energia, culminando com a morte neuronal (Dawson et al., 1991; Dubinsky & Rothman, 1991; Lei et al., 1992; Lafon-Cazal et al., 1993; Lipton & Rosenberg, 1994; Ozawa et al., 1998; Sattler & Tymianski, 2000). Desde então, a excitotoxicidade tem sido relacionada a várias neuropatologias agudas e crônicas como epilepsia, isquemia cerebral, tumores do sistema nervoso central, esclerose amiotrófica lateral, doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson e neurodegeneração associada a infecções por HIV (Greenamyre & Young, 1989; Meldrum & Garthwate, 1991; Rothstein et al., 1992; Lipton & Rosenberg, 1994; Price, 1999; Mattson et al., 1999, 2002; Brewer, 2000; Segovia et al., 2001; Ingram et al., 2001; Maragakis & Rothstein, 2001, 2004; Wang et al., 2003).

I.4.2 Ontogenia dos receptores glutamatérgicos em córtex cerebral e em estriado

A transmissão no SNC de mamíferos é mediada fundamentalmente pela ação do glutamato nos diversos tipos de seus receptores (Hollmann & Heinemann, 1994). Todos os subtipos de receptores glutamatérgicos têm um papel importante na excitotoxicidade. A vulnerabilidade dos neurônios à excitotoxicidade muda durante o desenvolvimento pós-natal, e isto pode ser devido a alterações na expressão das subunidades desses receptores (McDonald et al., 1988, 1992). No entanto, apesar das suas funções deletérias, quando superestimulados, os receptores glutamatérgicos têm importante papel na migração neuronal (Komuro & Rakic, 1993), no processo de extensão (Pearce et al., 1987; Brewer & Cotman, 1989) e no fortalecimento das conexões neurais através da plasticidade sináptica que são parâmetros cruciais para o desenvolvimento e função normais do SNC (Constantine-Paton et al., 1990; Fox & Zahs, 1994).

Estudos mostram que a distribuição cerebral dos receptores glutamatérgicos varia conforme a estrutura cerebral e idade dos animais. No córtex cerebral e no hipocampo a expressão dos receptores do tipo NMDA ocorre desde o início do período pós-natal, com desenvolvimento subsequente dos receptores do tipo não-NMDA (Insel et al., 1990; Brennan et al., 1997; Petralia et al., 1999). Entretanto, o estriado mostra uma tendência oposta: as respostas sinápticas provocadas pelo glutamato no período pós-natal são mediadas por receptores do tipo não-NMDA e a maturação dos receptores NMDA ocorre mais

tarde (Colwell et al., 1998; Nansen et al., 2000; Villares & Stavale, 2001; Lilliu et al., 2001).

I.4.3 Ontogenia dos transportadores glutamatérgicos no sistema nervoso central

Os transportadores glutamatérgicos de astrócitos e neurônios são essenciais para a função normal do sistema nervoso central representando o principal mecanismo capaz de remover rapidamente o glutamato do fluido extracelular (Ozawa et al., 1998; Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Chen & Swanson, 2003). Até o presente momento, cinco diferentes transportadores de glutamato foram identificados em mamíferos: GLAST e GLT-1 (os principais transportadores e os maiores responsáveis pela captação de glutamato, localizados predominantemente em astrócitos), EAAC1, EAAT4 e EAAT5 (transportadores neuronais) (Storck et al., 1992; Pines et al., 1992; Kanai & Hediger, 1992; Arriza et al., 1997; Gegelashvili & Schousboe, 1998; Lehre & Danbolt, 1998; Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001). A distribuição de GLAST e GLT-1 no SNC varia conforme a região cerebral e a idade dos animais (Ullensvang et al., 1997; Danbolt, 2001; Guillet et al., 2001; Schlüter et al., 2002). A expressão de GLAST, tanto em culturas celulares quanto em homogeneizados, predomina durante o estágio inicial de desenvolvimento do SNC sendo, porém, o principal transportador encontrado em cerebelo na idade adulta. Por sua vez, a expressão de GLT-1 apresenta-se mais tardiamente, permanecendo como principal transportador de glutamato (Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997;

Gegelashvili & Schousboe, 1998; Guillet et al., 2001; Danbolt, 2001; Schlüter et al., 2002).

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que pacientes afetados pela acidemia glutárica do tipo I (AG I) apresentam alterações neurológicas características no córtex cerebral e no estriado em períodos bem determinados para cada região cerebral e que o ácido glutárico é o metabólito que mais se acumula nesta doença, o objetivo geral deste estudo foi verificar o efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre vários parâmetros do sistema glutamatérgico no córtex cerebral e no estriado ou cérebro médio (região interna do cérebro onde está localizado o estriado; abrange as estruturas do tálamo, hipotálamo e gânglios da base) de ratos ao longo do seu desenvolvimento na tentativa de explicar a neuropatologia dos pacientes afetados por esta doença.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L-[³H]glutamato a receptores de membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e estriado ou cérebro médio de ratos ao longo do seu desenvolvimento.
- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L-[³H]glutamato a transportadores de membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e estriado ou cérebro médio de ratos ao longo do seu desenvolvimento.

- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a captação de L- $[^3\text{H}]$ glutamato em fatias de córtex cerebral e estriado de ratos ao longo do seu desenvolvimento.
- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a liberação de L- $[^3\text{H}]$ glutamato por sinaptossomas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos ao longo do seu desenvolvimento.
- Estudar os mecanismos de ação das alterações provocadas pelo ácido glutárico sobre os parâmetros analisados.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados para este estudo foram de grau de pureza pró-análise (p.a.). O AG foi sempre solubilizado no tampão específico de cada técnica no dia da realização dos ensaios e o ajuste da solução de AG para o pH 7,4 foi feito, quando necessário, com soluções de hidróxido de potássio ou de hidróxido de sódio.

III.1.1 REAGENTES UTILIZADOS

- Ácido acético glacial - Rhodia
- Ácido clorídrico - Synth
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) - Sigma
- Ácido glutárico - Sigma
- Albumina bovina sérica (BSA) - Sigma
- Bicarbonato de sódio - Merck
- Cloreto de cálcio - Sigma
- Cloreto de magnésio - Sigma
- Cloreto de potássio - Sigma
- Cloreto de sódio - Synth
- CNQX - Tocris
- Creatina - Sigma

- Dimetilsulfato de sódio - Sigma
- DL-AP5 - Tocris
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) - Synth
- Fosfato de potássio - Synth
- Fosfato dissódico - Merck
- Glicose - Sigma
- Glucamina - Sigma
- HEPES - Sigma
- Hidróxido de potássio - Synth
- Hidróxido de sódio - Synth
- L-glutamato - Sigma
- L[3,4-³H]glutamato - Amersham
- Líquido de cintilação Optiphase 'HiSafe' 3 Wallac
- N-acetilcisteína - Sigma
- Percoll - Sigma
- Reagente de Folin
- Sacarose - Synth
- Sulfato de cobre - Merck
- Sulfato de magnésio - Merck
- Tartarato de sódio - Merck
- Tris (hidróximetil) amino metano - Sigma
- Triton X-100 - Sigma

III.1.2 EQUIPAMENTOS E OUTROS MATERIAIS

- Agitador de tubos Thermolyne modelo Maxi Mix Plus
- Agitador magnético Tipo 7200 Thermolyne
- Balança Acculab modelo V-200
- Balança analítica digital Sartorius Basic
- Banho metabólico Dubnoff
- Banho-maria Biomatic modelo 1052
- Centrífuga de Eppendorf modelo 5417R
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC 5B plus
- Contador de cintilação líquida Wallac modelo 1409
- Deionizador
- Destilador
- Espectrofotômetro Spectronic Genesys 8
- Fatiador de tecidos Chopper - McIlwain
- Freezer -20°C Prosdócimo modelo H5
- Freezer -70°C Scien Temp
- Guilhotina
- Homogeneizador elétrico B. Braun Biotech International modelo Potter S
- Máquina de fazer gelo Everest
- Material cirúrgico: tesouras, bisturis e espátulas
- Micropipetas de volume regulável Gilson
- Placas de cultura com 6 wells

- Potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal)
- Refrigerador Brastemp
- Tubos plásticos Eppendorffs
- Ultracentrífuga Himaac CP 70 MX
- Vidraria: provetas, pipetas graduadas, potter de vidro, placas de Petri, pipetas Pasteur, Tubos de ensaio, funil, béqueres, cubetas, vials.

III.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar de 7, 15 e 60 dias de idade, de ambos os sexos, do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado a 25 °C, com intervalos de 12 h claro e escuro, com água e ração *ad libitum*.

III.3 PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS SINÁPTICAS

As membranas plasmáticas sinápticas foram preparadas de acordo com o método de Jones e Matus (1974). Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O córtex cerebral, o cérebro médio (ratos de 7 e 15 dias) ou o estriado (ratos de 60 dias) foram isolados, pesados e homogeneizados em meio contendo 0,32 M de sacarose, na proporção 1:9 (p/v). O tecido homogeneizado foi centrifugado a 1000 g por 15 min. O sobrenadante (S1) foi separado e mantido em gelo. O sedimento resultante foi homogeneizado novamente no mesmo volume e centrifugado na mesma velocidade e tempo. Os sobrenadantes S1 e S2,

resultantes da primeira e segunda centrifugações, respectivamente, foram unidos e centrifugados a 27000 g por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado em 300 µL Tris/HCl 5 mM, pH 7,4 (meio hiposmótico) e mantido em gelo por 30 minutos (agitando de 5 em 5 minutos) para lisar as vesículas formadas no meio isosmótico. Após, a solução foi aplicada sob um gradiente de sacarose (soluções de 10, 28,5 e 49 % de sacarose), seguindo-se de uma centrifugação a 24000 rpm por 2 horas. Após essa centrifugação, as membranas plasmáticas contidas na interface 28,5 e 49 % de sacarose foram retiradas com auxílio de pipeta Pasteur, aliqüotadas em ependorfes e congeladas a -70 °C. No momento de uso, as aliqüotas foram descongeladas e lavadas (homogeneizadas com 3 mL de tampão Tris/Acetato 5 mM, pH 7,4 e centrifugadas a 22500 g por 15 minutos). O sedimento resultante foi homogeneizado novamente com 3 mL de tampão Tris/Acetato 5 mM (pH 7,4) e incubado por 30 minutos a 37 °C. Após esta incubação, repetiu-se a lavagem por mais 3 vezes. O sedimento da última centrifugação foi honogeneizado em 1 mL de tampão Tris/Acetato 5 mM (pH 7,4), aliqüotado e teve sua concentração protéica dosada.

III.4 UNIÃO DE L-[³H]GLUTAMATO EM MEMBRANAS PLASMÁTICAS SINÁPTICAS

A medida da união de L-[³H]glutamato a seus receptores ou transportadores foi feita pela adição das membranas plasmáticas isoladas de córtex cerebral ou estriado ou cérebro médio de ratos de 7, 15 e 60 dias de vida

em um meio contendo tampão Tris/Acetato 50 mM (pH 7,4) ou tampão Tris/Acetato 50 mM e NaCl 120 mM (pH 7,4), respectivamente, com 40 nM de glutamato frio contendo 0,6 μCi de L-[^3H]glutamato. A união inespecífica de glutamato foi medida pela adição de 40 μM de glutamato frio ao meio de incubação. O ácido glutárico foi diluído em tampão Tris/Acetato 50 mM, pH 7,4. Sua concentração final no meio de incubação variou de 0,01 a 1 mM. Os controles não continham o ácido. A alguns ensaios foram adicionados 100 μM de DL-AP5 ou 100 μM de CNQX (antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA, respectivamente). Após a adição das membranas plasmáticas (aproximadamente 50 μg de proteína), procedeu-se uma incubação a 30 °C por 30 minutos. O processo foi interrompido por centrifugação a 21000 g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, lavou-se cuidadosamente o sedimento com água gelada (4 °C) para remover a radioatividade não incorporada. Depois de seco, o sedimento foi solubilizado em 100 μL de solução de dodecil sulfato de sódio 0,1 % e NaOH 0,1 N. Após 12 horas, aproximadamente, foi adicionado líquido de cintilação e a radioatividade foi medida em cintilador. A união específica de L-[^3H]glutamato foi calculada descontando-se a união inespecífica.

III.5 PREPARAÇÃO DAS FATIAS PARA A MEDIDA DA CAPTAÇÃO DE L-[^3H]GLUTAMATO

Ratos Wistar de 7 e 15 dias de vida foram decapitados sem anestesia e seus cérebros imediatamente removidos e submergidos em solução salina

balanceada de Hank (tampão HBSS). O córtex cerebral e o estriado foram dissecados e cortados em fatias de 400 μm de espessura usando um fatiador de tecido McIlwain. As fatias foram lavadas e separadas em tampão HBSS pH 7,2 (137 mM de NaCl, 0,63 mM de Na_2HPO_4 , 4,17 mM de NaHCO_3 , 5,36 mM de KCl, 0,44 mM de KH_2PO_4 , 1,26 mM de CaCl_2 , 0,41 mM de MgSO_4 , 0,49 mM de MgCl_2 e 5,55 mM de glicose). Adicionaram-se 280 μL de tampão HBSS às fatias consideradas controles, enquanto 260 μL de tampão HBSS e 20 μL do ácido glutárico (concentração final de 1 e 5 mM) foram adicionados às fatias testes. Procedeu-se então uma pré-incubação por 23 minutos a 35 °C. Em alguns ensaios a concentração final do ácido variou de 5 a 50 mM e em outros houve a adição de 3 mM de creatina e 1 mM de N-acetilcisteína. A medida da captação inespecífica foi realizada da mesma forma, porém em tampão glucamina pH 7,2 (137 mM de glucamina-HCl, 4,17 mM de glucamina-HEPES, 5,36 mM de KCl, 0,44 mM de KH_2PO_4 , 1,26 mM de CaCl_2 , 0,41 mM de MgSO_4 , 0,49 mM de MgCl_2 e 5,55 mM de glicose) e a uma temperatura de 0 °C.

III.6 CAPTAÇÃO DE L-[^3H]GLUTAMATO POR FATIAS DE CÓRTEX CEREBRAL E ESTRIADO

A captação do glutamato foi realizada segundo o método de Frizzo e colaboradores (2002). Foi feita a 35 °C e iniciada pela adição de 100 μM de glutamato frio contendo 0,1 μCi de L-[^3H]glutamato. A incubação foi interrompida depois de 7 minutos por duas lavagens com 1 mL de tampão HBSS gelado,

seguida pela adição de 300 μ L de NaOH 0,5 N para lisar o tecido. Após um período de aproximadamente 12 horas, retirou-se uma alíquota para dosagem de proteína e ao restante foi adicionado líquido de cintilação para a determinação do conteúdo intracelular de L-[3 H]glutamato através de um contador de cintilação líquida.

III.7 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SINAPTOSSOMAL PARA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-[3 H]GLUTAMATO

A preparação da fração sinaptossomal foi feita segundo o método de Gonçalves e colaboradores (1997). Foram utilizados ratos de 7 e 15 dias de idade que foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O córtex e o cérebro médio foram isolados e homogeneizados em 10 mL de uma solução sacarose pH 7,4 (0,32 M de sacarose, 1 mM de EDTA, 10 mM de HEPES e 1 mg/mL de BSA). O homogeneizado foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e centrifugado por 14000 g por 12 minutos. O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado em 2 mL de solução Percoll pH 7,4 (45 % v/v percoll, 115 mM de NaCl e qsp de solução Krebs HEPES Ring - KHR). Essa suspensão foi centrifugada a 14000 g por 2 minutos. A banda superior formada foi coletada e homogeneizada suavemente em 1 mL de solução KHR pH 7,4 (140 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10 mM de HEPES, 5 mM KCl e 5 mM de glicose). O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado em tampão HBSS baixo K^+ (133 mM de NaCl, 2,4 mM de KCl, 1,2 mM de KH_2PO_4 , 1,2 mM de

MgSO₄, 27,7 mM de HEPES, 12 mM de glicose e 1 mM de CaCl₂, pH 7,4). Alíquotas foram retiradas para a determinação da quantidade de proteína e para a dosagem da LDH (ensaio para avaliação da integridade do sinaptossoma).

III.8 ENSAIO DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE EM SINAPTOSSOMAS

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

III.9 LIBERAÇÃO DE L-[³H]GLUTAMATO PELA FRAÇÃO SINAPTOSSOMAL

A determinação da liberação de L-[³H]glutamato foi realizada conforme descrito por Miguez e colegas (1999). Os sinaptossomas foram inicialmente expostos ao glutamato marcado, por incubação da preparação sinaptossomal por 15 minutos a 37 °C em um meio não despolarizante (tampão HBSS baixo K⁺) na presença de 2 μM de glutamato frio contendo 0,4 μCi de L-[³H]glutamato. As alíquotas de sinaptossomas carregadas com L-[³H]glutamato foram centrifugadas a 21000 g por 1 minuto. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados quatro vezes em HBSS baixo K⁺ por centrifugação a 21000 g por 1 minuto (4 °C). No ensaio de liberação de L-[³H]glutamato, o sedimento final foi

ressuspenso em tampão HBSS baixo K^+ e incubado por 1 minuto no mesmo meio contendo 40 mM de KCl para induzir despolarização (liberação estimulada por K^+) na ausência (controles) ou presença do ácido glutárico (1 e 5 mM). A incubação foi interrompida por centrifugação a 21000 g por 1 minuto a 4 °C. A radioatividade presente no sobrenadante e no sedimento foi separadamente determinada em um cintilador Wallac. O L-[3H]glutamato liberado foi calculado como uma porcentagem da quantidade total de radioatividade presente no início do período de incubação.

III.10 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA

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

III.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressados como média \pm erro padrão da média e foram analisados usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador compatível. As comparações entre as médias foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan, quando o valor de F foi significativo. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

IV. RESULTADOS

Inicialmente estudamos o efeito do AG sobre a união de L-[³H]glutamato na ausência de sódio (receptores) em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias, bem como em córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade.

IV.1 Efeito do ácido glutárico sobre a união de L-[³H]glutamato na ausência de sódio em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias, e córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade

A figura IV.1 mostra que o AG diminui de forma significativa, nas concentrações de 0,1 e 1 mM, a união de L-[³H]glutamato a receptores em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos de 7 dias [F(3,26)=3,50; p<0,05], enquanto que em cérebro médio, de ratos da mesma idade, somente houve inibição na concentração de 1 mM [F(3,20)=7,961; p<0,05]. Já nas estruturas testadas de ratos de 15 dias, os resultados foram semelhantes, ou seja, houve inibição da união de L-[³H]glutamato em membranas plasmáticas de córtex cerebral em todas as concentrações testadas de ácido glutárico [F(3,26)=8,73; p<0,05], enquanto em cérebro médio essa inibição ocorreu apenas na concentração de 1 mM [F(3,19)=4,88; p<0,05] (figura IV.2). Já em córtex cerebral [F(3,20)=2,88; p>0,05] e estriado [F(3,20)=0,192; p>0,05] de ratos de 60

dias (figura IV.3), o AG não alterou significativamente a união de L-[³H]glutamato a receptores em membranas plasmáticas sinápticas em todas as concentrações testadas.

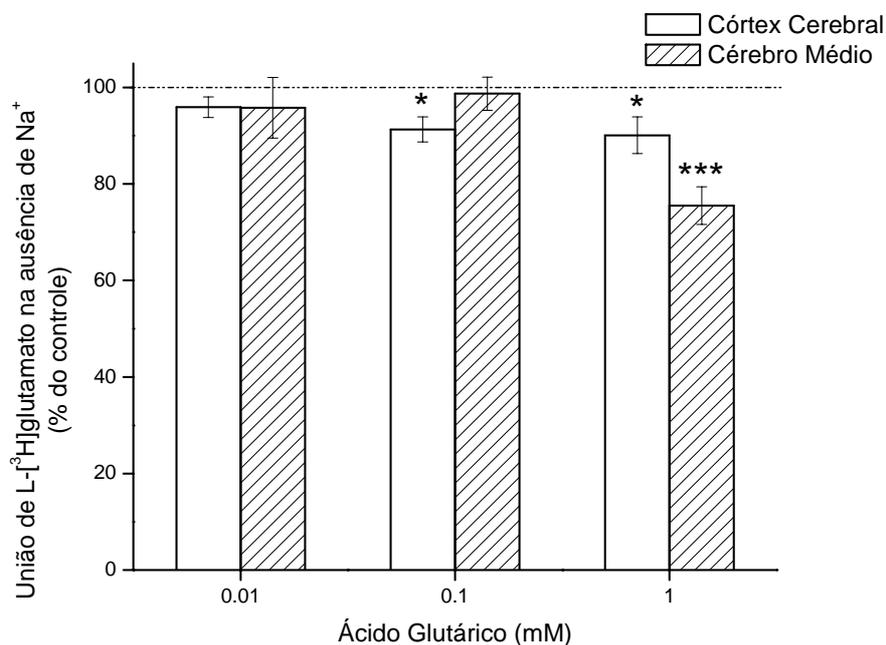


Figura IV.1 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L[³H]glutamato na ausência de sódio (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle ($2,81 \pm 1,28$ e $2,76 \pm 0,81$ pmol/ mg prot para córtex cerebral e cérebro médio, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, ***p<0,001, comparado ao controle).

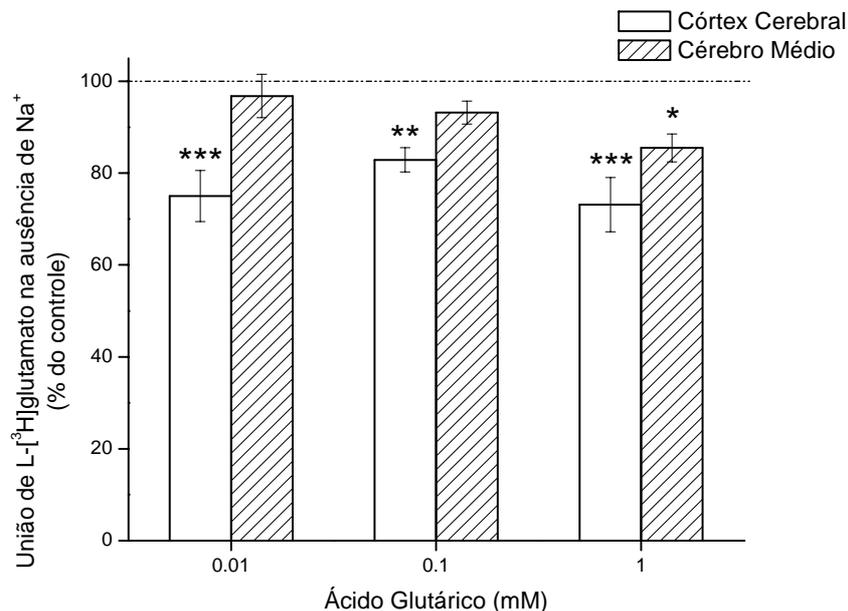


Figura IV.2 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L[³H]glutamato na ausência de sódio (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle (0,87 \pm 0,51 e 1,44 \pm 0,50 pmol/ mg prot para córtex cerebral e cérebro médio, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparado ao controle).

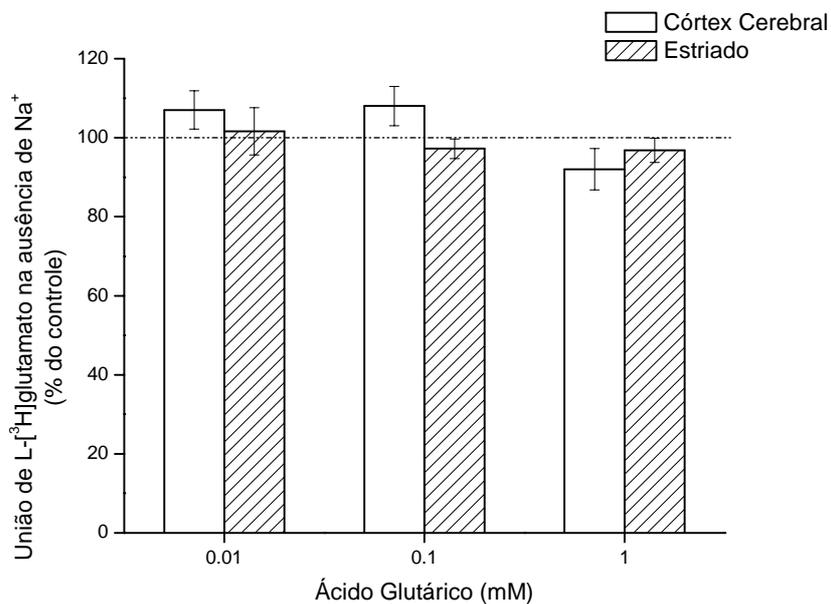


Figura IV.3 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L[³H]glutamato na ausência de sódio (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle ($1,72 \pm 1,08$ e $1,19 \pm 0,92$ pmol/ mg prot para córtex cerebral e estriado, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV.2 Efeito do ácido glutárico sobre a união de L-[³H]glutamato na ausência de sódio em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias na presença de antagonistas glutamatérgicos

Os resultados anteriores mostraram uma inibição significativa da união de L-[³H]glutamato na ausência de Na⁺ em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias de idade.

Esses resultados indicam que o AG poderia estar exercendo seu efeito inibitório em receptores glutamatérgicos que são sítios de união independente de sódio. Com o intuito de se determinar os subtipos de receptores glutamatérgicos possivelmente envolvidos no efeito inibitório do AG, investigou-se o efeito de antagonistas NMDA (DL-AP5) e não-NMDA (CNQX) sobre este efeito inibitório.

As figuras IV.4 e IV.5 mostram que a inibição causada pelo antagonista não-NMDA (CNQX) na união de L-[³H]glutamato a receptores de membranas plasmáticas sinápticas em córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de vida, respectivamente, é semelhante à inibição causada quando co-incubado com o AG, sugerindo que os dois compostos se unam ao mesmo receptor. Por outro lado, a inibição da união de L-[³H]glutamato causada pelo AG co-incubado com o antagonista NMDA (AP5) é ligeiramente maior que a inibição causada somente pelo AP5 no córtex cerebral (10 %) [F(5,36)=14,092; p<0,05] e no cérebro médio (16 %) [F(5,36)=5,56; p<0,05]. Tais resultados sugerem que o AP5 e o ácido glutárico podem estar se unindo a receptores diferentes. Verificamos também que o AP5 inibiu em maior grau (55 % de inibição) a união de L-[³H]glutamato a membranas plasmáticas sinápticas no córtex cerebral, quando comparado ao

cérebro médio (32 %), sugerindo que o conteúdo de receptores NMDA no córtex cerebral é maior do que no cérebro médio nesta idade.

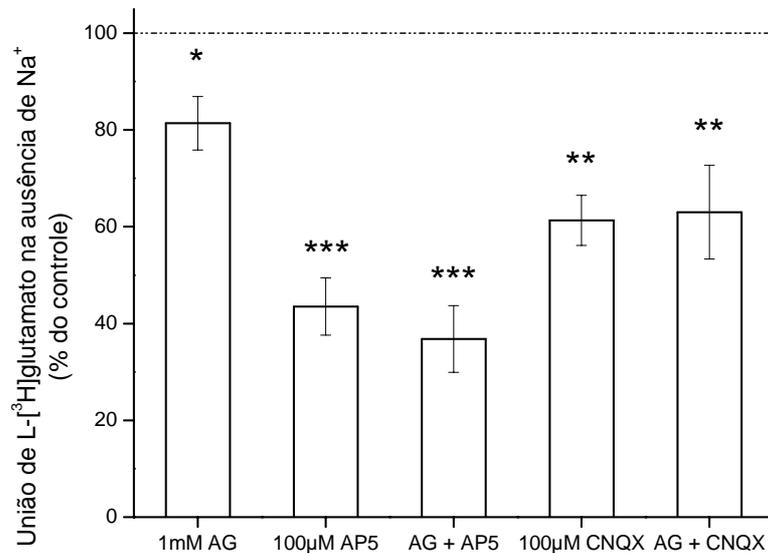


Figura IV.4 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico (1mM AG), AP5 (100 µM) e CNQX (100 µM) sobre a união de L[³H]glutamato na ausência de Na⁺ (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos de 15 dias de idade.

Os valores representam média ± erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle (0,46 ± 0,17 pmol/ mg prot). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparado ao controle).

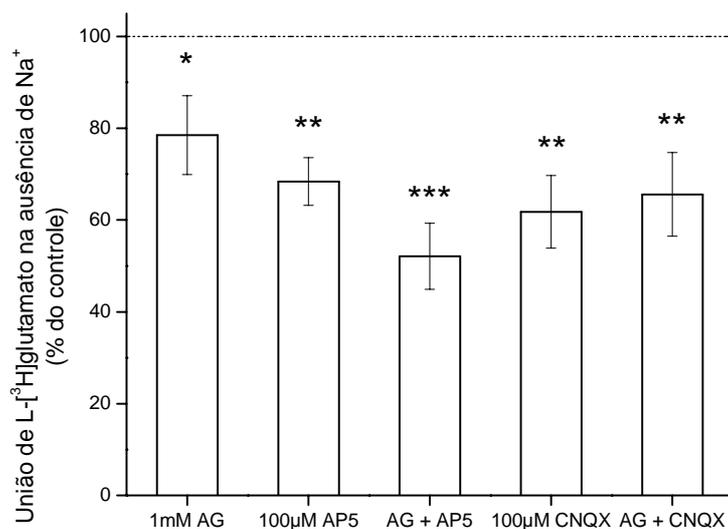


Figura IV.5 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico (1mM AG), AP5 (100 μM) e CNQX (100 μM) sobre a união de L[³H]glutamato na ausência de Na⁺ (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.

Os valores representam média ± erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle (0,49 ± 0,21 pmol/ mg prot). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparado ao controle).

IV.3 Efeito do ácido glutárico sobre a união de L-[³H]glutamato na presença de sódio em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias, e córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade

O próximo passo foi investigar a influência do AG sobre a união de L-[³H]glutamato a membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral e estriado (ou cérebro médio) na presença de sódio. Convém salientar que essa união, nas condições experimentais utilizadas, ocorre fundamentalmente em transportadores de glutamato.

A figura IV.6 mostra que o AG não exerceu nenhum efeito significativo em todas as concentrações testadas na união de L-[³H]glutamato a transportadores de glutamato de membranas plasmáticas sinápticas em córtex cerebral [$F(3,18)=1,134$; $p>0,05$] e cérebro médio [$F(3,16)=1,015$; $p>0,05$] de ratos de 7 dias. O mesmo ocorreu com o córtex cerebral [$F(3,20)=0,294$; $p>0,05$] e cérebro médio [$F(3,19)=0,170$; $p>0,05$] de ratos de 15 dias (figura IV.7) e com o córtex cerebral [$F(3,20)=0,193$; $p>0,05$] e estriado [$F(3,19)=0,228$; $p>0,05$] de ratos de 60 dias (figura IV.8).

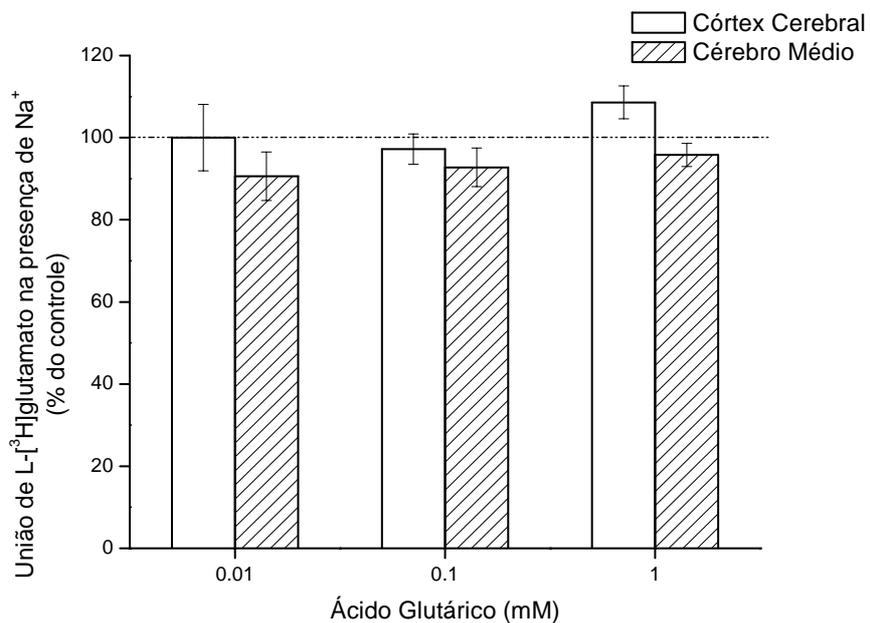


Figura IV.6 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L[³H]glutamato na presença de sódio (união a transportadores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão ($n=6$) e estão expressos em percentual do controle ($4,21 \pm 0,77$ e $6,62 \pm 2,07$ pmol/ mg prot para córtex cerebral e cérebro médio, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

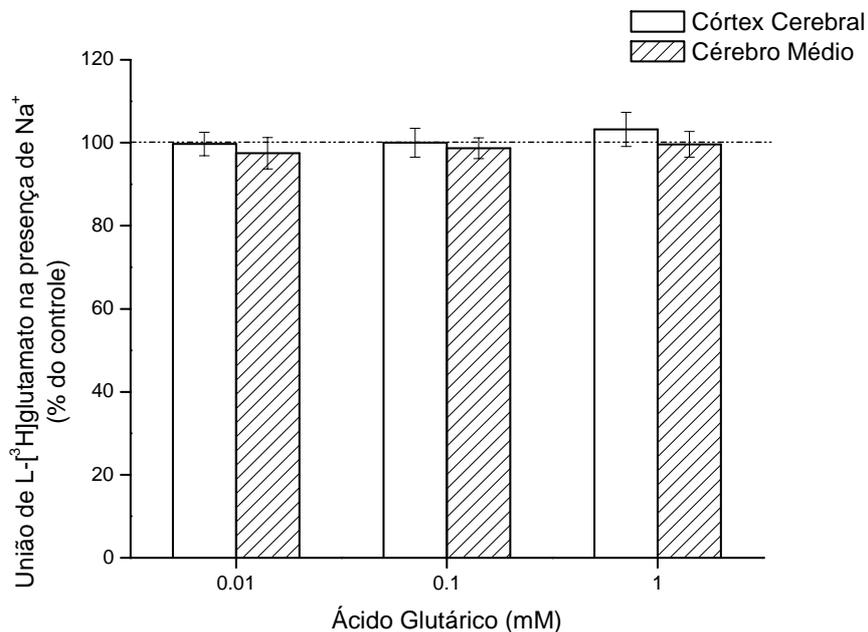


Figura IV.7 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L[³H]glutamato na presença de sódio (união a transportadores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão ($n=6$) e estão expressos em percentual do controle ($7,41 \pm 1,45$ e $5,49 \pm 1,09$ pmol/ mg prot para córtex cerebral e cérebro médio, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

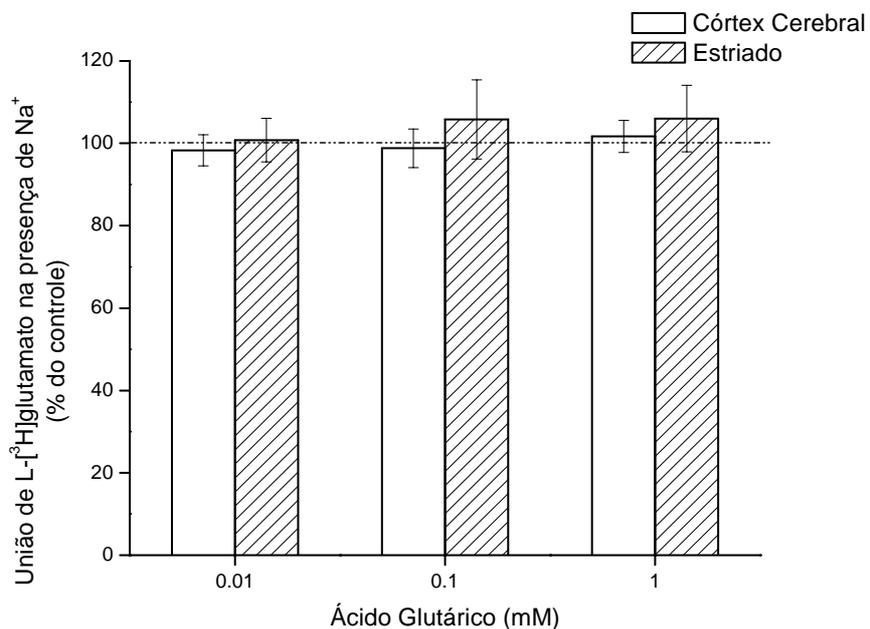


Figura IV.8 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a união de L[³H]glutamato na presença de sódio (união a transportadores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle (12,07 \pm 1,84 e 8,93 \pm 3,20 pmol/ mg prot para córtex cerebral e estriado, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV.4 Efeito do ácido glutárico sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 7 e 15 dias de vida

Testamos também o efeito do AG (1-5 mM) sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 7 e 15 dias de vida.

A figura IV.9 mostra que o AG inibe a captação de L-[³H]glutamato na concentração de 5 mM em córtex cerebral [$F(2,12)=6,973$; $p<0,05$], não alterando a captação em estriado [$F(2,15)=0,368$; $p>0,05$] obtidos de ratos de 7 dias de idade. Já em ratos de 15 dias (figura IV.10), o AG não alterou a captação em nenhuma das estruturas cerebrais e em todas as concentrações testadas (córtex cerebral: [$F(2,15)=0,506$; $p>0,05$]; cérebro médio: [$F(2,15)=0,064$; $p>0,05$]).

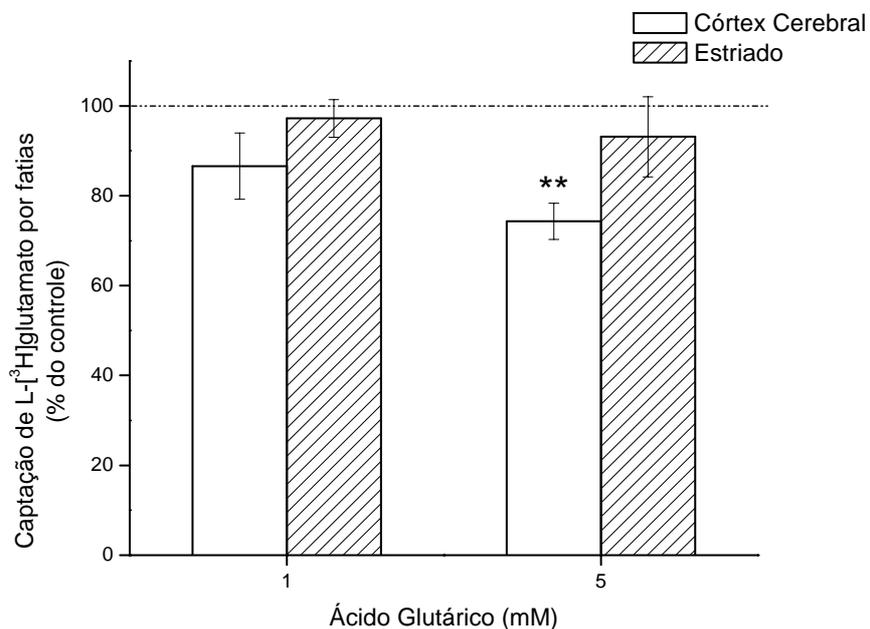


Figura IV.9 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a captação de L[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle (córtex cerebral: $0,96 \pm 0,20$ nmol/ mg prot/ min; estriado: $0,93 \pm 0,24$ nmol/ mg prot/ min). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,01, comparado ao controle).

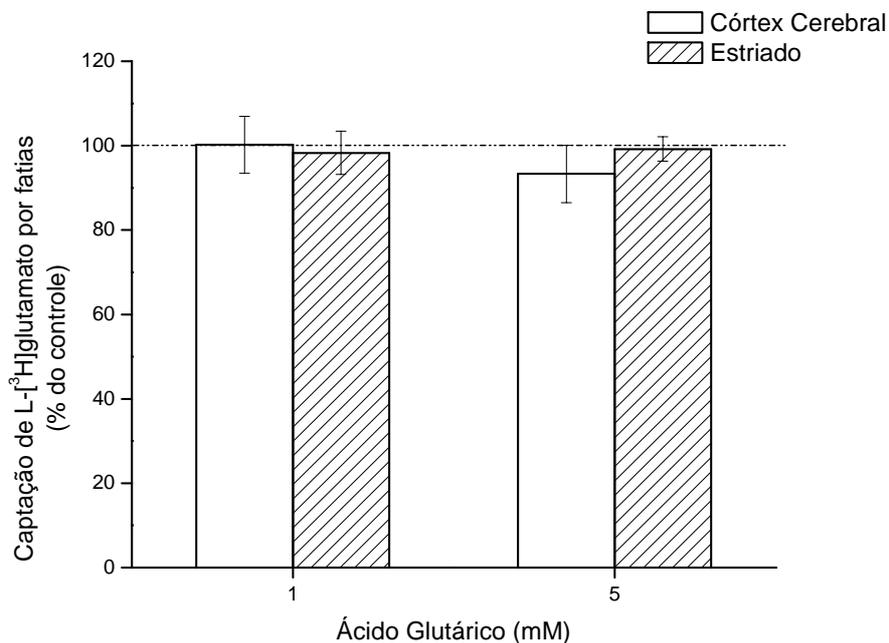


Figura IV.10 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a captação de L[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 15 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle (córtex cerebral: $0,64 \pm 0,06$ nmol/ mg prot/ min; estriado: $0,62 \pm 0,08$ nmol/ mg prot/ min). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Os resultados anteriores mostraram que na concentração de 5 mM do AG houve uma inibição na captação de L-[³H]glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias. Testamos então concentrações maiores deste ácido sobre a captação de L-[³H]glutamato pelo córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida. A figura IV.11 mostra que o AG inibiu [$F(3,15)=17,942$; $p<0,05$] em todas as concentrações testadas e de forma dose dependente ($\beta=-0,857$) a captação de L-[³H]glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias.

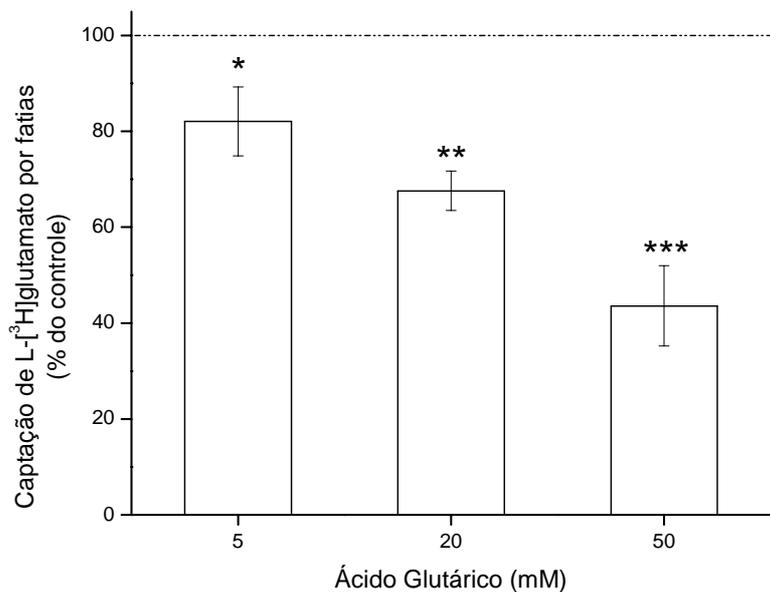


Figura IV.11 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico (5 – 50 mM) sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle ($0,99 \pm 0,25$ nmol/ mg prot/ min). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle).

IV.5 Efeitos da creatina e da N-acetilcisteína sobre a inibição da captação de L-[³H]glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida

Na tentativa de esclarecer os mecanismos pelos quais o AG inibe a captação de glutamato, co-incubamos o AG com creatina, um substrato energético, para testar se a inibição da captação de glutamato pudesse ser devido a um déficit energético causado pelo mesmo, visto que estudos anteriores mostraram que esse metabólico inibe o metabolismo energético (Ullrich et al., 1999; Silva et al., 2000; Kölker et al., 2002a; Ferreira et al., 2005a, 2005b) e que os transportadores de glutamato, localizados particularmente nas células gliais (astrócitos), necessitam de energia para sua função.

Ensaio semelhante também foram feitos, porém na presença da N-acetilcisteína que favorece a síntese de glutatião, o mais importante agente antioxidante no cérebro, visto que foi previamente verificado que o AG aumenta significativamente a lipoperoxidação e diminui as defesas antioxidantes no cérebro (de Oliveira Marques et al., 2003) e que radicais livres inibem o transporte de glutamato por oxidar os transportadores de glutamato (Volterra et al., 1994; Trotti et al., 1996, 1997a, 1997b).

A figura IV.12 mostra que a creatina não preveniu o efeito inibitório do AG (5 mM) sobre a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida [$F(3,25)=9,971$; $p<0,05$]. Similarmente, a N-acetilcisteína (figura IV.13) não preveniu o efeito inibitório do AG [$F(3,24)=5,512$; $p<0,05$]. Estes resultados mostram que a inibição do metabolismo energético ou a ação de radicais livres não foram provavelmente os responsáveis pela redução da captação de glutamato

provocada pelo AG e sugerem que possa ter sido um efeito direto deste ácido sobre os transportadores de glutamato. Devemos, no entanto, enfatizar que o tempo de incubação da creatina e da N-acetilcisteína foi de apenas 30 minutos, o que pode ser pouco para repor as reservas energéticas ou de glutatião intracelulares e, portanto, prevenir os efeitos do AG.

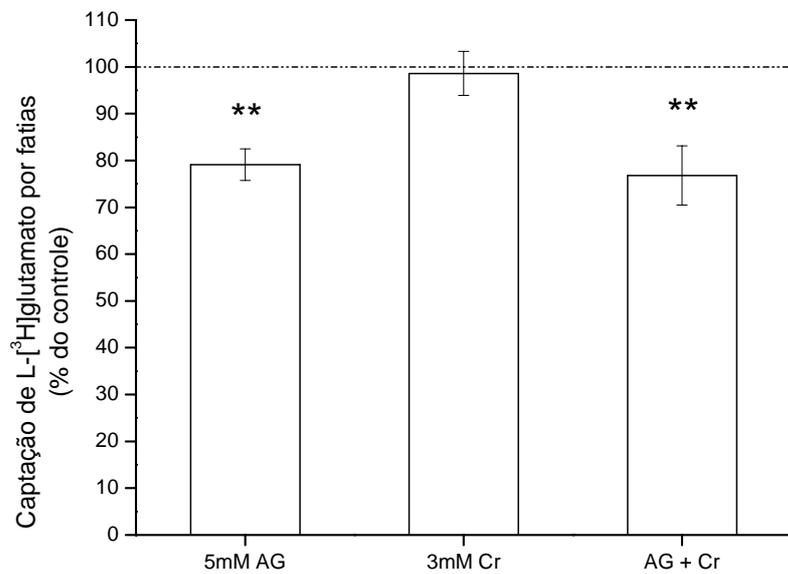


Figura IV.12 – Efeitos *in vitro* da creatina (3 mM) sobre a inibição da captação de L-[³H]glutamato provocada pelo ácido glutárico (AG 5 mM) em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5) e estão expressos em percentual do controle ($0,41 \pm 0,19$ nmol/ mg prot/ min). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,01, comparado ao controle).

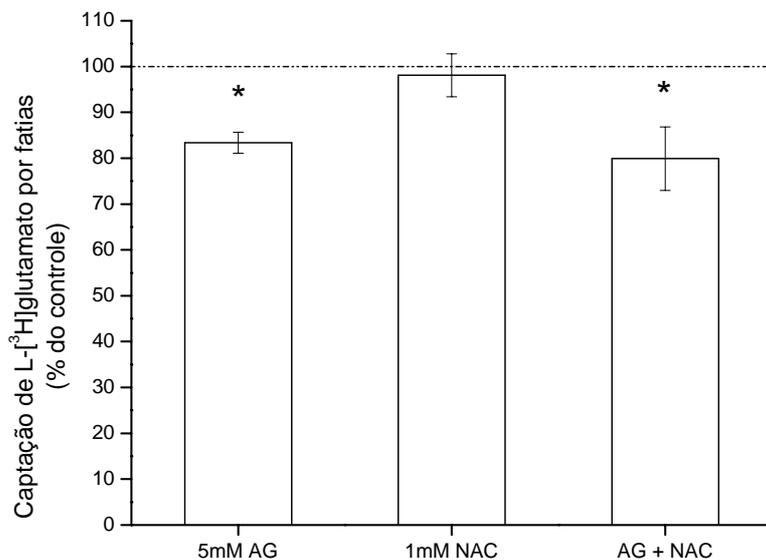


Figura IV.13 – Efeitos *in vitro* da N-acetilcisteína (NAC 1 mM) sobre a inibição da captação de L-[³H]glutamato provocada pelo ácido glutárico (AG 5 mM) em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5) e estão expressos em percentual do controle ($0,43 \pm 0,17$ nmol/ mg prot/ min). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (* $p < 0,05$, comparado ao controle).

IV.6 Efeito do ácido glutárico sobre a liberação de L-[³H]glutamato por sinaptossomas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias de vida

Inicialmente, procuramos determinar se o AG altera a permeabilidade das preparações sinaptossomais através da determinação da lactato desidrogenase. Após, investigamos o efeito do ácido na liberação de L-[³H]glutamato estimulada por potássio (membrana despolarizada) por sinaptossomas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias de idade.

As figuras IV.14 e IV.15 mostram que o AG na concentração de 5 mM não provoca alteração na liberação de lactato desidrogenase no meio de incubação pelas preparações sinaptossomais, em ratos de 7 dias de vida (córtex cerebral: [F(2,6)=0,429; p>0,05]; cérebro médio: [F(2,6)=0,045; p>0,05]) e 15 dias de vida (córtex cerebral: [F(1,4)=0,103; p>0,05]; cérebro médio: [F(1,6)=0,317; p>0,05]), respectivamente, indicando que nessa concentração não ocorre ruptura ou aumento da permeabilidade dos sinaptossomas.

A figura IV.16 mostra que o AG, em todas as concentrações testadas, não alterou a liberação de glutamato estimulada por potássio de preparações sinaptossomais de córtex cerebral [F(3,20)=0,685; p>0,05] e cérebro médio [F(3,20)=2,879; p>0,05] de ratos de 7 dias de idade e de ratos de 15 dias (córtex cerebral [F(3,20)=0,192; p>0,05] e cérebro médio [F(3,19)=0,061; p>0,05] (figura IV.17).

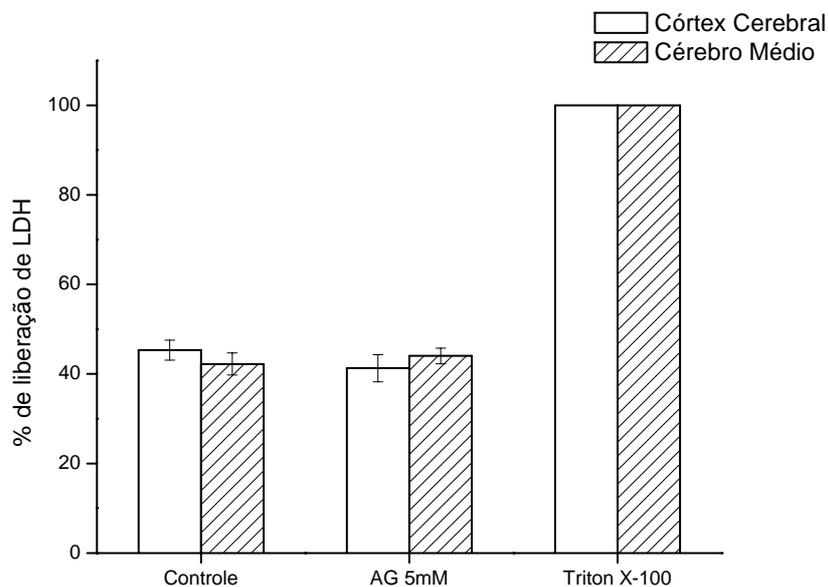


Figura IV.14 – Efeito do ácido glutárico (AG 5 mM) sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) de preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão ($n=4$) e expressam o percentual de liberação de lactato desidrogenase (LDH) em relação aos ensaios com Triton X-100 (100% de liberação). Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

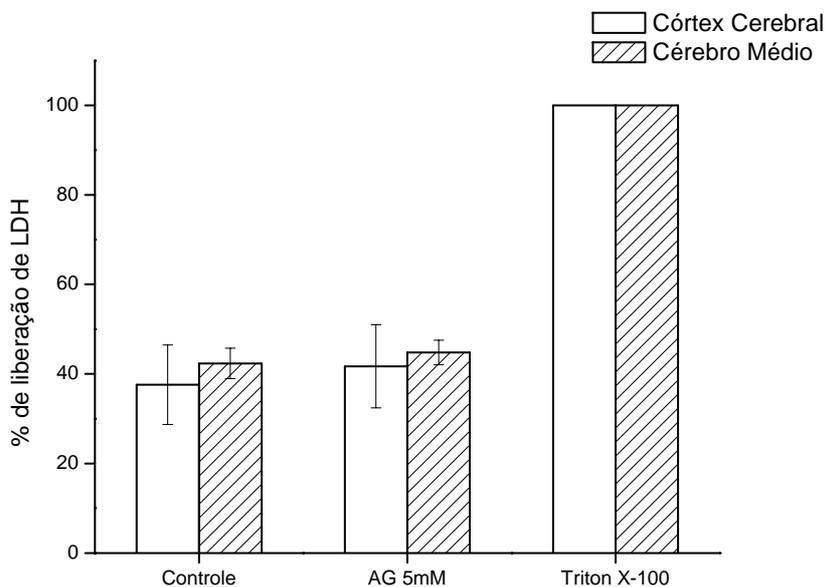


Figura IV.15 – Efeito do ácido glutárico (AG 5 mM) sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) de preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4) e expressam o percentual de liberação de lactato desidrogenase (LDH) em relação aos ensaios com Triton X-100 (100% de liberação). Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA de uma via).

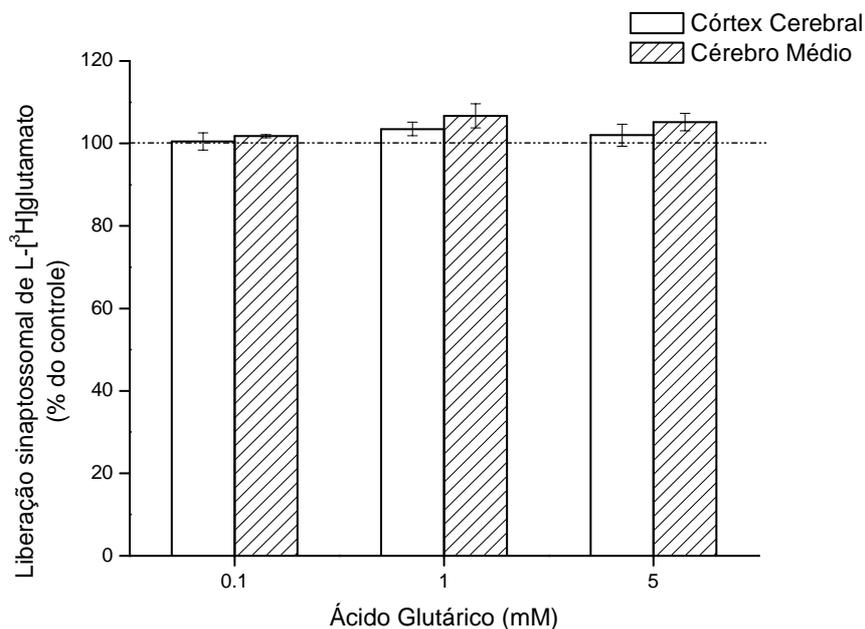


Figura IV.16 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a liberação de L[³H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.

Os valores representam média ± erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle (13,0 ± 0,84 e 16,3 ± 1,27 % de liberação para córtex e cérebro médio, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

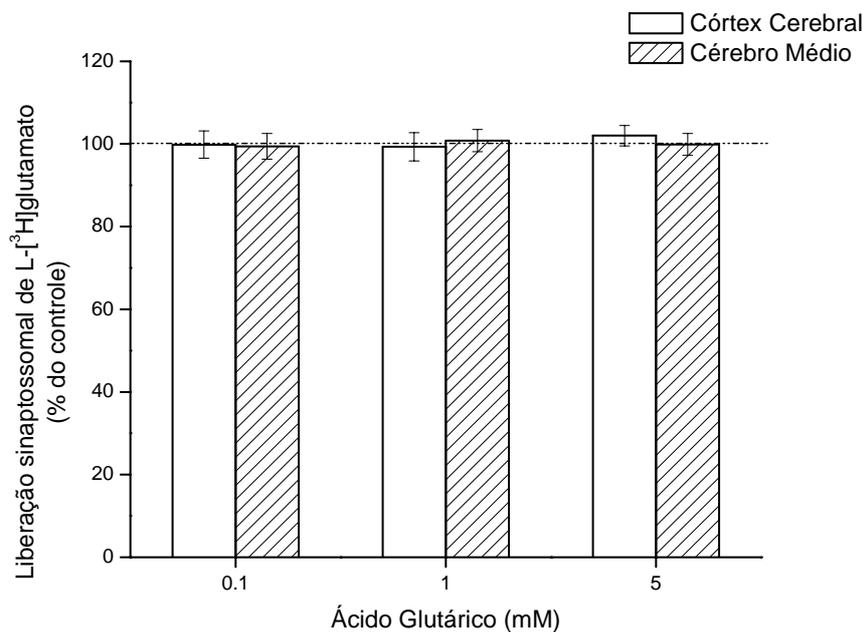


Figura IV.17 – Efeito *in vitro* do ácido glutárico sobre a liberação de L-[³H]glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos em percentual do controle ($17,9 \pm 1,14$ e $18,2 \pm 1,80$ % de liberação para córtex e cérebro médio, respectivamente). A linha tracejada indica o valor do controle (100 %). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

V. DISCUSSÃO

A acidemia glutárica tipo I (AG I) é um distúrbio hereditário neurometabólico devido à deficiência da atividade da enzima mitocondrial glutaril-CoA desidrogenase que está envolvida no metabolismo da lisina, hidroxilisina e triptofano. Caracteriza-se bioquimicamente pelo acúmulo predominante de ácido glutárico (AG) e 3-hidroxi glutárico (3OHAG) nos tecidos e líquidos biológicos dos afetados por esta doença (Goodman et al., 1977; Funk et al., 2005; Kolker et al., 2006). Os pacientes com AG I apresentam principalmente sintomas neurológicos, associados a dano progressivo principalmente no córtex cerebral (atrofia cortical dos lobos frontal e temporal) e destruição aguda do estriado que ocorre usualmente após crises encefalopáticas, caracterizadas por convulsões, coma, letargia, movimentos coreatéticos, atraso no desenvolvimento psicomotor e outros (Hoffmann & Zschocke, 1999; Funk et al., 2005). As concentrações séricas do AG usualmente encontradas na doença ficam entre 5 e 400 μM (Hoffmann et al., 1991, 1996; Merinero et al., 1995), mas pode alcançar valores consideravelmente maiores no cérebro (até 8 mM) durante as crises encefalopáticas (Funk et al., 2005).

Apesar do dano neurológico ser uma importante característica dessa doença, os mecanismos que levam à disfunção neurológica são pouco conhecidos. Neste sentido, muitos trabalhos têm demonstrado ações neurotóxicas principalmente para o 3OHGA que tem sido considerado o principal agente neurotóxico dessa enfermidade (Kölker et al., 2000a, 2006). Associa-se o fato de

que o aumento na concentração desse ácido na urina dos pacientes é diagnóstico dessa enfermidade. Foi, portanto, verificado, que o 3OHAG inibe o metabolismo energético (Ullrich et al., 1999; Das et al., 2003; Latini et al., 2005b), induz estresse oxidativo (Kölker et al., 2001; Latini et al., 2002, 2005a) e causa excitotoxicidade (Kölker et al., 2000a; Frizzo et al., 2004; Rosa et al., 2004). Outros autores, no entanto, não demonstraram excitotoxicidade para esse ácido (Bjugstad et al., 2001; Lund et al., 2004; Freudenberg et al., 2004).

Por outro lado, o AG é excretado na urina e se acumula nos tecidos dos pacientes com essa doença em concentrações muito elevadas. No entanto, há pacientes com AG I em que esse ácido é excretado em concentrações pouco aumentadas (variante de AG I não excretadores) (Baric et al., 1999). Acredita-se que nestes pacientes o AG não é excretado por ter seu efluxo do cérebro prejudicado, acumulando-se mais neste tecido (Kölker et al., 2006). No que diz respeito ao AG, foi verificado que este ácido provoca um dano celular em culturas organotípicas cortico-estriatais (Whetsell & Schwarcz, 1983) e em culturas de células estriatais (Whetsell, 1984). O AG inibe a captação de glutamato por sinaptossomas e a união de glutamato a seus transportadores em cérebro de ratos de 30 dias de vida (Porciúncula et al., 2000), além de inibir a captação de glutamato em vesículas sinápticas de córtex cerebral de ratos (Porciúncula et al., 2004). Também verificou-se que ele interage com receptores de glutamato metabotrópicos (Porciúncula et al., 2004) e ionotrópicos do tipo AMPA (Lima et al., 1998; Porciúncula et al., 2004). Estudos também demonstraram que o AG diminui as defesas antioxidantes, induz peroxidação lipídica e formação de espécies reativas, particularmente de óxido nítrico, em córtex cerebral e estriado de ratos jovens (de

Oliveira Marques et al., 2003). Quanto ao metabolismo energético, verificou-se que o AG provoca uma inibição dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral (Silva et al., 2000) e em cérebro médio *in vivo* (Ferreira et al., 2005a) e *in vitro* (Ferreira et al., 2005b). Também se verificou que o mesmo causa uma diminuição da produção de CO₂, diminuição dos níveis de ATP (Silva et al., 2000) e uma redução da atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase em córtex cerebral de ratos (Kölker et al., 2002a), além de uma redução da atividade da enzima creatina quinase em cérebro médio de ratos jovens (Ferreira et al., 2005b).

Tendo em vista que o papel do AG, o metabólito que mais se acumula na AG I, sobre parâmetros do sistema glutamatérgico não está completamente esclarecido, o objetivo dessa investigação foi estudar os efeitos desse ácido sobre alguns parâmetros do sistema glutamatérgico, tais como união de glutamato em preparações de membranas plasmáticas sinápticas na presença e ausência de sódio, captação de glutamato por fatias de córtex cerebral e de estriado e liberação de glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos ao longo do desenvolvimento. O córtex cerebral e o estriado ou cérebro médio foram as estruturas cerebrais utilizadas na presente investigação porque são os que apresentam maior dano na AG I.

Verificamos inicialmente que o AG inibe a união de glutamato a membranas sinápticas na ausência de sódio em córtex cerebral e cérebro médio (região onde está contido o estriado) de ratos de 7 e 15 dias de vida, mas não em animais de 60 dias de idade. Tais resultados apontam um efeito do ácido sobre receptores glutamatérgicos, visto que são sítios de união independentes de sódio. O efeito diferencial observado em ratos de menor idade (7 e 15 dias de vida), pode resultar

da expressão diferenciada de receptores glutamatérgicos ao longo do desenvolvimento pós-natal de ratos como visto previamente (McDonald et al., 1988, 1992), onde existe uma maior expressão dos receptores do tipo NMDA no córtex cerebral desde o início do período pós-natal, com desenvolvimento subsequente dos receptores do tipo não-NMDA (Insel et al., 1990; Brennan et al., 1997). Já no estriado as respostas sinápticas provocadas pelo glutamato no período pós-natal são mediadas inicialmente por receptores do tipo não-NMDA e a maturação dos receptores NMDA ocorre mais tarde (Colwell et al., 1998; Nansen et al., 2000; Villares & Stavale, 2001; Lilliu et al., 2001). Também observamos que a inibição da união de glutamato a membranas plasmáticas sinápticas na ausência de sódio causada pelo AG em córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida (10 %) foi menor que a inibição causada em ratos de 15 dias de vida (27 %), idade onde teríamos uma maior expressão de receptores do tipo não-NMDA. No cérebro médio, ocorreu o inverso, ou seja uma maior inibição da união de glutamato provocada pelo AG em ratos de 7 dias (25 %), coincidindo também com o período de maior expressão dos receptores não-NMDA no estriado, quando comparado com ratos de 15 dias de vida (15 %). Além disso, verificamos que em córtex cerebral de ratos de 15 dias de vida o antagonista NMDA (AP5) inibiu em maior grau (55 % de inibição) a união de glutamato a membranas plasmáticas sinápticas, quando comparado ao cérebro médio (32 %), sugerindo que o conteúdo de receptores NMDA no córtex cerebral é maior do que no cérebro médio nesta idade. Corroborando com a idéia de que a inibição causada pelo AG provavelmente ocorreu em receptores do tipo não-NMDA, verificamos que a inibição da união de glutamato a receptores de membranas plasmáticas sinápticas

em córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de vida observada na presença isolada do antagonista não-NMDA (CNQX) foi semelhante à inibição causada quando co-incubado (adicionado) com o AG, sugerindo que os dois compostos estão agindo sobre o mesmo receptor. Já a inibição da união de glutamato causada pelo AG co-incubado com o antagonista NMDA (AP5) foi maior que a inibição causada somente pelo AP5 no córtex cerebral (10 %) e no cérebro médio (16 %), sugerindo que o AP5 e o ácido glutárico podem estar atuando em receptores diferentes. Estes resultados estão de acordo com resultados prévios indicando que convulsões tônico-clônicas provocadas por injeções intraestriatais do AG foram prevenidas por DNQX, um antagonista de receptores AMPA, mas não por MK-801, um antagonista de receptores NMDA (Lima et al., 1998) e que baixas concentrações do AG estimulam receptores de glutamato metabotrópicos e ionotrópicos do tipo AMPA, não alterando a união a receptores do tipo NMDA e cainato (Porciúncula et al., 2004). Nossos resultados sugerem que o ácido glutárico pode competir com o glutamato pela união em receptores não-NMDA. Embora não se possa saber o(s) mecanismo(s) subjacente(s) de tal interação, é possível que ela tenha ocorrido pela semelhança estrutural química do AG e do glutamato. Neste particular, presume-se que o receptor ou um sítio dos receptores não-NMDA pode não distinguir o AG do glutamato, ligando-se igualmente aos dois compostos que competiriam por esta ligação.

O passo seguinte de nossa investigação foi estudar o efeito do AG sobre a união de glutamato na presença de sódio a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e estriado (ou cérebro médio) de ratos de 7, 15 e 60 dias de vida. Verificamos que o AG não teve efeito significativo sobre a união de glutamato a

membranas plasmáticas sinápticas nestas condições em nenhuma das estruturas e em todas as idades testadas. Portanto, já que, na presença de sódio, a união de glutamato a membranas plasmáticas sinápticas ocorre fundamentalmente em transportadores de glutamato, é possível inferir que o AG não interfere na união a transportadores localizados em membranas sinápticas. Nossos resultados diferem daqueles encontrados por Porciúncula e colaboradores (2000) que verificaram uma inibição provocada pelo AG sobre a união de glutamato a seus transportadores em cérebro de ratos de 30 dias de vida. Salientamos duas possíveis explicações para esses resultados discrepantes. É possível que em ratos de 30 dias a distribuição dos transportadores de glutamato seja distinta daquelas outras que foram objeto do nosso estudo (7, 15 e 60 dias de idade), podendo ter uma resposta diferente ao AG. Diferenças metodológicas também podem ser responsáveis por essa aparente discrepância, o uso de potássio, mesmo em baixas concentrações, para ajustar o pH da solução de AG para 7,4, pode ter provocado uma redução da união do glutamato a seus transportadores, como visto no estudo de Kramer & Baudry (1984) onde demonstram que mesmo em concentrações tão baixas quanto 1 mM já há uma redução significativa desta união.

Passamos então a investigar o efeito do AG sobre a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 7 e 15 dias de vida. Verificamos que apenas em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de idade houve uma inibição na captação de glutamato, e que esta inibição foi dose dependente. Embora esses resultados demonstrem que o AG inibe a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos muito jovens e os resultados registrados em

membranas plasmáticas sinápticas mostrem que o AG não interfere com a união de glutamato a transportadores (união de glutamato a membranas plasmáticas sinápticas na presença de sódio) em córtex cerebral de ratos nas várias idades testadas possam parecer conflitantes, deve-se enfatizar que os sistemas utilizados foram totalmente diferentes, um utilizando preparações purificadas de membranas plasmáticas sinápticas e o outro, tecidos íntegros em que todo o sistema celular está presente. Uma ação indireta do AG sobre os transportadores pode ter ocorrido. Pode-se também supor que receptores glutamatérgicos poderiam estar envolvidos na diminuição da captação provocada pelo AG em fatias de córtex cerebral, visto que verificamos anteriormente uma alteração na união de glutamato a seus receptores provocada pelo AG em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens. De qualquer forma, cremos que os resultados obtidos com fatias de tecidos sejam mais importantes do ponto de vista fisiológico. Verificamos também que o substrato energético creatina e que N-acetilcisteína, o antioxidante precursor da síntese de glutatião, não preveniram o efeito inibitório do AG sobre a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida. Tais resultados sugerem que o efeito inibitório causado pelo AG sobre a captação de glutamato em córtex cerebral não tenha sido devido à inibição do metabolismo energético, visto que os sistemas de transporte de glutamato necessitam de aporte energético para a captação desse neurotransmissor principalmente em astrócitos (Möller & Hamprecht, 1989) que são as células mais numerosas nas fatias cerebrais. Além disso, a oxidação de transportadores por radicais livres também seria uma alternativa pouco provável para explicar a inibição de glutamato causada pelo AG, já que a N-acetilcisteína, que é substrato

para a formação do antioxidante mais presente no cérebro (glutatião), também não foi capaz de reverter esse efeito inibitório do AG. Deve-se, no entanto, enfatizar que o período de incubação utilizado para testar os efeitos da creatina e da N-acetilcisteína foi de apenas 30 minutos, o que pode ter sido pouco para repor as reservas energéticas ou de glutatião intracelulares e, portanto, prevenir os efeitos do AG. Assim, não se pode descartar totalmente o déficit energético ou a formação aumentada de radicais livres para explicar os efeitos do AG sobre a captação de glutamato, visto que estudos anteriores, demonstraram que esse ácido compromete o metabolismo energético, inibindo complexos da cadeia respiratória, diminuindo a produção de CO₂ e os níveis de ATP, além de uma redução da atividade das enzimas Na⁺, K⁺-ATPase e creatina quinase em córtex cerebral e cérebro médio de ratos jovens (Silva et al., 2000; Kölker et al., 2002a; Ferreira et al., 2005a, 2005b) e também diminui as defesas antioxidantes, induz lipoperoxidação e formação de espécies reativas, particularmente de óxido nítrico, em córtex cerebral e estriado de ratos jovens (de Oliveira Marques et al., 2003).

Considerando que o AG diminui a captação de glutamato no córtex cerebral, é possível que a concentração de glutamato esteja aumentada na fenda sináptica nesta estrutura, ocasionando uma estimulação excessiva nos receptores glutamatérgicos e suas conseqüências, tais como epilepsia e morte neuronal, que são observados em pacientes com AG I (Kölker et al, 2006). Neste sentido, estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram efeitos provocados pelo AG, favorecendo o envolvimento do sistema glutamatérgico na toxicidade neuronal e nas convulsões em ratos (Lima et al., 1998).

A seguir investigamos o efeito do AG sobre a liberação de glutamato estimulada por potássio por preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias de vida. Para verificar a integridade dos sinaptossomas, testamos o efeito da presença do AG no meio de incubação sobre a liberação de lactato desidrogenase. Verificamos que este ácido na concentração de 5 mM não altera a liberação da enzima, indicando que os sinaptossomas estavam íntegros. A liberação de glutamato nas preparações despolarizadas (estimuladas por potássio) não foi modificada pela presença do AG.

Concluindo, encontramos no presente trabalho uma inibição causada pelo AG sobre a união de glutamato a membranas plasmáticas sinápticas na ausência de sódio (receptores) de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 e 15 dias de vida, e que essa inibição foi dirigida predominantemente a receptores do tipo não-NMDA. Encontramos também uma inibição dose dependente causada pelo AG sobre a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de vida. Tais resultados indicam uma alteração do sistema glutamatérgico causado pelo AG em um período crítico e vulnerável de desenvolvimento cerebral. Além disso, as doses do AG que resultaram nessas alterações foram concentrações similares às encontradas no cérebro de pacientes com AG I. É possível, portanto, presumir que nossos resultados, indicando alterações do sistema glutamatérgico em uma idade pós-natal precoce (7 e 15 dias de vida), possam estar relacionados, ao menos em parte, aos achados neurológicos (convulsões, comas, hipotonia, distonia, discinesia) e neuropatológicos (atrofia cortical e degeneração estriatal) verificados nos pacientes afetados pela AG I, que ocorre entre 6 meses e 2 anos de vida. Em resumo, os resultados da presente

investigação, bem como achados prévios (Lima et al., 1998; Porciúncula et al., 2000, 2004) indicam que o AG está envolvido com as alterações do sistema glutamatérgicos durante o desenvolvimento cerebral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amara, S.; Fontana, A. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.*, 41: 313-318, 2002.

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

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

Baric, I.; Zschocke, J.; Christensen, E.; Duran, M.; Goodman, S.I.; Leonard, J.V.; Muller, E.; Morton, D.H.; Superti-Furga, A.; Hoffmann, G.F. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 21: 326-340, 1998.

Baric, I.; Wagner, L.; Feyh, P.; Liesert, M.; Buckel, W.; Hoffmann, G.F. Sensitivity and specificity of free and total glutaric and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 22: 867-881, 1999.

Baric, I.; Furnic, K.; Hoffmann, G.F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croat. Med. J.*, 42 (4): 379-383, 2001.

Bergman, I.; Finegold, D.; Gartner Jr, J.C.; Zitelli, B.J.; Claassen, D.; Scarano, J.; Roe, C.R.; Stanley, C.; Goodman, S.I. Acute profound dystonia in infants with glutaric acidemia. *Pediatrics*, 83: 228-234, 1989.

Bickel, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme*, 38: 14-26, 1987.

Biery, B.J.; Stein, D.E.; Morton, D.H., Goodman, S.I. Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 1006-1011, 1996.

Bjugstad, K.B.; Zawada, W.M.; Goodman, S.; Free, C.R. IGF-1 and bFGF reduce glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid toxicity in striatal cultures. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 24: 631-647, 2001.

Brennan, E.M.; Martin, L.J.; Johnston, M.V.; Blue, M.E. Ontogeny of non-NMDA glutamate receptors in rat barrel field cortex: II. α -AMPA and kainate receptors. *The Journal of Comparative Neurology*, 386: 29-45, 1997.

Brewer, G.J.; Cotman, C.W. NMDA receptor-mediated regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, 99: 268-273, 1989.

Brewer, G.J. Neuronal plasticity and stresser toxicity during aging. *Exp. Gerontol.*, 35: 1165-1183, 2000.

Burlina, A.P.; Zara, G.; Hoffmann, G.F.; Zschocke, J.; Burlina, A.B. Management of movement disorders in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: anticholinergic drugs and botulinum toxin as additional therapeutic options. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 27: 911-915, 2004.

Busquets, C.; Merinero, B.; Christensen, E.; Gelpi, J.L.; Campistol, J.; Pineda, M.; Fernandez-Alvarez, E.; Prats, J.M.; Sans, A.; Arteaga, R.; Marti, M.; Campos, J.; Martinez-Pardo, M.; Martinez-Bermejo, A.; Ruiz-Falco, M.L.; Valquerizo, J.; Orozco, M.; Ugarte, M.; Coll, M.J.; Ribes, A. Glutaryl-CoA

dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. *Pediatr. Res.*, 48: 315-322, 2000.

Campistol, J.; Ribes, A.; Alvarez, L.; Christensen, E.; Millington, D.S. Glutaric aciduria type I: unusual biochemical presentation. *J. Pediatr.*, 121: 83-86, 1992.

Castellano, C.; Cestari, V.; Ciamei, A. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr. Drug Targets*, 2: 273-283, 2001.

Chalmers, R.A.; Lawson, A.M. Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. *London: Chapman & Hall*, 221-229, 1982.

Chen, Y.; Swanson, R.A. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23: 137-149, 2003.

Christensen, E.; Brandt, N.J. Studies on glutaryl-CoA dehydrogenase in leucocytes, fibroblasts and amniotic fluid cells. The normal enzyme and the mutant form in patients with glutaric aciduria. *Clin. Chim. Acta.*, 88: 267-276, 1978.

Christensen, E. A fibroblast glutaryl-CoA dehydrogenase assay using detritiation of 3H-labelled glutaryl-CoA: application in the genotyping of the glutaryl-CoA dehydrogenase locus. *Clin. Chim. Acta.*, 220: 71-80, 1993.

Collingridge, G.L.; Lester, R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 40: 143-210, 1989.

Colwell, C.S.; Cepeda, C.; Crawford, C.; Levine, M.S. Postnatal developmental of glutamate receptor-mediated responses in the neostriatum. *Dev. Neurosci.*, 20: 154-163, 1998.

Conn, P.J.; Pin, J.P. Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors in the vertebrate central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 205-237, 1997.

Constantine-Paton, M.; Cline, H.T.; Debski, E. Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Ann. Rev. Neurosci.*, 13: 129-154, 1990.

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

Danbolt, N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, 65: 1-105, 2001.

Das, A.M.; Luche, T.; Ullrich, K. Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatine phosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol. Genet. Metab.*, 78: 108-111, 2003.

Dawson, V.L.; Dawson, T.M.; London, E.D.; Bredt, D.S.; Snyder, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 6368-6371, 1991.

De Oliveira Marques, F.; Hagen, M.E.; et al. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Res.*, 11: 414-417, 1996.

Drigo, P.; Piovan, S.; Battistella, P.A.; Della Puppa, A.; Burlina, A.B. Macrocephaly, subarachnoid fluid collection, and glutaric aciduria type I. *J. Child. Neurol.*, 11: 414-417, 1996.

Dubinsky, J.M.; Rothman, S.M. Intracellular calcium concentrations during 'chemical hypoxia' and excitotoxic neuronal injury. *J. Neurosci.*, 11: 2545-2551, 1991.

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

Ferreira, G.C.; Viegas, C.M.; Schuck, P.F.; Tonin, A.; Ribeiro, C.A.J.; Coelho, D.M.; Dalla-Costa, T.; Latini, A.; Wyse, A.T.S.; Wannmacher, C.M.D.; Vargas, C.R.; Wajner, M. Glutaric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. *Neurochemical Research*, 30 (9): 1123-1131, 2005a.

Ferreira, G.C.; Viegas, C.M.; Schuck, P.F.; Latini, A.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.S.; Wannmacher, C.M.D.; Vargas, C.R.; Wajner, M. Glutaric acid moderately compromises energy metabolism in rat brain. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 23: 687-693, 2005b.

Flott-Rahmel, B.; Falter, C.; Schluff, P.; Fingerhut, R.; Christensen, E.; Jakobs, C.; Musshoff, U.; Deufel, T.; Ludolph, A.; Ullrich, K. Nerve cell lesions caused by 3-hydroxyglutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidaemia I. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 20: 387-390, 1997.

Fonnum, F. Glutamate: a neurotransmitter in the mammalian brain. *J. Neurochem.*, 42: 1-11, 1984.

Fox, K.; Zahs, K. Critical period control in sensory cortex. *Cur. Opin. Neurobiol.*, 4: 112-119, 1994.

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

Frizzo, M.E.S.; Schwarzbald, C.; Porciúncula, L.O.; Dalcin, K.B.; Rosa, R.B.; Ribeiro, C.A.J.; Souza, D.O.; Wajner, M. 3-Hydroxyglutaric acid enhances glutamate uptake into astrocytes from cerebral cortex of young rats. *Neurochemistry International*, 44: 345-353, 2004.

Funk, C.B.; Prasad, A.N.; Frosk, P.; Sauer, S.; Kölker, S.; Greenberg, C.R.; Del Bigio, M.R. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type I cohort. *Brain*, 128: 711-722, 2005.

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

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

Garrod, A.E. The incidence of alkaptonuria. A study in chemical individuality. *Lance*, ii:1616-1620, 1902.

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

Gonçalves, M.L.; Cunha, R.A.; Ribeiro, J.A. Adenosine A_{2A} receptors facilitate ⁴⁵C²⁺ uptake through class A calcium channels in rat hippocampal CA3 but not CA1 synaptosomes. *Neuroscience Letters*, 238: 73-77, 1997.

Goodman, S.I.; Markey, S.P.; Moe, P.G.; Miles, B.S.; Teng, C.C. Glutaric aciduria: a 'new' disorder of amino acid metabolism. *Biochem. Med.*, 12: 12-21, 1975.

Goodman, S.I.; Norenberg, M.D.; Shikes, R.H.; Breslich, D.J.; Moe, P.G. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J. Pediatr.*, 90: 746-750, 1977.

Goodman, S.I.; Kratz, L.E.; DiGiulio, K.A.; Biery, B.J.; Goodman, K.E.; Isaya, G.; Freyman, F.E. Cloning of glutaryl-CoA Dehydrogenase cDNA and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Hum. Mol. Genet.*, 4: 1493-1498, 1995.

Goodman, S.I.; Stein, D.E.; Schlesinger, S.; Christensen, E.; Schwartz, M.; Greenberg, C.R.; Elpeleg, O.N. Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum. Mutat.*, 12: 141-144, 1998.

Greenamyre, J.T.; Young, A.B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 10: 593-602, 1989.

Greenberg, C.R.; Duncan, A.M.; Gregory, C.A.; Singal, R.; Goodman, S.I. Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Genomics*, 21: 289-290, 1994.

Greenberg, C.R.; Reimer, D.; Singal, R.; Triggs-Raine, B.; Chudley, A.E.; Dilling, L.A.; Philipps, S.; Haworth, J.C.; Seargeant, L.E.; Goodman, S.I. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl-CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.*, 4: 493-495, 1995.

Guillet, B.; Lortet, S.; Masméjean, F.; Samuel, D.; Nicoullon, A.; Pisano, P. Developmental expression and activity of high affinity glutamate transporters in rat cortical primary cultures. *Neurochemistry International*, 1151: 1-11, 2001.

Härtel, U.; Eckel, E.; Koch, J.; Fuchs, G.; Linder, D.; Buckel, W. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas sp.*, an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *Arch. Microbiol.*, 159: 174-181, 1993.

Haworth, J.C.; Booth, F.A.; Chudley, A.E.; et al. Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds. *J. Pediatr.*, 118: 52-58, 1991.

Heyes, M.P. Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric acidurias and disorders of mitochondrial fattyacid transport and oxidation in Germany. *Eur. J. Pediatr.*, 163: 76-80, 2004.

Hoffmann, G.F.; Trefz, F.K.; Barth, P.; Böhles, J.H.; Biggemann, B.; Bremer, H.J.; Christensen, E.; Frosch, M.; Hanefeld, F.; Hunneman, D.H.; Jacobi, H.; Kurlemann, G.; Lawrenz-Wolf, B.; Rating, D.; Roe, C.R.; Schutgens, R.B.H.; Ullrich, K.; Weisser, J.; Wendel, U.; Lehnert, W. Glutaril-CoA Dehydrogenase Deficiency: a distinct encephalopathy. *Pediatrics*, 88: 1194-1203, 1991.

Hoffmann, G.F.; Seppel, C.K.; Holmes, B.; et al. Quantitative organic acid analysis in cerebrospinal fluid and plasma: reference values in a pediatric population. *J. Chromatogr.*, 617: 1-10, 1993.

Hoffmann, G.F.; Gibson, K.M.; Trefz, F.K.; et al. Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur. J. Pediatr.*, 153: S94-100, 1994.

Hoffmann, G.F. Selective screening for inborn errors of metabolism – past, present and future. *Eur. J. Pediatr.*, 153: S2-8, 1994.

Hoffman, G.F.; Bohles, H.J.; Burlina, A.; et al. Early signs and course of disease of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 18: 173-176, 1995.

Hoffmann, G.F. Organic Acid Analysis. In Blau, N.; Duran, M.; Blaskovics, M.E. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Disease.*, 1st ed., London, Chapman and Hall, 31-49, 1996.

Hoffmann, G.F.; Athanassopoulos, S.; Burlina, A.B.; Duran, M.; de Klerck, J.B.C.; Lehnert, W.; Leonard, J.V.; Monavari, A.A.; Müller, E.; Muntau, A.C.; Naughten, E.R.; Plecko-Starting, B.; Superti-Furga, A.; Zschocke, J.; Christensen, E. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatr*, 27: 115-123, 1996.

Hoffmann, G.F.; Zschocke, J. Glutaric Aciduria Type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 22: 381-391, 1999.

Hoffmann, G.F.; Von Kries, R.; Klose, D.; et al. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fattyacid transport and oxidation in Germany. *Eur. J. Pediatr.*, 163: 76-80, 2004.

Hollmann, M.; Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 31-108, 1994.

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

Insel, T.R.; Miller, L.P.; Gelhard, R.E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain I. NMDA and quisqualate receptors. *Neurosci.*, 35: 31-45, 1990.

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

Jones, D.H.; Matus, A.I.; Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 356: 276-287, 1974.

Kanai, Y.; Hediger, M.A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, 364: 467-471, 1992.

Kölker, S.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Hoffmann, G.F. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.*, 47: 495-503, 2000a.

Kölker, S.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Hoffmann, G.F. Evaluation of trigger factors of acute encephalopathy in glutaric aciduria type I: fever and tumour necrosis factor-alpha. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 23: 359-362, 2000b.

Kölker, S.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Hoffmann, G.F. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.*, 50: 76-82, 2001.

Kölker, S.; Okun, J.G.; Ahlemeyer, B.; Wyse, A.T.; Horster, F.; Wajner, M.; Kohlmüller, D.; Mayatepek, E.; Krieglstein, J.; Hoffmann, G.F. Chronic treatment

with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J. Neurosci. Res.*, 68: 424-431, 2002a.

Kölker, S.; Kohr, G.; Ahlemeyer, B.; Okun, J.G.; Pawlak, V.; Horster, F.; Mayatepek, E.; Krieglstein, J.; Hoffmann, G.F. Ca²⁺ and Na⁺ dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.*, 52: 199-206, 2002b.

Kölker, S.; Garbade, S.F.; Greenberg, C.R.; Leonard, J.V.; Saudubray, J.M.; Ribes, A.; Kalkanoglu, H.S.; Lund, A.M.; Merinero, B.; Wajner, M.; Troncoso, M.; Willians, M.; Walter, J.H.; Campistol, J.; Marti-Herrero, M.; Caswill, M.; Burlina, A.B.; Lagler, F.; Maier, E.M.; Schuahn, B.; Tokatli, A.; Dursun, A.; Coskun, T.; Chalmers, R.A.; Koeller, D.M.; Zschocke, J.; Christensen, E.; Burgard, P.; Hoffmann, G.F. Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.*, 59 (6): 840-847, 2006.

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

Kosinski, C.M.; Standaert, D.G.; Testa, C.M.; Penney, J.B. Jr. Expression of metabotropic glutamate receptor 1 isoforms in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuroscience*, 86: 783-798, 1998.

Kramer, K.; Baudry, M. Low concentrations of potassium inhibit the Na⁺-dependent [³H]glutamate binding to rat hippocampal membranes. *Eur. J. Pharmacol.*, 102: 155-158, 1984.

Kyllerman, M.; Skjeldal, O.; Christensen, E.; Hagberg, G.; Holme, E.; Lonngvist, T.; Skov, L.; Rotwelt, T.; von Döbeln, U. Long-term follow-up,

neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type I. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 8: 121-129, 2004.

Lafon-Cazal, M.; Pietri, S.; Culcasi, M.; Bockaert, J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 360: 535-537, 1993.

Latini, A.; Rosa, R.B.; Scussiato, K.; Llesuy, S.; Bello-Klein, A.; Wajner, M. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res.*, 956: 367-373, 2002.

Latini, A.; Scussiato, K.; Leipnitz, G.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J. Inher. Metab. Dis.*, 28: 57-67, 2005a.

Latini, A.; Rodriguez, M.; Rosa, R.B.; Scussiato, K.; Leipnitz, G.; de Assis, D.R.; Ferreira, G.C.; Funchal, C.; Jacques-Silva, M.C.; Buzin, L.; Giugliani, R.; Cassina, A.; Radi, R.; Wajner, M. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience*, 135: 111-120, 2005b.

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

Lei, S.Z.; Zhang, D.; Abele, A.E.; Lipton, S.A. Blockade of NMDA receptor-mediated mobilization of intracellular Ca^{2+} prevents neurotoxicity. *Brain Res.*, 598: 196-2002, 1992.

Leibel, R.L.; Shih, V.E.; Goodman, S.; Bauman, M.L.; McCabe, E.R.; Zwerdling, R.G.; Bergman, I.; Costello, C. Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. *Neurology*, 30: 1163-1168, 1980.

Liesert, M.; Zchocke, J.; Hoffmann, G.F.; Muhlhauser, N.; Buckel, W. Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of in vitro expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 22: 256-258, 1999.

Lilliu, V.; Pernas-Alonso, R.; Trelles, R.D.; di Porzio, U.; Zuddas, A.; Perrone-Capano, C. Ontogeny of AMPA receptors gene expression in the developing rat midbrain and striatum. *Molecular Brain Research*, 96: 133-141, 2001.

Lima, T.T.; Begnini, J.; de Bastiani, J.; Fialho, D.B.; Jurach, A.; Ribeiro, M.C.; Wajner, M.; de Mello, C.F. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res.*, 802: 55-60, 1998.

Lipton, S.A.; Rosenberg, P.A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.*, 330: 613-622, 1994.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.

Lund, T.M.; Christensen, E.; Kristensen, A.S.; Schousboe, A.; Lund, A.M. On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type I. *J. Neurosci. Res.*, 77: 143-147, 2004.

Magistretti, P.J. Review. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2304-2311, 2006.

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

Maragakis, N.J.; Rothstein, J.D. Glutamate transporters: animal models to neurological disease. *Neurobiol. Disease*, 15: 461-473, 2004.

Mattson, M.P.; Pedersen, W.A.; Duan, W.; Culmsee, C.; Camandola, S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N. Y. Acad Sci.*, 893: 154-175, 1999.

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

Mayatepek, E.; Hoffmann, G.F.; Baumgartner, R.; et al. Atypical vitamin B12-unresponsive methylmalonic aciduria in sibship with severe progressive encephalomyopathy: a new genetic disease? *Eur. J. Pediatr.*, 155: 398-403, 1996.

Maycox, P.R.; Hell, J.W.; Jahn, R. Amino acid neurotransmission: a spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci.*, 13: 83-87, 1990.

McDonald, J.W.; Silverstein, F.S.; Johnson, M.V. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.*, 459: 200-203, 1988.

McDonald, J.W.; Trescher, W.H.; Johnston, M.V. Susceptibility of brain to AMPA induced excitotoxicity transiently peaks during early postnatal development. *Brain Res.*, 583: 54-70, 1992.

Meldrum, B.; Garthwaite, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, (Special Report), 54-62, 1991.

Meldrum, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*, 44: S14-23, 1994.

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

Merinero, B.; Perez-Cerda, C.; Font, L.M.; et al. Variable clinical and biochemical presentation of seven Spanish cases with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuripediatics*, 26: 238-242, 1995.

Migues, P.V.; Leal, R.B.; Mantovani, M.; Nicolau, M.; Gabilan, N.H. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction BC2 from the venons of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Neuro. Report.*, 10: 67-70, 1999.

Nansen, E.A.; Jokel, E.S.; Lobo, M.K.; Micevych, P.E.; Ariano, M.A; Levine, M.S. Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in the rat. *Dev. Neurosci.*, 22: 329-340, 2000.

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

Olney, J.W.; Ho, O.L. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate, or cysteine. *Nature*, 227: 609-611, 1970.

Olney, J.W. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer E. G.; Olney, J.W.; McGeer, P.L., eds. Kainic acid as a tool in neurobiology. New York: Raven Press, 95-121, 1978.

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

Pearce, I.A.; Cambray-Deakin, M.A.; Burgoyne, R.D. Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett.*, 223: 143-147, 1987.

Petralia, R.S.; Esteban, J.A.; Wang, Y.X.; Partridge, J.G.; Zhao, H.M.; Wenthold, R.J.; Malinow, R. Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat. Neurosci.*, 2: 31-36, 1999.

Pin, J.O.; Duvoisin, R. Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.*, 34: 1-26, 1995.

Pineda, M.; Ribes, A.; Busquets, C.; Vilaseca, M.A.; Aracil, A.; Christensen, E. Glutaric aciduria type I with high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity. *Dev. Med. Child. Neurol.*, 40: 840-842, 1998.

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

Porciúncula, L.O.; Dal-Pizzol Jr., A.; Coitinho, A.S.; et al. Inhibition of synaptosomal [³H]glutamate uptake and [³H]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid in vitro. *J. Neurol. Sci.*, 173: 93-96, 2000.

Porciúncula, L.O.; Emanuelli, T.; Tavares, R.G.; et al. Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. *Neurochem. Int.*, 45: 1075-1086, 2004.

Price, D.L. New order from neurological disorders. *Nature*, 399: A3-A5, 1999.

Rashed, M.; Ozand, P.T.; Aqeel, A.; et al. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with organic acid disorders. *Brain Develop.*, 16: 1-6, 1994.

Rosa, R.B.; Schwarzbald, C.; Dalcin, K.B.; et al. Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int.*, 45: 1087-1094, 2004.

Rothstein, J.D.; Martin, L.J.; Kuncl, R.W. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 326: 1464-1468, 1992.

Sattler, R.; Tymianski, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.*, 78: 3-13, 2000.

Scannevin, R.H; Huganir, R.L. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Neurosci. Rev.*, 1: 133-141, 2000.

Schlüter, K.; Figiel, M.; Rozyczka, J.; Engele, J. CNS region-specific regulation of glial glutamate transporter expression. *European Journal of Neuroscience*, 16: 836-842, 2002.

Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8^a ed., New York, McGraw-Hill, 3-45, 2001.

Segovia, G.; Porras, A.; Del Arco, A.; Mora, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.*, 122 (1): 1-29, 2001.

Silva, C.G.; Silva, A.R.; Ruschel, C.; Helegda, C.; Wyse, A.T.; Wannmacher, C.M.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. Inhibition of energy production in vitro by glutaric acid in cerebral cortex of young rats. *Metab. Brain Dis.*, 15: 123-131, 2000.

Standaert, D.G.; Testa, C.M.; Young, A.B.; Penney, J.B. Jr. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 343: 1-16, 1994.

Stokke, O.; Goodman, S.I.; Moe, P.G. Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and beta-hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria? *Clin. Chim. Acta.*, 66: 411-415, 1976.

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

Strauss, K.A.; Puffenberger, E.G.; Robinson, D.L.; Morton, D.H. Type I glutaric aciduria, part I: natural history of 77 patients. *Am. J. Med. Genet > C. Semin. Med. Genet.*, 121: 38-52, 2003.

Superti-Furga, A.; Hoffmann, G.F. Glutaric aciduria type 1 (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency): advances and unanswered questions. Report from an international meeting. *Eur. J. Pediatr.*, 156: 821-828, 1997.

Trotti, D.; Rossi, D.; Gjesdal, O.; Levy, L.M.; Racagni, G.; Danbolt, N.C.; Volterra, A. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J. Biol. Chem.*, 271: 5976-5979, 1996.

Trotti, D.; Nussberger, S.; Volterra, A.; Hediger, M.A. Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human

neuronal glutamate transporter EAAC1. *Eur. J. Neurosci.*, 9 (10): 2207-2212, 1997a.

Trotti, D.; Rizzini, B.L.; Rossi, D.; Haugeto, O.; Racagni, G.; Danbolt, N.C.; Volterra, A. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.*, 9 (6): 1236-1243, 1997b.

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

Ullrich, K.; Flott-Rahmel, B.; Schluff, P.; Musshoff, U.; Das, A.; Lucke, T.; Steinfeld, R.; Christensen, E.; Jakobs, C.; Ludolph, A.; Neu, A.; Roper, R. Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 22: 392-403, 1999.

Varadkar, S.; Surtees, R. Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 27: 835-842, 2004.

Vesce, S.; Bezzi, P.; Volterra, A. The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Sci. Prog.*, 82: 251-270, 1999.

Villares, J.C.; Stavale, J.N. Age-related changes in the N-methyl-D-aspartate receptor binding sites within the human basal ganglia. *Experimental Neurology*, 171: 391-404, 2001.

Volterra, A.; Trotti, D.; Tromba, C.; Floridi, S.; Racagni, G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J. Neurosci.*, 14 (5 Pt 1): 2924-2932, 1994.

Wajner, M.; Kölker, S.; Souza, D.O.; Hoffmann, G.F.; de Mello, C.F. Modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in glutary-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 27: 825-828, 2004.

Wang, Z.; Pekarskaya, O.; Bencheikh, M.; Chao, W.; Gelbard, H.A.; Ghorpade, A.; Rothstein, J.D.; Volsky, D.J. Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp 120. *Virology*, 312: 60-73, 2003.

Whetsell, W.O. The use of organotypic tissue culture for study of amino acid neurotoxicity and its antagonism in mammalian CNS. *Clin. Neuropharmacol.*, 7: 452, 1984.

Yamaguchi, S.; Orii, T.; Yasuda, K.; Yoshinori, K. A case of glutaric aciduria type 1 with unique abnormalities in the cerebral CT findings. *Tohoku J. Exp. Med.*, 151: 293-299, 1987.

Ziadeh, R.; Hoffman, E.P.; Finegold, D.N.; Hoop, R.C.; Brackett, J.C.; Strauss, A.W.; Naylor, E.W. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: Neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. *Pediatr. Res.*, 37: 675-678, 1995.

Zschocke, J.; Quak, E.; Guldborg, P.; Hoffmann, G.F. Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *J. Med. Genet.*, 37: 177-181, 2000.

LISTA DE FIGURAS

Figura I. 1 Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano.....	8
Figura I. 2 Ciclo glutamato-glutamina.....	21
Figura IV. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na ausência de sódio (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.....	40
Figura IV. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na ausência de sódio (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.....	41
Figura IV. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na ausência de sódio (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade.....	42
Figura IV. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico (1 mM AG), AP5 (100 µM) e CNQX (100 µM) sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na ausência de Na ⁺ (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos de 15 dias de idade.....	45
Figura IV. 5 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico (1mM AG), AP5 (100 µM) e CNQX (100 µM) sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na ausência de Na ⁺ (união a receptores) a membranas plasmáticas sinápticas de cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.....	46
Figura IV. 6 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na presença de sódio (união a transportadores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.....	48
Figura IV. 7 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na presença de sódio (união a transportadores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.....	49
Figura IV. 8 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a união de L ^{[3]H} glutamato na presença de sódio (união a transportadores) a membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral e estriado de ratos de 60 dias de idade.....	50
Figura IV. 9 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a captação de L ^{[3]H} glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 7 dias de idade.....	52
Figura IV. 10 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a captação de L ^{[3]H} glutamato por fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 15 dias de idade.....	53

Figura IV. 11 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico (5 – 50 mM) sobre a captação de L ^{[3]H} glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de idade.....	55
Figura IV. 12 Efeitos <i>in vitro</i> da creatina (3 mM) sobre a inibição da captação de L ^{[3]H} glutamato provocada pelo ácido glutárico (AG 5 mM) em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de idade.....	58
Figura IV. 13 Efeitos <i>in vitro</i> da N-acetilcisteína (NAC 1 mM) sobre a inibição da captação de L ^{[3]H} glutamato provocada pelo ácido glutárico (AG 5 mM) em fatias de córtex cerebral de ratos de 7 dias de idade.....	59
Figura IV. 14 Efeito do ácido glutárico (AG 5 mM) sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) de preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.....	61
Figura IV. 15 Efeito do ácido glutárico (AG 5 mM) sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) de preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade.....	62
Figura IV. 16 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a liberação de L ^{[3]H} glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 7 dias de idade.....	63
Figura IV. 17 Efeito <i>in vitro</i> do ácido glutárico sobre a liberação de L ^{[3]H} glutamato por preparações sinaptossomais de córtex cerebral e cérebro médio de ratos de 15 dias de idade...	64