

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

***Efeitos da desnutrição protéica sobre o metabolismo cerebral e sistemas glutamatérgico e GABAérgico sob condições de excitotoxicidade em SNC de ratos Wistar***

**Ingrid D. Schweigert**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry  
Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

**Porto Alegre  
2005**

*“ ...O acesso à alimentação é um direito humano em si mesmo, na medida em que a alimentação constitui-se no próprio direito à vida... negar este direito é, antes de mais nada, negar a primeira condição para a cidadania, que é a própria vida.”*

(Relatório do Brasil para a Cúpula Mundial de Alimentação, Roma, 1994)

*Ao Marcos, companheiro querido de todas as horas.....*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcos Perry, por acreditar e investir profissionalmente em mim, pelo apoio, estímulo, crítica, participação em todas as etapas deste projeto e pelo imenso e consistente exemplo como pesquisador e orientador;

Ao Professor Diogo de Souza, co-orientador deste trabalho, por quem, igualmente, tenho profunda admiração, pela disponibilidade em participar na orientação com contribuições extremamente pertinentes no delineamento e sistematização deste trabalho;

À Professora Susana Wofchuk, pelas valiosas contribuições, disponibilidade e convivência;

Aos bolsistas de iniciação científica do laboratório 27 (em ordem cronológica de inserção direta ou indireta neste trabalho): Fernando Scheibel, Fabiane da Costa, Cíntia Roehrig, Juliana Marin, Fernanda S. Gravina, Cristina Kawano, Lisiane G. Londero, Betina Schmidt, Alexandre P. Müller (agora mestrando), Juliana M. Rodrigues (agora mestranda) pelo imenso apoio não apenas nas tarefas rotineiras e árduas, mas também e, principalmente, pelos seminários e discussões enriquecedores e estimuladores;

Aos colegas do laboratório 35, Diogo Losch de Oliveira, parceiro na execução, e, principalmente, interlocutor para os devaneios da pesquisa, e Ana Paula Thomazi, pelo auxílio inicial em parte da técnica utilizada;

Às colegas de laboratório Kally Berleze, Letícia Schmidt e Clarice K. Borges pelas inúmeras horas de trabalho compartilhadas, pelo carinho e apoio;

Aos colegas do laboratório 26/28, Lúcia Vinadé, Lúcia Martini, Marcelo Farina, Liane Rotta, Elsa Vinadé e Rejane Tavares pela participação ativa em etapas deste trabalho e aos queridos colegas Flúvia Jardim, Félix Soares e Débora Schaf pela amizade.

Aos professores e colegas do laboratório 33, Prof<sup>a</sup> Carmem Gottfried e Prof. Carlos A. Gonçalves, Ana Feoli e Francine Tramontina, pela participação solícita em parte deste trabalho;

Ao Professor José Cláudio Moreira e mestrando Ramatis de Oliveira pela participação em etapa deste trabalho;

Ao Professor Tadeu de Melo e Souza pelo auxílio solícito em parte da análise estatística;

Aos bolsistas e colegas mais recentes, Daniel Leszczinski, Adriana Vizquete, Cíntia Battú, Carolina de Souza e Carolina Pitta, com os quais não tive oportunidade de trabalhar mais diretamente, mas que sempre me recebem extremamente bem e me inserem no contexto de .... uma vez do 27, sempre do 27.... ;

Aos funcionários da Secretaria e Biotério;

À UFRGS e, em especial ao PPG-Bioquímica, por me acolher pela segunda vez;

Ao CNPq, pelo auxílio à pesquisa;

À UNIJUI, instituição cuja política de aperfeiçoamento do corpo docente me permitiu mais esta oportunidade,

Aos meus alunos, pela curiosidade manifesta e estímulo à busca de conhecimento; e

finalmente, porém, igualmente decisivo para a tranquilidade necessária a este tipo de empreendimento, aos colegas do Departamento de Ciências da Saúde, em especial aos colegas do Curso de Nutrição da UNIJUI, pela compreensão e apoio na iniciativa e consecução deste trabalho.

## RESUMO

Para um adequado funcionamento do SNC, são necessárias complexas interações entre os sistemas de neurotransmissão inibitório e excitatório. Desequilíbrios nos sistemas, e/ou na sua interação, podem acarretar comprometimentos neuropsiquiátricos. Várias etapas do desenvolvimento ontogenético cerebral, incluindo proliferação e migração neuronal, crescimento cerebral e mielinização, astrogênese e morte celular programada, são alteradas pela desnutrição protéica. Alterações no sistema glutamatérgico decorrentes de desnutrição, padrões de desenvolvimento afetados no sistema GABAérgico como a atividade da glutamato descarboxilase (GAD) e mRNA de subunidades de receptores GABA<sub>A</sub>, alterações nas reações a fármacos envolvendo o sistema GABAérgico, além de estudos epidemiológicos que apontam para a maior incidência de doenças neuropsiquiátricas em populações desnutridas precocemente e, ainda, os transtornos nas complexas interações entre células neuronais e glias, que acompanham o desenvolvimento destas patologias, levantam questionamentos sobre as implicações da desnutrição sobre o metabolismo cerebral e parâmetros inibitórios e excitatórios sob condições de excitotoxicidade. Considerando estes aspectos, investigou-se a sensibilidade a drogas convulsivantes agindo sobre os sistemas glutamatérgico (ácido quinolínico) e GABAérgico (picrotoxina), assim como se procurou detectar interferências provocadas pela desnutrição protéica gestacional e pós-natal, e/ou drogas em um dos parâmetros, que, além da biossíntese, liberação, interação com receptores, determina uma neurotransmissão eficiente, qual seja: na inativação dos dois principais neurotransmissores excitatório e inibitório, glutamato e GABA, respectivamente, por meio da captação mediada por transportadores localizados nas membranas neuronais e glias de córtex e hipocampo de ratos em desenvolvimento, assim como parâmetros ontogenéticos ligados ao transporte de GABA. A sensibilidade à picrotoxina foi avaliada ainda segundo parâmetros metabólicos, envolvendo o metabolismo da glicose e do acetato, procurando detectar interações neurônio-glia na resposta à droga, assim como a ocorrência de peroxidação lipídica, dado o seu envolvimento no processo convulsivante. Considerando que o acetato é metabolizado predominantemente pelos astrócitos, células que têm importante papel no fluxo de substratos energéticos aos neurônios, a sua oxidação foi avaliada em fatias de córtex cerebral de ratos adultos, frente a diferentes concentrações extracelulares de potássio. A desnutrição acarretou menor sensibilidade à ação convulsivante do ácido quinolínico, em ratos de 25 dias de idade, excluindo alterações na captação de glutamato como mecanismo envolvido, uma vez que este parâmetro não foi afetado pela desnutrição e/ou droga. Contrariamente, a desnutrição induziu maior sensibilidade à ação convulsivante da picrotoxina, em ratos de 25 dias, o que pode estar relacionado à maior captação de GABA por fatias de córtex cerebral e hipocampo evidenciadas no grupo desnutrido. A desnutrição alterou o perfil ontogenético da captação de GABA por fatias de córtex cerebral e também o perfil inibitório da β-alanina (inibidor de GAT-3), dando suporte à hipótese de que a maior captação de GABA em ratos desnutridos em desenvolvimento seja devida predominantemente a este transportador. A maior sensibilidade à picrotoxina no grupo desnutrido também foi evidenciada pelo maior estímulo à oxidação da glicose em fatias de córtex cerebral (que também é idade dependente) e peroxidação lipídica. Enquanto em ratos imaturos a administração de uma única dose de picrotoxina mostrou a maior susceptibilidade de ratos desnutridos, no procedimento de "kindling" químico pela picrotoxina em ratos em desenvolvimento, a susceptibilidade mostrou-se sexo e tratamento nutricional dependente. A picrotoxina estimulou a oxidação do acetato a CO<sub>2</sub>, mas não a da glicose em período precoce pós picrotoxina (24 horas) em fatias de córtex e hipocampo de ratos de 25 dias, indicando o envolvimento astrocitário na resposta ao agente convulsivante, independente do tratamento nutricional. A administração crônica de picrotoxina acarretou estímulo à oxidação da glicose em fatias de córtex de ratos desnutridos, mostrando efeito tempo e tratamento nutricional-dependente sobre o metabolismo da glicose, sem alteração da oxidação do acetato. Altas concentrações de potássio extracelular aumentaram a oxidação do acetato em fatias de córtex cerebral, em

função da redução intracelular de sódio em ratos controle e desnutridos adultos; o agravamento do déficit nutricional exacerbou a oxidação do acetato em fatias de cerebelo.

A desnutrição pré e pós-natal afeta respostas envolvendo os sistemas GABAérgico e glutamatérgico em situações de excitotoxicidade, provocada por antagonista de receptor GABA<sub>A</sub>, picrotoxina e por hiperestimulador do sistema glutamatérgico, ácido quinolínico, em ratos em desenvolvimento, assim como parâmetros ontogenéticos ligados ao transporte de GABA. A severidade da restrição nutricional é fator determinante da exacerbação do estímulo à oxidação do acetato. Além do mais, a desnutrição parece afetar a interação neurônio-glia em condições de excitotoxicidade.

Palavras chave: Desnutrição, Sistema Glutamatérgico, Sistema GABAérgico, Metabolismo Cerebral, Excitotoxicidade.

## ABSTRACT

The adequate functioning of the CNS requires a complex interaction between the excitatory and inhibitory neurotransmission systems. Imbalances between systems or system-interactions can trigger neuropsychiatric damage. Several ontogenetic stages of brain development, including neuronal proliferation and migration, brain growth spurt and myelination, astrocytogenesis and programmed cell death, are altered by protein malnutrition. Malnutrition induced alterations to the glutamatergic system, the significant alterations to the GABAergic system in response to malnutrition, including the activity of glutamic acid decarboxylase (GAD) and mRNA on subunits of GABA<sub>A</sub> receptors, reaction to drugs involving the GABAergic system, together with epidemiological studies that point to a higher incidence of neuropsychiatric disorders in early malnourished populations and, also, disturbances to the complex interaction between neuronal and glial cells that occur in such situations, provoke questions concerning the effects of malnutrition on cerebral metabolism and inhibitory and excitatory parameters under excitotoxic conditions. Considering these aspects, sensitivity to convulsant drugs acting on the glutamatergic (quinolinic acid) and GABAergic system (picrotoxin) was investigated. At the same time, an attempt was made to detect the effects of gestational and postnatal malnutrition and/or drugs on one of the parameters which, besides biosynthesis, release and receptor interaction, triggers efficient neurotransmission, be it: in glutamate and GABA inactivation (respectively, the major excitatory and inhibitory neurotransmitters), via uptake mediated by transporters localized in the glial and neuronal membranes of the cortex and hippocampus in developing rats, as well as GABA transport ontogenetic parameters. Picrotoxin sensitivity was also evaluated by metabolic parameters, including glucose and acetate metabolism, seeking glial-neuronal interaction in response to the drug, and the occurrence of lipid peroxidation, given its involvement in convulsive process. As acetate is mainly metabolized by astrocytes, cells with an important role in energetic substrate flux to neurons, its oxidation was evaluated in slices of cerebral cortex from adult rats, in the presence of different extracellular potassium concentrations. Malnutrition caused decreased sensitivity to the convulsant action of quinolinic acid in 25 old days rats. It was possible to exclude glutamate uptake alteration as the mechanism involved, since this parameter was not affected by malnutrition and/or drug. In contrast, malnutrition induced greater sensitivity to the convulsant action of picrotoxin at the same age, which could be related to the higher GABA uptake by cerebral cortex and hippocampal slices, evidenced in the malnourished group. Malnutrition affected the ontogenetic pattern of GABA uptake by cerebral cortex slices and also the inhibitory profile from  $\beta$ -alanine (GAT-3 inhibitor), so supporting the hypothesis that the higher GABA uptake by developing malnourished rats could be mainly attributed to this transporter. The greater sensitivity to picrotoxin in the malnourished group was also shown by the enhanced glucose oxidation by cerebral cortical slices (which is also age-dependent) and lipid peroxidation. Whereas in immature rats the administration of a single picrotoxin dose showed the greater sensitivity of malnourished rats, in the chemical "kindling" procedure with picrotoxin in developing rats, the susceptibility was shown to be gender and nutritional treatment dependent. In cerebral cortical and hippocampal slices from 25 old days rats, picrotoxin stimulated acetate oxidation to CO<sub>2</sub>, but not that of glucose in the early post-picrotoxin period (24 hours), pointing to astrocytic involvement in the response to the convulsant agent, independently of nutritional treatment. Chronic picrotoxin administration stimulated glucose oxidation in cerebral cortex slices from malnourished rats, showing a time and nutritional treatment-dependent effect on glucose metabolism, without any effect on acetate oxidation. High extracellular concentrations of potassium improved acetate oxidation in cerebral cortex slices, by decreasing intracellular sodium in well and malnourished adult rats; the aggravated nutritional deficit, exacerbated the acetate oxidation in cerebral slices.

Pre and postnatal malnutrition affects responses involving the GABAergic and glutamatergic systems in excitotoxic conditions caused by the GABA<sub>A</sub> antagonist picrotoxin and the glutamatergic system overstimulator quinolinic acid in developing rats, as well as GABA transport ontogenetic parameters. The severity of the nutritional

[TD1] Comentário: Pode escolher



restriction is a determinant factor in the exacerbation of acetate oxidation. In addition, malnutrition seems to affect neuronal-glial interaction in excitotoxicity.

Key-words: Malnutrition, Glutamatergic System, GABAergic System, Cerebral Metabolism, Excitotoxicity .

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Maturação cerebral, injúria e períodos críticos.....	4
1.3 Mecanismos adaptativos, compensatórios e/ou homeostáticos da desnutrição: efeitos transitórios, permanentes ou atraso no desenvolvimento?.....	7
1.4 Desnutrição e doenças neuropsiquiátricas.....	11
1.5 Doenças neuropsiquiátricas: efeitos sobre a interação neurônio-glia.....	13
1.6 Efeitos da desnutrição sobre os sistemas glutamatérgico e GABAérgico.....	19
1.6.1 Sistema glutamatérgico.....	20
1.6.1.1 Receptores glutamatérgicos.....	21
1.6.1.2 Transportadores de glutamato.....	23
1.6.1.3 Ação convulsivante do ácido quinolínico.....	24
1.6.1.4 Efeitos da desnutrição sobre o sistema glutamatérgico.....	26
1.6.2 Sistema GABAérgico.....	26
1.6.2.1 Sinalização GABAérgica durante o desenvolvimento.....	28
1.6.2.2 Receptores de GABA.....	30
1.6.2.3 Transporte de GABA.....	33
1.6.2.3.1 Transportadores de GABA em cérebro de mamíferos: sub-tipos, localização e desenvolvimento.....	34
1.6.2.3.2 Fisiologia do transporte, regulação da expressão, sítios de ligação e especificidade de substrato dos GATs.....	38
1.6.2.3.3 Expressão de GATs em enfermidades neuropsiquiátricas.....	42
1.6.2.4 Ação convulsivante do antagonista GABAérgico picrotoxina.....	45
1.6.2.5 Desnutrição e sistema GABAérgico.....	48
1.7 Objetivos.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Reagentes.....	55
2.2 Animais experimentais e paradigma de desnutrição.....	55
2.3 Massa corporal e de estruturas cerebrais.....	58
2.4 Concentração protéica de estruturas cerebrais.....	58
2.5 Convulsões induzidas por picrotoxina.....	58
2.6 Convulsões induzidas por ácido quinolínico.....	59
2.7 Ensaios de captação de [ <sup>3</sup> H]GABA e de [ <sup>3</sup> H]Glutamato por fatias de córtex	

cerebral e hipocampo.....	60
2.8 Ensaios de captação de [ <sup>3</sup> H]GABA por fatias de córtex cerebral frente à utilização de inibidores – estudo ontogenético.....	62
2.8.1 Mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada nas condições de incubação.....	63
2.9 Ensaios de oxidação de nutrientes energéticos por estruturas cerebrais.....	64
2.9.1 Efeitos da picrotoxina “ <i>in vitro</i> ” sobre o metabolismo da glicose em córtex cerebral de ratos Wistar controle e desnutridos.....	64
2.9.1.1 Isolamento do córtex cerebral e condições de incubação com precursor radioativo para determinação de CO <sub>2</sub> .....	65
2.9.1.2 Captação de CO <sub>2</sub> .....	66
2.9.2 Efeitos da picrotoxina injetada “ <i>in vivo</i> ” sobre a oxidação “ <i>ex vivo</i> ” do acetato e da glicose em córtex cerebral de ratos controle e desnutridos.....	66
2.9.3 Efeitos de altas concentrações extracelulares de potássio sobre o metabolismo cerebral do acetato, lactato e glicose em ratos controle e desnutridos.....	67
2.10 Procedimento de “ <i>kindling</i> ” por picrotoxina.....	71
2.11 Efeitos da picrotoxina sobre o peroxidação lipídica em cérebro de ratos controle e desnutridos.....	73
2.12 Análise estatística.....	75
3 RESULTADOS.....	76
3.1 Efeitos da desnutrição sobre a evolução do ganho de massa corporal, cerebral, cerebelar e hipocampal e concentração protéica de estruturas cerebrais .....	76
3.2 Sensibilidade à picrotoxina .....	76
3.2.1 Ação convulsivante da picrotoxina e captação de [ <sup>3</sup> H]GABA em córtex e hipocampo em ratos jovens.....	76
3.2.2 Efeitos da picrotoxina “ <i>in vitro</i> ” sobre o metabolismo da glicose em córtex cerebral de ratos Wistar controle e desnutridos.....	81
3.2.3 Efeitos da picrotoxina sobre o peroxidação lipídica em cérebro de ratos controle e desnutridos.....	81
3.2.4 Efeitos da picrotoxina injetada “ <i>in vivo</i> ” sobre a oxidação “ <i>ex vivo</i> ” do acetato e da glicose em fatias córtex cerebral e hipocampo de ratos controle e desnutridos .....	84
3.2.5 Efeitos da desnutrição sobre o “ <i>kindling</i> ” induzido por picrotoxina.....	86
3.3 Convulsões induzidas por ácido quinolínico e captação de [ <sup>3</sup> H]Glutamato.....	88
3.3.1 Captação de [ <sup>3</sup> H]Glutamato.....	88
3.4 Captação de GABA e ontogenia.....	90
3.5 Efeitos de altas concentrações extracelulares de potássio sobre o metabolismo cerebral do acetato, lactato e glicose em ratos controle e desnutridos.....	93

4 DISCUSSÃO.....	98
5 CONCLUSÃO.....	121
6 PERSPECTIVAS.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

#### ANEXOS

ARTIGO CIENTÍFICO I - **Schweigert, I.D.**; Roehrig, C.; da Costa, F.; Scheibel, F.; Gottfried, C.J.S.; Rotta, L.N., Gonçalves, C.A.; Souza, D.O.; Perry, M.L.S. High extracellular K<sup>+</sup> levels stimulate acetate oxidation in brain slices from well and malnourished rats. *Neurochemical Research* Aug;29(8):1547-51 (2004).

ARTIGO CIENTÍFICO II - **Schweigert, I.D.**; de Oliveira, D.L.; Scheibel, F.; da Costa, F.; Wofchuk, S.T.; Souza, D.O. and Perry, M.L.S. Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices. *Developmental Brain Research* Feb 8; 154(2):177-85 (2005).

ARTIGO CIENTÍFICO III - **Schweigert, I.D.**; Vinadé, L.; da Costa, F.; Gravina, F.; Kawano, C.; Londero, L.G.; Rodrigues, J.M.; Souza, D. O. and Perry, M.L.S. Modified malnutrition-induced developmental pattern on the effect of GABA uptake inhibitors in rats. Em preparação.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Distribuição geográfica de crianças de baixo peso menores de 5 anos.....	3
Figura 1.2 -	Relação entre a prevalência da epilepsia e as classes econômicas em São José do Rio Preto, Brasil.....	13
Figura 1.3 -	Interação metabólica entre neurônios e astrócitos.....	14
Figura 1.4 -	Representação esquemática do receptor NMDA.....	23
Figura 1.5 -	Transportadores de glutamato e sua localização na sinapse glutamatérgica.....	25
Figura 1.6 -	Síntese de GABA a partir de glutamato no citosol neuronal pelas duas isoformas de glutamato descarboxilase.....	29
Figura 1.7 -	Receptores ionotrópicos de GABA.....	32
Figura 1.8 -	Representação esquemática da localização dos transportadores de GABA em sinapses corticais.....	35
Figura 1.9 -	Representação esquemática da maturação pós-natal dos GATs e outros marcadores GABAérgicos em córtex cerebral de roedores.....	37
Figura 1.10 -	Representação esquemática do GAT-1.....	39
Figura 3.1 -	Convulsões induzidas por picrotoxina.....	78
Figura 3.2 -	Latência para convulsões induzidas por picrotoxina.....	78
Figura 3.3 -	Curva de captação de GABA por fatias de (A) córtex cerebral e (B) hipocampo de ratos de 25 dias.....	79
Figura 3.4 -	(A) Captação de GABA por fatias de córtex cerebral parietal de ratos controle e desnutridos (B) Captação de GABA por fatias de hipocampo de ratos controle e desnutridos de 25 dias.....	80
Figura 3.5 -	Efeitos de diferentes concentrações de picrotoxina “ <i>in vitro</i> ” sobre a oxidação de D-[U- <sup>14</sup> C]Glicose a CO <sub>2</sub> em fatias de córtex cerebral de ratos de 25 e 75-80 dias submetidos a dietas contendo (A) 25% de caseína e (B) 7% de caseína durante os períodos gestacional e pós-natal.....	82
Figura 3.6 -	Efeitos da picrotoxina sobre a peroxidação lipídica em cérebro e cerebelo de ratos de 25 dias controle e desnutridos pré e pós-natalmente.....	83
Figura 3.7 -	(A) Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico geradas em um sistema contendo gema de ovo como substrato lipídico e AAPH como gerador	

	de dano oxidativo. (B) Potencial Antioxidante Total (TRAP) “ <i>in vitro</i> ”.....	84
Figura 3.8 -	Efeitos da picrotoxina sobre a oxidação de D-[U- <sup>14</sup> C]Glicose (A) e [U- <sup>14</sup> C]Acetato a CO <sub>2</sub> (B) em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 25 dias de idade, controle e submetidos à desnutrição protéica gestacional e pós-natal, em período precoce pós dose única de picrotoxina.....	85
Figura 3.9 -	Efeitos da aplicação crônica da picrotoxina sobre a oxidação de D-[U- <sup>14</sup> C]Glicose (A) e [U- <sup>14</sup> C]Acetato a CO <sub>2</sub> (B) em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 25 dias de idade, controle e ratos submetidos à desnutrição gestacional e pós-natal.....	86
Figura 3.10 -	Evolução do ganho de massa corporal de ratos machos (A) e fêmeas (B), em desenvolvimento, submetidos à administração diária de veículo/picrotoxina (i.p.).....	87
Figura 3.11 -	Período de latência (dias) para a manifestação dos estágios de convulsão em ratos controle e desnutridos submetidos ao procedimento de “ <i>kindling</i> ” por picrotoxina.....	88
Figura 3.12 -	Convulsões induzidas por AQ em ratos controle e desnutridos de 25 dias de idade.....	89
Figura 3.13 -	Captação de glutamato por fatias de córtex cerebral parietal e hipocampo de ratos controle e desnutridos de 25 dias, 10 minutos após a administração de AQ ou salina (i.c.v.), e ratos que não foram submetidos à cirurgia ( <i>naive</i> ).....	89
Figura 3.14 -	Captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos controle e desnutridos de 7, 25 e 75-80 dias de idade, incubados por 15 minutos com 25μM (A) ou 100μM de [ <sup>3</sup> H]GABA (B).....	91
Figura 3.15 -	Percentual de inibição da captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos controle e desnutridos, pré-incubadas/incubadas com β-alanina (1mM) e incubadas com 25μM (A) ou 100μM de [ <sup>3</sup> H]GABA (B).....	92
Figura 3.16 -	Percentual de inibição da captação de GABA por fatias de córtex parietal cerebral de ratos controle e desnutridos, pré-incubadas/incubadas com L-DABA (1mM) e incubadas com 25 μM (A) ou 100μM de [ <sup>3</sup> H]GABA.....	93
Figura 3.17 -	Efeito de altas concentrações extracelulares de K <sup>+</sup> sobre a oxidação de [U- <sup>14</sup> C]Acetato a CO <sub>2</sub> em fatias de córtex cerebral de ratos machos de 75 dias, controle e desnutridos gestacional e pós-natalmente.....	94

- Figura 3.18 - Efeito da monensina (10 $\mu$ M) e da ouabaína (1mM) sobre a oxidação de [U-<sup>14</sup>C]Acetato a CO<sub>2</sub> em fatias de córtex cerebral de ratos machos controle e desnutridos no período gestacional e pós-natal, de 75 dias, controle e desnutridos no período gestacional e pós-natal..... 94
- Figura 3.19 - Efeito de baixas concentrações de Na<sup>+</sup> sobre a oxidação de [U-<sup>14</sup>C]Acetato a CO<sub>2</sub> em fatias de córtex cerebral de ratos machos de 75 dias, controle (G<sub>25</sub>) e desnutridos (G<sub>7</sub>) no período gestacional e pós-natal..... 95
- Figura 3.20 - Efeitos de altas concentrações extracelulares de K<sup>+</sup>, da nifedipina (10 $\mu$ M), da ausência de Ca<sup>2+</sup> (EGTA 100 $\mu$ M) e de bumetanide (100 $\mu$ M) sobre a oxidação de [U-<sup>14</sup>C]Acetato por fatias de córtex cerebral de ratos de 75-80 dias..... 96
- Figura 3.21 - Efeito de altas concentrações extracelulares de K<sup>+</sup> sobre a oxidação de (A) [U-<sup>14</sup>C]Acetato e (B) D-[U-<sup>14</sup>C]Glicose e L-[U-<sup>14</sup>C]Lactato a CO<sub>2</sub> em fatias de cerebelo obtidas de ratos machos de 75-80 dias, controle (G<sub>25</sub>) e submetidos à desnutrição protéica gestacional e pós-natal (7% de caseína sem suplementação de L-metionina- G<sub>7</sub>SSMet)..... 97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição das rações.....	57
Tabela 2.2	Composição do tampão Dulbecco.....	72
Tabela 3.1	Efeitos da desnutrição sobre a evolução do ganho de massa corporal e cerebral.....	77
Tabela 3.2	Efeitos da desnutrição sobre a concentração protéica de estruturas cerebrais.....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	<i>2,2' –Azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride</i>
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AQ	ácido quinolínico
BGT-1	transportador de
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
DTT	Ditiotreitol
CACA	ácido cis-4-aminocrotônico
DZP	Diazepam
EAAC 1	carreador de aminoácidos excitatórios 1
EAAT 1	transportador de aminoácidos excitatórios 1
EAAT 2	transportador de aminoácidos excitatórios 2
EAAT 3	transportador de aminoácidos excitatórios 3
EAAT 4	transportador de aminoácidos excitatórios 4
EAAT 5	transportador de aminoácidos excitatórios 5
EDTA	ácido etileno di-amino-tetracético
EGTA	etileno glicol-bis ( $\beta$ -amino etílico)
ENDEF	Estudo Nacional de Despesa Familiar
GABA	ácido $\gamma$ -amino-butírico
GABA <sub>A</sub>	receptor de GABA A
GABA-T	GABA transaminase
GAD	glutamato descarboxilase
GAT-1	transportador de GABA 1
GAT-2	transportador de GABA 2
GAT-3	transportador de GABA 3
GLAST	transportador de glutamato e aspartato
Gln	Glutamina
GLT 1	transportador glial 1
Glu	Glutamato
GluRs	receptores glutamatérgicos
HSP	<i>heath shock protein</i>
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitonal

iGluRs	receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IUPHAR	<i>International Union of Pharmacology</i>
L-DABA	ácido L- 2,4-Diamino-n-butírico
LDH	lactato desidrogenase
LTP	potenciação de longa duração
MDA	Malondialdeído
mGluRs	receptores glutamatérgicos metabotrópicos
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMRspectroscopia	espectroscopia de ressonância nuclear magnética
PCT	Picrotoxina
PKC	proteína cinase dependente de cálcio
PNAN	Plano Nacional de Alimentação e Nutrição
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde
PTB	Pentobarbital
PTZ	Pentilenotetrazol
s.c.	Subcutâneo
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor</i>
SNC	sistema nervoso central
SSA	semialdeído succínico
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRIS	tris-hidroxi-metil-amino metano
TPMPA	<i>[1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il(methylphosphinic acid)]</i>
TRAP	potencial antioxidante total
VGAT	transportador vesicular de GABA

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

A nutrição desempenha um papel central, ligando os campos da neurobiologia, do desenvolvimento e da neurociência cognitiva, exercendo um profundo impacto no desenvolvimento das estruturas e funções cerebrais. Evidências consideráveis de estudos em humanos e em outras espécies animais mostram que a desnutrição<sup>1</sup> pré e pós-natal precoce influenciam estes aspectos e o desempenho cognitivo posterior. Várias patologias ligadas ao desenvolvimento neural podem estar relacionadas a injúrias, como a hipóxia, viroses, exposição a drogas ou desnutrição durante o período intra-uterino. Recentes avanços na neurobiologia do desenvolvimento e neurociência cognitiva sugerem mecanismos que medeiam estes efeitos (DAUNCEY e BICKNELL, 1999).

O interesse na determinação da extensão pela qual condições sub-otimizadas de saúde e enfermidades na vida adulta, cujo rastreamento remete ao período de experiências ambientais precoces, tais como a injúria nutricional, renovou-se e intensificou-se nos últimos anos. Para além da conhecida “programação metabólica” induzida pela desnutrição fetal com propósito de aumentar as chances de sobrevivência do feto e na vida pós-natal, como uma resposta adaptativa do organismo ao déficit nutricional (HALES e BARKER, 1992), vários estudos apontam a deficiência nutricional pré-natal como fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurológicas (HACKET e IYPE, 2001; DIOP et al., 2003) e psiquiátricas (SUSSER e LIN, 1992; SUSSER et al., 1996; HOECK et al., 1998). Entre estes, recentes estudos epidemiológicos baseados no “inverno de fome holandês”<sup>2</sup> mostram

---

<sup>1</sup> O termo desnutrição foi usado genericamente para discriminar deficiências nutricionais (PNAN, MS, 2000) ou ainda como sinônimo de “deficiência nutricional”, definida como “doença decorrente do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou ainda do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos” (MONTEIRO, 2003).

<sup>2</sup> Estudos de coorte em população cujas mães sofreram privação alimentar durante a gestação no período epidêmico de fome na Holanda, de 1944-45, durante a Segunda Guerra Mundial.

que fetos expostos à condição de privação alimentar (*peak famine*- fome aguda epidêmica) durante o primeiro trimestre da vida intrauterina apresentam risco de desenvolver doenças neuropsiquiátricas na vida adulta (SUSSER e LIN, 1992; HOECK et al., 1998; SUSSER et al., 1996).

O acentuado interesse na busca do estabelecimento de correlações entre a desnutrição e, entre outros efeitos deletérios ao longo prazo, os relacionados às disfunções cerebrais, encontra ressonância no fato de que, apesar da caracterização de períodos de transição nutricional<sup>3</sup> (MONTEIRO, 2000) e de projeções de redução da prevalência da desnutrição para algumas regiões do globo, noutras a expectativa ainda é alarmante (de ONIS et al., 2004). Embora do outro lado da escala da má nutrição, a obesidade tenha emergido em todas as idades e grupos sócio-econômicos, tornando-se problema de saúde pública, ela convive paradoxalmente com a desnutrição na mesma população (POPKIN, 1994; NISHIDA et al., 2004).

A desnutrição humana é uma condição que afeta populações de todas as nações, sejam elas subdesenvolvidas ou tecnologicamente avançadas (WHO, 2003). A desnutrição infantil é internacionalmente reconhecida como um importante problema de saúde pública e seus efeitos devastadores sobre a saúde e a sobrevivência estão bem estabelecidos. A distribuição geográfica global de crianças com baixo peso, menores de cinco anos de idade, baseada no último levantamento da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) caracteriza prevalências extremamente elevadas em países africanos e asiáticos (figura 1.1). Enquanto globalmente a projeção da prevalência do baixo peso infantil<sup>4</sup> é de declínio de 26,5 para 17,6% entre 1990 e 2015, em países em desenvolvimento, a estimativa é de decréscimo de 30,2 para 19,3%. Paradoxalmente, na África a projeção é de aumento de 24,0 para 26,8%. Globalmente, a projeção do número de crianças de baixo peso aponta

---

<sup>3</sup> O conceito de transição nutricional diz respeito a mudanças seculares em padrões nutricionais que resultam de modificações na estrutura da dieta dos indivíduos e que se correlacionam com mudanças econômicas, sociais, demográficas e relacionadas à saúde (POPKIN et al., 1993).

<sup>4</sup> O reconhecimento da relevância da nutrição como pilar básico para o desenvolvimento social e econômico colocou a desnutrição infantil entre os objetivos de desenvolvimento do milênio para a erradicação da pobreza extrema e da fome (United Nations, 2002 *apud* de ONIS et al., 2004), com o objetivo de reduzir 50% da prevalência do baixo peso entre crianças menores de 5 anos [definida como 2DP abaixo do peso para a idade da população referência da OMS e NCHS (National Center for Health Statistics)] entre 1990 e 2015.

para uma diminuição de 163,8 milhões em 1990 e para 113,4 milhões em 2015. Na América Latina, de 4,8 milhões, a projeção é de declínio para 1,9 milhões. Embora uma melhora geral na situação global possa ser vislumbrada, nem mesmo globalmente, e sequer em regiões desenvolvidas, o objetivo de redução de 50% na prevalência do baixo peso entre crianças até cinco de idade, estabelecido pelas Nações Unidas (United Nations, 2002), será alcançado até 2015 (de ONIS et al., 2004).

No Brasil, a exemplo de várias outras regiões do globo, a leitura comparativa dos três estudos transversais realizados nas décadas de 70, 80 e 90, em âmbito nacional e microrregional, (*Estudo Nacional de Despesas Familiares – ENDEF, 1974/1975; Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição – PNSN, 1989; Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde – PNDS 1995-1996*), caracteriza um período de transição nutricional, podendo-se inferir um declínio na prevalência da desnutrição em crianças menores de cinco anos e, por outro lado, a elevação da prevalência de sobrepeso/obesidade em adultos. Há que se considerar, porém, que as características do declínio na prevalência da desnutrição no Brasil se apresentam assimétricas no que se refere ao meio urbano e rural e distribuições regionais (BATISTA FILHO e RISSIN, 2003).

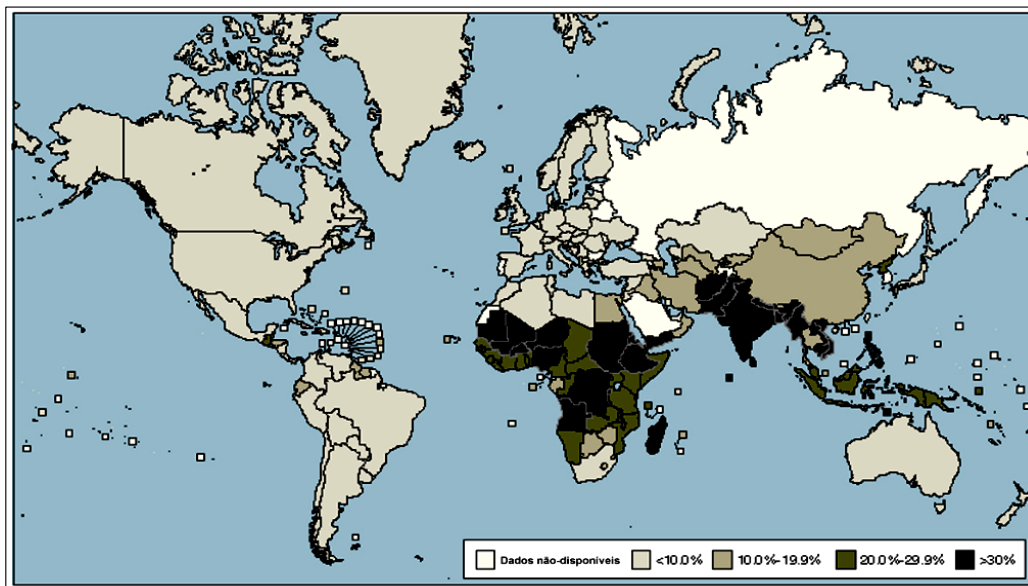


Figura 1.1 – Distribuição geográfica de crianças de baixo peso < de 5 anos. Percentagem representa crianças com peso 2DP abaixo da média para a idade segundo referência do NCHS (National Center for Health Statistics) e OMS. Fonte: Adaptado de de Onis (2004).

A desnutrição humana está associada a uma série de fatores que incluem a pobreza, a negligência e abuso de drogas, e consiste de aspectos biológicos, psicológicos e sociológicos (MORGANE et al., 2002). Um fator agravante associado aos efeitos de longa duração ou até mesmo permanentes é o de que estes vários dispositivos e práticas comportamentais, associados com a desnutrição, tendem a ser transmitidos de geração a geração. A extensão pela qual estes efeitos se tornam perpetuados, e mesmo cumulativos sobre várias gerações, demonstra que reabilitação educacional, econômica, comportamental e nutricional extensiva para além de uma única geração é necessária para mitigar os efeitos residuais da desnutrição multigeracional (MORGANE et al., 2002).

Considerações a respeito dos efeitos subliminares ou expressivos das doenças neuropsiquiátricas sobre a qualidade de vida, e, também, sobre o próprio sistema de saúde pública, consolidam a importância do desenvolvimento de pesquisas que se dirijam à compreensão e elucidação dos impactos e mecanismos que modulam os efeitos da desnutrição precoce sobre o neurodesenvolvimento.

## 1.2 Maturação cerebral, injúria e período críticos

A maturação do Sistema Nervoso Central (SNC) depende de diretrizes genéticas, da complexidade e grau da estimulação ambiental e de alimentação adequada (MORGANE et al., 1993), sendo a desnutrição um dos principais fatores não genéticos que afetam o desenvolvimento cerebral (MORGANE et al., 2002). A maturação cerebral envolve uma série de estágios sobrepostos temporalmente e que seguem uma seqüência precisa, que difere de região para região cerebral e mesmo dentro de uma região em particular, variando temporalmente de uma espécie animal para outra (MORGANE et al., 2002).

O conceito relativo ao impacto da injúria precoce ao cérebro está baseado na concepção de que há períodos do desenvolvimento durante os quais o organismo é particularmente vulnerável. Este denominado período crítico representa uma única “janela de desenvolvimento” que não pode ser revertida ou repetida em um período posterior.

Simplificações quantitativas a respeito do denominado período de rápido crescimento cerebral (*brain growth spurt* - período no qual os processos organizacionais estão sendo modificados mais rapidamente) podem derivar da omissão das complexas inter-relações temporais seguidas pelas sub-regiões do cérebro. Enquanto cada sub-região segue uma cuidadosa e intrincada programação seqüencial de desenvolvimento, deve sincronizar-se temporalmente com outras regiões interligadas, de tal forma que o produto final resulte intacto e apto na estrutura madura. O desenvolvimento normal também depende da formação e diferenciação de células neurais, ocorrendo de forma inter-relacionada. Uma das maiores incumbências no cérebro em desenvolvimento é estabelecer padrões corretos de conexões em um determinado período de tempo (*windows of opportunity*) (MORGANE et al., 2002). Distorções na maturação coordenada de diferentes componentes cerebrais poderão romper o crescimento ordenado e elaboração do circuito neural (KAWAGUCHI e HAMA, 1988, *apud* MORGANE et al., 2002). Atraso em apenas poucos eventos neurológicos isolados resultantes da desnutrição, pode ser causa de reação em cadeia, amplificando erros funcionais. Interferências temporais na progressão dos processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento do SNC, podem levar a déficit funcional permanente (MORGANE et al., 2002).

São fatores críticos na determinação do como e em que extensão a injúria afetará o cérebro, a idade na qual a desnutrição ocorre associada à duração e severidade da mesma (MORGANE et al., 1993). A depender do período de desnutrição (fase embrionária, fetal, pós-natal precoce ou tardia), os efeitos na proliferação de diferentes tipos de neurônios (macro e micro) ou células gliais (astroglia e oligodendroglia) serão diferentes (MORGANE et al., 2002). Embora a desnutrição em período específico pré ou pós-natal, por exemplo, possa causar alterações específicas no SNC determinadas pela fase na qual a injúria é imposta, em combinação os efeitos podem ser aditivos (KEHOE et al., 2001), como demonstrado em estudos em animais e humanos. A maior parte dos estudos, porém, mostra que a desnutrição pré-natal resulta em deficiências mentais mais importantes e permanentes que a desnutrição pós-natal (SMART, 1993 *apud* MORGANE et al., 2002).

A depender do grau da injúria nutricional, período e tempo de imposição (MORGANE et al., 2002) e de eventual posterior reabilitação nutricional (GRESSENS et al., 1997), nem alterações anatômicas ou até mesmo patologias focais equivalentes a lesões microscópicas, nem mesmo retardo mental expressivo ou psicopatologias são detectáveis. Poderão resultar, porém, condições sub-otimizadas permanentes do desenvolvimento intelectual e comportamental. Desequilíbrios no sistema de neurotransmissores, por exemplo, mais do que lesões focais aparentes, contribuem significativamente para alterações funcionais tardias (MORGANE et al., 2002).

Por outro lado, déficits de desenvolvimento devido à injúria nutricional não levam necessariamente a disfunções cerebrais imediatas. A maior parte dos fenômenos biológicos opera em um princípio de excesso, com um nível de substrato além do que aquele necessário para encontrar a velocidade máxima ou manter as condições de equilíbrio. Portanto, as conseqüências de uma limitação anormal durante um período específico do desenvolvimento cerebral podem permanecer subliminarmente, ou podem apenas manifestar-se como uma predisposição, até que o sistema seja estressado por circunstâncias emocionais ou ambientais não usuais. Em outras palavras, o estresse adicional rompe um sistema já fragilizado (MORGANE et al., 2002).

Como conseqüência da desnutrição em um período crítico, apenas uma limitada plasticidade pode permanecer no sistema. É este nível residual de plasticidade que permite que a reabilitação nutricional, associada a outros fatores ambientais, exerça algum efeito de melhora após a injúria nutricional (MORGANE et al., 2002).

Partindo do pressuposto que alterações no desenvolvimento cerebral têm implicações funcionais a longo prazo, o estudo sobre efeitos da inadequação nutricional sobre este desenvolvimento, subsidia, principalmente, estratégias de prevenção dos efeitos deletérios na organização e funções cerebrais precoces, e, de otimização de condições ambientais que possam melhorar as funções cerebrais comprometidas (MORGANE et al., 2002).



1.3 Mecanismos adaptativos, compensatórios e/ou homeostáticos da desnutrição: efeitos transitórios, permanentes ou atraso no desenvolvimento?

Caracterizados como sendo de ordem adaptativa, compensatória, homeostática, de programação ou reprogramação, os efeitos da desnutrição precoce sobre o SNC são enfocados também sob os aspectos de caráter de longo prazo, permanente ou ainda multigeracional. Noções de meros atrasos e evolução para normalização, envolvendo conceito de prolongamento da imaturidade, convivem com comprometimentos acentuados ou menos expressivos na vida adulta.

Embora a natureza dos mecanismos propostos não seja de todo excludente e haja necessidade de considerar modelos de desnutrição impostos (grau, período, extensão, reabilitação), assim como parâmetros avaliados, as considerações a seguir propõem-se a focar congruências e disparidades entre pesquisadores, preservando terminologia original dos mesmos (grifo nosso).

Em 1962, Neel propôs a hipótese de que a seleção natural, operando durante milhares de anos de alimentação precária e intermitente, selecionou genes que conferem um estado metabólico econômico, que auxiliaria na sobrevivência (hipótese do “gene econômico”). Já em 1992, Hales e Barker propuseram a teoria do “fenótipo econômico” que propõe que o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente nutricional. Quando este é precário, uma resposta *adaptativa* é instigada para otimizar o crescimento de órgãos como o cérebro, em detrimento de outros, como as vísceras. Esta *programação fetal* teria a finalidade de melhorar as chances de sobrevivência do feto e levaria ao alterado metabolismo pós-natal, o qual, igualmente, teria a função de aumentar as chances de sobrevivência sob condições de nutrição precária e intermitente, mas que, segundo Petry et al. (2001), se torna deletéria quando a nutrição é excessiva ou mesmo adequada. Wu et al. (2004) apontam a nutrição como o fator intrauterino mais importante, que altera a expressão do genoma fetal e pode ter conseqüências de *longo prazo*. Este fenômeno pode resultar em *adaptações* no desenvolvimento, as quais alteram *permanentemente* a estrutura, fisiologia e metabolismo, predispondo, portanto, a enfermidades metabólicas, endócrinas e

cardiovasculares na vida adulta. Há crescentes evidências de que a desnutrição materna pode alterar o estado epigenético do genoma fetal. Isto pode prover um mecanismo molecular para o impacto da nutrição materna em ambos: *programação fetal* e *impressão genômica*.

Especificamente em relação ao cérebro, Morgane et al. (2002) enfocam a necessidade de distinguir entre *retardo do desenvolvimento normal* (desenvolvimento normal que apenas se lentificou) e *desenvolvimento anormal*. Para os autores, a desnutrição resulta em desenvolvimento *anormal* considerável, incluindo desequilíbrio de neurotransmissores, e não meramente um *atraso* no desenvolvimento normal.

Em populações humanas, períodos moderados a severos de desnutrição antes dos dois primeiros anos de vida, são associados com *retardos* no desenvolvimento cognitivo e desempenho escolar em crianças (HALL et al. , 2001; GALLER e ROSS, 1993 *apud* FIACCO et al., 2003).

Modelos de desnutrição animal durante o período pré-natal levam à alteração do desenvolvimento pós-natal do cérebro *apesar de reabilitação nutricional* ao nascimento. Alterações no comportamento, anatomia, química e fisiologia *estendem-se após o período pós-natal, continuando até a vida adulta* (FIACCO et al., 2003).

Del Angel-Meza (2001) mostram um *retardo* na migração de células granulares em córtex de cerebelo de ratos de 21 dias submetidos à desnutrição pré e pós-natal. Aos 30 dias, os dendritos das células granulares apresentam-se maiores e, aos 60 dias, a arborização das células de Purkinje é mais profusa em comparação aos ratos controle. O *retardo* na migração das células granulares poderia, segundo os autores, ser parcialmente devida à *imaturidade* das células gliais de Bergmann. Conseqüentemente, *vários eventos plásticos*, e possivelmente *compensatórios*, poderiam ter ocorrido em células granulares e de Purkinje.

Segundo Gressens et al. (1997), a desnutrição protéica precoce durante o período de desenvolvimento embrionário induz múltiplas e *transitórias* alterações no desenvolvimento cerebral. O *atraso* na astrocitogênese, a *diminuída* programação da morte celular,

sinaptogênese e diferenciação neuronal *anormal* em ratos em desenvolvimento e a quase completa *normalização* de parâmetros de desenvolvimento cerebral em animais adultos (citoarquitetura, diferenciação neuronal e glial), sugerem ao menos duas possibilidades, segundo os autores:

1. As anormalidades *transitórias* observadas poderiam representar as bases morfológicas de distúrbios do circuito e funcionamento neuronal mais *duradouros* e profundos que poderiam *persistir* nos animais adultos. Este paradigma poderia representar um modelo animal para casos humanos de retardo mental ou distúrbios de comportamento associados com tamanho cerebral normal e exames neuropatológicos *normais ou sub-normais*. A *retardada* astrocitogênese poderia representar um mecanismo fisiopatológico crítico, pelos múltiplos papéis dos astrócitos, e a reduzida morte neuronal (para *compensar* o estoque neuronal inicial reduzido), poderia levar à manutenção de células anormais e/ou redução da diversidade neuronal.

2. A normalização da histologia e tamanho do cérebro poderiam refletir a importante plasticidade do cérebro em desenvolvimento e sua habilidade em adaptar-se ao estresse precoce severo. Neste caso, a *retardada* gliogênese, a reduzida morte celular e o distúrbio *transitório* na diferenciação neuronal, poderiam ser considerados como eficientes *mecanismos compensatórios* que levariam ao *cérebro adulto normal ou levemente sub-normal*.

Evidências mostram também que a desnutrição precoce afeta mecanismos neuronais, implicando em alterações *adaptativas* em resposta a diferentes eventos experimentais e/ou tratamentos. Ratos privados nutricionalmente em período perinatal falharam em desenvolver tolerância ao efeito do diazepam (DZP) e pentobarbital (PTB) (BORGHESE et al., 1998), e também a tolerância farmacológica à administração crônica do etanol (CÓRDOBA et al., 1997), efeitos que são evidentes em animais controle. Estes resultados remarcam a influência da desnutrição precoce na regulação de *respostas adaptativas* induzidas por estresse crônico ou tratamento farmacológico prolongados,

indicando que a desnutrição altera mecanismos subjacentes a mudanças adaptativas a estímulos repetidos.

A *manutenção da homeostase* apontada, entre outros, por Steiger et al. (2003) como motivo da *resposta compensatória* do genoma ao alterar, por exemplo, os níveis de mRNA de subunidade de receptores GABA<sub>A</sub> na desnutrição pré-natal, como descrito no item 1.6.2, constitui interessante perspectiva, na qual sistemas lançam mão de mecanismos reacionais frente à agressão em busca de “um novo ponto de equilíbrio”.

Embora a natureza dos mecanismos propostos não seja de todo excludente e haja necessidade de considerar modelos de desnutrição impostos, assim como parâmetros avaliados, as congruências e também disparidades entre pesquisadores, refletem fatos derivados da desnutrição precoce, que apontam, em sua maioria, caráter permanente em algum grau, se não imediato, prospectivo e comprometedor da performance bioquímica, fisiológica e comportamental. Apesar dos evidenciados e assim denominados “atrasos” no desenvolvimento de parâmetros neurológicos, incorporando os conceitos explorados por Morgane et al. (2002), estes não constituem apenas erros funcionais isolados, uma vez que as inter-relações e conexões ideais são influenciadas, ampliando os erros temporais de ocorrência de eventos. A impressão da marca da desnutrição em nível de código genético, possibilidade considerada, ao aumentar os horizontes dos efeitos da desnutrição em uma perspectiva multigeneracional, amplifica os seus efeitos.

Aspectos caracterizados como mecanismos compensatórios, se, por um lado apontam para uma habilidade em adaptar-se ao estresse precoce severo, o que levaria a um cérebro adulto normal ou sub-normal, em uma das proposições de Gressens et al. (1997), por outro poderiam ser comprometidos na contingência de estresse adicional de ordem ambiental ou emocional.

Além disso, alterações adaptativas que ocorrem em ratos normais frente ao uso de determinadas drogas, e que não ocorrem em ratos desnutridos, sugerem a necessidade de maiores estudos sobre a especificidade da farmacologia do desnutrido. Da mesma forma, fármacos cuja posologia ou composição sejam benéficas para indivíduos que não sofreram

desnutrição, poderiam, eventualmente, ter efeitos minimizados ou acentuados quando utilizados em indivíduos com agressão nutricional anterior. Além do que, poderiam constituir um estresse adicional ao desnutrido, caracterizando-se como circunstância ambiental não usual, rompendo um sistema já fragilizado conforme proposição de Morgane et al. (2002).

#### 1.4 Desnutrição e doenças neuropsiquiátricas

Há hipóteses de que a esquizofrenia seja uma enfermidade no desenvolvimento neural que ocorre, em parte, como decorrência de eventos primários no útero e cujas manifestações ocorrem mais tardiamente na vida (WEISS e FELDON, 2001). Estudos epidemiológicos do “Inverno de Fome Holandês” mostram que fetos expostos à condição de desnutrição (*peak famine*) durante o primeiro trimestre de vida intrauterina, apresentam risco de desenvolver esquizofrenia (SUSSER e LIN, 1992; SUSSER et al., 1996; HOEK et al., 1998). Análises “*post-mortem*” do cérebro de pacientes esquizofrênicos mostram evidências da migração neuronal anormal (AKBARIAN et al., 1996; RIOUX et al., 2003), corroborando com a hipótese de que eventos pré-natais contribuem para a gênese da esquizofrenia (PALMER et al., 2004).

Já a epilepsia, que se caracteriza por episódios recorrentes de disfunções cerebrais paroxísticas devido à súbita, desordenada e excessiva descarga neuronal (ADAMS et al., 1997), representa um dos principais distúrbios cerebrais crônicos em países em desenvolvimento (DIOP et al., 2003). Dos 40 a 50 milhões de pessoas epiléticas, nos quais 50% dos casos inicia na infância ou na adolescência, há estimativas de que 85% residem nos países em desenvolvimento (WHO, 2001). A incidência em países em desenvolvimento praticamente dobra comparativamente aos países desenvolvidos e uma das razões para essa maior incidência é o maior risco de experienciar condições que podem levar a dano cerebral permanente (BALE, 1993; GAJANA, et al., 1995; WHO, 2001).

Embora a desnutrição e a epilepsia sejam problemas prevalentes em países em desenvolvimento (de BITTENCOURT et al, 1996; WHO, 2001, 2003; DIOP et al., 2003), sendo uma relação causa-efeito, sugerida em vários estudos com modelo animal (STERN et

al., 1974; TABER et al., 1980; BRONZINO et al., 1986, 1990; GIETZEN et al, 1996; PALENCIA et al., 1996), até o presente não se demonstrou que a desnutrição *per se* aumenta o risco de epilepsia. A alta prevalência da epilepsia infantil nesses países é apontada por estudos epidemiológicos (de BITTENCOURT et al, 1996; HACKET et al., 1997). Infecções que acometem o SNC e complicações perinatais, infecções tipicamente tropicais como a malária, infecções como a meningite bacteriana (MATUJA, 1989, AZIZ et al., 1994, WARUIRU et al., 1996, LEARY e MORRIS, 1988, *apud* HACKET e IYPE, 2001), parasitoses como a neurocisticercose que, embora não tipicamente tropical, está relacionada à pobreza (BERN et al., 1999; PAL et al., 2000), a desnutrição (WHO, 2001) e ainda a diminuição da imunidade e resistência a infecções por vírus que apresentam tropismo pelo SNC causadores de epilepsia que a mesma acarreta (CHANDRA, 1997), são sugeridas como fatores etiológicos. A maior parte destes estudos, porém, usa um modelo etiológico monofatorial, mas é provável que haja interação com fatores subjacentes (tais como a predisposição genética, segundo Schauman, 1994), predispondo à epilepsia (HACKET e IYPE, 2001). A desnutrição e a epilepsia podem, portanto, coexistir constituindo importante problema de saúde pública (SHORVON e BARUCHA, 1993 *apud* HUANG et al., 2003; HACKET e IYPE, 2001).

No Brasil, onde dados epidemiológicos mostram prevalência da epilepsia semelhante aos países em desenvolvimento (MARINO et al., 1986 e FERNANDES et al., 1992 *apud* BORGES et al., 2001; BORGES et al., 2004), um estudo sobre a prevalência da epilepsia na população urbana de São José do Rio Preto, SP (figura 1.2), mostra uma forte associação entre a epilepsia e as classes sociais. As prevalências de epilepsia acumulada das classes econômicas A e B são baixas, semelhantes às dos países desenvolvidos e nas classes C e D são elevadas, semelhantes às observadas em países em desenvolvimento (BORGES, 2002).

Em ratos desnutridos, vários estudos sugerem uma diminuição nos limiares de susceptibilidade para crise convulsiva em modelos de convulsão (STERN et al., 1974; TABER et al., 1980; BRONZINO et al., 1986, 1990; GIETZEN et al, 1996; PALENCIA et al.,

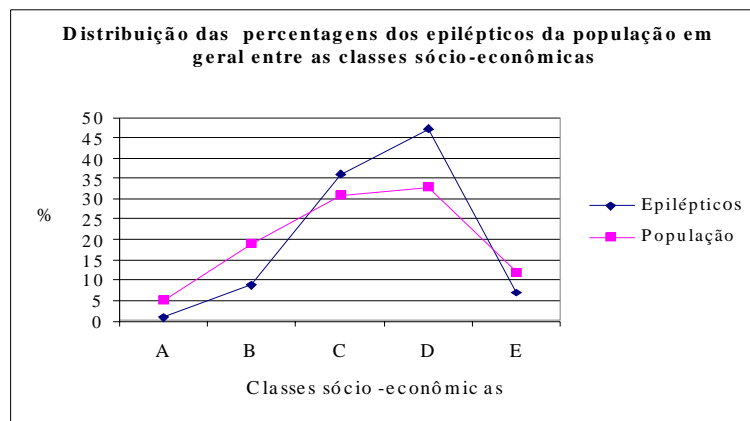


Figura 1.2 - Relação entre a prevalência da epilepsia e as classes econômicas em São José do Rio Preto, Brasil. Fonte: Borges (2002).

1996), inclusive sem reversão de resposta quando da reabilitação nutricional (STERN et al., 1974). Em contraposição, uma menor susceptibilidade a convulsões é sugerida por Rotta et al. (2003a), Bronzino et al. (1991), Austin-LaFrance et al. (1991), enquanto nos trabalhos de Nunes et al. (2002), Schultz et al. (1996) e Forbes et al. (1978) a desnutrição não modificou a resposta comparativamente aos animais controle.

As aparentes contradições encontradas na literatura sugerem que os efeitos da desnutrição sejam específicos para o modelo de convulsão. A ampla documentação de que a desnutrição em roedores altera significativamente a sensibilidade a uma variedade de drogas atuando em diversos sistemas de neurotransmissores (BUTLER et al., 1994; ALMEIDA et al., 1996), sugere uma sensibilidade específica sujeita às propriedades das drogas sendo seletivamente modificada pela desnutrição.

### 1.5 Doenças neuropsiquiátricas: efeitos sobre a interação neurônio-glia

A avaliação do metabolismo cerebral durante convulsões e períodos interictais é utilizada para identificar estruturas cerebrais responsáveis pela geração, propagação e controle da atividade epileptiforme (SOKOLLOFF et al., 1977; SCORZA et al., 2002). Da mesma forma, estudos sobre o metabolismo cerebral em situações fisiológicas e/ou frente a acometimentos de ordem patológica ou injúrias ambientais são de relevância na avaliação

da utilização específica de nutrientes e interação glial e neuronal (SONNEWALD e KONDZIELLA, 2003; ELOQAYLI et al., 2004).

Foi demonstrado que o metabolismo cerebral está compartimentalizado em nível celular e intracelular (WAAGEPETERSEN, 2003). O metabolismo cerebral do acetato também é compartimentalizado e ocorre na glia (WANIEWSKI e MARTIN, 1998). O acetato extracelular no cérebro pode ser derivado de, ao menos, três fontes: (1) o acetato é produzido por bactérias no intestino e está presente a 0,2-0,3mM no sangue (ORREGO et al., 1988); (2) o etanol é metabolizado a acetato, podendo aumentar de 0,3 a 1,0mM no plasma após uma única dose intravenosa de etanol em humanos (McNEIL, 1984) e, (3) no cérebro a acetilcolina é rapidamente metabolizada pela colinesterase extracelular a acetato e colina (KISELEVSKI et al., 2003). No cérebro, o acetato é seletivamente captado pelos astrócitos através de um sistema especializado de transporte que está ausente ou é menos ativo em neurônios, onde se sugere que a glicose seja mais metabolizada no ciclo do ácido tricarboxílico neuronal (SONNEWALD et al., 1991; WANIEWSKI e MARTIN, 1998; QU et al., 2000) (figura 1.3). Por meio de estudos usando  $^{13}\text{C}$  NMR espectroscopia, calcula-se que 65% do acetil-CoA derivado da glicose seja metabolizado no ciclo do ácido tricarboxílico neuronal (HASSEL et al, 1995; QU et al, 2000).

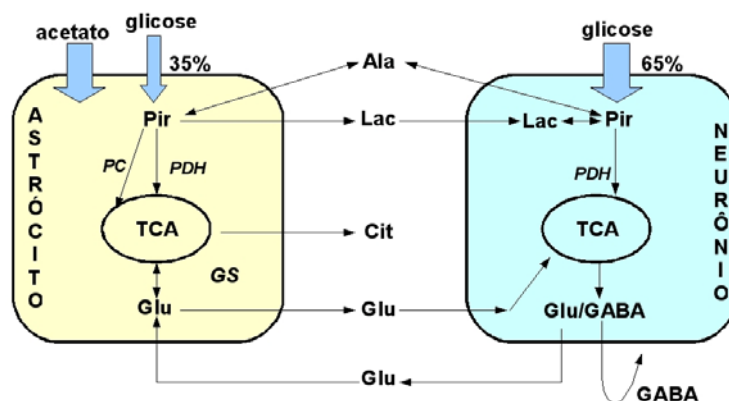


Figura 1.3 - Interação metabólica entre neurônios e astrócitos.  
 Fonte: Sonnewald e Kondziella (2003).

A determinação da metabolização cerebral da glicose (*LCMR<sub>glc</sub>*- *local cerebral metabolic rates of glucose*) em tecido neural por meio de método autoradiográfico, utilizando



[<sup>14</sup>C]deoxiglicose ( [<sup>14</sup>C]DG ) (HERTZ e PENG, 2002), evidencia claramente que a ativação funcional aumenta as concentrações extracelulares de K<sup>+</sup> ( [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> ) e o metabolismo energético nas regiões ativadas (SOKOLOFF, 1981; 1993). O descrito aumento é evidenciado predominantemente em neuropilos ou regiões ricas em sinapses (KADEKARO et al., 1983). Porém, a resolução espacial do método autoradiográfico utilizando [<sup>14</sup>C]DG é limitado a 100-200µm (TAKAHASHI et al., 1997) e é insuficiente para identificar os elementos celulares específicos no neuropilo que contribuem para o aumento da LCMRglc, permanecendo, portanto, indefinido se a função envolvida no aumento do metabolismo energético é confinada aos processos axonais e /ou dendríticos ou inclui processos astrocitários envolvendo as sinapses.

A estimulação do metabolismo por meio da ativação funcional é dependente da atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, a qual contribui para a manutenção de concentrações basais extracelulares de K<sup>+</sup>, que, no cérebro “*in vivo*”, situam-se normalmente em torno de 3mM, podendo aumentar durante períodos de ativação neuronal para 12mM (SOMJEN 1975, 1979). Estes valores podem atingir 50 a 80mM durante a convulsão, isquemia, hipoglicemia ou depressão cortical alastrante (HERTZ, 1977; ERECINSKA e SILVER, 1994).

A manutenção das [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> em tecidos neurais dentro de limites estreitos é desempenhada essencialmente pelas células gliais (MODDEL et al., 2003). Potenciais de ação refletem o influxo de Na<sup>+</sup> e o efluxo de K<sup>+</sup> em neurônios, e o metabolismo energético aumenta em proporção direta às suas frequências, o que resulta em aumento na concentração intracelular e extracelular de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, respectivamente, assim como o aumento da atividade da bomba Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e do metabolismo energético com finalidade de restaurar os gradientes iônicos aos níveis normais. Pode-se inferir que a restauração dos gradientes iônicos ocorre nos neurônios (onde os potenciais de ação são gerados), porém, os astrócitos envolvidos nas sinapses locais podem também estar envolvidos na resposta metabólica, regulando a [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> por difusão passiva e/ou transporte ativo (SOKOLOFF et al., 1996). Astrócitos em cultura captam K<sup>+</sup> avidamente do meio, e a velocidade de captação é maior do que aquela para neurônios. Os astrócitos também

podem captar  $K^+$  de áreas com estimulação neuronal para áreas com menor concentração de  $K^+$  extracelular (tamponamento espacial do  $K^+$ ).

Os neurônios podem responder com elevada utilização da glicose a mudanças no meio iônico extracelular (SOKOLOFF et al. 1996). Não está totalmente esclarecido se o aumento nas  $[K]_e$  estimula o metabolismo energético em astrócitos, porém, ao aumentar a liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, promove o aumento do  $Na^+$  intracelular mediante a liberação de neurotransmissores. Após interagir com receptores específicos, o glutamato é recaptado por meio de transportadores localizados em astrócitos e neurônios (PELLERIN e MAGISTRETTI, 1994; SOKOLOFF et al., 1996; ZIGMOND et al., 1999). O glutamato avidamente captado do espaço extracelular desempenha um papel importante como sinal acoplador da atividade neuronal com o metabolismo da glicose em astrócitos (MAGISTRETTI et al., 1999). A captação de glutamato é acompanhada por substancial carregamento de  $Na^+$  no astrócito, levando ao aumento da atividade da  $Na^+/K^+$  - ATPase, consumo de ATP, e a um aumento da glicólise com concomitante aumento da produção de lactato (PELLERIN e MAGISTRETTI, 1994; CHATTON et al., 2000), postulando-se que o lactato produzido por este mecanismo poderia servir como fonte metabólica para o neurônio ativado (MAGISTRETTI, et al., 1999). A estequiometria do transporte de glutamato é de três íons  $Na^+$  por glutamato (DANBOLT, 2001), (ou dois  $Na^+$  e um  $H^+$ ) em troca de um  $K^+$  e uma  $OH^-$  (ou um  $HCO_3^-$ ), o que leva a um aumento na concentração intracelular de  $Na^+$ , acompanhada por uma acidificação intracelular e alcalinização extracelular. A demanda metabólica aumentada ligada ao rompimento da homeostase do  $Na^+_i$ , ativa a captação de glicose e a glicólise em astrócitos. Parece, então, que os astrócitos participam no metabolismo energético aumentado associado com atividade funcional, mas, ao contrário dos neurônios, a estimulação por aumento na  $[K^+]_e$  é de menor relevância do que outros mecanismos, tais como a liberação neuronal de glutamato e possivelmente outros neurotransmissores que promovam a entrada de  $Na^+$  nas células.

Para avaliar o metabolismo glial no cérebro, o acetato é amplamente utilizado. A aplicação de [ $^{14}\text{C}$ ]acetato a tecidos cerebrais resulta em rápida incorporação do precursor radioativo em glutamina, com uma maior atividade específica que o glutamato. Por outro lado, experimentos com [ $^{14}\text{C}$ ]glicose resultam em uma rápida incorporação em glutamato e com menor atividade específica em glutamina (O'NEAL e KOEPPE, 1966; VAN DEN BERG et al., 1969). Como a glutamina é sintetizada em astrócitos (NORENBERG e MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979), foi proposto que o acetato é preferencialmente utilizado pelos astrócitos (FONNUN, 1985). Estudos de ressonância nuclear magnética utilizando [ $^{13}\text{C}$ ]acetato estabeleceram o metabolismo seletivo do acetato pelos astrócitos (BADAR-GOOFER et al., 1990; CERDAN et al., 1990; CHAPA et al., 1995). Corroborando com a argumentação da compartimentalização do metabolismo do acetato, Waniewski e Martin (1998) mostraram que a oxidação de [ $^{14}\text{C}$ ]acetato a  $\text{CO}_2$  por astrócitos corticais é 10 vezes maior do que por sinaptossomas, nos quais o transporte de acetato é insignificante.

A regulação de ambiente extracelular e gradiente iônico é essencial para a manutenção da função neuronal normal e da excitabilidade (GORGI et al., 2001). Variações nas  $[\text{K}^+]_e$  podem induzir a alterações de funções fisiológicas essenciais em neurônios e estão implicadas na patofisiologia de várias enfermidades, tais como a epilepsia (PEDLEY et al., 1976; MOULARD et al., 2001). A relação entre as concentrações de potássio e os mecanismos de *clearance* de potássio e a epileptogênese foi descrita por Psarropoulou et al. (1993) e D'Ambrosio et al. (2002), havendo evidências de que disfunções nos canais de potássio estão associadas com a epilepsia em humanos (BIERVERT et al., 1998; ZUBERI et al., 1999). Estudos mostram evidências de um papel dos canais de  $\text{K}^+$  ATP-sensíveis ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) no controle e excitabilidade neuronal e propagação das convulsões (HERNANDEZ-SANCHEZ et al., 2001; YAMADA et al., 2001). Canais de  $\text{K}^+$  ATP-sensíveis são expressos pré e pós-sinápticamente em muitas regiões cerebrais. A função dos canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  é controlada pelo status metabólico do neurônio. Uma diminuição na relação ATP-ADP ativa os canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , limitando a excitabilidade celular e liberação de transmissores durante períodos de estresse metabólico. Foram descritos efeitos neuroprotetores induzidos pela

abertura de canais de  $K_{ATP}$  em vários estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” (MATTIA et al., 1994; TAKABA et al., 1997; WIND et al., 1997; DOMOKI et al., 1999, NISHADI et al., 2002), dando suporte a possível utilização futura de promotores da abertura de canais de  $K_{ATP}$ , como drogas anti-epilépticas (AEDs). De fato, a ativação de canais de  $K_{ATP}$  ou mitocondrial (mKATP) resulta na redução da liberação de neurotransmissores (AMOROSO et al., 1990; ASHCROFT e ASHCROFT, 1990). Em outros estudos, fatias cerebrais de tecidos de pacientes epiléticos mostram uma diminuída habilidade no transporte de  $K^+$  através da membrana (TOWER, 1965 *apud* GORGI et al., 2001). Também está descrito que a atividade da  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase está alterada na epilepsia humana e que a afinidade da subunidade catalítica para o  $K^+$  está reduzida (GRISAR et al., 1992).

Durante o “*status epilepticus*”, a utilização cerebral local de glicose se altera drasticamente (EVANS e MELDRUM, 1984; FOLBERGROVA et al., 1985; INGVAR, 1986) e o hipermetabolismo regional está correlacionado com o desenvolvimento de dano neuronal em vários modelos de convulsões em roedores e primatas (INGVAR, 1986; HANDFORTH e TREIMAN, 1995). As dramáticas mudanças metabólicas e bioenergéticas ocorrem em episódios agudos de convulsões na epilepsia crônica (FERNANDES et al., 1999 ; MELDRUM, 2002) e as conseqüências agudas são um aumento na captação e metabolismo da glicose (MELDRUM, 1983; THEODORE, 1999; CORNFORD et al., 2002). O fluxo sanguíneo é aumentado para dar vazão a este hipermetabolismo (MELDRUM, 1983; FRANCK et al., 1986) e a aumentada glicólise excede à utilização do piruvato pela piruvato desidrogenase, resultando em aumentada formação de lactato. Enquanto o hipermetabolismo ocorre no foco epilético em humanos durante a fase ictal, o hipometabolismo é prevalente durante fases interictais (THEODORE, 1999).

Já os astrócitos estão envolvidos na homeostase dos aminoácidos e desempenham papel significativo no foco epileptogênico, onde a sua proliferação (astrogliose) é um fenômeno conhecido (HERTZ, 1979; KHURGEL e IVY, 1996).

Mediante análise de espectroscopia de ressonância nuclear magnética [ $^{13}C$ ], na utilização de pentilenotetrazol, foi observado por Eloqayli et al. (2003) que após uma única

injeção de PTZ, seguida 30 minutos após por [1-<sup>13</sup>C]glicose e [1,2-<sup>13</sup>C]acetato e decapitação após 15 minutos, a maior parte dos neurônios glutamatérgicos estava afetado, porém o metabolismo dos astrócitos estava inalterado neste período pós-ictal precoce.

Já em modelo de epilepsia induzido por cainato, 24 horas ou 14 dias após sua administração i.p., foi injetado [1-<sup>13</sup>C]glicose e [1,2-<sup>13</sup>C]acetato. A avaliação dos metabólitos mediante <sup>13</sup>C NMR espectroscopia mostrou que, 24 horas após a convulsão, alterações ocorreram predominantemente nos metabólitos do acetato, enquanto que duas semanas após a convulsão, apenas os metabólitos da glicose foram afetados. A análise dos metabólitos (HPLC) levou a concluir que apenas precoce e temporariamente a aumentada atividade astrocitária levou ao subsequente alterado metabolismo nos neurônios, com um importante aumento do “*turnover*” de aminoácidos como GABA e glutamato (MÜLLER et al., 2000; QU et al., 2003). Da mesma forma, em modelo de hidrocefalo, as análises de [1-<sup>13</sup>C]glicose mais [1,2-<sup>13</sup>C]acetato por meio de <sup>13</sup>C NMR espectroscopia, mostraram distúrbios do metabolismo dos astrócitos mais precocemente, prolongando-se cronicamente e, só então, os primeiros sinais de alteração metabólica neuronal começam a aparecer (KONDZIELLA, et al., 2002). Sonnewald e Kondziella (2003) ressaltam o fato de que em ambos os estudos, o metabolismo astrocitário é afetado primeiramente, o que, segundo eles, poderia indicar que as células gliais protegem os neurônios inicialmente, ou, alternativamente, as células gliais afetadas induzem hipermetabolismo neuronal atrasado.

#### 1.6 Efeitos da desnutrição sobre os sistemas glutamatérgico e GABAérgico

A desnutrição protéica afeta diversos sistemas de neurotransmissores. É conhecida a sua influência sobre os sistemas catecolaminérgico, colinérgico, serotoninérgico (WIGGINS et al., 1984), glutamatérgico (ROTTA et al., 2003a) e GABAérgico (LUEBKE et al., 2000; STEIGER et al., 2002, 2003).

Uma vez que as funções cerebrais dependem da interação dinâmica entre “*inputs*” excitatórios e inibitórios, a modulação da liberação de GABA por terminais GABAérgicos e/ou glutamatérgicos contendo receptores de glutamato é de extrema importância na

manutenção do balanço entre excitação e inibição. A modulação da transmissão sináptica GABAérgica induzida por receptores de glutamato é descrita como estando envolvida nas convulsões induzidas por glutamato e dano neuronal (BELAN e KOSTYUK, 2002). Saransaari e Oja (2003) mostraram que os agonistas do receptor ionotrópico cainato, o NMDA e o AMPA aumentam a liberação basal de GABA mediada pelo receptor, sem efeito na liberação de GABA estimulada por  $K^+$ .

#### 1.6.1 Sistema glutamatérgico

Vários processos fisiológicos e plásticos do SNC, tais como a memória (IZQUIERDO e MEDINA, 1997), adaptação ambiental (OZAWA et al., 1998), desenvolvimento e envelhecimento (SEGOVIA et al., 2001), proliferação e migração celular (MCDONALD e JOHNSTON, 1990), são modulados pelo glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos. O glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir da glutamina, por meio da ação da enzima glutaminase, podendo também provir do  $\alpha$ -cetoglutarato, via glutamato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato aminotransferases (SCHOUSBOE et al., 1997). É armazenado num "pool" vesicular onde pode chegar a concentrações de 100mM (NEDERGAARD, 2002). A captação vesicular é  $Na^+$ -independente através da ação de transportadores de membrana, sendo sua incorporação possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma  $H^+$ -ATPase vacuolar, a qual medeia o transporte de  $H^+$  para dentro da vesícula (NAITO e UEDA, 1985).

Na despolarização dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, ocorre a liberação do glutamato das vesículas para a fenda sináptica por exocitose dependente da concentração de cálcio citosólico (NICHOLLS e ATWELL, 1990; VESCE et al., 1999), interagindo com receptores glutamatérgicos (GluRs) ionotrópicos (iGluRs) e/ou metabotrópicos (mGluRs) localizados nas membranas pós-sinápticas e gliais (GALLO e GHIANI, 2000; MELDRUM, 2000). A concentração de glutamato na sinapse no período pré-liberação é de 2-5 $\mu$ mol/L, podendo chegar a 5-100 $\mu$ mol/L depois da despolarização (DAIKHIN e YUDKOFF, 2000).

Após a promoção do influxo iônico nas células gliais e neuronais, e a modulação da produção de segundos mensageiros, o glutamato é removido da fenda sináptica por sistemas de transporte dependentes de sódio, localizados predominantemente nas células gliais (DANBOLT, 2001; AMARA e FONTANA, 2002; ANDERSON e SWANSON, 2000).

A captação de glutamato tem vital importância na manutenção de baixas concentrações extracelulares deste neurotransmissor (ANDERSON e SWANSON, 2000; DAIKHIN e YUDKOFF, 2000), além de prover glutamato para síntese de GABA (TILLAKARATNE et al., 1995), glutatona e para a liberação de energia (DANBOLT, 2001). A captação de glutamato desempenha papel importante como acoplador da atividade neuronal com o metabolismo da glicose em astrócitos (MAGISTRETTI et al., 1999), como descrito no item 1.5.2.

Após a captação astrocitária, o glutamato é transformado pela glutamina sintetase em glutamina. Esta é transportada para os neurônios, convertida pela glutaminase a glutamato, que pode ser captado pelas vesículas sinápticas e liberado novamente, recomeçando o processo (SCHOUSBOE et al., 1997; ANDERSON e SWANSON, 2000; DANBOLT, 2001; AMARA e FONTANA, 2002). A regeneração do glutamato a partir da glutamina, fecha o chamado ciclo glutamato-glutamina que, promove, portanto, os seguintes eventos: (1) rápida remoção de glutamato da sinapse; (2) conversão no astrócito do glutamato em glutamina, um composto não neuro-ativo que serve de "carreador" do glutamato de volta para os neurônios; (3) mecanismo para a regeneração do glutamato no compartimento neuronal; (4) provisão dos neurônios com substrato metabólico, uma vez que a glutamina pode ser usada como fonte energética em potencial; (5) mecanismo para tamponamento da amônia, espécie potencialmente neurotóxica, via glutamina sintetase (DAIKHIN e YUDKOFF, 2000).

#### 1.6.1.1. Receptores glutamatérgicos

Os receptores metabotrópicos (mGluRs), acoplados a mecanismos de transdução de sinal via proteínas G, modulam a produção intracelular de segundos mensageiros e são

divididos em 8 subtipos (mGluR<sub>1-8</sub>) (OZAWA et al., 1998). Os mGluR1 e mGluR5 (Grupo I) são ligados via proteínas G à ativação da fosfolipase C. Os mGluR2 e mGluR3 (Grupo II) e os mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8 (Grupo III) estão negativamente correlacionados à ativação da adenilato ciclase (CHAPMAN, 2000).

Por outro lado, os receptores ionotrópicos (iGluRs), responsáveis pela iniciação, propagação e ampliação do sinal glutamatérgico (COTMAN et al., 1995), são canais iônicos cátion-específicos e são subdivididos em três subtipos:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA), sendo os dois primeiros denominados coletivamente de receptores não-NMDA (OZAWA et al., 1998).

Enquanto os receptores AMPA e cainato estão associados primariamente a canais independentes de voltagem e são permeáveis a Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, sendo que algumas subunidades apresentam permeabilidade ao Ca<sup>2+</sup> (COTMAN et al., 1995), os receptores NMDA são dependentes de voltagem, altamente permeáveis ao Ca<sup>2+</sup> e de baixa permeabilidade ao Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, mediando a transmissão sináptica excitatória lenta (OZAWA et al., 1998). O complexo do receptor apresenta sítios para ligantes que regulam a abertura do canal: um sítio para o glutamato ou NMDA, um sítio para o co-agonista endógeno glicina, um sítio para a união dos inibidores não competitivos (MK-801; PCP) no interior do canal e sítios modulatórios, tais como um sítio para o zinco, outro para poliaminas, um sensível à modulação redox (modulado tanto por oxidantes quanto por redutores) e um sensível a prótons (PIGGOTT et al., 1992; EULER e LIU, 1993; GOSLAN e BEM-ARI, 1995; MARTIN et al., 1995; OZAWA et al., 1998) (figura 1.4).

O canal do receptor NMDA é bloqueado por Mg<sup>2+</sup> em neurônios em potencial de repouso, e a ativação deste receptor só ocorre se a membrana neuronal for despolarizada pela ativação dos receptores AMPA, permitindo a saída do Mg<sup>2+</sup> do interior do canal (EDMONS et al., 1995). O bloqueio voltagem-dependente do canal NMDA por Mg<sup>2+</sup> pode ser visto como um mecanismo protetor intrínseco contra o influxo excessivo de Ca<sup>2+</sup> na célula e a conseqüente toxicidade neuronal (SCATTON et al., 1993).



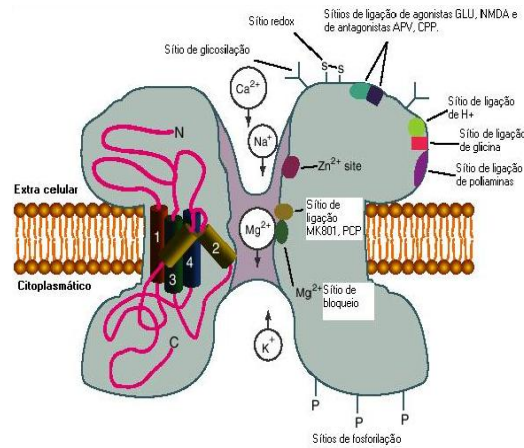


Figura 1.4 - Representação esquemática do receptor NMDA.  
Fonte: ZIGMOND et al. (2003)

A ativação do receptor NMDA contribui para a plasticidade neuronal e para a indução da potenciação de longa duração (LTP) e, por outro lado, a sua estimulação excessiva leva ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e morte celular (MODY e MacDONALD, 1995).

Os receptores NMDA são encontrados tanto em células neuronais quanto gliais (CONTI et al., 1996, 1997). A expressão de suas diferentes subunidades varia muito no SNC, sendo o hipocampo e o córtex cerebrais estruturas particularmente ricas neste receptor (WATKINS et al., 1990).

#### 1.6.1.2. Transportadores de glutamato

Foram clonados cinco transportadores de glutamato em mamíferos, GLAST/EAAT1 (STORCK et al., 1992) e GLT-1/EAAT2 (PINES et al., 1992), quantitativamente os dois principais transportadores de glutamato e responsáveis pela maior parte da atividade de captação (ANDERSON e SWANSON, 2000; DANBOLT, 2001), localizam-se predominantemente em astrócitos (ROTHSTEIN et al., 1994; LEHRE e DANBOLT, 1998). Enquanto que, EAAC1 (KANAI e HEDIGER, 1992), EAAT4 (FAIRMAN et al., 1995) e EAAT5 (ARRIZA et al., 1997) são localizados neuronalmente (GEGELASHVILI e SCHOUSBOE, 1998) (figura 1.5). Os cinco transportadores de glutamato apresentam entre 50 e 60% de semelhança na seqüência de aminoácidos (AMARA e ARRIZA, 1993). A distribuição de GLAST e GLT-1 no SNC é dependente da região do cérebro e da idade do animal (FURUTA

et al., 1997; ULLENSVANG et al., 1997; GEGELASHVILI e SCHOUSBOE, 1998; DANBOLT, 2001; MARAGAKIS e ROTHSTEIN, 2001). O GLAST é encontrado principalmente na glia cerebelar de Bergman (ROTHSTEIN et al., 1994; LEHRE e DANBOLT, 1998) e sua expressão é maior do que a de GLT-1 em telencéfalo em estágios precoces do desenvolvimento (ULLENSVANG et al., 1997). Já o GLT-1, transportador de glutamato predominante em todas as regiões do cérebro, não é detectável em ratos neonatos (LEVY et al., 1995), atingindo valores adultos no mesmo período que o GLAST, ou seja, na quinta semana pós-natal (ULLENSVANG et al., 1997). Quando presente em altas concentrações na fenda sináptica, mediante estímulos endógenos e exógenos, por um longo período, o glutamato pode ser uma potente neurotoxina (OBRENOVITCH et al., 2000) e sua excitotoxicidade tem implicações na patogênese de inúmeros transtornos agudos e crônicos do SNC como doenças neurodegenerativas, convulsões, isquemia e trauma cerebral (CARLSON, 1992; DURING e SPENCER, 1993; LIPTON e ROSENBERG, 1994; MELDRUM, 1994, 2000; BRADFORD, 1995; OZAWA et al., 1998; PRICE, 1999; CHAPMAN, 2000; MARAGAKIS e ROTHSTEIN, 2001, 2004). Estudos em humanos (MARAGAKIS e ROTHSTEIN, 2004) e em ratos transgênicos (MELDRUM et al., 1999) mostram que alterações nos transportadores de glutamato podem resultar em fenótipos epiléticos; estudos em ratos *knock-out* para o GLT-1 mostraram que estes apresentam convulsões letais nas primeiras horas de vida (TANAKA et al., 1997) assim como uma maior susceptibilidade à injúria cerebelar e cortical e redução da coordenação motora (WATASE et al., 1998); a perda do transportador neuronal EAAC1 e resultante epilepsia (ROTHSTEIN et al., 1996) e anormalidades de comportamento (DANBOLT, 2001), indicam também que disfunções na captação de glutamato podem desempenhar um importante papel no processo epileptogênico.

#### 1.6.1.3 Ação convulsivante do ácido quinolínico

O ácido quinolínico é um metabólito do triptofano estruturalmente análogo ao glutamato, normalmente presente em concentrações nanomolares no fluido cérebro-

espinhal e no cérebro humano, aumentando em várias patologias cerebrais. Há relatos de seu envolvimento na etiopatogenia de síndromes neuropsiquiátricas como a SIDA e Huntington (STONE, 2001) e epilepsia (HEYES et al., 1990; NAKANO et al., 1993; STONE, 2001). Em animais experimentais, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de ácido quinolínico induz a convulsões (SCHMIDT et al., 2000; LARA et al., 2001). O ácido quinolínico, ligando-se aos receptores NMDA (STONE e PERKINS, 1981; STONE, 2001) promove a sua ativação (MCLARNON e CURRY, 1990), o que causa aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (DANIELL, 1991). Além disso, a hiper estimulação do sistema glutamatérgico pelo ácido quinolínico, causa alteração em parâmetros glutamatérgicos como a estimulação da liberação de glutamato em preparações sinaptossomais e em fatias (STONE, 2001; TAVARES et al., 2002) e a inibição da captação de glutamato em cultura de astrócitos (TAVARES et al., 2002) e vesículas sinápticas (TAVARES et al., 2000).

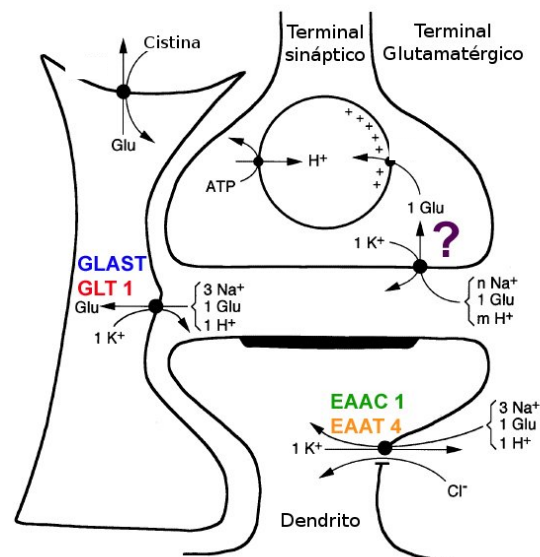


Figura 1.5 - Transportadores de glutamato e sua localização na sinapse glutamatérgica. GLT-1 e GLAST - Transportadores de glutamato presentes na membrana celular de células gliais; EAAC-1 - em todo o cérebro; EAAT-4 - somente nos dendritos das células de Purkinge - Transportadores de glutamato presentes na membrana celular pós-sináptica de neurônios; ? - Transportadores de glutamato presentes na membrana celular pré-sináptica de neurônios. A identidade molecular e a estequiometria destes transportadores não são conhecidos. Fonte: Adaptado de Danbolt (2001).

#### 1.6.1.4 Efeitos da desnutrição sobre o sistema glutamatérgico

Embora os relatos dos efeitos da desnutrição sobre o sistema glutamatérgico considerando os aspectos fisiológicos e a toxicidade do glutamato sejam escassos, a participação deste sistema em vários processos plásticos do cérebro (OZAWA et al., 1998) e sobre a memória e aprendizado (IZQUIERDO e MEDINA, 1997), processos que são afetados pela desnutrição (MORGANE et al., 2002), são amplamente descritos. Tonkiss et al. (1998) mostraram evidências comportamentais de que o sistema envolvendo aminoácidos excitatórios pode estar alterado em ratos que sofreram desnutrição protéica pré-natal. Fiacco et al. (2003), demonstraram aumentada densidade de receptores hipocampais de cainato em ratos adultos, porém densidade normal de receptores NMDA e AMPA em um modelo de desnutrição protéica pré-natal em ratos, sugerindo que o aumento na densidade poderia ser compensatório à diminuída liberação de glutamato em função da redução das fibras musgosas hipocampais, relatada em ratos desnutridos por Cintra et al. (1997). Concentrações cerebrais aumentadas de glutamato foram relatadas por Colombo et al. (1992) e Nayak e Chatterjee (2003) em resposta à desnutrição protéica. Recentemente, Rotta et al. (2003a), mostraram que a desnutrição pré e pós-natal afeta alguns parâmetros glutamatérgicos tais como: a sensibilidade de ratos adultos a convulsões induzidas por ácido quinolínico; diminui a ligação  $\text{Na}^+$ - independente de glutamato ao seu receptor em membranas sinápticas e a liberação basal de glutamato de preparações sinaptossomais, porém não a estimulada por  $\text{K}^+$ .

#### 1.6.2 Sistema GABAérgico

O ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do SNC adulto, é sintetizado em 20 a 30 % dos neurônios, pelos chamados neurônios GABAérgicos e é indispensável para o controle de funções do SNC como atividade locomotora, aprendizado e ritmo circadiano (VARJU et al., 2001). No SNC de vertebrados o GABA é o principal neurotransmissor inibitório (SILVILOTTI e NISTRÌ, 1991). Está localizado em interneurônios de axônios curtos que fazem sinapse com o corpo celular e axônios proximais, e mantém o

tônus inibitório que contrabalança a excitação neuronal. Quando este balanço é perturbado, pode ocorrer a convulsão (TREIMAN, 2001). O GABA é formado dentro dos terminais dos axônios GABAérgicos por meio da transaminação do  $\alpha$ -cetogluturato a ácido glutâmico (TREIMAN, 2001), que é descarboxilado a GABA pelas duas isoformas da ácido glutâmico descarboxilase GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> (ERLANDER e TOBIN, 1991; YAMASAKI et al., 1999) (figura 1.6). Ambas as isoformas estão presentes em “pools” de GAD solúvel e associadas à membrana (DIRKX et al., 1995; SHEIKH e MARTIN, 1996; KANAANI et al., 1999). A distribuição preferencial da GAD<sub>65</sub> em terminais nervosos e sua associação com vesículas sinápticas, sugere que possa estar envolvida na síntese de GABA vesicular que medeia a comunicação sináptica rápida (SHEIKH e MARTIN, 1996). Já a GAD<sub>67</sub>, predominantemente citoplasmática, poderia ser principalmente responsável pela síntese do “pool” não sináptico ou metabólico de GABA, que é conectado ao ciclo do ácido tricarboxílico e ao “shunt” de GABA (SOGO HOMONIAN e MARTIN, 1998; WAAGEPETERSEN et al., 1999). Observações de que camundongos que não expressam GAD<sub>65</sub> podem apresentar crescimento relativamente normal, porém com maior susceptibilidade a convulsões (ASADA et al., 1997), aumento da ansiedade (STORK et al., 2000) e falha de plasticidade cortical (MATAGA et al., 2002), enquanto que a não expressão de GAD<sub>67</sub> é letal (ASADA et al., 1997; CONDIE et al., 1997), são compatíveis com a noção de que GAD<sub>65</sub> é primariamente responsável pela síntese de GABA a ser usado como neurotransmissor, enquanto a GAD<sub>67</sub> é responsável pela síntese de GABA a ser usado para funções tais como molécula de sinalização no desenvolvimento, fonte de energia e fonte de GABA liberado via mecanismo não vesicular (JIN et al., 2003).

Antes da liberação na fenda sináptica, o GABA é transferido para vesículas sinápticas por ação de proteínas integrais de membrana, denominadas transportadores vesiculares de GABA (VGAT), as quais são cruciais para a função GABAérgica (McINTIRE et al., 1993; RAND et al., 2000; SHINGAI, 2000; TAKAMORI et al., 2000) e cuja atividade depende do pH e de gradientes elétricos (McINTIRE et al., 1997; SAGNÉ et al., 1997). No cérebro e medula espinhal de ratos adultos, VGAT está localizado em axônios inibitórios

terminais em neurônios GABAérgicos e glicininérgicos, onde está associado a vesículas sinápticas (CHAUNDRY et al., 1998; DUMOULIN et al., 1999).

A liberação pré-sináptica de GABA pode ser vesicular, cálcio dependente e estimulada por altas concentrações de potássio e não vesicular, cálcio independente e secundária à despolarização da membrana celular e influxo de sódio. A liberação não vesicular de GABA depende do transporte reverso de GABA (veja item 1.6.2.3.2) (TREIMAN, 2001). Depois da liberação de GABA dos terminais dos axônios e ação sobre receptores ionotrópicos e metabotrópicos (BORMANN, 2000), esta é terminada pela sua rápida recaptação via transportadores  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dependentes, ligados a membranas pré e pós-sinápticas de neurônios e também em células gliais (MINELLI et al, 1995, 1996), sendo então catabolizado pela GABA transaminase (GABA-T) a semialdeído succínico, que é convertido a ácido succínico pela semialdeído ácido succínico desidrogenase, entrando, então, no ciclo de Krebs (TREIMAN, 2001) (figura 1.6). O aumento da atividade da enzima GABA-T no cérebro, diminui as concentrações de GABA e pode levar a convulsões, coma e óbito. A inibição desta enzima aumenta consideravelmente as concentrações de GABA (JAYAKUMAR et al., 1999).

Enquanto o glutamato induz respostas metabólicas potentes nos astrócitos (diminuição do ATP e estimulação da captação de glicose - item 1.5.2), o GABA não acopla a atividade neuronal inibitória com a utilização de glicose, sugerindo, portanto, que o mecanismo de reciclagem de GABA não esteja ligado intrinsecamente à utilização da glicose em astrócitos (CHATTON et al., 2003).

#### 1.6.2.1 Sinalização GABAérgica durante o desenvolvimento

Amplas evidências na neurociência do desenvolvimento mostram que o sistema GABAérgico apresenta importante papel na maturação das redes neurais. Precocemente no desenvolvimento, o GABA atua como neurotransmissor excitatório, o que foi descrito em várias estruturas do SNC como o hipocampo (LEINEKUGEL et al., 1999; DZHALA et al., 2003), córtex (OWENS et al., 1996), hipotálamo (CHEN et al., 1996), tronco encefálico

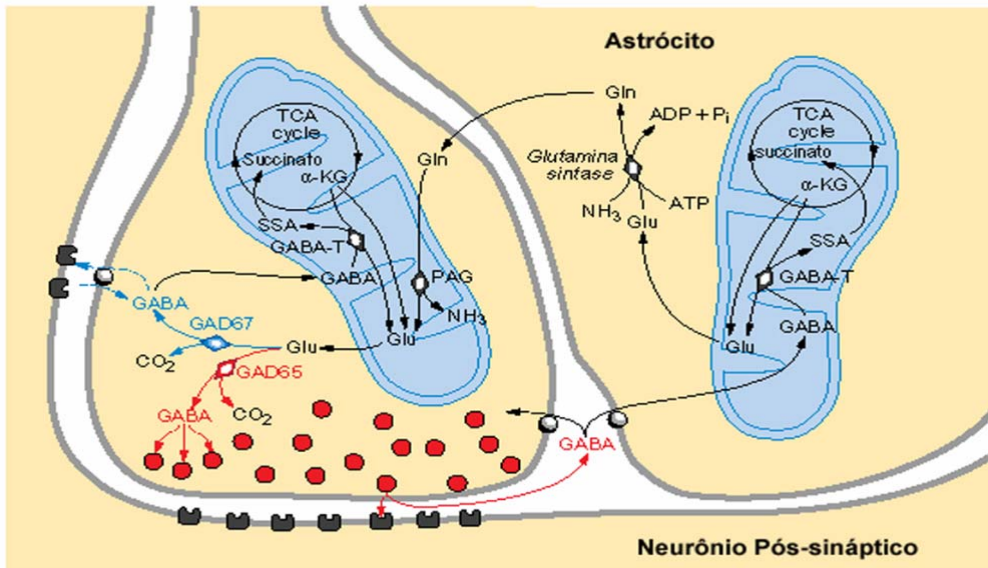


Figura 1.6 – Síntese de GABA a partir de glutamato no citosol neuronal pelas duas isoformas de glutamato descarboxilase. Embora GABA sintetizado pelas duas isoformas aparentemente possa ser usado para a transmissão sináptica, GAD65 parece estar concentrada em terminais nervosos e associada com vesículas e pode sintetizar a maior parte do transmissor GABA sob condições normais. GAD67 está distribuída mais uniformemente em neurônios e pode sintetizar a maior parte do GABA citoplasmático. GABA citoplasmático pode ser liberado pelo transporte reverso de GABA (linha pontilhada) e ativar receptores extra sinápticos. “Pools” vesicular e citoplasmático de GABA são mostrados em vermelho e azul, respectivamente. O precursor glutamato (Glu) é sintetizado a partir da glutamina (Gln) pela glutamina sintase ativada por fosfato (PAG) e de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) por várias enzimas, incluindo a GABA transaminase (GABA-T). GABA é degradado na mitocôndria em ambos, neurônios e astrócitos pela GABA-T, que produz semialdeído succínico (SSA); o SSA é então convertido a succinato, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A glutamina é sintetizada em astrócitos e exportada para os neurônios. Fonte: Soghomonian e Martin (1998).

(RITTER e ZHANG, 2000) e medula espinhal (WU et al., 1992). A despolarização induzida por GABA leva ao amplo aumento nas concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (KULLMANN et al., 2002; WHITE e PLATT, 2002), o que pode estar ligado aos efeitos neurotróficos do GABA (ZISKIND-CONHAIM, 1998), ao estimular um aumento do BDNF no SNC (MARTY et al., 1996).

Durante o desenvolvimento precoce, período no qual a neurotransmissão GABAérgica é menos proeminente, o GABA pode ser sintetizado mediante uma rota alternativa envolvendo a ornitina (SEILER, 1980), o que é reiterado por Waagepetersen et al. (1999), ao analisar o fato de em retina de aves o GABA ser encontrado antes da detecção de GAD (HOKOC et al., 1990) e a ornitina descarboxilase, enzima chave na síntese de

GABA a partir de poliaminas, estar presente na retina durante a ontogênese precoce (De Mello et al., 1976). A acumulação e liberação de GABA mediada por GATs (HATTEN et al., 1984 e TAYLOR e GORDON-WEEKS, 1989 *apud* VARJU et al., 2001) foi observada em cérebro perinatal bem antes das sinapses serem formadas. O GABA pode ser liberado de cones de crescimento mediante estimulação por altas concentrações de  $K^+$  por meio de mecanismo independente de  $Ca^{2+}$  devido ao transporte reverso dos GATs (TAYLOR et al., 1990; TAYLOR e GORDON-WEEKS, 1991). Durante o desenvolvimento embrionário, o aparecimento de GABA bem antes do início da sinaptogênese inibitória e a concomitante presença de fibras GABAérgicas, mecanismos de liberação de GABA e receptores, implica no fato de que ele atua como fator neurotrófico durante a neurogênese (VARJU, et al., 2001).

#### 1.6.2.2 Receptores de GABA

Os receptores GABA<sub>A</sub> são ionotrópicos, constituindo-se de um complexo de estrutura hetero-oligômera, cujas subunidades formam um canal de cloreto, o qual, ao aumentar o influxo, hiperpolariza o neurônio. Estes receptores medeiam a resposta inibitória rápida em cérebro de mamíferos (KORPI et al., 2002). A inibição é um processo fundamental na atividade cerebral, e, portanto, a maior parte das células neuronais expressam estes receptores nas suas membranas celulares (KORPI et al., 2002). Os receptores GABA<sub>A</sub> apresentam sítios de ligação para GABA, benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides, picrotoxina e etanol (figura 1.7a) (BORMANN, 1988; MacDONALD e OLSEN, 1994; KORPI et al., 2002).

Foram isoladas várias subunidades do complexo GABA<sub>A</sub> ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ 1-4,  $\delta$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ , segundo BORMANN, 2000). Segundo Treiman (2001), além destes existem as subunidades  $\rho$ . Parecem existir múltiplos subtipos de receptores (TREIMAN, 2001). As conjugações mais freqüentes são compostas de subunidades  $\alpha$ 1  $\beta$ 2  $\gamma$ 2 (BORMANN, 2000). Receptores compostos de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , contém duas subunidades  $\alpha$ , duas  $\beta$  e uma única subunidade  $\gamma$  (IM et al., 1995; CHANG et al., 1996; FARRAR et al., 1999). Na posição 2 de



receptores GABA<sub>A</sub>, a subunidade  $\alpha$ 1 tem uma valina, a subunidade  $\beta$  tem uma alanina, e a subunidade  $\gamma$  tem uma serina (TYNDALE et al., 1995 apud BELL-HORNER, 2000). Em um receptor expressando as três subunidades, modelos estequiométricos sugerem que na posição 2 do canal existam 2 valinas (da subunidade  $\alpha$ ), duas alaninas (da subunidade  $\beta$ ) e uma serina (da subunidade  $\gamma$ ). Embora a estequiometria dos receptores GABA<sub>A</sub> expressando subunidade  $\beta$  e  $\gamma$  não seja conhecida, e muitas possibilidades possam existir, presume-se que, pelo menos, duas a três ou mais das subunidades sejam  $\beta$  (BELL-HORNER, 2000).

Os subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> são formados por diferentes combinações de subunidades, cuja expressão em diferentes células e regiões do cérebro e propriedades farmacológicas variam (KORPI et al., 2002). Sperk et al. (1997) sugerem que a distribuição das subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> difere entre células e mesmo entre regiões do mesmo neurônio. Mudanças na expressão das subunidades ocorrem em resposta a tratamento com drogas, como, por exemplo, o etanol, barbitúricos, neuroesteróides e benzodiazepínicos. Portanto, a densidade relativa de subtipos de receptores e sua eficácia funcional no cérebro adapta-se a um ambiente interno alterado (KORPI et al., 2002).

Um segundo tipo de receptores ionotrópicos foi descrito em retina de vertebrados. Compostos de sub-unidades  $\rho$ , estes receptores de GABA, insensíveis à bicuculina e baclofen, são frequentemente denominados de receptores GABA<sub>C</sub> (BORMANN, 2000; ALAKUIJALA et al., 2005) (figura 1.7c), embora não seja esta a recomendação do "IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification", que sub-classifica estes receptores como GABA<sub>A0r</sub> (BARNARD et al., 1998).

Já os receptores GABA<sub>B</sub> ligados a proteínas G, hiperpolarizam o neurônio aumentando a condutância do potássio e diminuindo o influxo de cálcio, tendo efeito inibitório lento. Estão presentes em terminais de axônios excitatórios e inibitórios e são ativados por baclofen e resistentes a drogas que modulam os receptores GABA<sub>A</sub> (SCHWARTZWELDER et al., 1986; BORMANN, 1988; BOWERY, 1989; MARSHAL et al., 1999). A ativação está associada à diminuição na liberação do neurotransmissor, e,

portanto, agonistas de receptor GABA<sub>B</sub>, como o baclofen, sob certas circunstâncias, podem ser anticonvulsivantes (SCHWARTZWELDER et al., 1986), e, em outros paradigmas experimentais, ser pró-convulsivantes (MOTT et al., 1989).

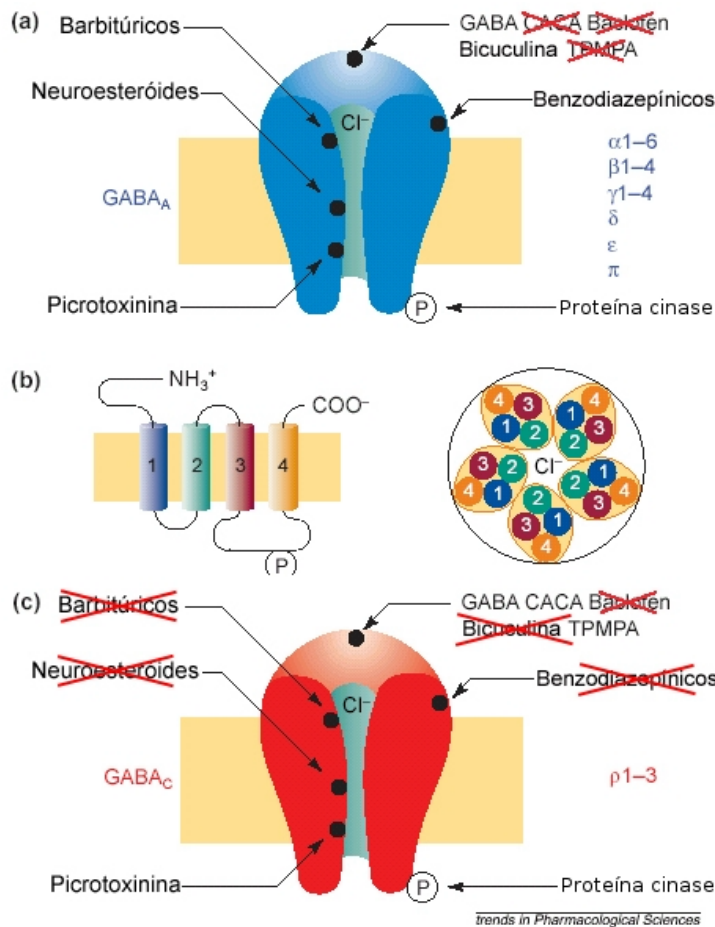


Figura 1.7 – Receptores ionotrópicos de GABA. (a) Receptor GABA<sub>A</sub> (canal de Cl<sup>-</sup> de 5Å de diâmetro e sítios ligantes modulatórios para benzodiazepínicos, barbituratos e neuroesteróides): As respostas ao GABA são bloqueadas competitivamente por bicuculina e não competitivamente por picrotoxina; são modulados intracelularmente por proteínas cinases, tais como as proteína cinase A e C. O agonista do receptor GABA<sub>C</sub> CACA (ácido cis-4-aminocrotônico) e o antagonista do receptor GABA<sub>C</sub> TPMPA [1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il(metilfosfínico ácido)] não têm efeito. Da mesma forma, o agonista de receptor GABA<sub>C</sub> baclofen é inativo. O complexo do receptor GABA<sub>A</sub> de vertebrados constitui-se de 5 subunidades, pertencendo a diferentes famílias (α 1-6, β 1-4, γ 1-4, δ, ε e π) (b) Cada subunidade compreende quatro domínios transmembrana (TM1-TM4). A alça maior entre TM3 e TM4 contém sítios de consenso para fosforilação por proteínas cinases (P). O receptor GABA<sub>A</sub> mais abundante no cérebro está na isoforma α1 β2 γ2. (c) Assume-se que a topologia de membrana do receptor GABA<sub>C</sub> seja muito similar à dos receptores GABA<sub>A</sub>, porém, receptores GABA<sub>C</sub> são compostos exclusivamente de subunidades ρ (ρ1-3), que podem ser expressas em receptores homo oligoméricos ou pseudo homo-oligoméricos. O receptor GABA<sub>C</sub>, também composto de canais Cl<sup>-</sup> e ativado seletivamente por CACA, é bloqueado competitivamente por TPMPA e não competitivamente por picrotoxina. Bicuculina, baclofen, assim como drogas que modulam o receptor GABA<sub>A</sub> são todas inativas neste receptor. As respostas de GABA<sub>C</sub> são “down” reguladas por meio de fosforilação intracelular pela proteína cinase C.

Fonte: Bormann (2000).

### 1.6.2.3 Transporte de GABA

Dado o papel crucial da transmissão GABAérgica no funcionamento cerebral, grandes esforços de pesquisa foram direcionados para este tema nas últimas décadas. A maior parte dos estudos enfocando fatores pré e pós-sinápticos (em particular, receptores de GABA), gerando amplo escopo de dados sobre o seu papel no processamento de informações e na fisiopatologia (e, em alguns casos, na terapia) nas enfermidades em humanos. Os estudos sobre os GATs permaneceram em plano secundário, apesar da sua óbvia importância. Revisões da literatura mostram um complexo e heterogêneo sistema mediando a captação de GABA. O complexo e assíncrono padrão de maturação dos GATs, por sua vez, sugere que o transporte de GABA pode contribuir para a cascata de eventos levando à sinaptogênese inibitória e à maturação neuronal durante o desenvolvimento precoce.

Enquanto na neurotransmissão glutamatérgica, os transportadores astrocitários são os mais proeminentes, na neurotransmissão GABAérgica a captação em terminais nervosos pré-sinápticos prevalece sobre a captação pelos astrócitos (SCHOUSBOE, 2003), o que dá suporte à noção de que a neurotransmissão GABAérgica está preferencialmente baseada na reciclagem de GABA (SCHOUSBOE et al., 2004). Isto não implica no fato de que o transporte glial não tenha importância funcional. Pelo contrário, inibidores do transporte astroglial de GABA são capazes de aumentar a disponibilidade de GABA no “*pool*” dos neurotransmissores (SCHOUSBOE, 2003; SARUP et al, 2003 a,b), sugerindo que a captação glial de GABA constitui importante fator regulador da disponibilidade de GABA na sinapse (SCHOUSBOE et al., 2004).

Levando em consideração que o tônus GABAérgico diminuído relativamente ao da neurotransmissão excitatória, pode resultar em atividade convulsivante (MELDRUM, 1975; WOOD, 1975), uma série de drogas anticonvulsivantes atuando na neurotransmissão GABAérgica foi desenvolvida (LÖSCHER, 1998). Enquanto o GABA captado pelos neurônios GABAérgicos pode ser reutilizado como neurotransmissor, o captado em células gliais circunvizinhas é consumido no metabolismo via GABA transaminase e ciclo do ácido

tricarboxílico (SCHOUSBOE et al., 1983, 2003). Partindo deste princípio e baseados no fato de que existe uma correlação estabelecida entre atividade anticonvulsivante de inibidores de transporte astroglial de GABA, enquanto que esta correlação parece não existir para a inibição neuronal de captação de GABA (WHITE et al., 2002), o desenvolvimento de drogas antiepilépticas, cuja ação é baseada na inibição seletiva do transporte astrocitário, é de grande importância farmacológica.

#### 1.6.2.3.1 Transportadores de GABA em membrana celular de cérebro de mamíferos: subtipos, localização e desenvolvimento

Além da biossíntese, liberação e interação com seu receptor, a inativação de neurotransmissores é condição para garantir adequadas funções cerebrais. Na finalização da atividade GABAérgica são responsáveis transportadores de alta afinidade, localizados no terminal pré-sináptico de interneurônios, em processos gliais adjacentes (CHERUBINI e CONTI, 2001; GADEA E LOPEZ-COLOME, 2001) e, possivelmente, também em membranas celulares pós-sinápticas (FRAHM e DRAGUHN, 2001). Foram caracterizados e clonados quatro transportadores de GABA ligados à membrana<sup>5</sup>, dependentes de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (GUASTELLA et al., 1990; LOPÉZ-CORCUERA et al., 1992; LIU et al., 1992, 1993; BORDEN, 1996; BORDEN et al., 1992, 1994, 1995; CLARK et al. 1992): GAT-1, GAT-2, GAT-3 (de alta afinidade) e BGT-1 (de baixa afinidade) (GADEA e LOPEZ-COLOME, 2001), os quais apresentam diferentes afinidades por GABA. Em ordem decrescente de afinidade GAT-3 ≥ GAT-1= GAT-2 >> BGT-1. Um K<sub>m</sub> para GABA próximo de 100μM foi calculado para BGT-1, uma a duas ordens de magnitude superiores do que para GAT-1, 2 e 3 (0,8-12μM ) (LIU et al., 1993; THOMSEN et al., 1997).

---

<sup>5</sup> Foi utilizada a nomenclatura de Guastella et al. (1990) e Borden (1996) que se referem ao cDNA de cérebro de ratos. A clonagem dos GATs na década de 1990 trouxe uma discrepância na nomenclatura de transportadores homólogos entre espécies, tornando-se confusa, devido ao fato do GAT2 de camundongos (mGAT2) ser o homólogo de BGT-1 de outras espécies (ratos, cães e humanos). Liu et al. (1993) introduziram uma nomenclatura que identifica cDNA clones de cérebro de camundongos que codificam quatro GATs, denominando-os de GAT1 – GAT4 (não sendo usado o hífen entre GAT e o número). Enquanto mGAT1 de camundongo é homólogo de rGAT-1, mGAT2, mGAT3 e mGAT4 são homólogos de BGT-1, rGAT-2 e rGAT-3, respectivamente. Além disso rGAT-3 é idêntico ao clone denominado GAT-B por Clark et al. (1992).

GAT-1 e GAT-3 são os principais GATs no SNC (IKEGAKI et al., 1994; DURKIN et al., 1995; MINELLI et al., 1995, 1996; YAN e RIBAK, 1998), onde são expressos com exclusividade (DALBY, 2003; CHATTON, et al., 2003; LIU, 1993). Uma vez que o BGT-1, presente no cérebro em neurônios e glia (BORDEN, 1996; NOREMBERG et al., 2000), exibe baixa afinidade por GABA (LIU et al., 1993), sua efetividade em regular os níveis de GABA no cérebro é dúbia (DALBY, 2003). Da mesma forma os efeitos do GAT-2 sobre as respostas mediadas por GABA parecem ser de menor importância (CONTI et al, 2004) dada à escassa expressão neuronal e astrocitária do GAT-2 durante o desenvolvimento (EVANS et al., 1996; MINELLI et al., 2003a).

Dados farmacológicos controversos, quando da utilização de inibidores seletivos de transportadores (SARUP et al., 2003 a,b), apontam para a possibilidade de que possam existir outros transportadores de GABA ainda não clonados (SCHOUSBOE, 2003, 2004).

GAT-1, o mais expresso transportador de GABA em córtex cerebral de rato adulto, localiza-se principalmente em neurônios, estando também presente em células gliais (MINELLI et al., 1995; GADEA e LOPEZ-COLOME, 2001). GAT-3, por sua vez, embora também esteja presente em neurônios, é preferencialmente expresso em células astrogliais (MINELLI et al., 1996, 2003a; RIBAK et al., 1996a, b; DeBIASI, 1998) (figura 1.8).

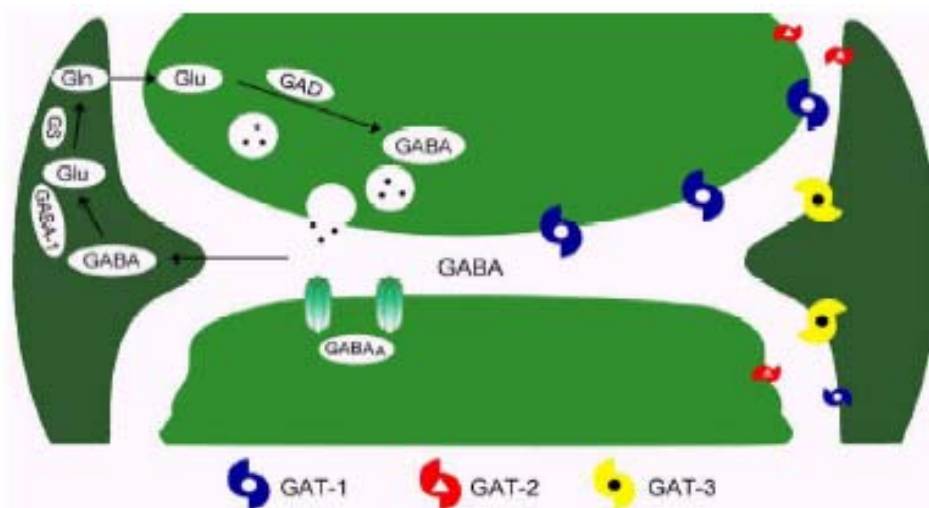


Figura 1.8- Representação esquemática da localização dos Transportadores de GABA em sinapses corticais. GAT-1 é representado em azul, GAT-2 em vermelho e GAT3 em amarelo. Fonte: Adaptado de de Conti et al. (2004).

Enquanto que o GAT-3 é encontrado em astrócitos em neocórtex adulto, no período perinatal ele é encontrado de forma expressiva em neurônios corticais GABAérgicos (MINELLI et al., 2003a), sugerindo que a liberação de GABA seja mediada pelo GAT-3 via transporte reverso (CONTI et al., 2004), propiciando, ao menos em parte, a liberação de GABA não vesicular (MINELLI et al., 2003b). As concentrações de GABA nesta fase são relativamente altas (figura 1.9) e ele atua de forma parácrina (DEMARQUE et al., 2002; OWENS e KRIEGSTEIN, 2002ab; NGUYEN et al., 2003) como fator trófico influenciando a maturação neuronal (BEHAR et al., 1994; LaMANTIA, 1995) mediante mecanismos mediados via receptor (SORIA e VALDELMILLOS, 2002). Uma vez que o GAT-3 é o transportador mais expresso onde os receptores GABA<sub>A</sub> também estão mais densamente representados (POULTER et al., 1992, 1993; FRITSCHY, et al., 1994), ele poderia estar envolvido na modulação da ação trófica do GABA (CONTI et al., 2004). Por outro lado, é sugerido um papel na formação e maturação de sinapses corticais GABAérgicas, mediado pelo GAT-1 (CONTI et al., 2004), haja visto que o desenvolvimento da sua expressão é coordenado com o de outras proteínas pré-sinápticas GABAérgicas, quais sejam, a enzima sintetizadora GAD (WOLFF et al., 1984; HACHIYA e TAKASHIMA, 2001) e o transportador vesicular VGAT (MINELLI et al., 2003b). Além disso, o desenvolvimento do GAT-1 é paralelo ao da subunidade  $\alpha 1$  do receptor GABA<sub>A</sub> (LAURIE et al., 1992; FRITSCHY et al., 1994), que participa na transmissão GABAérgica madura.

Em ratos, o perfil de desenvolvimento dos GATs pode contribuir para a determinação de fatores que regulam o desenvolvimento dos sinais mediados por GABA. Há evidências de que a maturação do GAT-1 atinge padrões adultos somente em P30-45 (YAN et al., 1997) e de que o mRNA e proteína do GAT-1 são detectados apenas no período embrionário tardio. Sua expressão em córtex neonatal é pequena e aumenta gradualmente nas duas primeiras semanas de vida pós-natal (EVANS et al., 1996; JURSKY e NELSON, 1996; MINELLI et al., 2003b). Em P1, o mRNA de GAT-1 perfaz 28% dos níveis do adulto e entre P10-30, excede os valores de adulto em 25-40% (XIA et al., 1993). A expressão

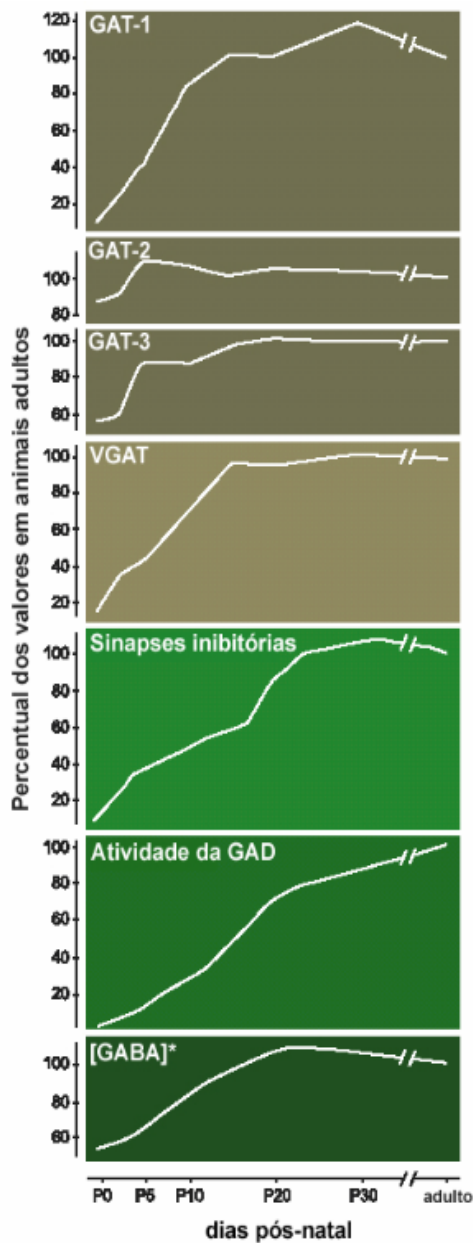


Figura 1.9 - Representação esquemática da maturação pós-natal dos GATs e outros marcadores GABAérgicos em córtex cerebral de roedores. \* Dados relativos ao cérebro total. Fonte: Adaptado de : de Conti et al. ( 2004).

transitória maior de GAT-1 em corpo celular de neurônios e astrócitos relatada (YAN et al., 1997), e o pico acima dos valores de adulto no período intermediário e fases tardias da maturação cortical (HACHIYA e TAKASHIMA, 2001; MINELLI et al., 2003b; XIA et al., 1993; YAN et al., 1997), está em consonância com estudos que mostram que em córtex em desenvolvimento, a captação de GABA transitoriamente excede valores de adultos. O perfil

de captação de GABA durante o desenvolvimento é descrito como perfazendo 170-190% dos valores de adulto, aproximadamente no 15º dia de vida pós-natal (WONG e McGEER, 1981); como próximo aos valores de adultos ao nascimento, com um pico acima destes entre uma a duas semanas após o nascimento e declínio aos valores do adulto na quarta semana (COYLE e ENNA, 1976) ou 21 dias (HITZEMAN e LOH, 1978); como aumento progressivo em telencéfalo a partir do terceiro dia após o nascimento e, no tronco encefálico, valores excedentes ao de adultos em P10 (BLAKELY, 1991); e como valores excedentes aos de adultos já em P7 (REDBURN, 1977 *apud* CONTI et al., 2004).

Relativamente ao GAT-2, ele é pouco expresso no período pós-natal precoce, o que não se altera significativamente durante o desenvolvimento pós-natal (MINELLI et al., 2003a). O GAT-3 aumenta rapidamente na primeira semana, atingindo padrões adultos em P20. Portanto, no período precoce de desenvolvimento, o GAT-3 provavelmente responde pela maior fração do transporte de GABA no córtex neonatal (MINELLI et al., 2003a).

#### 1.6.2.3.2 Fisiologia do transporte, regulação da expressão, sítios de união e especificidade de substrato dos GATs

Foi proposto que transportadores de neurotransmissores  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dependentes são compostos por 12 domínios transmembrana ligados por 6 alças hidrofílicas com os terminais amino e carboxil, localizados intracelularmente (GUASTELLA et al., 1990) no lado citoplasmático da membrana (AMARA e KUHAR, 1993) (figura 1.10). Estudos mutagênicos, em particular com o GAT1, mas também com outros membros da família, sugerem a importância dos domínios transmembrana I e III na interação do transportador com os neurotransmissores, assim como com o sódio e o cloreto (MAGER et al., 1996; BISMITH et al., 1997; CHIN et al., 1997; BARKER et al., 1999). Segundo Zomot e Kanner (2003), as alças extracelulares III, IV e V contêm determinantes para a seletividade e afinidade por GABA.

Relativamente aos terminais intracelulares N e C, enquanto é sugerido que domínios intracelulares do transportador regulem o transporte do substrato, em função de que a



sintaxina 1A liga-se ao terminal N do GAT-1 (BENETT et al., 2000), o papel funcional do terminal C ainda não está bem estabelecido (MABJEESH e KANNER, 1992).

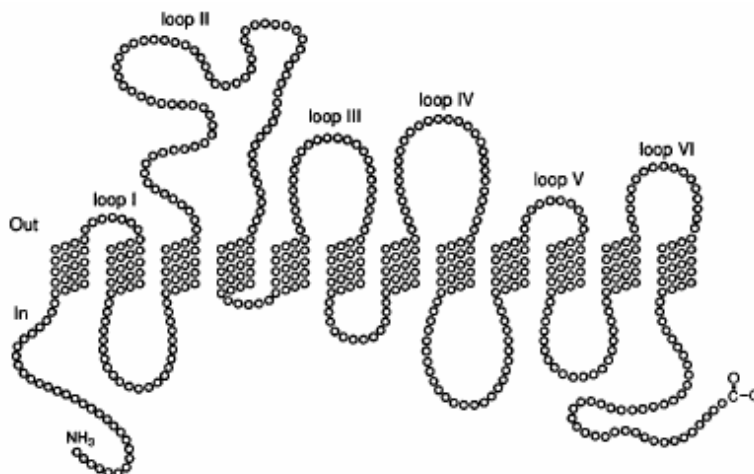


Figura 1.10 – Representação esquemática do GAT-1.  
Fonte: Tamura et al. (1995).

O principal fator que diferencia GAT-1 dos outros três transportadores é a especificidade de substrato. Enquanto GAT-1 exclusivamente transporta GABA, os outros transportadores também são capazes de transportar  $\beta$ -alanina e taurina (GUASTELLA et al., 1990; KANNER e BENDAHAN, 1990; NELSON et al., 1990; RADIAN et al., 1990; BORDEN et al., 1992; CLARK et al., 1992; LÓPEZ-CORCUERA et al., 1992; LIU et al., 1993; JURSKY et al., 1994). Conseqüentemente, a  $\beta$ -alanina e a taurina inibem o transporte de GABA pelo GAT-2, GAT-3 e BGT-1 (denominados GAT2,3 e 4 pelos autores), mas não tem efeito sobre o transporte de GABA por GAT-1 (TAMURA et al., 1995). A seqüência de aminoácidos das seis alças externas de vários tamanhos é aproximadamente similar entre GAT-2,-3 e BGT-1 e significativamente diferente no GAT-1. Nas regiões III, IV, V e VI a seqüência de aminoácidos de GAT1 é exclusiva e, segundo proposição de Tamura et al. (1995), são três aminoácidos na alça V que participam no domínio de ligação da  $\beta$ -alanina.

O transporte de GABA é eletrogênico, com uma estequiometria para o co-transporte de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-:\text{GABA}$  de 2:1:1 (GUASTELLA et al., 1990; KAVANAUGH et al., 1992; MAGER et al., 1993; CLARK e AMARA, 1994; CAMMACK et al., 1994; LU e HILGEMANN, 1999),

embora a estequiometria para o BGT-1 expresso em *Xenopus oocytes* possa ser de 3:2 – 1:1 para  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-:\text{GABA}$  (MATSKEVITCH et al., 1999). Controversamente, foi proposto também que, durante o transporte acoplado de GABA e sódio, obrigatoriamente ocorre a troca de cloreto intra e extra celular (LOO et al., 2000). Dada a estequiometria do transporte de GABA, e estabelecido um potencial de membrana despolarizada e suficiente concentração intracelular de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e GABA, é possível o transporte reverso (ATWELL et al., 1993; CAMMACK et al., 1994). Portanto, transportadores de GABA agem de forma bidirecional e podem mediar o efluxo, assim como influxo, de GABA a depender do ambiente iônico (NELSON e BLAUSTEIN, 1982). Ou seja, adicionalmente à função de remoção de GABA, liberado espontaneamente ou por impulsos pré-sinápticos, outra função dos transportadores inclui, além da reposição de suprimento de GABA em neurônios inibitórios, a liberação de GABA em um mecanismo voltagem dependente, porém,  $\text{Ca}^{2+}$  independente (LESTER et al., 1996). Por longo tempo afirmou-se que o transporte reverso ocorre em resposta a estímulos patológicos, mas novos dados mostram que alguns transportadores podem também reverter em resposta a estímulos fisiológicos relevantes (SZERB, 1979; BERNATH e ZIGMOND, 1988; RICHERSON e WU, 2003).

Em geral, a regulação funcional dos transportadores ocorre ou pela alteração da velocidade da translocação de substrato por meio do transportador, ou pela alteração do número funcional de transportadores na superfície celular (QUICK et al., 2004). As moléculas de GAT-1 apresentam uma densidade de 800 a 1300 por  $\mu\text{m}^2$  em botões pré-sinápticos, porém, 61-63% destas moléculas estão na superfície da membrana, enquanto os remanescentes estão a poucos centenas de nanômetros, dentro do citoplasma (CHIU et al., 2002) em pequenas vesículas de 50nm de diâmetro (DEKEN et al., 2003). A modulação da rápida redistribuição do transportador, entre localização intracelular e a membrana plasmática, pode ocorrer em parte por fatores como pH, segundos mensageiros como as cinases e fosfatases (CASADO et al., 1993; CONRADT e STOFFEL, 1997; HUFF et al., 1997; RAMAMOORTHY et al., 1998) ou pela regulação da interação do transportador com outras proteínas sinápticas, como, por exemplo, a syntaxina (BECKMAN et al. 1998).

Os GATs são regulados por fosforilação pela proteína cinase C (PKC) ou tirosina cinase (BECKMANN et al., 1999; BERNSTEIN e QUICK, 1999; LAW et al., 2000). No caso do GAT-1, mais extensivamente estudado, a ativação da proteína cinase C por ésteres de forbol e receptores acoplados a proteínas G envolvidas na ativação da PKC (GOMEZA et al., 1991; COREY et al, 1994; OSAWA et al. 1994; SATO et al., 1995; BECKMAN et al., 1999) causa uma redução do número de transportadores na membrana celular, o que é presumivelmente mediado por uma interação de GAT-1 com o aparelho vesicular de exocitose (BECKMAN e QUICK, 1998), com subsequente redistribuição do transportador da superfície celular para localização intracelular (BECKMAN et al. 1998; LAW et al., 2000). Portanto, uma inibição da PKC aumenta a captação de GABA (MAUS et al., 2002). Por outro lado, a fosforilação da tirosina no GAT-1, mediada por BDNF, aumenta o número de transportadores na superfície da membrana celular (LAW et al., 2000), devido a uma lentificação na taxa de internalização deste transportador (WHITWORTH e QUICK, 2001). As ações opostas da atividade da tirosina cinase e da PKC, possibilitam que a distribuição subcelular de GAT-1 esteja associada com eventos de fosforilação dos transportadores mutuamente excludentes e que a abundância relativa destes estados determina, em parte, a distribuição deste transportador (QUICK et al., 2004).

O GAT-1 está associado com, e é regulado por (DEKEN et al., 2003) SNARE (soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment protein receptor) que é, parte do aparato envolvido no acoplamento e fusão das vesículas sinápticas contendo neurotransmissores na membrana plasmática (SÜDHOFF, 1995). A interação com a syntaxina 1A aumenta a expressão de GAT-1 na superfície celular (HORTON e QUICK, 2001). Já a internalização está associada com processos clatrina e dinamina- dependentes (DEKEN et al., 2000) e aproximadamente 5% dos GAT-1 localizados na superfície são internalizados a cada minuto no estado basal (WITHWORTH e QUICK, 2001). Portanto, um balanço de recorrentes exocitose e endocitose determina a expressão de GAT-1. Contudo, vários fatores podem alterar este balanço. Substratos dos transportadores aumentam a

expressão na superfície, enquanto antagonistas dos transportadores os diminuem (BERNSTEIN e QUICK, 1999).

A redistribuição dos transportadores de, e para, a membrana plasmática sugere, segundo Deken et al. (2003), um papel para este tráfego na regulação de níveis de neurotransmissores na fenda sináptica. Um método para controlar os níveis de neurotransmissores poderia ser a regulação da redistribuição de transportadores, em paralelo com a liberação de neurotransmissores.

#### 1.6.2.3.3 Expressão de GATs em doenças neuropsiquiátricas

Embora vários relatos de alterações no transporte de GABA em enfermidades neuropsiquiátricas tenham sido feitos, nos deteremos sinteticamente na abordagem de alterações mais evidentes e que estejam no escopo do tema desta tese, quais sejam, a esquizofrenia pela relatada relação com a desnutrição (HOECK et al., 1998, SUSSER et al., 1996, SUSSER e LIN, 1992); a isquemia como forma de injúria que reverte a expressão de GAT-3 ao padrão imaturo (MELONE et al., 2003), possibilidade que será abordada posteriormente em relação à desnutrição e epilepsia, em função do modelo de convulsão utilizado nesta tese.

Na esquizofrenia a redução da imunoreatividade para o GAT-1 em um grupo de neurônios inibitórios (LEWIS et al., 1999), parece ser devida a alterações na expressão gênica, resultando em alterações na neurotransmissão GABAérgica e contribuindo para a disfunção cortical pré-frontal, característica da esquizofrenia (VOLK et al., 2001).

Em modelo experimental de isquemia, Melone et al. (2003) mostraram uma marcada alteração seletiva na expressão de GAT-3 na região perilesional, enquanto a expressão de GAT-1 permanece inalterada. GAT-3 em processos distais astrocíticos é reduzido em córtex perilesional e numerosos neurônios corticais, a grande maioria dos quais piramidais, tornam-se GAT-3 positivos, particularmente no córtex perilesional. Estes neurônios não são apoptóticos (são TUNEL negativos) e expressam HSP70. Estes dados sugerem que GAT-3 em neurônios não representam um evento pré-terminal e que os neurônios GAT-3 positivos,

portanto, contribuem para os mecanismos adaptativos que ocorrem no córtex perilesional (MELONE et al., 2003).

Neurônios corticais expressando GAT-3 constituem uma conhecida instância fisiológica no desenvolvimento precoce (MINELLI et al., 2003), indicando que durante a isquemia a expressão de GAT-3 possa sofrer uma reversão a seus padrões imaturos. A reativação de padrões da expressão gênica embrionária pode ocorrer no cérebro após injúria induzida pela hipóxia (KIETZMANN et al., 2001). Embora GAT-3 neuronal no cérebro isquêmico possa desempenhar funções com diferentes conseqüências para o organismo quando comparado ao neocortex em desenvolvimento, Conti et al. (2004) especulam sobre a possibilidade de que esta seja parte de uma reprogramação genética, ocorrendo em resposta à injúria.

Em ratos, um aumento de mRNA de GAT-1 em neocortex (OROZCO-SUAREZ et al., 2000) e de GAT-1 e -3 em hipocampo (HIRAO et al., 1998 ; UEDA e WILLMORE, 2000a; SPERK et al, 2003) foi relatado em diferentes modelos de convulsão. Os aumentos foram tempo e região-dependentes. Estes dados sugerem que a atividade convulsivante está associada a um aumento da expressão de GATs. Dados mostrando que camundongos transgênicos hiperexpressando GAT-1 (HUA et al., 2001), apresentam aumentada susceptibilidade a convulsões induzidas quimicamente por drogas relacionadas ao sistema GABAérgico, como a picrotoxina e o pentilenotetrazol (ZHAO et al., 2003), e também por ácido caínico (ZHAO et al., 2003; HUA et al., 2001), assim como dados que mostram o aumento do transporte de GABA mediado pelo GAT-1, em associação com convulsões em cepa de camundongos geneticamente epiléticos (FUETA et al., 2003), dão suporte a esta possibilidade. Corroborando com esta hipótese, Mathern et al. (1999) relatam diferenciada imunoreatividade para os transportadores de GABA, GAT-1 e GAT-3, e de glutamato, EAAT1, EAAT2 e EAAT3 em hipocampo de pacientes com epilepsia lobo-temporal, quando comparados com autópsias de pacientes não epiléticos. Em hipocampo de "gerbils" (*Meriones unguiculatus*), Kang et al. (2001), relatam uma forte imunoreatividade para GAT-1 no complexo hipocampal, em um grupo de "gerbils" suscetíveis à convulsão no período pré-

convulsão, diminuída no período pós-ictal (30 min), com retorno aos níveis pré-convulsão 12 horas após.

Por outro lado, vários estudos em modelos animais de epilepsia sugerem uma “*down-regulation*” da captação de GABA, em nível da expressão ou função dos transportadores (JANJUA et al, 1991; JEFFWERYYS et al., 1991; AKBAR et al., 1998; SUTCH et al., 1999; ANDRE et al., 2001; PATRYLO et al., 2001). A captação cortical de GABA é reduzida em diferentes modelos genéticos de ratos e camundongos epiléticos (CORDERO et al, 1994; SUCHT el al., 1999), e a expressão do mRNA do GAT-1 é reduzida em neocórtex de ratos geneticamente propensos à epilepsia (AKBAR et al., 1998) e em córtex sensorio motor de ratos em modelo de epilepsia lobo temporal, induzido por pilocarpina (SILVA et al., 2002). Alguns estudos evidenciam uma diminuição na expressão ou eficácia de transportadores de GABA em humanos com epilepsia lobo-temporal crônica (DURING et al., 1995; PATRYLO et al., 2001). Além da redução, Spreafico et al. (2000) relatam distribuição anormal de GAT-1 em neocórtex de pacientes com epilepsia lobo temporal e displasia focal.

A inerente dificuldade em isolar modificações primárias da expressão dos GATs, das mudanças adaptativas secundárias, assim como o emprego dos diferentes modelos tornam a interpretação destes dados dificultosa (CONTI et al., 2004). A aumentada expressão dos GATs poderia ocasionar maior recaptação de GABA para o *pool* e diminuir níveis extracelulares de GABA, contribuindo, portanto para, a origem e disseminação da atividade epilética. Nesta linha de evidências, bloqueadores seletivos de GAT-1 (ADKINS e NOBLE, 1998; LEACH e BRODIE, 1998; LUER e RHONEY, 1998; MELDRUM e CHAPMAN, 1999; SOUDIJN e van WIJNGAARDEN, 2000) e gliais (DALBY, 2000; GADEA e LOPEZ-COLOME, 2001; SARUP et al., 2003a; WHITE et al., 2002), possivelmente mediados por GAT-3, mostram ter atividade anticonvulsivante. Alternativamente, uma vez que os transportadores de GABA podem trabalhar em reverso (ATTWELL et al., 1993; JAFFE e FIGUEROA, 2001, WU et al, 2003; RICHERSON e WU, 2003), um aumento dos GATs, após continuada atividade neuronal pode induzir uma compensatória liberação de GABA via

mecanismo não vesicular mediado por transportador (DURING et al., 1995; GASPARY et al., 1998; WU et al., 2003), ou seja, estas alterações podem ser parte da ação bidirecional dos GATs como resposta à convulsão (ictal) que resulta em aumento da liberação de GABA não vesicular (UEDA e WILLMORE, 2000a). Aumentos na expressão de GAT-3, após convulsão em modelo envolvendo neurodegeneração do complexo hipocampal (HIRAO et al., 1998; UEDA e WILLMORE, 2000a) são associados à possível gliose reativa ao dano ou morte neuronal.

Por outro lado, a redução do transporte de GABA e expressão dos GATs poderia representar uma resposta compensatória, modulando homeostaticamente a hiperexcitação neuronal (SOUDIEN e van WIJNGAARDEN, 2000). Alternativamente, a reduzida expressão de GATs em tecidos epiléticos pode exacerbar a atividade epileptiforme ao diminuir o heterotransporte de GABA (DURING et al., 1995; GASPARY et al., 1998; PATRYLO et al., 2001).

A alteração da expressão dos GATs, descrita na literatura, parece ser dependente do período considerado para a avaliação, do modelo (geneticamente predispostos ou não), do tipo de indução de convulsão (aguda ou *kindling*), do fator convulsivante e da região do cérebro estudada. Embora estes estudos não forneçam respostas definitivas sobre as implicações fisiopatológicas das alterações encontradas, mostram que estas alterações são compatíveis com um papel dos GATs nas disfunções cerebrais.

#### 1.6.2.4 Ação convulsivante do antagonista GABAérgico picrotoxina

A picrotoxina (uma mistura racêmica de picrotina e o agente ativo picrotoxina, isolada da semente da *Anamirta cocculus L.*) liga-se a um sítio localizado dentro do canal de  $Cl^-$  acoplado aos receptores  $GABA_A$  (NEWLAND e CULL-CANDY, 1992; GURLEY et al., 1995), bloqueando estes por meio da (BELL-HORNER et al., 2000) diminuição do tempo (SIERRA-PAREDES et al., 1998) e da frequência de abertura (TWYMAN et al., 1989). Isto acarreta um desequilíbrio entre as funções excitatórias e inibitórias no SNC (SIERRA-PAREDES et al., 1998). Este modelo de convulsões, relacionado ao sistema GABAérgico, é

utilizado frequentemente para avaliar a efetividade de drogas anticonvulsivantes e também para avaliar o estado funcional do sistema GABAérgico, ou seja, alterações na neurotransmissão mediada por GABA seguida à diferentes drogas e/ou manipulações (PERICIC et al., 1996).

Conhecida por décadas como antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> (CONSTANTI, 1978; BARKER et al., 1983), em anos mais recentes mostrou-se também que a picrotoxina inibe o fluxo de Cl<sup>-</sup> em receptores da glicina (SCHMIEDEN et al., 1989), GABA<sub>C</sub> (ZHANG et al., 1995) e receptores de glutamato acoplados a canais de Cl<sup>-</sup> (ETTER et al., 1999), inibindo todos os membros da super família de ligantes de canais iônicos ânion seletivos, sendo este espectro extendido inclusive ao ligante de canais iônicos, cátion seletivo, receptor 5-HT<sub>3a</sub> (DAS et al., 2003).

Embora seu sítio exato de ligação não seja conhecido, há evidências indicando que a picrotoxina atue no aspecto citoplasmático do domínio TM2 do receptor GABA<sub>A</sub> (BUHR et al., 2001; DIBAS et al., 2002). Estudos indicam alguma seletividade relativa a subunidades de receptores GABA<sub>A</sub>. A habilidade da picrotoxina em bloquear receptores GABA<sub>A</sub> não muda significativamente em receptores expressando diferentes isoformas das subunidades  $\alpha$ , porém, receptores que não contêm esta subunidade são mais sensíveis ao bloqueio por picrotoxina do que receptores expressando subunidades  $\alpha\beta\gamma$ . Por outro lado, foi demonstrada a importância da presença da alanina na posição 2, para a sensibilidade à picrotoxina em receptores GABA<sub>A</sub> de mamíferos. A mutação da valina para alanina, na posição equivalente na subunidade  $\alpha 1$ , aumenta a sensibilidade dos receptores  $\alpha 1\beta 2$  para a picrotoxina em aproximadamente 20 vezes. Um fator adicional que pode fazer os receptores  $\alpha\beta\gamma$  relativamente menos sensíveis à picrotoxina, do que receptores expressando subunidades  $\beta\gamma$ , talvez seja a presença da valina na posição 2 (subunidade  $\alpha$ ), nos receptores que expressam subunidades  $\alpha\beta\gamma$ . A presença destas duas valinas, que são relativamente maiores quando comparadas à serina ou alanina, poderia diminuir a habilidade da picrotoxina no acesso ao seu sítio de ligação. Se a sensibilidade à picrotoxina é influenciada mais pela presença de resíduos de alanina *per se* na posição 2, ou pela falta



de resíduos de valina, não é conhecido. Além disso, não se pode excluir a possibilidade de que interações entre as diversas subunidades possam existir em receptores (BELL-HORNER et al., 2000).

Alternativamente Rajasekaran et al. (2003) e Willoughby et al. (1995) sugerem um padrão de envolvimento neuronal regional distinto nas convulsões induzidas por picrotoxina. Ainda segundo Rajasekaran et al. (2003), a atividade epileptogênica da picrotoxina pode envolver o óxido nítrico (NO), produzido neuronalmente. O óxido nítrico produzido estimula guanilato ciclase (GC) solúvel, que aumenta as concentrações intracelulares de GMPc (RAJASEKARAN et al., 2003) e este suprime a atividade de receptores GABA<sub>A</sub> (ROBELLO et al., 1996; WEXLER et al., 1998). Aumentados níveis de GMPc ocorrem durante convulsões induzidas por picrotoxina (FERRENDELLI et al., 1980), sendo que Rajasekaran et al. (2003.) propõem que o aumento de GMPc induzido pela picrotoxina envolva ativação prévia da nNOS, com subsequente ativação da GC pelo NO.

A inibição da atividade sináptica através de antagonistas GABA<sub>A</sub> (HERRON et al., 1985), e especificamente da picrotoxina (FORMAN et al. 1998), foi correlacionada com a facilitação da ativação de receptores NMDA, através do aumento (FORMAN et al. 1998) e potencialização (SIERRA-PAREDES et al., 2000, 1998) das concentrações intersticiais de glutamato. Não é conhecido, porém, se este aumento está relacionado à ativação do nNOS, uma vez que NO atua como um neurotransmissor retrógrado que causa a liberação adicional de glutamato (MCNAUGHT e BROWN, 1998). Uma vez que o glutamato induz o influxo de Ca<sup>2+</sup>, é possível que o ciclo de despolarização, influxo de Ca<sup>2+</sup>, formação de NO, e liberação de glutamato levem à adicional despolarização e ao desenvolvimento do foco epiléptico no cérebro (RAJASEKARAN et al., 2003).

Já em estudo desenvolvido por Jayakumar et al. (1999), a administração de picrotoxina aumentou a atividade da enzima GABA-T, diminuiu as concentrações de GABA e não alterou a concentração de glutamato e atividade da enzima GAD em córtex cerebral de ratos em avaliação 10 minutos após a administração de picrotoxina.

Na resposta à administração de drogas que interferem na transmissão GABAérgica, foram descritas diferenças relativas ao sexo (PEREZ et al., 1986; MANEV et al., 1987; THOMAS e YANG, 1991; KOKKA et al., 1992; FINN e GEE, 1994), o que está em consonância com estudos sugerindo que a neurotransmissão GABAérgica é sexualmente dimórfica (FRANKFURT et al., 1984; MANEV e PERICIC, 1987; JÜPTER e HEMKE, 1990). A presença de hormônios gonadais parece ser determinante quanto à diferenciada resposta convulsivante entre os sexos, uma vez que as mesmas são detectáveis somente em animais sexualmente maduros e gonadectomizados (SCHWARTZ-GIBLIN et al., 1989, WILSON, 1992), e não em animais imaturos ou velhos (MANEV et al., 1987).

Pericic et al. (1996), mostraram que, em ratos jovens, a picrotoxina é igualmente potente em ratos machos e fêmeas de 20 dias de idade. Ao contrário, ratos sexualmente maduros apresentam diferenças relativas ao sexo. A mesma dose, subconvulsivante em ratos machos adultos, é convulsivante em fêmeas da mesma idade. Além deste fato, fêmeas adultas tendem a ser mais (PERICIC et al., 1996), enquanto machos adultos tendem a ser menos sensíveis à picrotoxina do que ratos jovens (VELISKOVÁ et al., 1992; PERICIC et al., 1996). Tratamento crônico de ratos machos com benzoato de estradiol, assim como a gonadectomia, aumentam sua susceptibilidade à picrotoxina. Estes resultados sugerem uma potência pró-convulsivante dos estrogênios e uma potência anticonvulsivante da testosterona (PERICIC et al., 1996).

Diferenças entre os sexos na resposta à utilização da picrotoxina em diferentes rotas de administração são atribuíveis, segundo Pericic e Bujas (1997) a prováveis diferenças sexuais quanto a farmacocinética (i.p.) ou farmacodinâmica (e.v.).

#### 1.6.2.5 Desnutrição e sistema GABAérgico

Relativamente ao sistema GABAérgico há substanciais evidências de alterações significativas em resposta à desnutrição em várias regiões do cérebro.

Steiger et al. (2002) mostraram que os efeitos da desnutrição pré-natal podem incluir alterações na regulação das sub-unidades  $\gamma$  e  $\beta$  de receptores GABA<sub>A</sub> em septo, com

diminuição da expressão do mRNA das sub-unidades  $\gamma_{2L}$  em septo medial, porém não em septo lateral e redução das sub-unidades  $\beta_2$  e  $\beta_3$  em septo lateral. Os autores associam alterações nos níveis de mRNA das sub-unidades  $\beta_2$  e  $\beta_3$  a modificações nas propriedades dos canais (BUREAU e OLSEN, 1990) e representação dos receptores na superfície celular (CONNOLLY, 1996). O estado funcional do complexo dos receptores GABA<sub>A</sub>, de ratos desnutridos pré-natalmente, também foi avaliado por Borghese et al.(1998) por meio da observação do influxo de  $^{36}\text{Cl}^-$  em sinaptossomas de córtex cerebral. O estudo evidenciou uma menor captação de  $^{36}\text{Cl}^-$  por córtex de ratos desnutridos, quando comparado com ratos controle.

Em estudo posterior, Steiger et al. (2003) mostraram aumento no mRNA das subunidades  $\alpha_3$  dos receptores GABA<sub>A</sub> em estrutura hipocampal de ratos em P15 e P90, e subunidade  $\alpha_1$  diminuída em P90, em consequência de desnutrição protéica pré-natal, em contraposição à expressão mais abundante de  $\alpha_3$  no período pós-natal precoce. Há declínio da mesma quando o mRNA da subunidade  $\alpha_1$  aumenta após P12 (LAURIE et al., 1992) em ratos normais, o que é apontado pelos autores como um possível reflexo de atraso na expressão pós-natal do sistema de receptores GABA<sub>A</sub>. Confere suporte a esta teoria o fato de que em ratos desnutridos ocorre diminuição na neurogênese de células granulares do giro denteado (DIAZ-CINTRA et al., 1991), com correspondente redução de ramificações dendríticas e na densidade de espinhas dendríticas em células granulares e piramidais da região CA3 (DIAZ-CINTRA et al., 1994, 1991). Da mesma forma, o declínio do mRNA da subunidades  $\beta_2$  e  $\alpha_1$  em hipocampo adulto dos ratos desnutridos pré-natalmente, é sugerido pelos autores como sendo uma resposta adaptativa à aumentada inibição que envolve a diminuição da expressão gênica do receptor GABA<sub>A</sub>. Por outro lado, os aumentados níveis de mRNA de  $\alpha_3$ , são sugeridos como uma resposta compensatória do genoma para manter a homeostase.

Em um modelo de desnutrição protéica e/ou de restrição de triptofano nos períodos pré-gestacional, gestacional e pós-natal, Del Angel-Meza et al. (2002) mostraram atividade diminuída da GAD aos 14 e 21 dias de idade em córtex cerebral e hipocampo de ratos

Wistar, e reversão dos padrões aos 30 dias de idade, mostrando um atraso de aproximadamente uma semana no desenvolvimento. A liberação basal de GABA das duas estruturas cerebrais estudadas, foi menor nos grupos com restrições na dieta, em todas as idades estudadas, enquanto que a liberação estimulada de GABA era correspondente aos níveis de atividade da GAD na mesma idade, levando os autores a interpretarem os resultados como respostas neuroquímicas plásticas, de natureza aparentemente compensatória.

Telang et al. (1984) mostraram que a desnutrição precoce influenciou significativamente a união específica de [<sup>3</sup>H]GABA ao seus receptores em córtex cerebral e hipocampo. Análises de saturação revelaram componentes de alta e de baixa afinidade em ratos desnutridos, enquanto que ratos controle possuíam apenas sítios de baixa afinidade, sendo que a concentração de sítios de baixa afinidade era maior nos ratos desnutridos. A reabilitação nutricional aboliu as diferenças entre os grupos. Ao tratar as membranas com Triton X-100, os dois sítios, de alta e de baixa afinidade, foram observados em ambos os grupos de ratos, embora os de baixa afinidade se mantivessem mais expressos no grupo desnutrido. Os autores sugerem que as diferenças, quanto aos sítios de alta afinidade, sejam decorrentes de reduzidos inibidores endógenos dos sítios de alta afinidade nos ratos desnutridos.

Em estudo de Luebke et al. (2000), a desnutrição pré-natal, embora não tenha afetado as características das correntes sinápticas espontâneas em fatias de hipocampo de ratos adultos, assim como não afetou a amplitude e cinética das mini correntes inibitórias pós-sinápticas (mIPSCs) mediadas pelo receptor GABA<sub>A</sub>, afetou, contudo, a frequência das mesmas em células piramidais da região CA1 em ratos desnutridos, aumentando-a. A ausência de diferenças no efeito do agonista do receptor benzodiazepínico, clordiazepoxide sobre as características das mIPSC, juntamente com a falta de mudança na amplitude, cinética e modulação das mIPSC pelos benzodiazepínicos, em resposta à desnutrição, indica, segundo os autores, um *locus* pré-sináptico dos efeitos da injúria nutricional.

Em modelo de desnutrição lactacional, por sua vez, Almeida et al. (2001), encontraram uma diminuição de cerca de 40% dos neurônios GABAérgicos em retina de ratos em P8, sendo que em P13 e 21 o percentual destes neurônios aumenta e é compatível com o valor de animais controle adultos. Já na atividade da GAD, não foram observadas diferenças durante o desenvolvimento relativamente aos animais controle.

Relativamente às concentrações cerebrais de GABA na desnutrição, enquanto Colombo et al. (1992) não encontraram diferenças entre ratos controle e desnutridos, Wapnir e Lifshitz (1977) apud Nayak e Chatterjee (2003) relatam aumento nas concentrações de GABA, causado pela restrição protéica.

Alterações na reatividade a drogas atuando via receptor  $GABA_A$  tais como o etanol (BORGHESE et al., 1998; CÓRDOBA et al., 1992,1997) e benzodiazepínicos (ALMEIDA et al., 1996; BRIONI et al., 1989; TONKISS et al, 2000), induzidas por desnutrição precoce, ampliam as evidências sobre os efeitos da desnutrição sobre o sistema GABAérgico, e levantam questionamentos quanto à reatividade afetada em desnutridos a outras drogas.

## 1.7 Objetivos

Considerando:

i) que as funções cerebrais estão baseadas na interação dinâmica entre os sistemas inibitórios e excitatórios, os quais, por sua vez, estão envolvidos em vários distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo convulsões e epilepsia;

ii) que estudos epidemiológicos mostram uma correlação entre desnutrição e doenças neuropsiquiátricas;

iii) as evidências de significativas alterações no sistema GABAérgico em resposta à desnutrição, incluindo a reatividade a drogas que atuam via receptor  $GABA_A$ , como benzodiazepínicos e etanol;

iv) as alterações no sistema glutamatérgico, recentemente descritas, envolvendo liberação de glutamato, união  $\text{Na}^+$ - independente de glutamato aos seus receptores, em membranas sinápticas, induzidas pela desnutrição;

v) que, além da biossíntese, liberação e interação com os receptores, a captação de neurotransmissores constitui condição para garantir adequada atividade funcional do cérebro;

vi) que a captação de GABA apresenta perfil ontogenético diferenciado, tanto na quantidade de GABA captado quanto na expressão dos diferentes tipos de transportadores, e na sua expressão neuronal e/ou glial;

vii) que o perfil de desenvolvimento da expressão dos GATs (GAT-1) é coordenado com o de outras proteínas pré sinápticas como da GAD e VGAT, e paralela à expressão da subunidade  $\alpha 1$  do receptor  $\text{GABA}_A$ , que participa da neurotransmissão GABAérgica madura;

viii) que o perfil de desenvolvimento dos GATs pode contribuir para a determinação de fatores que regulam o desenvolvimento de sinais mediados por GABA e que, além do sistema GABAérgico ser o principal sistema inibitório do SNC, desempenha também importante papel na maturação neuronal em ratos em fase de desenvolvimento;

ix) que vários passos ontogenéticos no desenvolvimento neuronal, incluindo proliferação e migração, mielinização e astrocitogênese, assim como mudanças na atividade da GAD e mRNA de receptores  $\text{GABA}_A$  são alteradas pela desnutrição;

x) que estudos sobre a complexa interação neurônio-glia no cérebro são importantes para a compreensão dos aspectos fisiológicos, uma vez que o desenvolvimento de doenças neurológicas/psiquiátricas é acompanhado de alterações nestes processos;

xi) que a compartimentalização do metabolismo cerebral permite inferir alterações metabólicas também através do estudo da metabolização do acetato e da glicose;

xii) que o acetato é predominantemente metabolizado nos astrócitos, células que têm papel determinante no fluxo de substratos energéticos para os neurônios, especialmente em condições de ativação neuronal;

xiii) que altas concentrações de potássio extracelular constituem estímulo para o uso de nutrientes energéticos pelo SNC (e mimetizam condição resultante de excitotoxicidade);e

xiv) que o grande aumento da utilização energética está associado a dano neuronal em vários modelos de convulsão e que os astrócitos estão envolvidos na homeostase dos aminoácidos desempenhando um papel significativo no foco epileptogênico, onde a astrogliose é um fenômeno conhecido, o presente estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

#### OBJETIVO GERAL:

- Investigar os efeitos da desnutrição pré e pós-natal sobre parâmetros GABAérgicos e glutamatérgicos e sobre o metabolismo energético do SNC em condições de excitotoxicidade em ratos Wistar.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a sensibilidade “*in vivo*” de ratos Wistar jovens, controle e desnutridos, frente à ação convulsivante do antagonista GABAérgico picrotoxina e à hiperestimulação do sistema glutamatérgico pelo ácido quinolínico;

- Verificar o efeito da desnutrição sobre a sensibilidade ao procedimento de “*kindling*” (abrasamento) químico por picrotoxina em ratos em desenvolvimento;

- Verificar o efeito da picrotoxina “*in vitro*” sobre o metabolismo da glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens e adultos, controle e desnutridos, com finalidade de avaliar alterações frente ao uso da droga;

- Avaliar os efeitos da picrotoxina sobre a peroxidação lipídica em córtex cerebral e cerebelo de ratos controle e desnutridos, de 25 dias de idade;

- Investigar os efeitos da desnutrição, sobre a captação de GABA e glutamato, em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 25 dias de idade, frente à utilização das drogas convulsivantes picrotoxina e ácido quinolínico, respectivamente;

- Avaliar o perfil ontogenético da captação de GABA por fatias de córtex cerebral em ratos desnutridos;

- Avaliar a captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos desnutridos, em uma perspectiva ontogenética, frente ao uso de inibidores seletivos de captação de GABA;

- Verificar os efeitos da picrotoxina injetada "*in vivo*" sobre o metabolismo "*ex vivo*" do acetato e da glicose, em fatias de estruturas cerebrais de ratos controle e desnutridos, com o objetivo de avaliar alterações neuronais e astrocitárias frente aos agentes estressores desnutrição e picrotoxina;

- Avaliar os efeitos de altas concentrações extracelulares de potássio sobre o metabolismo do acetato, da glicose e do lactato em fatias de estruturas cerebrais de ratos adultos jovens, controle e desnutridos gestacional e pós natalmente.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

- [2,3-<sup>3</sup>H]ácido gama-aminobutírico ([<sup>3</sup>H]GABA) - Amersham Pharmacia Biotech (UK) - atividade específica 94 Ci/mmol
- [U-<sup>14</sup>C]ácido acético, sal de sódio - Amersham Pharmacia Biotech (UK) - atividade específica 57mCi/mmol
- D-[U-<sup>14</sup>C]glicose - Amersham Pharmacia Biotech (UK) - atividade específica 2-4mCi/mmol
- L-[2,3-<sup>3</sup>H]ácido glutâmico ([<sup>3</sup>H]Glu) - Amersham Pharmacia Biotech (UK) - atividade específica 49 Ci/mmol
- L-[U-<sup>14</sup>C]ácido láctico, sal de sódio - Amersham Pharmacia Biotech (UK)- atividade específica 157mCi/mmol
- β-Alanina (ácido 3-aminopropiônico) - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Ácido glutâmico - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Ácido quinolínico - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Ácido γ-amino-butírico - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Ácido tiobarbitúrico - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Ácido L- 2,4-Diamino-n-butírico (L-DABA) – Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Hidróxido de hiamina - J.T. Baker (Chemical Company, Phillipsburg-USA)
- Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione*) – Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Monensina - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- N-Metil-D-glucamina - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Ouabaína - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Picrotoxina - Sigma (St. Louis, MO, USA)

Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de pureza “pró-análise”.

### 2.2 Animais experimentais e paradigma de desnutrição

Considerando que os nutrientes em geral exercem influências sobre a maturação cerebral, porém, que a proteína é um dos componentes mais críticos no desenvolvimento

das funções cerebrais, o modelo de desnutrição utilizado no presente trabalho foi o de restrição protéica nos períodos gestacional e pós-natal. Para o período de imposição da restrição utilizado, foi considerada a alta incidência de desnutrição intra-uterina, severa ou moderada, e a constatação da continuidade do processo na lactação e na infância em muitos casos. Estudos em humanos e animais experimentais indicam que a combinação de desnutrição pré e pós-natal é mais deletéria do que a injúria nutricional em apenas um dos períodos (MORGANE et al., 2002). A opção pela fonte protéica, caseína, assim como o percentual de proteína na composição das rações do grupo controle e desnutrido, levou em consideração a possibilidade de estabelecimento de comparativos com desenhos experimentais amplamente descritos na literatura (TELANG et al., 1984; BRONZINO et al., 1991; GRESSENS et al., 1997; BORGHESE et al., 1998; LUEBKE et al., 2000; MORGANE et al. 1993, 2002; STEIGER et al., 2002, 2003; TONKISS et al., 1998, 2000), trabalhos do próprio grupo de pesquisa (ROTTA et al., 2003a; DE SOUZA et al., 2004) e, ainda, as necessidades mínimas de 12% de proteína apontadas por Morgane et al., (1993). Acrescido a estes elementos, a utilização da caseína pautou-se na sua qualidade (EGWIN et al., 1986; YOKOGOSHI et al., 1992), evitando-se influência de variáveis adicionais resultantes da utilização de proteína de baixa qualidade.

A desnutrição pré-natal e lactacional foi induzida mediante restrição de proteína (caseína) a 7% na dieta das mães durante a gestação e período lactacional, sendo caracterizada, portanto, pela restrição da quantidade total de nutrientes acessíveis aos filhotes (PINE et al., 1994; PASSOS et al., 2000). A desnutrição pós-lactacional, caracterizada pelo decréscimo de proteína na dieta dos filhotes, foi induzida por meio da manutenção da mesma dieta até os 75-80 dias de idade. No grupo controle, o percentual de proteína (caseína) fez 25%. Ambas as dietas, oferecidas durante o período gestacional e pós-natal, foram suplementadas com 0,15% de L-metionina, sendo isocalóricas e contendo quantidades similares de lipídios (15%), celulose (1%), minerais (4%) e vitaminas (1,5%), como recomendado pela “*Association of Official Analytical Chemists*” (HORWITZ, 1980) (tabela 2.1). Após o nascimento (as primeiras 24 horas de vida foram consideradas como

dia 0), no dia 1 pós-natal, o tamanho da ninhada foi mensurado, as ninhadas foram ajustadas para 8 filhotes por mãe, e, aos 21 dias de idade, os filhotes foram desmamados, passando a alimentar-se exclusivamente da respectiva dieta (25% ou 7% de caseína). Aos 30 dias, os filhotes foram separados por sexo e mantidos em gaiolas de plástico em número de 5 por gaiola.

Para os experimentos de avaliação dos efeitos da desnutrição sobre a oxidação da glicose, lactato e acetato a  $\text{CO}_2$  em fatias de cerebelo (item 2.9.3), os animais foram submetidos às mesmas condições descritas acima, exceto no que se refere à suplementação de L-metionina na dieta com restrição protéica (tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Composição das rações (g/kg/ração).

Composição	25% de proteína (G <sub>25</sub> )	7% de proteína (G <sub>7</sub> )	7% de proteína sem suplementação de L- metionina (G <sub>7</sub> SSMET)
Caseína (87%) <sup>a</sup>	287,0	80,5	80,5
L-metionina <sup>b</sup>	1,5	1,5	-,
Óleo de soja	150,0	150,0	150,0
Amido de milho	501,5	708,0	709,5
Mistura salina <sup>c</sup>	40,0	40,0	40,0
Mistura vitamínica <sup>d</sup>	10,0	10,0	10,0
Fibras	10,0	10,0	10,0

Composição das misturas salina e vitamínica de acordo com Horwitz (1980). Rações isocalóricas (4,3 kcal/g ração).

<sup>a</sup> Caseína, pureza 87% (Farmaquímica, Porto Alegre, Brasil)

<sup>b</sup> L-metionina (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)

<sup>c</sup> Mistura de minerais (Roche, São Paulo, Brasil) mg/100g de ração: NaCl, 557; KI, 3.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1556;  $\text{MgSO}_4$ , 229;  $\text{CaCO}_3$ , 1526;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 108;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 16;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.2;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1.9;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.09.

<sup>d</sup> Mistura vitamínica (Roche, São Paulo, Brasil) mg/100g de ração: Vitamina A, 4; Vitamina D, 0.5; Vitamina E, 10; Menadiona, 0.5; Colina, 200; PABA, 10; Inositol, 10; Niacina, 4; Ácido Pantotênico, 4; Riboflavina, 0.8; Tiamina, 0.5; Piridoxina, 0.5; Ácido Fólico, 0.2; Biotina, 0.04; Vitamina B12, 0.003.

Foram utilizados ratos Wistar provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio grande do Sul – UFRGS. Para os experimentos envolvendo animais até 25 dias de idade, foram utilizados ratos de ambos os sexos, uma vez que, nos diversos parâmetros testados, não houve diferença sexo-dependente. Para os experimentos envolvendo animais a partir dessa idade, foram utilizados exclusivamente animais machos, exceto para o procedimento

de “*kindling*” por picrotoxina (item 2.10), no qual foram usados animais fêmeas e machos. Todos os animais experimentais foram mantidos a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. A manipulação e cuidado dos animais foi conduzida de acordo com as diretrizes do Comitê de Cuidados e Usos de Recursos Animais Experimentais, Escola de Medicina Veterinária e Ciências Animais da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Os grupos experimentais, alimentados com rações contendo 25% de caseína, 7% de caseína e 7% de caseína sem suplementação de L-metionina, passarão a ser denominados como G<sub>25</sub>, G<sub>7</sub> e G<sub>7</sub>SSMET, respectivamente.

### 2.3 Massa corporal e de estruturas cerebrais

A evolução do ganho da massa corporal dos animais pertencentes aos grupos experimentais G<sub>25</sub> e G<sub>7</sub> foi avaliada nos dias 1, 7, 21, 25 e 75 pós-natal (P1, P7, P21, P25 e P75). A massa cerebral, de cerebelo e hipocampo foi avaliada aos 7, 25 e 75 dias de idade, em ambos os grupos ( $n=40$  para a massa corporal;  $n=14$  para a massa das estruturas cerebrais).

Nos animais submetidos a procedimento de “*kindling*” por picrotoxina (item 2.10), a verificação da massa corporal foi realizada diariamente a partir dos 25 dias de idade ( $n=9$  animais/grupo para os injetados com picrotoxina e 6 para os injetados com o veículo).

### 2.4 Concentração protéica de estruturas cerebrais

Para a estimativa da concentração protéica do córtex cerebral, cerebelo e hipocampo dos animais pertencentes aos grupos experimentais G<sub>25</sub> e G<sub>7</sub>, ( $n=8$  por grupo), foi utilizado o método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

### 2.5 Convulsões induzidas por picrotoxina

Como estratégia farmacológica experimental, com finalidade de avaliar o sistema GABAérgico em ratos desnutridos jovens, foi utilizada a picrotoxina. Para tanto, a mesma foi

diluída em solução salina, pH 7,4 e injetada em P25 (1mL/kg), subcutaneamente (s.c.) na região dorsal dos animais, nas doses de 2,3; 4,0; 4,8; 5,6 e 6,4mg/kg, procurando-se identificar a menor dose que induz ao “*status epilepticus*” em 100% dos ratos ( $n=9-10$  por grupo). Os animais foram observados quanto a sinais de convulsão, por 60 minutos. Os mesmos foram classificados como: (1) clonismos dos músculos da cabeça e membros anteriores, com preservação do equilíbrio; (2) “*running*” seguido de perda postural acompanhada de fase tônica e, após alguns segundos, ocorrência de convulsões clônicas de longa duração (VELISKOVA e VELISEK, 1992).

Para a curva de convulsão dose-resposta, apenas convulsões enquadradas no item 2 da classificação de Veliskova e Velisek (1992) foram consideradas. A latência para convulsão foi considerada como o tempo para o início de manifestação de convulsões clônicas de todos os membros ( $n=9-10$  animais por grupo).

## 2.6 Convulsões induzidas por ácido quinolínico

Para avaliar os efeitos da desnutrição sobre o sistema glutamatérgico em ratos desnutridos jovens, foi realizada uma curva dose-resposta utilizando o ácido quinolínico injetado intracerebroventricularmente (i.c.v) nas quantidades de 36, 72, 145, 194 e 242nmol, procurando-se identificar a menor dose capaz de convulsionar 100% dos animais ( $n=8-10$  por grupo). Para tanto, foi realizada cirurgia em ambos os grupos ( $G_{25}$  e  $G_7$ ) em P23. Os animais foram anestesiados com quetamina ( $G_{25}=90\text{mg/kg}$ ;  $G_7=70\text{mg/kg}$ ) e xilasina (12mg/kg para ambos os grupos) e posicionados em aparelho estereotáxico. A pele da cabeça foi removida, e uma cânula guia de 6mm (27-Gauge) foi posicionada a 1mm acima do ventrículo lateral (AP: -0,5mm; L: -1,5mm; V: -3,0mm da superfície do crânio). A cânula foi fixada com cimento acrílico, foi aplicada xilocaína em torno da incisão e os animais permaneceram em recuperação por 48 horas. Para a administração i.c.v. de ácido quinolínico (1,0 $\mu$ l) em P25, uma cânula de infusão 7mm (30-Gauge) foi acoplada à cânula guia e conectada por um tubo de polietileno a uma micro seringa de 5 $\mu$ l (micro seringa Hamilton). Os animais foram observados após a administração, durante 10 minutos, em

gaiolas de plástico, para a ocorrência de convulsões tônico-clônicas. Após a observação, foi injetado azul de metileno (0,5µl) e os animais sem coloração no ventrículo cerebral lateral foram descartados.

## 2.7 Ensaio de captação de [<sup>3</sup>H]GABA e de [<sup>3</sup>H]Glutamato por fatias de córtex cerebral e hipocampo

Considerando que, além da biossíntese, liberação e interação com seu receptor, a recaptação de neurotransmissores é condição para garantir adequadas funções cerebrais, foram realizados ensaios de captação de GABA e glutamato, com fatias de córtex cerebral e hipocampo, com finalidade de avaliar efeitos da desnutrição e/ou droga quanto a este parâmetro em animais de 25 dias de idade.

Para determinar as concentrações adequadas de GABA, assim como o tempo de incubação, fatias de hipocampo e de córtex parietal de ratos de 25 dias de idade foram incubadas com 25, 50 e 100µM de GABA por 5, 10, 15 e 30 minutos. Com base nestes dados, a concentração de GABA e o período de incubação usados nos ensaios de captação de GABA, foram de 25µM e de 15 minutos, respectivamente, exceto nos experimentos realizados com finalidade de avaliar a captação em perspectiva ontogenética, assim como a inibição da captação frente à utilização de β-alanina e L-DABA descritos em item posterior (2.8), nos quais foi utilizada adicionalmente a concentração de 100µM de GABA.

Para os experimentos cuja finalidade foi avaliar efeitos da desnutrição e/ou administração da picrotoxina, assim como o efeito do tempo pós-aplicação da picrotoxina sobre a captação de GABA por fatias de córtex e hipocampo, em animais de 25 dias de idade, os grupos experimentais foram delineados da seguinte forma: G<sub>25</sub>-veículo; G<sub>25</sub>-picrotoxina; G<sub>7</sub>-veículo; G<sub>7</sub>-picrotoxina. Os animais foram injetados com veículo ou picrotoxina subcutaneamente (menor concentração capaz de convulsionar 100% dos animais, detectada em experimento anterior – item 2.5), foram sacrificados por decapitação 15, 25 ou 60 minutos após a administração de picrotoxina ou veículo (*n*=6-8 por grupo). Os cérebros foram rapidamente removidos e submergidos em Solução Salina Balanceada de

HANK (HBSS contendo 137mM de NaCl; 0,63mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,17mM de NaHCO<sub>3</sub>; 5,36mM de KCl; 0,44mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,26mM de CaCl<sub>2</sub>; 0,41mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,49mM de MgCl<sub>2</sub> e 5,5mM de glicose), pH 7,2. Os córtices parietais foram dissecados e fatias coronais (0,4 mm) foram obtidas da área parietal usando um fatiador de tecidos (McIlwain). As fatias foram transferidas para uma placa de cultura de 24 poços, e o meio de transferência foi substituído por 1,0mL de HBSS a 37°C para pré-incubação por 15 minutos para a estabilização das mesmas. O meio foi novamente substituído por 300µL de HBSS contendo 25µM de [<sup>3</sup>H]GABA. A incubação foi interrompida após 15 minutos, por meio de substituição do meio por 1,0mL de HBSS a 4°C por três vezes subsequentes, seguida de adição de 300µL de NaOH 0,5N para a solubilização do tecido. Alíquotas do lisado foram tomadas para determinação da concentração protéica (PETERSON, 1977) e do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H]GABA por meio de contador de cintilação líquida. Para a determinação da captação sódio-dependente, os valores obtidos na captação total foram subtraídos da captação sódio-independente. Esta, foi realizada utilizando os mesmos procedimentos descritos acima, exceto pela substituição de cloreto de sódio por N-metil-D-glucamina no meio de incubação e pela temperatura da incubação (placa e tampão foram mantidos em gelo). Os experimentos foram feitos em triplicata. Os resultados foram expressos em pmol de GABA captado por mg proteína por minuto.

O mesmo procedimento foi realizado para os ensaios de captação de GABA por fatias de hipocampo, exceto que a dissecação hipocampal e a incubação das fatias foram realizadas apenas 60 minutos após a administração subcutânea de picrotoxina.

Para avaliação dos efeitos do ácido quinolínico e/ou do tratamento nutricional sobre a captação de glutamato, os animais experimentais foram divididos em seis grupos: G<sub>25</sub>-naive; G<sub>25</sub>-veículo; G<sub>25</sub>-ácido quinolínico; G<sub>7</sub>-naive; G<sub>7</sub>-veículo e G<sub>7</sub>-ácido quinolínico. Os animais dos grupos submetidos à administração i.c.v. de ácido quinolínico ou veículo, foram previamente submetidos à cirurgia, conforme descrito no item 2.6. Aos 25 dias, foram sacrificados por decapitação, 10 minutos após a administração de ácido quinolínico (menor dose capaz de causar convulsões em 100% dos animais, determinada anteriormente,

conforme descrito no item 2.6) ou veículo, os cérebros foram imediatamente removidos e submergidos em HBSS. Fatias de córtices parietais ( $n=12$  por grupo) e hipocampais ( $n=6$  por grupo) foram dissecados como descrito acima para os experimentos de captação de GABA. A captação de glutamato, realizada de acordo com Frizzo et al. (2002) e Thomazi et al. (2004) foi iniciada pela adição de  $100\mu\text{M}$  de  $[^3\text{H}]\text{Glutamato}$  em  $300\mu\text{L}$  de HBSS a  $37^\circ\text{C}$ . A incubação foi interrompida depois de 7 minutos para as fatias de córtex e após 5 minutos para as fatias de hipocampo, da mesma forma descrita para a captação de GABA, assim como a determinação da captação independente de sódio e a determinação da concentração de proteínas. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em pmol de glutamato captado por mg de proteína por minuto.

## 2.8 Ensaio de captação de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ por fatias de córtex cerebral frente à utilização de inibidores – estudo ontogenético

Considerando a localização predominantemente glial ou neuronal dos GATs (MINELLI et al., 1995; 1996, 2003a; DeBIASI, 1998; RIBAK et al., 1996 a, b; GADEA e LOPEZ-COLOME, 2001), o descrito perfil ontogenético diferenciado dos mesmos (YAN et al., 1997; HACHIYA e TAKASHIMA, 2001; MINELLI et al., 2003b) e da captação de GABA, estabelecido previamente por pesquisadores (COYLE e ENNA, 1976; HITZEMANN e LOH, 1978; REDBURN et al., 1978; WONG e McGEER, 1981; BLAKELY et al., 1991), foram realizados experimentos de captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos controle e desnutridos ( $G_{25}$  e  $G_7$ ), aos 7, 25 e 75-80 dias de idade, com a finalidade de avaliar efeitos da desnutrição sobre a captação de GABA nesta perspectiva. Além disso, foram verificados efeitos da desnutrição gestacional e pós-natal sobre a captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos nas mesmas idades (7, 25 e 75-80 dias) em presença de  $\beta$ -alanina (antagonista de GAT-3) e L-DABA (clássico inibidor neuronal do transporte de GABA com alta afinidade por – GAT-1, GAT-2 e bem menos expressiva afinidade por GAT-3) com a finalidade de estabelecer um perfil preliminar de desenvolvimento dos GATs.



Nas idades explicitadas acima, os animais dos grupos G<sub>25</sub> e G<sub>7</sub> foram sacrificados por decapitação, seus cérebros rapidamente removidos e submergidos em HBSS a 4°C, conforme descrito no item anterior. Córtices parietais cerebrais foram dissecados e fatias coronais de 0,4mm foram obtidas. As fatias foram transferidas para placas de cultura e o meio substituído por 1,0mL de HBSS a 37°C, sendo deixadas por 15 minutos para estabilização. Após terem sido pré-incubadas em 300 µL de HBSS contendo 1mM de L-DABA ou β-Alanina durante 15 minutos (37°C), as fatias foram submetidas à incubação por mais 15 minutos a 37°C ao adicionar HBSS contendo 25 ou 100 µM de [<sup>3</sup>H]GABA. A reação foi interrompida pela adição de HBSS a 4°C e as fatias lavadas rapidamente por mais três vezes com HBSS a 4°C e deixadas por um período de 12 horas em NaOH 0,5N em temperatura ambiente para solubilização. Alíquotas do lisado foram retiradas para estimar a concentração de proteínas (PETERSON, 1977), e a determinação de GABA captado foi feita mediante contador de cintilação líquida. A captação independente de sódio foi determinada usando N-metil-D-glucamina, no lugar de cloreto de sódio no meio de incubação, conforme descrito no item anterior, sendo subtraído da captação total para obter a captação dependente de sódio. Para poder expressar o percentual de inibição relativamente ao seu controle, fatias de córtex do mesmo animal foram incubadas nas mesmas condições descritas acima, na ausência de inibidores. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada condição de incubação (*n*=12 animais por grupo e idade).

#### 2.8.1 Mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada nas condições de incubação

Para avaliar a integridade e das fatias após o período de pré-incubação/incubação, uma alíquota do sobrenadante em cada condição de incubação descrita nos itens 2.7 e 2.8, foi coletada para a determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada, usando método espectrofotométrico (510nm) que mensura a quantidade de complexo colorimétrico derivado de NADH formado por reação enzimática (Doles Reagents, São Paulo, Brasil).

## 2.9 Ensaios de oxidação de nutrientes energéticos por estruturas cerebrais

A utilização de fatias de tecido cerebral nos experimentos descritos a seguir foi realizada no intuito de manter as interações anatômicas e funcionais entre astrócitos e neurônios. O período de incubação das estruturas cerebrais com os diferentes nutrientes energéticos utilizado foi de 1 hora, em função da linearidade da produção de CO<sub>2</sub> obtida em períodos de 30 a 120 minutos.

### 2.9.1 Efeitos da picrotoxina “*in vitro*” sobre o metabolismo da glicose em córtex cerebral de ratos Wistar controle e desnutridos

Para avaliar as diferenças na susceptibilidade frente a drogas convulsivantes, modelos “*in vitro*” são descritos como especialmente interessantes, em função da possível eliminação de variáveis sistêmicas interferentes que modelos “*in vivo*” podem acarretar, além do que, oferecem vantagens técnicas para manipulações bioquímicas (WONG e YAMADA, 2001).

Enquanto vários estudos “*in vitro*” utilizam fatias hipocâmpais para estudar as mudanças na atividade epileptiforme que ocorrem durante o desenvolvimento (AVOLI, 1990; FUETA e AVOLI, 1992; CHESNUT e SWANN, 1998), no presente trabalho optou-se por verificar os efeitos da picrotoxina “*in vitro*” sobre parâmetros metabólicos em fatias de córtex cerebral, considerando também que, enquanto que a epilepsia em adultos frequentemente resulta de esclerose hipocâmpal, crianças raramente apresentam esclerose hipocâmpal (BOURGEOIS, 1998) e que, em fatias de córtex de ratos incubados com picrotoxina, foi demonstrada atividade epileptiforme (WONG e YAMADA, 2001). Modelos neocorticais podem ser mais apropriados para estudar a atividade epileptiforme em cérebro em desenvolvimento (WONG e YAMADA, 2001), sendo vários estudos “*in vitro*” estabelecidos em fatias de neocórtex (AVOLI et al., 1987; HABLITZ e HEINEMANN, 1987, 1989).

Sabendo-se que a utilização cerebral de glicose muda drasticamente durante o “*status epilepticus*” (FERNANDES et al., 1999; MELDRUM, 2002), estes experimentos foram realizados com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento nutricional sobre alterações

metabólicas da glicose “*in vitro*”, decorrentes da estimulação pelo efeito epileptiforme da picrotoxina, descrito na literatura também para experimentos “*in vitro*” (WONG e YAMADA, 2001) em ratos de 25 e de 75-80 dias, em função da alteração da sensibilidade à droga idade-dependente (VELISKOVA e VELISEK, 1992; PERICIC et al., 1996).

#### 2.9.1.1 Isolamento do córtex cerebral e condições de incubação com precursor radioativo para determinação de CO<sub>2</sub>

Ratos de 25 dias, de ambos os sexos, e de 75-80 dias, machos, submetidos à dieta contendo 7% ou 25% de proteína (modelo descrito no item 2.2), foram sacrificados por decapitação. Seus cérebros foram rapidamente removidos, os córtices cerebrais isolados, colocados sobre placas de Petry invertidas, acondicionadas sobre gelo e cobertas com papel filtro umedecido com solução tampão Dulbecco, pH 7,2 (tabela 2.2 – página 72, tampão B). Para determinar a produção de CO<sub>2</sub> a partir do precursor radioativo, 50mg de córtex cerebral, previamente fatiados em 0,3mm por meio de fatiador de tecidos (McIlwain), com a finalidade de aumentar a superfície de contato do tecido com o nutriente energético, foram incubados em 0,8mL de solução tampão Dulbecco Na<sup>+</sup>-Fosfato, pH 7,2, contendo 5,0mM de D-glicose + 0,2μCi de D-[U-<sup>14</sup>C]Glicose na ausência ou presença de 2,5; 5,0 ou 10μM de picrotoxina.

O meio de incubação pipetado em frascos de vidro de 10mL, foi levado a 35°C antes da adição das estruturas. Após o conteúdo dos frascos ter sido aerado por 1 minuto com O<sub>2</sub>, as estruturas foram adicionadas, os frascos foram fechados com tampas de borracha contendo poços de vidro com papel-filtro dobrado em forma de “W” e vedados com parafilme.

O sistema foi incubado a 35°C por 1 hora, em banho metabólico com agitação (Dubnoff a 60 ciclos/minuto), de acordo com o método de Dunlop et al. (1975).

#### 2.9.1.2 Captação de CO<sub>2</sub>

Finalizado o período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de

0,2mL de ácido tricloroacético (TCA), a 50%, no meio de incubação em cada frasco, através das tampas de borracha, por meio de seringa. Foram injetados 0,2mL de hidróxido de sódio (NaOH 2N) no pocinho central, sendo os frascos novamente vedados com parafilme e submetidos à agitação em banho metabólico por 30 minutos, para a captação de CO<sub>2</sub>.

Após este procedimento, o conteúdo dos pocinhos foi transferido para tubos Eppendorf com o auxílio de pinça e pipeta automática. Em cada Eppendorf foi adicionado 1,5mL de líquido de cintilação (Perkin Elmers-Optiphase "HiSafe"<sub>3</sub>). Os tubos foram agitados em vórtex e a radioatividade incorporada a CO<sub>2</sub> foi medida em contador de cintilação líquida (Wallac 1409). Os resultados foram expressos em pmoles de glicose oxidada a CO<sub>2</sub> por mg de córtex cerebral por hora ( $n=10$  por grupo e idade).

### 2.9.2 Efeitos da picrotoxina injetada "in vivo" sobre a oxidação "ex vivo" do acetato e da glicose em córtex cerebral de ratos controle e desnutridos

Com a finalidade de investigar o envolvimento neuronal e astrocitário nos efeitos agudos da picrotoxina em ratos em desenvolvimento (24 horas após a aplicação de uma dose subconvulsivante), foi avaliada a metabolização do acetato e da glicose a CO<sub>2</sub> em fatias de córtex e hipocampo. Este estudo foi realizado considerando a compartimentalização do metabolismo cerebral (WAAGEPETERSEN et al., 2003), a exemplo dos estudos sobre os metabólitos do acetato e da glicose por meio da <sup>13</sup>C NMRS espectroscopia (HASSEL et al., 1995; QU et al., 2000; TAYLOR et al., 1996; SONNEWALD e KONDZIELLA, 2003) e a astrogliose descrita em função de foco epileptogênico (HERTZ, 1979; KHURGEL e IVY, 1996). Para tanto, ratos Wistar controle (G<sub>25</sub>) e submetidos ao modelo de desnutrição (G<sub>7</sub>), descritos no item 2.2, foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 1,5mg de picrotoxina por kg/rato, invariavelmente entre 9 e 11 horas, aos 25 dias de idade. A opção pela dose utilizada baseou-se em observação prévia, em estudo piloto e em dados da literatura (TIAN et al., 2001; SHANDRA et al., 1996; KRYZHANOVSKY et al., 1989). A picrotoxina foi diluída em solução salina, pH 7,4, imediatamente antes dos experimentos, observando-se a manipulação da solução em ambiente protegido da luz. Os

animais foram observados por 1 hora após a aplicação. Animais com manifestações visíveis de alterações convulsivantes foram descartados. Após 24 horas da aplicação dessa dose única, os animais foram sacrificados por decapitação ( $n=11$  animais por grupo), seus cérebros rapidamente removidos e os córtices cerebrais e hipocampos isolados e acondicionados conforme descrito no item 2.9.1.1. Foram incubados entre 45 a 50 mg de córtex e de hipocampo, previamente fatiados a 0,3mm (McIlwain) e incubados em 0,8mL de tampão Dulbecco, 2,7mM de  $K^+$ , pH 7,2 (tabela 2.2 - tampão A e B), contendo, respectivamente:

- a) 1,0mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de [U- $^{14}$ C] Acetato
- b) 5,0mM de D-glicose + 0,2 $\mu$ Ci de D-[U- $^{14}$ C]Glicose

Para avaliar os efeitos decorrentes de processo crônico de administração de picrotoxina sobre o metabolismo neuronal e astrocitário, animais dos mesmos grupos foram submetidos a 1 dose diária de picrotoxina (1,5mg/kg) durante 30 dias, a partir dos 25 dias de idade, e, 24 horas após a última aplicação, foram sacrificados por decapitação ( $n=8$  por grupo), seus cérebros removidos e os córtices dissecados. Pedacos entre 45 a 50 mg dessa estrutura foram fatiados em 300 $\mu$ m e incubados, igualmente, em tampão Dulbecco, 2,7mM de  $K^+$ , contendo os mesmos precursores radioativos e nutrientes energéticos descritos acima.

As condições de incubação, ressalvadas as especificidades dos nutrientes energéticos e precursores radioativos, seguiram os procedimentos descritos no item 2.9.1.1. Para a captação de  $CO_2$ , igualmente, foram observados os procedimentos descritos no item 2.9.1.2, sendo os resultados expressos em pmoles de nutriente energético oxidado a  $CO_2$  por mg de córtex cerebral por hora (acetato e glicose, respectivamente).

### 2.9.3 Efeitos de altas concentrações extracelulares de potássio sobre o metabolismo cerebral do acetato, lactato e glicose em ratos controle e desnutridos

Sabendo-se que altas concentrações de potássio extracelular constituem estímulo

para a utilização de nutrientes energéticos pelo SNC (PENG et al., 1996; SOKOLOFF et al., 1996; McDOUGAL et al., 1997; HASSEL e SONNEWALD, 2002; HERTZ e PENG, 2002), a oxidação do acetato, da glicose e do lactato foi avaliada em estruturas cerebrais de ratos controle ( $G_{25}$ ) e submetidos a diferentes modelos de desnutrição ( $G_7$  e  $G_{7SSMET}$ ).

Para tanto, ratos dos grupos  $G_{25}$  e  $G_7$  foram sacrificados por decapitação aos 75-80 dias de idade ( $n=8$  animais por grupo e condição de incubação), seus cérebros retirados e seus córtices dissecados, acondicionados e fatiados conforme descrito no item 2.9.1.1. As estruturas foram incubadas nas mesmas condições descritas acima para os outros experimentos, porém em meio contendo 1,0mL de tampão Dulbecco, pH 7,2 e diferentes concentrações de potássio, como descrito a seguir:

a) Objetivo do experimento: avaliar o efeito de  $[K^+]_e$  fisiológicas e supra-fisiológicas sobre o metabolismo do acetato em córtex cerebral de animais normo e desnutridos

Meios de incubação:

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão A) 2,7mM de potássio, 1mM de acetato de sódio+ 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão F) 20mM de potássio, 1mM de acetato de sódio+ 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão G) 50mM de potássio, 1mM de acetato de sódio+ 0,2  $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato

Nos meios nos quais a concentração de KCl foi aumentada para valores acima de 2,7mM, a concentração de NaCl foi reduzida de forma a manter a osmolaridade (tabela 2.2 – tampão F e G).

b) Objetivo do experimento: avaliar o efeito do sódio extra e intracelular sobre o metabolismo do acetato, frente a altas concentrações de potássio extracelular, por meio (1). de ouabaína (1mM), inibidor da  $Na^+,K^+$ -ATPase (CLAUSEN et al., 1987), objetivando aumentar o  $[Na^+]_i$ ; (2). da monensina (10  $\mu$ M), um ionóforo de  $Na^+$  (PRESSMAN e FAHIM,

1982; TAKAHASHI et al., 1997), com intenção de aumentar o  $[Na^+]_i$ , e, (3). da diminuição do  $[Na^+]_e$

Meios de incubação:

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 - tampão A) 2,7mM de potássio, 1mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão A) 2,7mM de potássio, 1mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato + **monensina 10 $\mu$ M**

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão C) 2,7mM de potássio **sem NaCl**, 1mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão E) 12mM de potássio, 1mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão E) 12mM de potássio, 1mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato + **ouabaína 1mM**

No meio com baixa concentração de sódio, o NaCl foi substituído por sacarose, em função da manutenção da osmolaridade (tabela 2.2 – tampão C). No meio com 12mM de  $K^+$ , a concentração de NaCl foi reduzida com a mesma finalidade (tabela 2.2 – tampão E).

c) Objetivos do experimento: - investigar o efeito do  $Ca^{2+}$  sobre o metabolismo do acetato em córtex cerebral de ratos, em meio contendo altas concentrações extracelulares de potássio (altas concentrações de potássio promovem influxo de  $Ca^{2+}$ ), por intermédio de (1). meio isento de  $Ca^{2+}$ , (2). pela utilização de nifedipina (10 $\mu$ M), inibidor dos canais L-voltagem sensíveis (HERTZ e CODE, 1993 *apud* HUANG et al., 1994);

- investigar o envolvimento do co-transportador  $Na^+/K^+/2Cl^-$  no estímulo à oxidação do acetato por altas  $[K^+]_e$ , por meio da utilização do inibidor bumetanide (100 $\mu$ M) (HUANG et al., 1994; WALZ, 2000).

Meios de incubação:

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão A) 2,7mM de potássio, 1mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de  $[U-^{14}C]$  Acetato

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão H) 50mM de potássio **sem Ca<sup>2+</sup>**, 1mM de acetato de sódio + 0,2µCi de [U-<sup>14</sup>C] Acetato

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão G) 50mM de potássio, 1mM de acetato de sódio + 0,2µCi de [U-<sup>14</sup>C] Acetato + **nifedipina 10µM**

Tampão Dulbecco (tabela 2.2 – tampão G) 50mM de potássio, 1mM de acetato de sódio + 0,2µCi de [U-<sup>14</sup>C] Acetato + **bumetanide 100µM**

No meio de incubação isento de CaCl<sub>2</sub>, o MgCl<sub>2</sub> foi aumentado para 1,39mM (tabela 2.2 – tampão H) e EGTA (100µM) foi acrescido.

Para os experimentos a, b e c, o meio de incubação, a exemplo do descrito no item 2.9.1, foi pipetado em frascos de vidro de 10mL e levado a 35°C antes da adição das estruturas. Após o conteúdo dos frascos ter sido aerado por 1 minuto com O<sub>2</sub> (100%), as estruturas foram adicionadas, os frascos foram fechados com tampas de borracha contendo poços de vidro com papel-filtro dobrado em forma de “W” e vedados com parafilme. As fatias dos córtices cerebrais foram incubadas a 35°C por 1 hora, em banho metabólico com agitação (Dubnoff a 60 ciclos/minuto). Para a captação de CO<sub>2</sub>, foram observados os procedimentos descritos no item 2.9.1.2, exceto que, em vez de NaOH, foi injetado hidróxido de hiamina no pocinho central e o líquido de cintilação utilizado foi o POP-POPOP (4g/50mg em tolueno q.s.p. 1000mL). Os resultados foram expressos em pmoles de acetato oxidado a CO<sub>2</sub> por mg de córtex cerebral por hora.

Objetivando avaliar os efeitos das concentrações extracelulares de potássio ([K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>) sobre a oxidação do acetato, glicose e lactato a CO<sub>2</sub>, em modelo mais agressivo de desnutrição, pedaços entre 45 a 50mg de cerebelo de animais submetidos a dietas contendo 25% de caseína (G<sub>25</sub>) ou 7% de caseína sem suplementação de L-metionina (G<sub>7</sub>SSMET), desde o período gestacional e pós-natal até os 75-80 dias, e dissecados conforme descrito nos itens anteriores, foram fatiados em 0,3mm e incubados por 1 hora em tampão Dulbecco, pH 7,2, 2,7 mM ou 50mM de potássio, contendo, respectivamente:



- a) 1,0mM de acetato de sódio + 0,2 $\mu$ Ci de [U-<sup>14</sup>C] Acetato (tabela 2.2 – tampão A e G)
- b) 5,0mM de D-glicose + 0,2 $\mu$ Ci de D-[U-<sup>14</sup>C]Glicose (tabela 2.2 – tampão B e I)
- c) 10mM de L-lactato + 0,2 $\mu$ Ci de L-[U-<sup>14</sup>C]Lactato (tabela 2.2 – tampão D e J)

As condições de incubação e de captação de CO<sub>2</sub> observadas foram as mesmas descritas no item 2.9.1.1. e 2.9.1.2 (com exceção da observação feita no parágrafo anterior quanto à utilização do hidróxido de hiamina no pocinho central), sendo os resultados expressos em pmoles de acetato, glicose ou lactato oxidado a CO<sub>2</sub> por mg de cerebelo por hora ( $n=10$  animais por grupo).

## 2.10 Procedimento de “*kindling*” por picrotoxina

O “*kindling*” químico é amplamente utilizado como modelo experimental de epilepsia e epileptogênese. Este fenômeno é caracterizado pela progressiva intensificação de atividade convulsivante, após administrações repetidas de doses subconvulsivantes de diferentes estimulantes do SNC (MASON e COOPER, 1972; BRUNO et al., 2003), incluindo a picrotoxina (SHANDRA et al., 1996; MAZARATI et al., 1993). Procedimento de “*kindling*” químico foi induzido através da administração i.p. diária de picrotoxina, em uma dose de 1,5 mg/kg, até o alcance do estágio 5 descrito abaixo, ou por até 60 dias, com a finalidade de avaliar se ratos em desenvolvimento, controle e desnutridos apresentavam diferenças no padrão de desenvolvimento do “*kindling*”. A dose diária de picrotoxina (diluída em solução salina, pH 7,4) foi determinada a partir de estudo piloto (dados não mostrados) e a partir de dados da literatura que mostram a dose de 1,5mg/kg como dose adequada para induzir “*kindling*” sem uma elevada mortalidade dos animais (KRYZHANOVSKY et al., 1989; SHANDRA et al., 1996; TIAN et al., 2001).

As injeções diárias de picrotoxina iniciaram aos 25 dias de idade dos animais machos e fêmeas, submetidos às dietas contendo 25 (G<sub>25</sub>) ou 7% (G<sub>7</sub>) de proteína, descritas no item 2.2 ( $n= 9$  animais por grupo e sexo). Por se tratar de animais em desenvolvimento,

Tabela 2.2 – Composição do Tampão Dulbecco

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Sais e nutrientes energéticos	2,7mM K <sup>+</sup> acetato/sódio	2,7mM K <sup>+</sup> glicose	2,7mM K <sup>+</sup> baixo Na <sup>+</sup>	2,7mM K <sup>+</sup> lactato	12mM K <sup>+</sup> acetato/sódio	20mM K <sup>+</sup> acetato/sódio	50mM K <sup>+</sup> acetato/sódio	50mM K <sup>+</sup> s/Ca <sup>++</sup>	50mM K <sup>+</sup> glicose	50mM K <sup>+</sup> lactato
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,7mM	17,7mM	17,7mM	17,7mM	17,7mM	17,7mM	17,7mM	17,7mM	17,7mM	17,7mM
CaCl <sub>2</sub>	0,9mM	0,9mM	0,9mM	0,9mM	0,9mM	0,9mM	0,9mM	-	0,9mM	0,9mM
MgCl <sub>2</sub>	0,49mM	0,49mM	0,49mM	0,49mM	0,49mM	0,49mM	0,49mM	1,39mM	0,49mM	0,49mM
KCl	2,7mM	2,7mM	2,7mM	2,7mM	12,0mM	20,0mM	50,0mM	50,0mM	50,0mM	50,0mM
NaCl	113,3mM	113,3mM	-	113,3mM	104,0mM	96,0mM	66,0mM	66,0mM	66,0mM	66,0mM
Acetato de sódio	1mM	-	1,0mM	-	1,0mM	1,0mM	1,0mM	1,0mM	-	-
Glicose	-	5,0mM	-	-	-	-	-	-	5,0mM	-
Lactato	-	-	-	10,0mM	-	-	-	-	-	10,0mM
EGTA	-	-	-	-	-	-	-	0,1mM	-	-
Sacarose	-	-	113,3mM	-	-	-	-	-	-	-

os mesmos foram pesados diariamente, objetivando avaliar a interferência da droga, ou procedimento de “*kindling*”, sobre o ganho de massa corporal, além da re-adequação diária da dose proporcional à massa corporal. Controles dos diversos grupos foram injetados diariamente com salina.

Para a determinação da atividade convulsivante, animais foram pesados, injetados, posicionados individualmente em caixas de plástico e observados por 60 minutos, para a evolução da severidade das convulsões, de acordo com a seguinte escala comportamental: (0) ausência de sinais: (1) tremores faciais e corporais (2) mioclonismos do corpo inteiro “myoclonic jerks” (3) convulsões clônicas (4) convulsões tônico-clônicas generalizadas com “rearing” e “falling” e flexão de membros posteriores (5) repetidas convulsões tônico-clônicas generalizadas, com distensão de membros anteriores e posteriores, seguida, por vezes, de óbito (adaptado de SHANDRA et al., 1996 e RAJASEKARAN et al., 2003 ).

Os experimentos foram realizados invariavelmente entre 9:00 e 12:00 horas, sendo ratos machos e fêmeas (G<sub>25</sub> e G<sub>7</sub>) submetidos aos procedimentos e observados nos mesmos dias.

#### 2.11 Efeitos da picrotoxina sobre a peroxidação lipídica em cérebro de ratos controle e desnutridos

Considerando o efeito convulsivante da picrotoxina (BELL-HORNER et al., 2000) e a relação das convulsões com a peroxidação lipídica (BRUCE e BAUDRY, 1995), a avaliação de ratos controle e desnutridos frente a parâmetros envolvendo a peroxidação lipídica em estruturas cerebrais na utilização da picrotoxina, constitui modelo relacionado ao sistema GABAérgico, passível de complementar parâmetros de susceptibilidade avaliados em itens anteriores (itens 2.5; 2.9.1; 2.9.2 e 2.10).

Como índice de peroxidação lipídica, foi utilizado a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), durante reação ácida a quente, conforme descrito previamente por Draper e Hadley (1990). Alíquotas das amostras de córtex cerebral e cerebelo, coletadas 1 hora após aplicação de picrotoxina (menor dose capaz de convulsionar 100%

dos animais detectada conforme descrito no item 2.5), em ratos G<sub>25</sub> e G<sub>7</sub> de 25 dias de idade, foram incubadas em 1mL de ácido tricloroacético 10% e 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e aquecidas em banho-maria com água fervente por 15 minutos. Malondilaldeído (MDA), um produto intermediário da lipoperoxidação, foi determinado a 532nm. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA) (nmol/mg/proteína), sendo a proteína determinada por meio do método de Lowry et al. (1951) ( $n=6-8$  animais por grupo e dose).

Para determinar se a picrotoxina é capaz de gerar sozinha danos à biomoléculas, foi utilizada a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), contendo .no meio reacional 100 $\mu$ L de gema de ovo 0,1% $m/v$ , como substrato para ser oxidado (sonicado 2x segundos), 100 $\mu$ L do agente gerador de radicais livres AAPH 0,07M e 1000 $\mu$ L Tampão Fosfato (PBS). Depois de homogeneizados os compostos (100  $\mu$ l) foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, colocados em reação com 1ml TCA 10% e 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA), em banho-maria com água fervente por 15 minutos. Após centrifugação (800g/5 minutos) as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foram determinadas a 532nm. As concentrações crescentes de picrotoxina no meio reacional perfizeram 1,38; 1,84; 2,76; 3,22 e 3,68 $\mu$ g/mL.

Para determinar se a picrotoxina é capaz de atuar como um antioxidante, foi avaliado o Potencial Antioxidante Total (TRAP) “*in vitro*” (WAYNER et al., 1985 modificado) Este teste é determinado pela quimiluminescência da reação entre o Luminol com radicais peroxil gerados pelo reagente AAPH, em um meio tamponado. Para tanto, 100 $\mu$ L do composto em estudo (1,38; 1,84; 2,76; 3,22 e 3,68 $\mu$ g/mL) foram adicionados em 4mL de Tampão Glicina 160mM, pH 8,6, juntamente com 10 $\mu$ L de Luminol 4mM e 10 $\mu$ L de AAPH 10mM. A quimiluminescência foi mensurada em contador de cintilação líquida (Wallac1409) em seis ciclos de 10 segundos para cada amostra, e o resultado expresso como uma cinética das contagens por minutos (CPM).

## 2.12 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita utilizando os seguintes testes: (1) Teste Exato de Fisher para comparação da ocorrência de convulsões; (2) Coeficiente de Correlação de Pearson para a latência para as convulsões; (3) ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* Duncan para a captação de neurotransmissores, para a oxidação de nutrientes energéticos e para a peroxidação lipídica; 4) teste *t*-Student para o tempo de latência para convulsões entre as doses, massa corporal e de estruturas cerebrais, concentração protéica das estruturas cerebrais e tamanho das ninhadas; (5) ANOVA-Kruskal Wallis para o “*kindling*” por picrotoxina. O nível de significância considerado está referido junto aos resultados específicos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeitos da desnutrição sobre a evolução do ganho de massa corporal, cerebral, cerebelar e hipocampal e concentração protéica de estruturas cerebrais

No primeiro dia de vida pós-natal, a verificação da massa corporal dos ratos evidenciou média significativamente menor no grupo desnutrido em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A diferença evidenciou-se mais acentuada durante o período lactacional e pós-lactacional ( $p < 0,01$ ) (tabela 3.1). Da mesma forma, a massa do cérebro e cerebelo apresentou-se menor no grupo desnutrido em todas as idades consideradas, acentuando-se a partir de P25 ( $p < 0,01$ ), enquanto que a diferença relativa à massa do hipocampo foi observada apenas em P25 e 75-80 ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) (tabela 3.1). A desnutrição não afetou a concentração de proteína nas estruturas cerebrais avaliadas nas idades consideradas, exceto em hipocampo de ratos desnutridos de 7 dias de idade ( $p < 0,05$ ; teste *t*-Student) (tabela 3.2), assim como não influenciou a média do número de filhotes nascidos por ninhada, com  $10,90 \pm 0,37$  filhotes/ninhada no grupo  $G_{25}$  e  $9,90 \pm 0,83$  no grupo  $G_7$  ( $n=20$  em cada grupo; teste *t*-Student).

#### 3.2 Sensibilidade à picrotoxina

##### 3.2.1 Ação convulsivante da picrotoxina e captação de [ $^3$ H]GABA em córtex cerebral e hipocampo em ratos jovens

Com a finalidade de investigar os efeitos da desnutrição sobre a ação convulsivante da picrotoxina, foi realizada uma curva dose-resposta para a picrotoxina em ratos controle e desnutridos de 25 dias de idade, de ambos os sexos. A picrotoxina foi injetada subcutaneamente (s.c.) nas doses de 2,3 ; 4,0 ; 4,8 ; 5,6 e 6,4mg/kg (figura 3.1). A menor dose que induziu ao *status epilepticus* em 100% dos ratos, diferiu entre os grupos: 4,8mg/kg

em ratos desnutridos e 5,6mg/kg em ratos controle ( $p < 0,05$ ; teste exato de Fisher) (figura 3.1).

Tabela 3.1- Efeitos da desnutrição sobre a evolução do ganho de massa corporal e cerebral.

		G <sub>25</sub>	G <sub>7</sub>
Massa corporal (g)	P1	6,25 ± 0,63	5,41 ± 0,57*
	P7	16,02 ± 1,70	9,13 ± 1,14**
	P14	31,77 ± 2,65	13,14 ± 3,98**
	P21	49,03 ± 4,11	19,03 ± 5,81**
	P25	67,37 ± 4,99	23,17 ± 5,49**
	P75-80	365,40 ± 29,50	95,00 ± 7,58**
Massa cerebral (mg)	P7	587,8 ± 50,0	537,0 ± 39,9*
	P25	1245,0 ± 139,3	799,0 ± 182,8**
	P75-80	1415,0 ± 63,4	1050,0 ± 60,8**
Massa cerebelar (mg)	P7	83,2 ± 4,3	71,0 ± 13,7*
	P25	235,0 ± 49,3	175,0 ± 26,3**
	P75-80	323,0 ± 21,2	260,0 ± 23,7**
Massa hipocampal (mg)	P7	40,3 ± 7,6	39,1 ± 4,3
	P25	74,8 ± 7,2	66,4 ± 5,0*
	P75-80	248,7 ± 26,5	160,5 ± 27,8**

*Nota:* Os dados foram expressos como *média ± D.P.M.* ( $n=40$  para a massa corporal;  $n=14$  para a massa das estruturas cerebrais). Nas aferições até os 25 dias foram considerados animais de ambos os sexos, enquanto aos 75 dias de idade foram considerados somente os machos. \* Difere de G<sub>25</sub> na mesma idade ( $p < 0,05$  teste *t*-Student); \*\* Difere de G<sub>25</sub> na mesma idade ( $p < 0,01$  teste *t*-Student).

Tabela 3.2- Efeitos da desnutrição sobre a concentração protéica de estruturas cerebrais.

		G <sub>25</sub>	G <sub>7</sub>
Córtex (mg%)	P7	10,20 ± 1,39	9,76 ± 2,18
	P25	12,27 ± 1,05	13,57 ± 2,61
	P75-80	13,12 ± 0,57	11,96 ± 1,59
Cerebelo (mg%)	P7	10,58 ± 1,90	8,90 ± 1,51
	P25	13,06 ± 1,19	11,70 ± 1,67
	P75-80	13,61 ± 1,01	13,16 ± 1,56
Hipocampo (mg%)	P7	12,33 ± 2,70	9,68 ± 0,87*
	P25	14,79 ± 1,75	12,05 ± 2,59
	P75-80	12,08 ± 0,89	12,94 ± 0,47

*Nota:* Nas aferições até os 25 dias foram considerados animais de ambos os sexos, enquanto aos 75 dias de idade foram considerados somente os machos. Os dados foram expressos como *média ± D.P.M.* \*  $p < 0,05$  comparado a G<sub>25</sub> (teste *t*-Student) ( $n= 8-10$  em cada grupo).

A latência para a convulsão também foi menor no grupo desnutrido ( $p < 0,05$ ; teste *t*-Student) (figura 3.2). Ambos os grupos apresentaram um período de latência dose-dependente ( $r=0,723$ ,  $p < 0,001$ , G<sub>25</sub>;  $r=0,386$ ,  $p < 0,05$ , G<sub>7</sub> - Coeficiente de Correlação de Pearson) (figura 3.2).

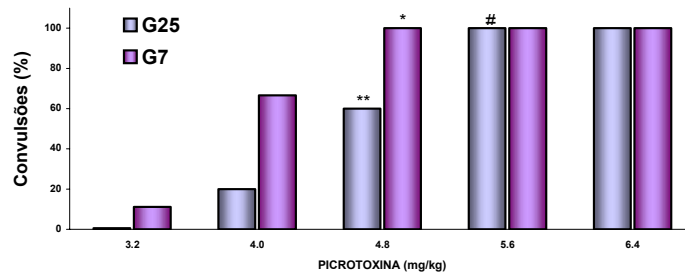


Figura 3.1– Convulsões induzidas por picrotoxina. Os ratos controle e submetidos à desnutrição gestacional e pós-natal, de ambos os sexos, foram injetados com picrotoxina (s.c.) aos 25 dias de idade e observados por 60 minutos quanto à ocorrência de convulsões.  $n=9-10$  animais/grupo. #  $p<0,05$  quando comparado com  $G_{25}$  (3,2; 4,0; 4,8 mg/kg). \*  $p<0,05$  quando comparado com  $G_7$  (3,2 e 4,0mg/kg). \*\*  $p<0,05$  quando comparado com  $G_7$  (4,8mg/kg). Os dados foram expressos como percentual de ratos que apresentaram convulsões. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste exato de Fisher.

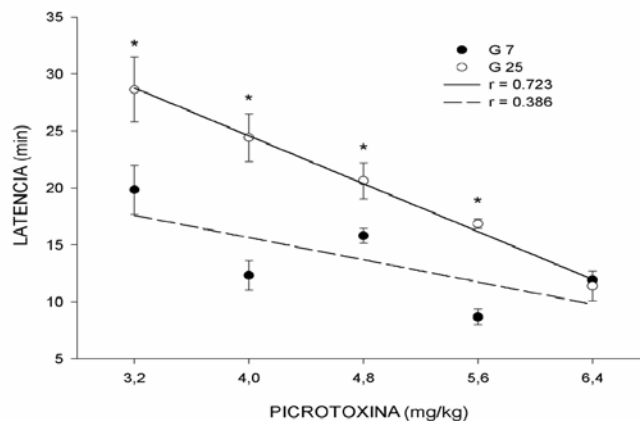


Figura 3.2– Latência para convulsões induzidas por picrotoxina. Os ratos controle e submetidos à desnutrição gestacional e pós-natal, de ambos os sexos, foram injetados com picrotoxina aos 25 dias de idade. Na latência para as convulsões foi considerado o tempo para o início das convulsões clônicas de todos os membros.  $n=9-10$  animais/grupo. A latência foi expressa como *média ± E.P.M.* \* Significativamente diferente de  $G_7$  para a mesma dose ( $p<0,05$ , teste  $t$ -Student). Linhas contínua ( $G_{25}$ ) e pontilhada ( $G_7$ ) indicam o Coeficiente de Correlação de Pearson relativo à latência para convulsões dose-dependentes.

Para determinar a concentração de GABA e o tempo de incubação adequado para os ensaios de captação de GABA, fatias de hipocampo e córtex parietal foram incubadas com 25, 50 e 100 $\mu$ M GABA por 5, 10, 15 e 30 minutos. Com base nestes dados prévios, a concentração de GABA e período de incubação, utilizados nos experimentos, foram de 25 $\mu$ M e 15 minutos, respectivamente, em função da linearidade da curva manifesta nestas condições de incubação (figura 3.3 A e B).



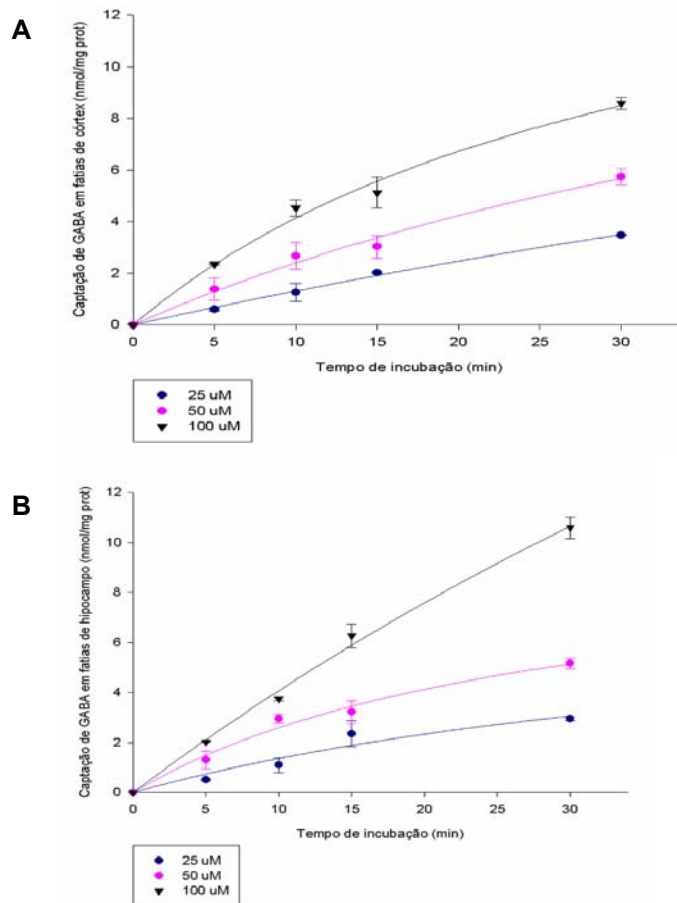


Figura 3.3 – Curva de captação de GABA por fatias de (A) córtex cerebral parietal e (B) hipocampo de ratos de 25 dias.

Os ensaios de captação de GABA por fatias de córtex cerebral parietal e hipocampo foram realizados com a finalidade de verificar se a desnutrição e/ou administração de picrotoxina influenciam a captação de GABA por estas estruturas cerebrais. Além disso, curvas de tempo pós-administração de picrotoxina (s.c.) foram realizadas com finalidade de observar o efeito do mesmo sobre a captação de GABA em fatias de córtex cerebral.

Em córtex cerebral, a desnutrição aumentou a captação de GABA ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan) em todos os tempos pós-picrotoxina /veículo considerados. Já a picrotoxina não teve efeito sobre ambos os grupos (figura 3.4 A). Não houve diferença na captação de GABA para o mesmo grupo em diferentes tempos de incubação pós-picrotoxina/veículo, exceto para o grupo  $G_{7\text{-picrotoxina}}$ , ou seja, o efeito da picrotoxina foi maior em fatias de córtex cerebral de ratos desnutridos as quais foram

incubadas 60 minutos após a injeção de picrotoxina, em comparação com aquelas fatias incubadas 15 minutos pós-picrotoxina (figura 3.4 A).

Em fatias de hipocampo (incubadas apenas 60 minutos após a injeção de picrotoxina/veículo), a desnutrição também induziu ao aumento da captação de GABA ( $p<0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan). Nesta estrutura, contudo, a picrotoxina causou aumento na captação de GABA em ambos os grupos ( $p<0,05$ ) (figura 3.4 B).

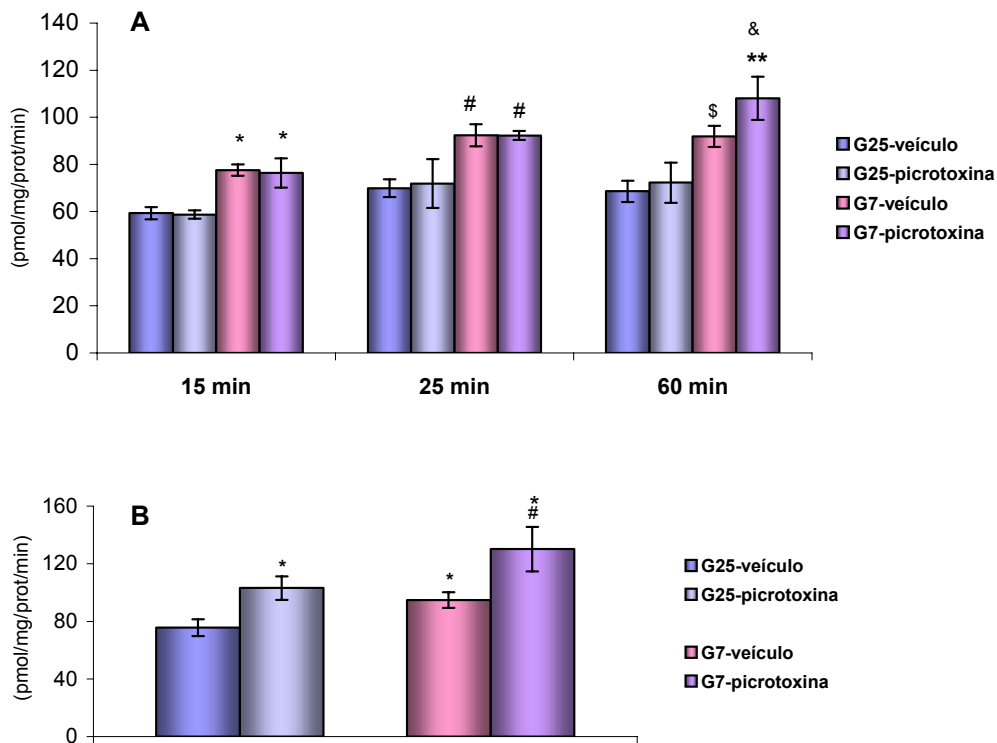


Figura 3.4 – (A) Captção de GABA por fatias de córtex cerebral parietal de ratos controle (G<sub>25</sub>) e desnutridos (G<sub>7</sub>) de 25 dias de ambos os sexos. Os dados estão representados como média ± E.P.M. (barras) para 6 a 8 animais/grupo, cujas fatias de córtex foram incubadas 15, 25 e 60 minutos após a injeção de picrotoxina. Experimentos foram feitos em triplicata. Significância das diferenças (ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla amplitude de Duncan): \*  $p<0,05$  comparado com G<sub>25</sub>-veículo e -picrotoxina 15 minutos; #  $p<0,05$  comparado com G<sub>25</sub>-veículo e -picrotoxina 25 minutos; \$  $p<0,05$  comparado com G<sub>25</sub>-veículo 60 minutos; \*\*  $p<0,05$  comparado com G<sub>25</sub>-veículo e -picrotoxina 60 minutos; &  $p<0,05$  comparado com G<sub>7</sub>-picrotoxina 15 minutos. (B) Captção de GABA por fatias de hipocampo de ratos controle (G<sub>25</sub>) e desnutridos (G<sub>7</sub>) após 60 minutos da injeção de veículo/picrotoxina. Os dados estão representados como média ± E.P.M. (barras) e foram obtidos a partir de três experimentos independentes, realizados em triplicata para oito animais por grupo. Significância de diferenças (ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla amplitude de Duncan): \*  $p<0,05$  comparado com G<sub>25</sub>-veículo; #  $p<0,05$  comparado com G<sub>7</sub>- e G<sub>25</sub>-veículo.

### 3.2.2 Efeitos da picrotoxina “*in vitro*” sobre o metabolismo da glicose em córtex cerebral de ratos Wistar controle e desnutridos

Considerando que “*in vitro*” é relatada atividade epileptiforme em estruturas cerebrais incubadas com picrotoxina (WONG e YAMADA, 2001), e que mudanças metabólicas e bioenergéticas ocorrem em episódios agudos de convulsões na epilepsia crônica (FERNANDES et al., 1999; MELDRUM, 2002), com conseqüências agudas sobre o metabolismo da glicose (MELDRUM, 1983; THEODORE, 1999; CORNFORD et al., 2002), avaliações do metabolismo da glicose nestas condições podem constituir indicativo de sensibilidade à picrotoxina.

As figuras 3.5 A e B mostram que a picrotoxina estimula a oxidação da glicose em fatias de córtex cerebral de ratos controle e desnutridos de 25 dias de idade, havendo, porém, estímulo à oxidação já em concentração de 2,5 $\mu$ M no meio de incubação nos animais desnutridos ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan), enquanto nos animais controle a dose necessária para estimulação à oxidação da glicose é de 5,0 $\mu$ M ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan). Embora para os animais desnutridos a estimulação se mantenha aos 75-80 dias (os ratos controle não apresentam resposta à picrotoxina nas concentrações estudadas), o aumento da oxidação da glicose ocorre apenas frente ao uso de 10 $\mu$ M de picrotoxina no meio de incubação ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan), o que poderia configurar, também nos desnutridos, uma alteração da susceptibilidade idade-dependente (figuras 3.5 A e B).

### 3.2.3 Efeitos da picrotoxina sobre a peroxidação lipídica em cérebro de ratos controle e desnutridos

Considerando que a proteína da dieta é importante para os mecanismos antioxidantes e que a desnutrição protéica pode levar ao aumento do dano oxidativo ao diminuir defesas antioxidantes do organismo (WANG et al., 2002), a avaliação da susceptibilidade de ratos controle e desnutridos frente a parâmetros envolvendo a

peroxidação lipídica na utilização da picrotoxina, constitui modelo relacionado ao sistema GABAérgico passível de avaliar mecanismos e/ou conseqüências da maior susceptibilidade à droga evidenciada em itens anteriores (3.2.1 e 3.2.2).

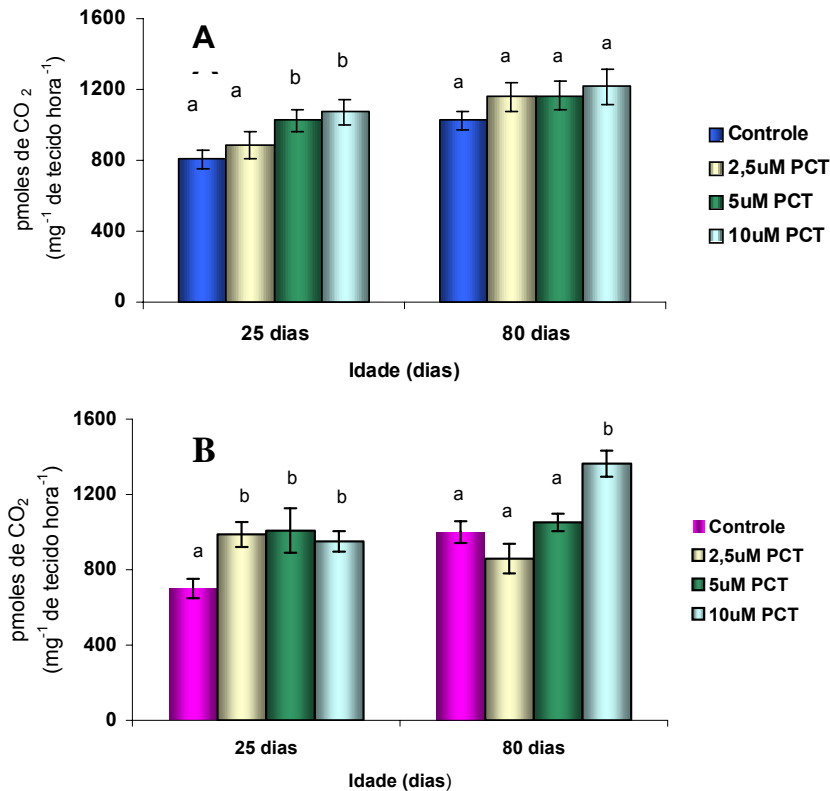


Figura 3.5 - Efeitos de diferentes concentrações de picrotoxina (PCT) “*in vitro*” sobre a oxidação de D-[U-<sup>14</sup>C]Glicose a CO<sub>2</sub> em fatias de córtex cerebral de ratos de 25 dias (de ambos os sexos) e 75-80 dias (machos) submetidos a dieta contendo (A) 25% de caseína (G<sub>25</sub>) e (B) 7% de caseína (G<sub>7</sub>) durante os períodos gestacional e pós-natal. Cada barra representa a *média ± E.P.M.*, para 10 animais. Sobrescritos de letras diferentes expressam médias estatisticamente diferentes nas respectivas idades ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Duncan).

Houve expressivo aumento da peroxidação lipídica em cérebro e cerebelo de ratos desnutridos previamente injetados com concentrações crescentes de picrotoxina (figura 3.6 A e B) ( $p < 0,01$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan), comparativamente ao seu controle sem picrotoxina, enquanto o efeito inverso foi

observado nos ratos controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan).

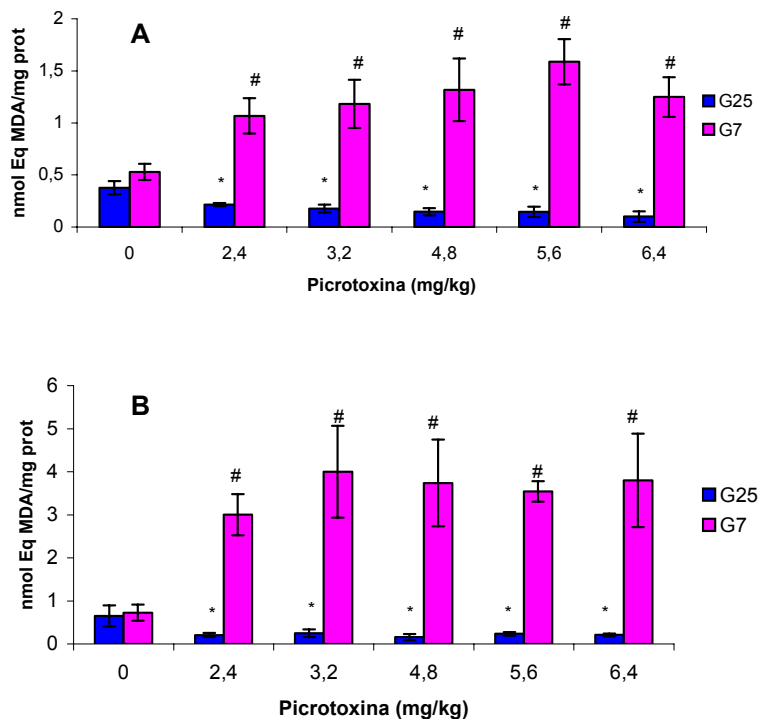


Figura 3.6 – Efeitos da picrotoxina sobre a peroxidação lipídica em cérebro (A) e cerebelo (B) de ratos de 25 dias, controle ( $G_{25}$ ) e desnutridos pré e pós-natalmente ( $G_7$ ). Animais foram sacrificados por decapitação (1 hora após a administração de picrotoxina/veículo via intraperitoneal nas concentrações de 2,4; 3,2; 4,8; 5,6 e 6,4mg/kg), o cérebro isolado e o conteúdo de TBARS foi determinado e expresso como nmol de equivalentes MDA/mg proteína. Dados representam a *média*  $\pm$  D.P.M. para 6-8 animais por grupo/dose de picrotoxina. # Estatisticamente diferente dos demais ( $p < 0,01$ ; ANOVA/Duncan). \* Estatisticamente diferente de  $G_{25}$  e  $G_7$  sem picrotoxina ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Duncan).

Como evidenciado em itens anteriores, a manifestação convulsivante e a latência são dose-dependentes para os grupos (figuras 3.1 e 3.2). Na análise dos resultados expressos na figura 3.6 A e B, observa-se que tanto em ratos controle quanto desnutridos, os efeitos da droga são observados em todas as doses de picrotoxina utilizadas, levando a questionar se os efeitos observados estão correlacionados com a severidade das manifestações convulsivantes ou são devidos a eventuais propriedades pró-oxidantes da picrotoxina. A avaliação *in vitro* das propriedades oxidantes da droga, mediante as técnicas

do TRAP e TBA, demonstrou que a própria droga possui capacidade de gerar danos oxidativos e que esta propriedade já é expressa nas menores concentrações de picrotoxina avaliadas (figura 3.7 A e B) ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Duncan).

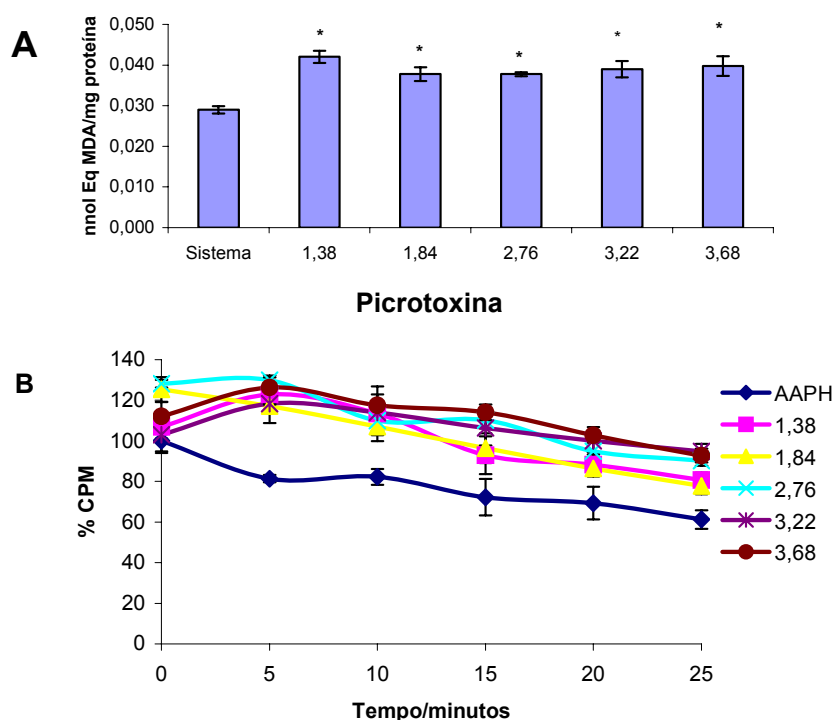


Figura 3.7 – (A) Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico geradas em um sistema contendo gema de ovo como substrato lipídico e AAPH como gerador de dano oxidativo. As barras representam *média ± E.P.M.* para três experimentos independentes. \* difere do controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Duncan) (B) Potencial Antioxidante Total (TRAP) “*in vitro*”. Dados representados com *média ± E.P.M.* para três experimentos independentes (concentrações de picrotoxina no meio reacional= 1,38; 1,84; 2,76; 3,22 e 3,68  $\mu\text{g/mL}$ ). Em todas as concentrações de picrotoxina há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $\blacklozenge$ ), exceto nos tempos 15 e 20, nas concentrações de 1,38 e 1,84  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Duncan).

### 3.2.4 Efeitos da picrotoxina injetada “*in vivo*” sobre a oxidação “*ex vivo*” do acetato e da glicose em fatias córtex cerebral e hipocampo de ratos controle e desnutridos

Ao avaliar os efeitos da desnutrição sobre a oxidação do acetato e da glicose pós tratamento agudo e crônico com picrotoxina, este estudo objetivou verificar alterações interações metabólicas neuronais e astrocitárias nestas condições, em período precoce pós

aplicação (24 horas) de uma única dose e após aplicações diárias (30 dias) de dose subconvulsivante de picrotoxina.

Embora a oxidação da glicose não tenha sido afetada 24 horas após a aplicação de uma única dose de picrotoxina em ambos os grupos ( $G_{25}$  e  $G_7$ ), a oxidação do acetato aumentou significativamente em fatias de córtex e hipocampo de ratos imaturos controle e desnutridos (figura 3.8 A e B).

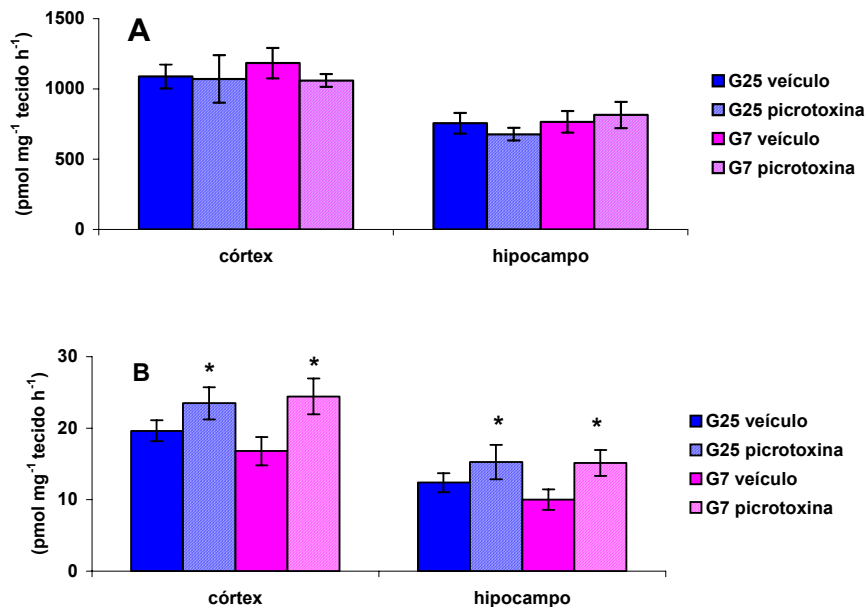


Figura 3.8 – Efeitos da picrotoxina sobre a oxidação de D-[U-<sup>14</sup>C]Glicose (A) e [U-<sup>14</sup>C] Acetato a CO<sub>2</sub> (B) em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 25 dias de idade, controle ( $G_{25}$ ) e submetidos à desnutrição gestacional e pós-natal ( $G_7$ ), em período precoce pós dose única de picrotoxina. Avaliações foram feitas 24 horas após a aplicação i.p. da picrotoxina (1,5mg/kg) para 11 animais por grupo em dois experimentos independentes. Foram considerados apenas animais machos. Os dados foram expressos como *média* ± *E.P.M.* \* Estatisticamente diferente de  $G_{25}$  e  $G_7$  veículo em cada estrutura ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Duncan).

Já a administração crônica de picrotoxina ocasionou efeito sobre a oxidação da glicose em fatias de córtex cerebral, única estrutura avaliada sob estas condições, apenas em ratos desnutridos (figura 3.9 A e B), sem evidenciar diferenças na oxidação do acetato a CO<sub>2</sub>.

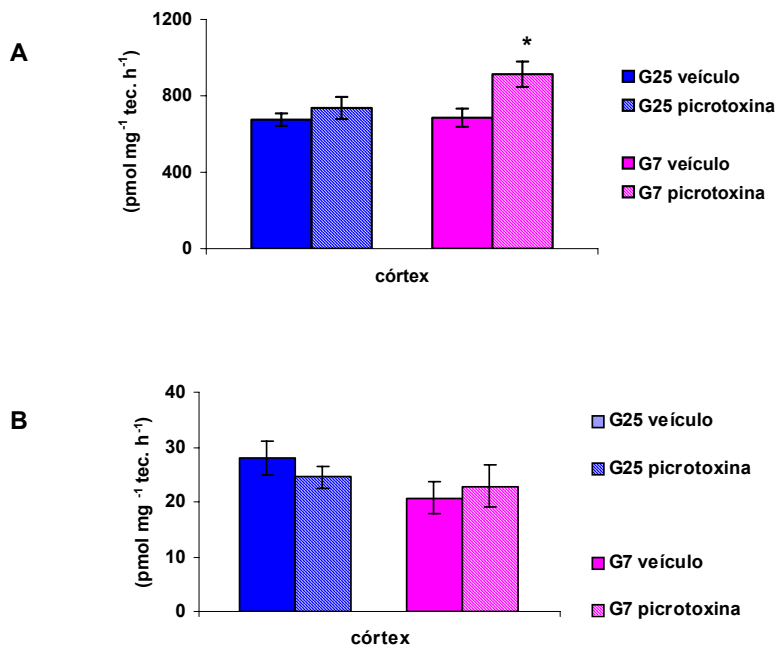


Figura 3.9 – Efeitos da aplicação crônica da picrotoxina sobre a oxidação de (A) D-[U-<sup>14</sup>C]Glicose a CO<sub>2</sub> e (B) [U-<sup>14</sup>C]Acetato em fatias de córtex cerebral de ratos controle (G<sub>25</sub>) e ratos submetidos à desnutrição gestacional e pós-natal (G<sub>7</sub>). Avaliações foram feitas após aplicações diárias de picrotoxina (1,5mg/kg) durante 30 dias para 8 animais por grupo em dois experimentos independentes. Foram utilizados apenas animais machos. Os dados foram expressos como *média ± E.P.M.* \* Estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Duncan).

### 3.2.5 Efeitos da desnutrição sobre o “*kindling*” induzido por picrotoxina

Em se tratando de ratos em desenvolvimento, controle e desnutridos gestacional e pós-natalmente, o padrão de ganho de massa corporal foi observado com a finalidade de avaliar eventuais interferências da droga e/ou “*kindling*”. Apesar da tendência a menor ganho na massa corporal dos ratos submetidos ao procedimento, estes dados não se configuram em significância estatística, exceto no grupo G<sub>25</sub> no qual a massa corporal difere significativamente apenas quando ocorre o agravamento do quadro convulsivante ( $p < 0,05$ ; Teste *t*-Student) (figura 3.10 A e B).

A repetida administração de picrotoxina (1,5mg/kg/rato/dia) resultou em progressivo desenvolvimento das características convulsivantes. Observa-se uma diferença entre os grupos em relação ao primeiro dia de manifestação de cada estágio (ANOVA de Kruskal



Wallis;  $\chi^2 > 18,6$ ;  $df=3$ ;  $p<0,001$ ). O grupo  $G_{25}\text{-Fêmeas}$  atingiu os diversos estágios mais rapidamente (Mann-Whitney,  $p<0,01$ ). O grupo  $G_{7}\text{-Machos}$  atingiu os estágios 1 e 3 mais precocemente do que o grupo  $G_{25}\text{-Machos}$  (Mann-Whitney,  $p<0,05$ ), sendo que, neste último grupo, o estágio 3 não foi observado. Os animais do grupo  $G_{7}\text{-Fêmeas}$  foram mais rápidos do que  $G_{7}\text{-Machos}$  no alcance dos diferentes estágios (Mann-Whitney,  $p<0,05$ ), exceto para o estágio 2 (Mann-Whitney,  $p<0,052$ ), onde houve uma tendência estatística para a mesma diferença. Portanto, o tratamento nutricional caracteriza efeitos opostos em animais machos e fêmeas no que se refere ao início dos estágios 1 e 3. Além disso, as fêmeas manifestam os diversos estágios mais precocemente do que os machos (Mann-Whitney,  $p<0,01$ ) (figura 3.11).

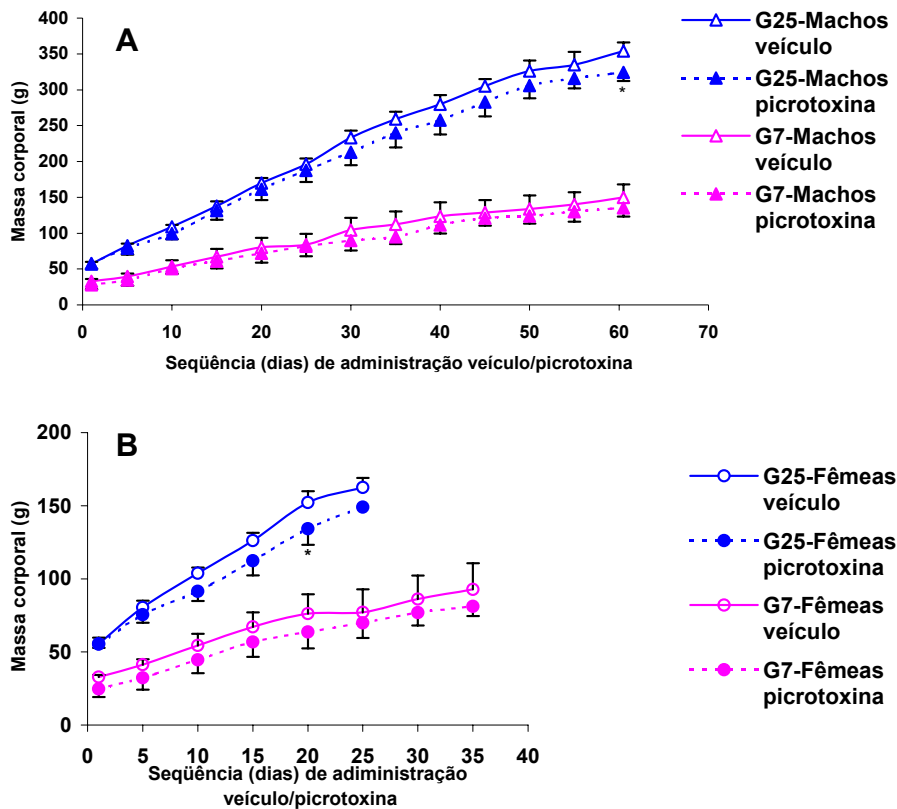


Figura 3.10 - Evolução do ganho de massa corporal de ratos machos (A) e fêmeas (B) em desenvolvimento, submetidos à administração diária de veículo/picrotoxina (i.p.). Dados foram expressos como *média ± DPM* para 9 animais/grupo para os injetados com picrotoxina e 6 para os injetados com o veículo. \* Expressa média estatisticamente diferente do grupo  $G_{25}\text{-Machos}$  veículo (A) e  $G_{25}\text{-Fêmeas}$  veículo (B) ( $p<0,05$ ; Teste *t*-Student).

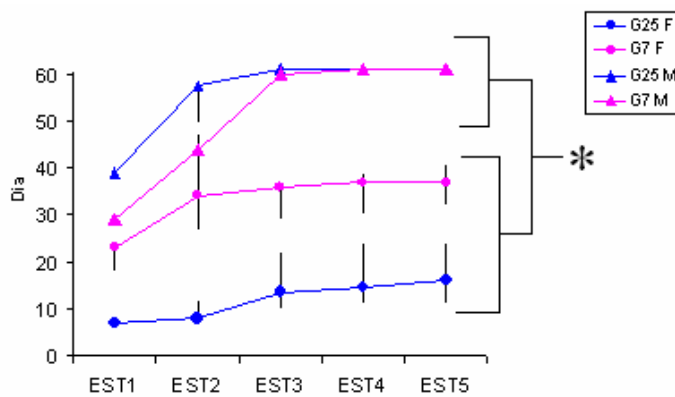


Figura 3.11 – Mediana (intervalo interquartil) das latências (dias) para a manifestação dos estágios de convulsão em ratos controle e desnutridos submetidos ao procedimento de “*kindling*” por picrotoxina (1,5mg/kg/rato, i.p.). Os ratos foram injetados diariamente até alcance do estágio 5, ou durante 60 dias, a partir do 25º dia de vida pós-natal e foram observados por 60 minutos após a injeção de picrotoxina para detecção de sinais convulsivantes. Os procedimentos ocorreram invariavelmente entre 9:00 e 12:00 horas. ( $n = 9$  por grupo). Os dados foram censurados no 61º dia (ou seja, valores acima de 60 foram considerados como sendo 61). Asterisco indica que os machos são mais resistentes ao tratamento (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ). Cores mostram, dentro do mesmo sexo, a diferença na resistência ao tratamento de acordo com o estado nutricional (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Observa-se efeito oposto em cada sexo.

### 3.3 Convulsões induzidas por ácido quinolínico e captação de [ $^3$ H]glutamato

Para investigar os efeitos da desnutrição sobre a ação convulsivante do ácido quinolínico, foi realizada uma curva dose-resposta nas doses de 36, 72, 145, 194 e 242nmol, conforme figura 3.12. Foram utilizados ratos de ambos os sexos. A menor dose de ácido quinolínico que causou convulsões em todos os animais desnutridos foi de 242nmol, enquanto que no grupo controle foi de 145nmol (teste exato de Fisher) (figura 3.12).

#### 3.3.1 Captação de [ $^3$ H]glutamato

Considerando que o transporte astrocitário sódio-dependente de glutamato é o mais importante processo para a manutenção de concentrações extracelulares de glutamato abaixo de níveis tóxicos (ANDERSON e SWANSON, 2000; DANBOLT, 2001) e que as convulsões induzidas por ácido quinolínico constituem estratégia farmacológica para avaliar a excitotoxicidade por meio de estimulação do sistema glutamatérgico (STONE, 2001; TAVARES et al., 2000, 2002), foram investigados os efeitos da desnutrição sobre a

captação de [ $^3\text{H}$ ]glutamato por fatias de córtex cerebral e hipocampo, 10 minutos após a injeção de ácido quinolínico. Não houve efeito da desnutrição, assim como não houve efeito do ácido quinolínico sobre as estruturas cerebrais avaliadas (figura 3.13).

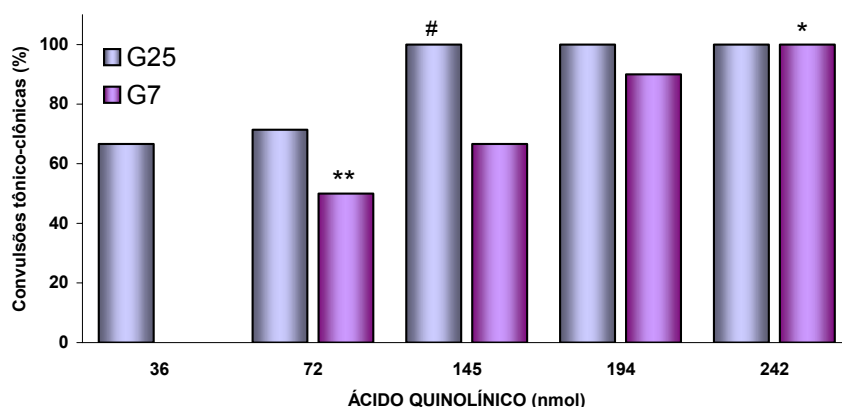


Figura 3.12 – Convulsões induzidas por AQ em ratos controle (G<sub>25</sub>) e desnutridos (G<sub>7</sub>) de 25 dias de idade. Os ratos (de ambos os sexos por não haver sido encontrada diferença entre eles quanto a este parâmetro) foram injetados (i.c.v.) com AQ e observados por 10 minutos. Dados estão representados como percentual de ratos que apresentaram convulsões tônico-clônicas ( $n = 8-10$  animais por grupo). Foram utilizados os dados referentes a ambos os sexos, por não haver sido observada diferença entre eles quanto a este parâmetro. #  $p < 0,05$  comparado a G<sub>25</sub> (72 e 36nmol); \*  $p < 0,05$  comparado com G<sub>7</sub> (72 e 145 nmol); \*\*  $p < 0,05$  comparado com G<sub>25</sub> (a partir de 145nmol) (Teste exato de Fisher).

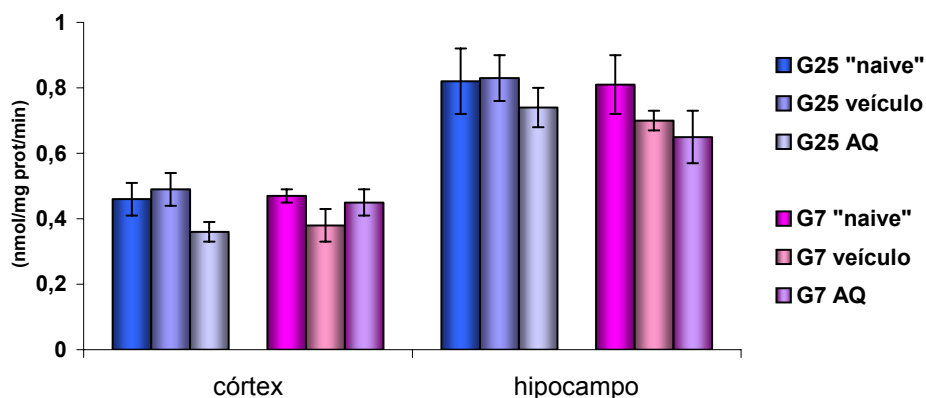


Figura 3.13 – Captação de glutamato por fatias de córtex cerebral parietal e hipocampo de ratos controle (G<sub>25</sub>) e desnutridos (G<sub>7</sub>) de 25 dias, 10 minutos após a administração de AQ ou salina (i.c.v.) e ratos que não foram submetidos à cirurgia (*naive*). Período de incubação: 7 e 5 minutos, em córtex e hipocampo, respectivamente. Grupos: G<sub>25</sub>-*naive*; G<sub>25</sub>-veículo; G<sub>25</sub>-AQ; G<sub>7</sub>-*naive*; G<sub>7</sub> veículo; G<sub>7</sub>-AQ. Os dados representam as *médias*  $\pm$  E.P.M. e foram obtidos a partir de quatro experimentos independentes, feitos em triplicata para 12 animais/grupo para a captação por fatias de córtex. Experimentos para a captação de glutamato por fatias de hipocampo foram feitos em triplicata com 6 animais/grupo, em dois experimentos independentes. Foram utilizados dados referentes a ambos os sexos, por não haver sido encontrada diferença entre eles quanto a este parâmetro. Não houve diferença entre os grupos na mesma estrutura cerebral usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

### 3.4 Captação de GABA e ontogenia

Com a finalidade de avaliar o perfil de desenvolvimento dos GATs em modelo de desnutrição, a captação de GABA por fatias de córtex cerebral foi avaliada frente à utilização de inibidores de GAT-3 ( $\beta$ -alanina) e GAT-1 e 2 (L-DABA). A integridade e viabilidade das fatias avaliadas por meio de atividade da lactato desidrogenase em todas as condições de incubação, mostrou não haver liberação significativa (LDH citosólico < 3%), indicando ausência de dano celular (KOH, J. e CHOI, D.W., 1987 *apud* TAKAHASHI et al., 2000) nas condições de incubação utilizadas.

Em córtex em desenvolvimento, a captação de GABA transitoriamente excedeu os valores de adultos em ratos controle, declinando a valores similares aos dos ratos adultos nas avaliações feitas aos 25 dias de idade. A desnutrição ocasionou um perfil diferenciado, com manutenção de maior captação de GABA até P25. Embora tenha sido observado um declínio na captação de GABA de P7 a P25 neste grupo, este não atinge valores dos adultos (figura 3.14 A e B). A maior captação de GABA por ratos desnutridos em P25, em comparação com o grupo controle na mesma idade (figura 3.14 A e B), também é observada em P7 em condição de incubação contendo  $25\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]GABA (figura 3.14 A), chegando a um padrão similar entre os grupos em P75 (figura 3.14 A e B). O perfil de captação proporcional com diferentes concentrações de GABA no meio de incubação ( $25$  e  $100\mu\text{M}$ ) foi de aproximadamente 3,1 vezes maior nas fatias incubadas com  $100\mu\text{M}$  de GABA, em ambos os grupos ( $G_{25}$  e  $G_7$ ).

A inibição da captação de GABA por meio de  $\beta$ -alanina, um potente antagonista de GAT-3 (BORDEN et al., 1992), foi maior no grupo controle aos 7 dias, comparado aos 25 e 75 dias, quando o percentual de inibição diminuiu significativamente, exibindo valores similares. Já em ratos desnutridos foi detectada alta inibição da captação de GABA ainda aos 25 dias, e redução para valores similares ao do controle apenas aos 75 dias (figura 3.15 A e B). A inibição induzida por  $\beta$ -alanina aos 25 dias de idade foi significativamente

diferente entre os grupos, sendo que o percentual é maior no grupo desnutrido (figura 3.15 A e B).

Por outro lado, L-DABA apresenta a mesma capacidade de inibição, tanto no mesmo grupo em diferentes idades quanto na mesma idade em diferentes grupos de dieta (figura 3.16 A e B).

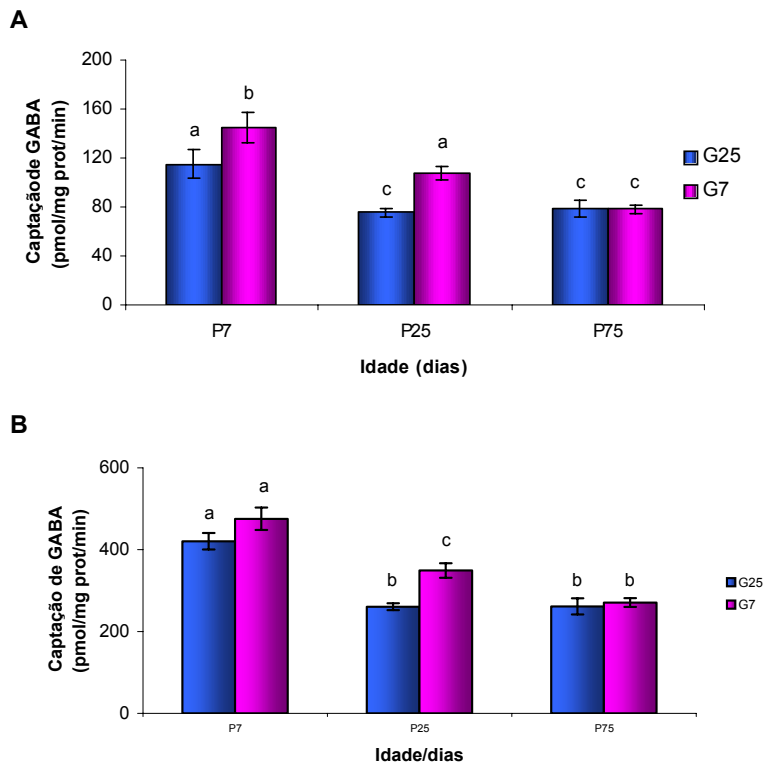


Figura 3.14 – Captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos controle ( $G_{25}$ ) e desnutridos ( $G_7$ ) aos 7, 25 e 75-80 dias de idade, incubados por 15 minutos com  $25\mu\text{M}$  (A) ou  $100\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]GABA (B). Os dados representam a *média*  $\pm$  *E.P.M.* e foram obtidos a partir de três experimentos independentes, feitos em triplicata para 12 animais por grupo e idade. Nas idades de 7 e 25 dias foram utilizados animais de ambos os sexos nos experimentos, enquanto que aos 75 dias de idade foram utilizados somente animais machos. Sobrescritos de letras diferentes expressam médias estatisticamente diferentes (ANOVA/Duncan,  $p < 0,05$ ).

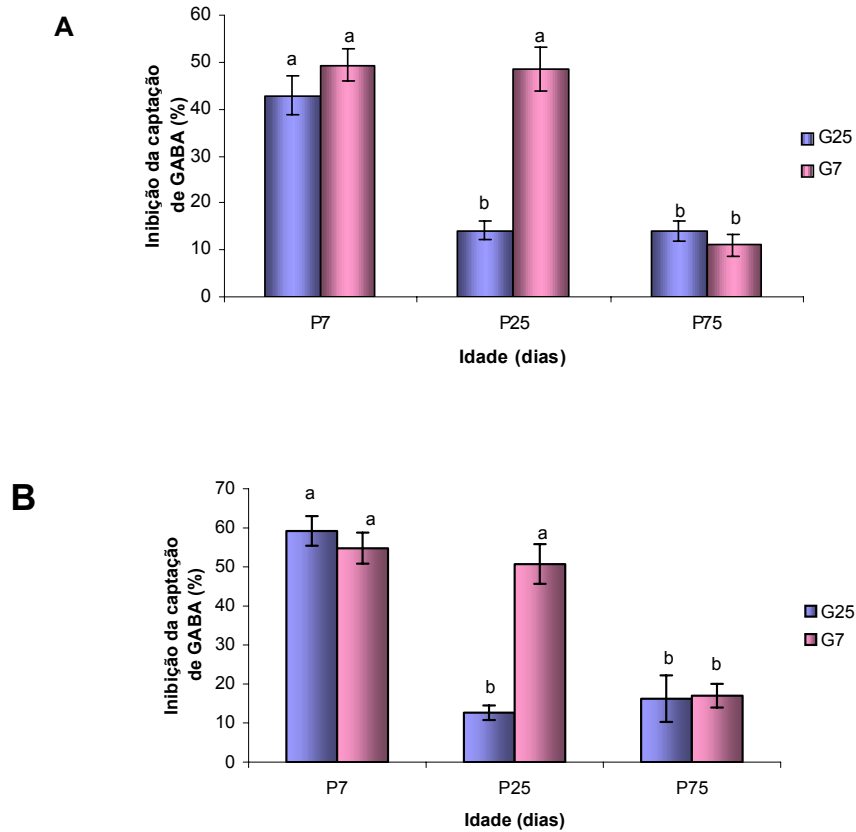


Figura 3.15 – Percentual de inibição da captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos controle (G<sub>25</sub>) e desnutridos (G<sub>7</sub>), pré-incubadas/incubadas com  $\beta$ -alanina (1mM) e incubadas com 25 $\mu$ M (A) ou 100 $\mu$ M de [<sup>3</sup>H]GABA (B). Os dados representam a *média*  $\pm$  E.P.M. e foram obtidos a partir de três experimentos independentes, que foram feitos em triplicata para 12 animais por grupo e idade. Nas idades de 7 e 25 dias foram utilizados animais de ambos os sexos nos experimentos, enquanto que aos 75 dias de idade foram utilizados somente animais machos. Sobrescritos de letras diferentes expressam médias estatisticamente diferentes (ANOVA/Duncan;  $p < 0,05$ ).

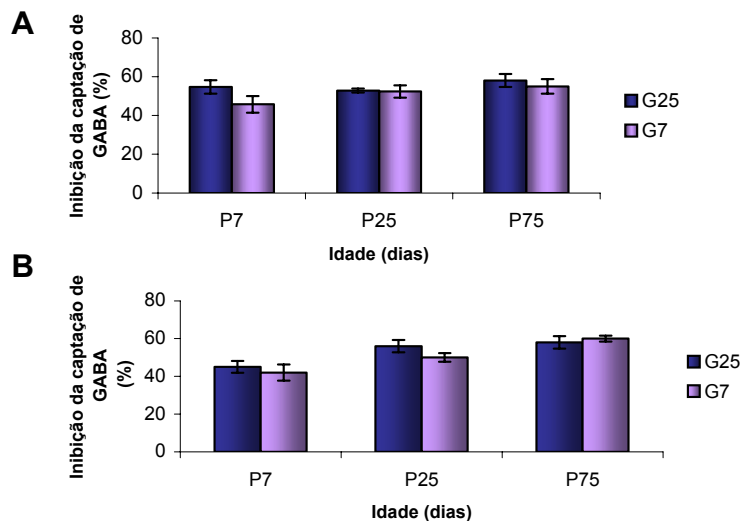


Figura 3.16 – Percentual de inibição da captação de GABA por fatias de córtex parietal cerebral de ratos controle ( $G_{25}$ ) e desnutridos ( $G_7$ ), pré-incubadas/incubadas com L-DABA (1mM) e incubadas com 25  $\mu$ M (**A**) ou 100 $\mu$ M de [ $^3$ H]GABA (**B**). Os dados representam a *média*  $\pm$  *E.P.M.* e foram obtidos a partir de três experimentos independentes, feitos em triplicata para 12 animais por grupo e idade. Nas idades de 7 e 25 dias foram utilizados animais de ambos os sexos nos experimentos, enquanto que aos 75 dias de idade foram utilizados somente animais machos. Não há diferença estatística entre os grupos (ANOVA/Duncan).

### 3.5 Efeitos de altas concentrações extracelulares de potássio sobre o metabolismo cerebral do acetato, lactato e glicose em ratos controle e desnutridos

Sabendo-se que altas concentrações de potássio extracelular constituem estímulo para a utilização de nutrientes energéticos pelo SNC (PENG et al., 1996; SOKOLOFF et al., 1996; McDOUGAL et al., 1997; HASSEL e SONNEWALD, 2002; HERTZ e PENG, 2002), a oxidação do acetato, da glicose e do lactato foi avaliada em estruturas cerebrais de ratos controle e submetidos a diferentes modelos de desnutrição.

Como mostra a figura 3.17, a oxidação do acetato a  $CO_2$  não foi modificada pela dieta. Por outro lado, as concentrações extracelulares de potássio de 12, 20 e 50mM aumentaram a oxidação do acetato, comparadas com o meio contendo 2,7mM  $[K^+]_e$  ( $p < 0,01$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan) (figuras 3.17 e 3.18). A adição do inibidor da  $Na^+, K^+$ -ATPase (ouabaína 1mM) ao sistema de incubação contendo 12mM  $[K^+]_e$ , diminuiu a oxidação do acetato a  $CO_2$  em fatias de tecido cerebral de ratos controle e desnutridos ( $p < 0,01$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan) (figura

3.18). Considerando estes resultados, foi averiguado o efeito da monensina (ionóforo de  $\text{Na}^+$ ) sobre a oxidação do acetato em um sistema de incubação contendo  $2,7\text{mM} [\text{K}^+]_e$ . Como mostra a figura 3.18 a monensina ( $10\mu\text{M}$ ) diminuiu a oxidação do acetato a  $\text{CO}_2$  em córtex cerebral de ratos de ambos os grupos ( $p < 0,01$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan).

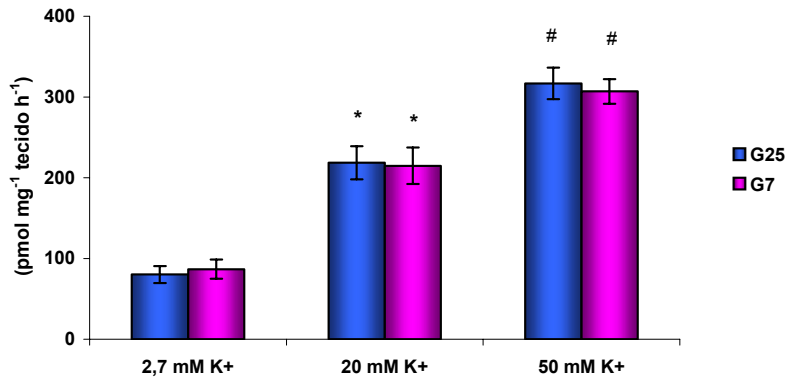


Figura 3.17 – Efeito de altas concentrações extracelulares de  $\text{K}^+$  sobre a oxidação de  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Acetato a  $\text{CO}_2$  em fatias de córtex cerebral de ratos machos de 75 dias, controle ( $\text{G}_{25}$ ) e desnutridos ( $\text{G}_7$ ) gestacional e pós-natal. As barras representam a *média ± D.P.M.* de 2 experimentos independentes ( $n = 8$  em cada grupo). \* Diferente de  $2,7\text{mM} \text{K}^+$  ( $p < 0,01$ ); # Diferente de  $2,7\text{mM}$  e  $20\text{mM} \text{K}^+$  (ANOVA/Duncan,  $p < 0,01$ ).

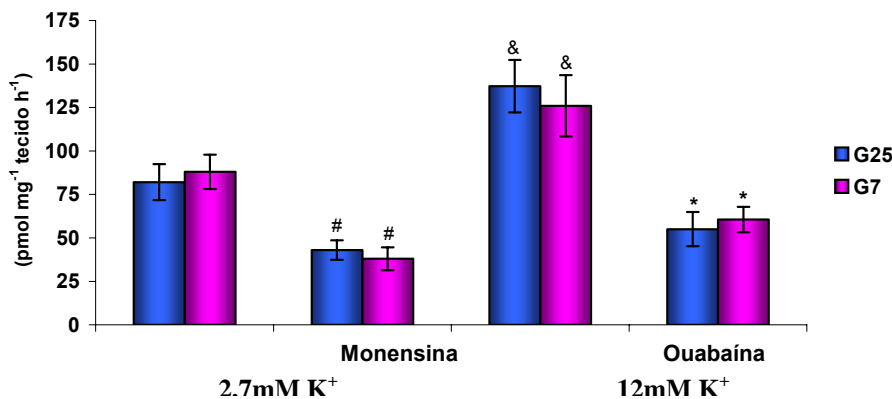


Figura 3.18 - Efeito da monensina ( $10\mu\text{M}$ ) e da ouabaina ( $1\text{mM}$ ) sobre a oxidação de  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Acetato a  $\text{CO}_2$  em fatias de córtex cerebral de ratos machos de 75 dias, controle ( $\text{G}_{25}$ ) e desnutridos ( $\text{G}_7$ ) no período gestacional e pós-natal. Resultados foram expressos como *média ± D.P.M.* para dois experimentos independentes ( $n = 8$  em cada grupo). # Estatisticamente diferente de  $2,7\text{mM} \text{K}^+$  sem monensina ( $p < 0,01$ ); & diferente de  $2,7\text{mM} \text{K}^+$  ( $p < 0,01$ ); \* diferente de  $12\text{mM} \text{K}^+$  sem ouabaina ( $p < 0,01$ ) (ANOVA/Duncan).



A oxidação do acetato a  $\text{CO}_2$  em um sistema contendo  $2,7\text{mM } [\text{K}^+]_e$  e baixas concentrações de  $\text{Na}^+$ , aumentou expressivamente em relação ao meio com a mesma  $[\text{K}^+]_e$ , porém com concentração normal de  $\text{Na}^+$  em fatias cerebrais de ambos os grupos ( $p < 0,01$ ; ANOVA/teste de múltipla amplitude de Duncan) (figura 3.19).

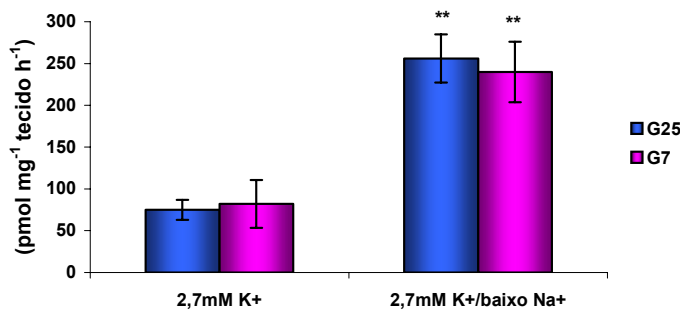


Figura 3.19 – Efeito de baixas concentrações de  $\text{Na}^+$  sobre a oxidação de  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Acetato a  $\text{CO}_2$  em fatias de córtex cerebral de ratos machos de 75 dias, controle ( $\text{G}_{25}$ ) e desnutridos ( $\text{G}_7$ ) no período gestacional e pós-natal. Dados representam a *média*  $\pm$  *D.P.M.* ( $n = 8$  em cada grupo) para dois experimentos independentes. \*\* Diferente de  $2,7\text{mM } \text{K}^+$  ( $p < 0,01$ ).

Com a finalidade de verificar a influência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre a oxidação do acetato, foi avaliada a produção de  $\text{CO}_2$  a partir do acetato em um meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  e contendo  $50\text{mM } [\text{K}^+]_e$ . Não houve diferença na oxidação do acetato comparando com o meio contendo concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 3.20). A presença da nifedipina, inibidor dos canais L voltagem-sensíveis (HERTZ e CODE, 1993 *apud* HUANG et al., 1994), na concentração de  $10\mu\text{M}$  no meio de incubação, não modificou o estímulo das altas  $[\text{K}^+]_e$  sobre o metabolismo do acetato. Avaliando a possibilidade do envolvimento do transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  na estimulação da oxidação do acetato pelas altas  $[\text{K}^+]_e$ , ao utilizar bumetanide ( $100\mu\text{M}$ ) no meio de incubação, inibidor do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (HUANG et al., 1994; WALZ, 2000), não se observou alteração da oxidação do acetato (figura 3.20).

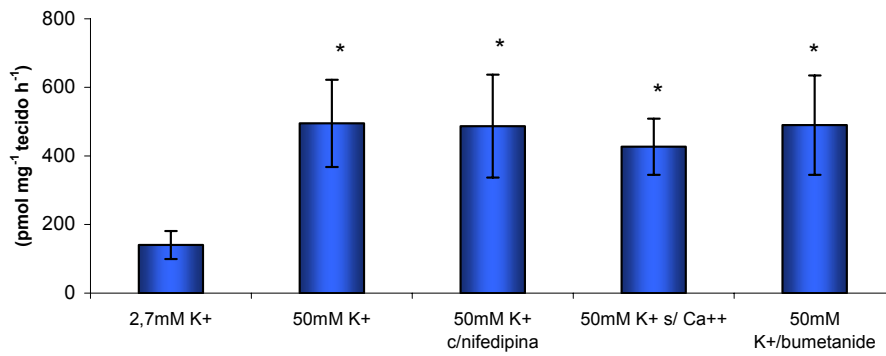


Figura 3.20 – Efeitos de altas concentrações extracelulares de  $K^+$ , da nifedipina ( $10\mu M$ ), da ausência de  $Ca^{2+}$  (EGTA  $100\mu M$ ) e de bumetanide ( $100\mu M$ ) sobre a oxidação de  $[U-^{14}C]$ Acetato por fatias de córtex cerebral de ratos de 75-80 dias. Foram utilizados apenas animais machos. As barras representam a *média*  $\pm$  *D.P.M.* ( $n = 8$  animais). \* Expressa diferença estatisticamente significativa de  $2,7mM K^+$  (ANOVA/Duncan,  $p < 0,01$ ).

Por outro lado, em modelo de desnutrição mais agressivo, sem suplementação de L-metionina na ração dos animais, ao avaliar o efeito sobre o metabolismo do acetato foi constatado um aumento da oxidação relativamente ao grupo controle já em concentrações fisiológicas de  $[K^+]_e$  em fatias de cerebelo ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan) (figura 3.21 A). Quanto ao metabolismo da glicose e do lactato foram ambos estimulados nos grupos  $G_{7/SSMET}$  e  $G_{25}$  pelas altas  $[K^+]_e$ , ocorrendo maior oxidação do lactato relativamente à glicose já em concentrações fisiológicas de potássio extracelular ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via/teste de múltipla amplitude de Duncan) (figura 3.21 B). A oxidação da glicose e do lactato não foi afetada pela diminuição da L-metionina.

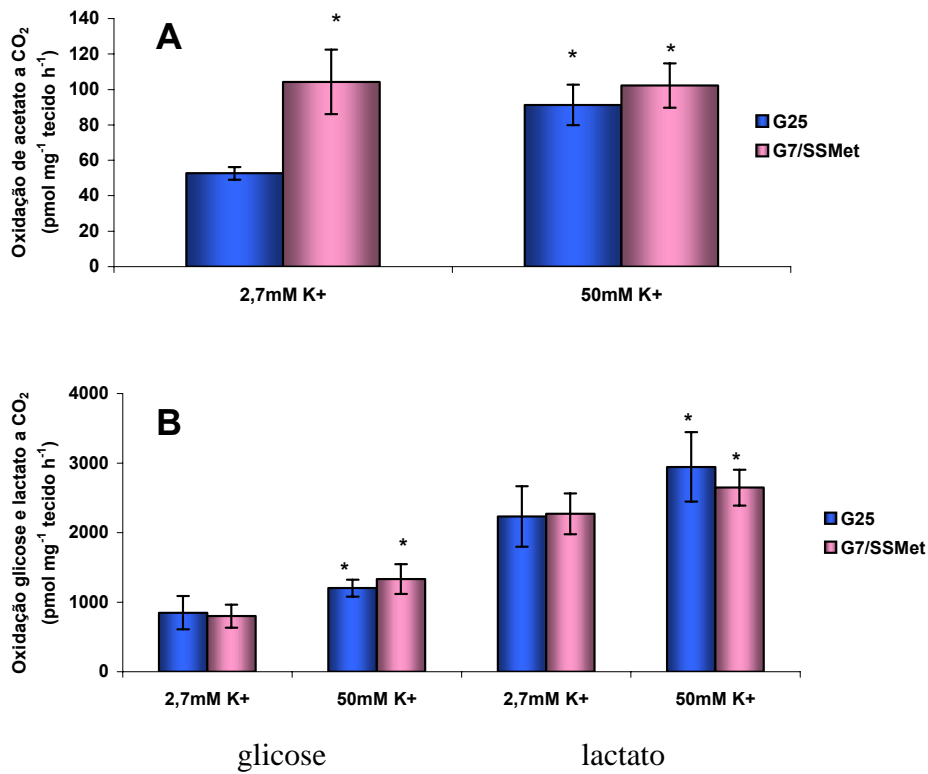


Figura 3.21 – Efeito de altas concentrações extracelulares de K<sup>+</sup> sobre a oxidação de (A) [U-<sup>14</sup>C]Acetato e (B) D-[U-<sup>14</sup>C]Glicose e L-[U-<sup>14</sup>C]Lactato a CO<sub>2</sub> em fatias de cerebelo obtidas de ratos machos de 75-80 dias, controle (G<sub>25</sub>) e submetidos à desnutrição protéica gestacional e pós-natal (7% de caseína sem suplementação de L-metionina - G<sub>7</sub>/SSMet). Resultados foram expressos como *média ± D.P.M.* para 3 experimentos independentes (n=10 em cada grupo). \* Estatisticamente diferente de (A) G<sub>25</sub> 2,7mM K<sup>+</sup> e (B) G<sub>25</sub> e G<sub>7</sub> 2,7mM K<sup>+</sup> no respectivo nutriente (ANOVA/Duncan,  $p < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Sensibilidade à picrotoxina

A sensibilidade à ação excitotóxica da picrotoxina (antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>), ao ser utilizada como estratégia farmacológica para avaliar o sistema GABAérgico, permite verificar alterações na neurotransmissão mediada por GABA seguidas à condição de manipulação dietética composta de restrição protéica utilizada neste trabalho.

#### 4.1.1 Ação convulsivante da picrotoxina e captação de GABA em córtex e hipocampo em ratos jovens

Vários estudos com recombinantes específicos de receptores GABA<sub>A</sub> (SIEGEL et al, 1990; McDONALD e OLSEN, 1994; WHITE e GURLEY, 1995) ou modelos animais utilizando estratégias de “*gene-knockout*” ou “*knock-in*” (LOW et al., 2000; McKERNAN et al., 2000; SUR et al., 2001; KRALIC et al., 2002), indicam que a composição das subunidades dos receptores GABA<sub>A</sub> confere um perfil farmacológico exclusivo, e que alterações na expressão de genes em subunidades específicas pode contribuir para alterações nas funções dos receptores GABA<sub>A</sub> (STEIGER et al., 2003).

A sensibilidade à picrotoxina aumenta expressivamente em receptores GABA<sub>A</sub> que não contêm a sub-unidade  $\alpha$ ; receptores expressando as sub-unidades  $\alpha \beta \gamma$  são relativamente menos sensíveis à picrotoxina do que receptores expressando as sub-unidades  $\beta \gamma$ . Além disso, a presença da alanina (sub-unidade  $\beta$ ) na posição 2' é considerada de importância para a sensibilidade à picrotoxina em receptores GABA<sub>A</sub> em mamíferos. A presença da valina na posição 2' (sub-unidade  $\alpha$ ) pode dificultar a habilidade da picrotoxina em acessar o seu sítio de ligação. Não está claro, porém, se a sensibilidade à picrotoxina é mais influenciada pela presença de resíduos de alanina ou pela falta de resíduos de valina (BELL-HORNER et al., 2000).

Além disso, alterações seletivas no mRNA das subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> em hipocampo e septo, mas não em neocórtex, foram detectadas em ratos desnutridos no período pré-natal (STEIGER et al. 2002,2003). Embora diferenças na expressão das subunidades  $\alpha$  em hipocampo não tenham sido observadas em ratos de 30 dias, e apenas em ratos adultos, um significativo aumento da expressão da sub-unidade  $\beta_2$  foi detectada nesses ratos (STEIGER et al., 2003).

No intuito de explicar a maior sensibilidade dos ratos desnutridos à picrotoxina, detectada neste trabalho e evidenciada pela menor dose convulsivante e menor período de latência para convulsões (figuras 3.1 e 3.2), é possível especular que as descritas alterações, induzidas pela desnutrição protéica nas subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> (STEIGER et al., 2002,2003), e que os diferentes perfis das características inibitórias da picrotoxina nas diversas configurações de subunidades de receptores (BELL-HORNER et al., 2000; SEMYANOV e KULLMANN, 2002), possam ser subjacentes aos presentes resultados. A maior sensibilidade à picrotoxina em ratos desnutridos de 25 dias de idade, portanto, poderia estar relacionada ao aumento da expressão da subunidade  $\beta_2$  descrita por Steiger et al. (2003). Contudo, esta interpretação deve ser analisada com precaução, uma vez que as diferenças regionais e ontogenéticas mostradas por Steiger et al. (2002, 2003) em ratos desnutridos, podem não ser reproduzidas em outras estruturas cerebrais e outros fatores podem estar envolvidos.

Além do mais, a maior sensibilidade à ação convulsivante da picrotoxina em ratos desnutridos (figura 3.1) poderia estar associada com a maior captação basal de GABA por fatias de córtex e hipocampo induzida pela desnutrição (figura 3.4 A e B), uma vez que a aumentada captação poderia diminuir as concentrações extracelulares de GABA, levando ao observado aumento na sensibilidade à picrotoxina. Relativamente a esta consideração, Zhao et al. (2003) mostraram aumento das convulsões induzidas por picrotoxina em camundongos transgênicos com expressão aumentada de GAT-1, o que sugere que os transportadores de GABA desempenhem importante papel na epileptogênese.

Afora o efeito intrínseco do tratamento nutricional sobre a maior captação de GABA, tanto em córtex quanto em hipocampo, evidenciado neste trabalho (figura 3.4 A e B) e discutido em item posterior (4.3), o efeito da picrotoxina em hipocampo nos dois grupos e ausência do efeito em córtex cerebral, são passíveis de algumas considerações: (1). a desnutrição afeta diferentes estruturas de diversas maneiras e/ou intensidade, sendo o hipocampo severamente afetado (CINTRA et al., 1990; BEDI,1991ab; LEVITSKY e STRUPP, 1995; MORGANE et al., 2002) e, (2). há relato de um padrão regional diferenciado de envolvimento neuronal da picrotoxina (WILLOUGHBY et al., 1995; RAJASEKARAN et al., 2003). Além disso, o efeito da convulsão “*per se*” poderia ter afetado transitoriamente a expressão de transportadores, resultando na maior captação de GABA evidenciada uma hora após a administração de picrotoxina. Conferem suporte à esta hipótese, relatos da literatura referentes a modelos experimentais utilizando “gerbils” (*Meriones unguiculatus*) sensíveis a convulsões espontâneas (KANG et al., 2001), assim como análises de pacientes apresentando epilepsia lobo temporal (MATHERN et al., 1999) e ratos induzidos quimicamente a convulsões (HIRAO et al., 1998; UEDA e WILLMORE, 2000), os quais mostram alterações tempo e região dependentes na expressão de GAT-1 (HIRAO et al., 1998; MATHERN et al., 1999; KANG et al., 2001; UEDA e WILLMORE, 2000) e GAT-3 (HIRAO et al., 1998; MATHERN et al., 1999; UEDA e WILLMORE, 2000) em hipocampo. Estudos recentes em modelos de “*kindling*” por picrotoxina que mostram um decréscimo de mRNA de VGAT e uma elevação no mRNA de GAT-1 em hipocampo de ratos nos períodos entre as convulsões, reforçam a possibilidade de que tanto os ratos do grupo controle (G<sub>25</sub>) quanto os do grupo desnutrido (G<sub>7</sub>) apresentam maior captação de GABA em hipocampo, frente ao uso da picrotoxina, em função da alteração na expressão dos transportadores GAT-1 (HIRAO et al.,1998; MATHERN et al. 1999; KANG et al., 2001; UEDA e WILLMORE, 2000) e eventualmente também de GAT-3 (HIRAO et al., 1998; MATHERN et al, 1999; UEDA e WILLMORE, 2000) induzida pela convulsão pós-picrotoxina.

Outra possibilidade de correlação do efeito da picrotoxina associado à expressão de GATs é a de que, durante convulsões em humanos (DURING,1995) e em modelos de

“*kindling*” (SUSDAK e JANSEN, 1995; UEDA e TSURU, 1995), a concentração de GABA aumenta gradualmente, chegando a um platô em 15 a 20 minutos, que permanece por várias horas após a estimulação (UEDA e TSURU, 1995). Este aumento de GAT-1, paralelo ao aumento de GABA extracelular, poderia refletir uma medida compensatória para a maior recaptção de GABA (maior recaptção evidenciada em nosso estudo em modelo de convulsão induzido por picrotoxina), ou, poderia fazer parte da ação bidirecional dos GATs como resposta à convulsão que resulta em aumento da liberação não vesicular de GABA (UEDA e WILLMORE, 2000). Portanto, o efeito protetor dos GATs dependeria do transporte reverso e da recaptção de GABA nos neurônios (UEDA e WILLMORE, 2000).

Partindo do relato de que ocorre aumento da concentração extracelular de GABA pós-convulsão (DURING, 1995; SUSDAK e JANSEN, 1995; UEDA e TSURU, 1995), e que este aumento é gradual e relativamente persistente, poder-se-ia supor que, em resposta às maiores concentrações de GABA no meio extracelular, ocorreria maior expressão de transportadores na superfície, como descrito por Bernstein e Quick (1999). Deken et al. (2003) ao sugerir que um método para controlar os níveis de neurotransmissores poderia ser a regulação da redistribuição de transportadores (cuja internalização e reinserção na superfície da membrana ocorre em minutos) em paralelo com a liberação de neurotransmissores, corroboram com esta suposição.

Já no grupo desnutrido, no presente estudo, a picrotoxina e subsequente convulsão, poderiam ter potencializado o efeito da desnutrição “*per se*” sobre a captação de GABA.

#### 4.1.2 Efeitos da picrotoxina “*in vitro*” sobre o metabolismo da glicose em córtex cerebral de ratos Wistar controle e desnutridos

Considerando que mudanças metabólicas e bioenergéticas expressivas ocorrem em episódios agudos de convulsões (FERNANDES et al., 1999; MELDRUM, 2002); que o hipermetabolismo regional está correlacionado com o desenvolvimento de dano neuronal em vários modelos de convulsão em roedores e primatas (INGVAR, 1986; HANDFORTH e TREIMANN, 1995); que a glicose é proporcionalmente mais metabolizada no ciclo do ácido

tricarboxílico neuronal (SONNEWALD et al., 1991; SONNEWALD e KONDZIELLA, 2003), e que, em sistema de incubação de fatias de estruturas cerebrais de ratos, contendo picrotoxina, é detectada atividade epileptiforme (WONG e YAMADA, 2001), o presente estudo avaliou alterações no metabolismo da glicose em fatias de córtex cerebral de ratos controle e desnutridos, com finalidade de verificar se os diferentes efeitos do tratamento nutricional frente à resposta à picrotoxina “*in vivo*”, refletem alterações metabólicas “*in vitro*”. Considerando ainda, que referências da literatura mostram menor sensibilidade de ratos adultos frente a convulsões induzidas por picrotoxina “*in vivo*” (VELISKOVA e VELISEK, 1992; PERICIC et al., 1996), quando comparados a ratos jovens, os mesmos parâmetros foram avaliados em ratos de 25 e 80 dias.

A observação de que a picrotoxina induz a um aumento da oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> em fatias de córtex cerebral de ratos, e que esta estimulação é concentração, estado nutricional e idade-dependente (figura 3.5 A e B), reflete, no que se refere aos dois primeiros itens, o perfil encontrado no presente trabalho quanto aos parâmetros convulsivantes da picrotoxina “*in vivo*”. A maior sensibilidade ao estímulo da picrotoxina à oxidação da glicose, é evidenciada nos ratos desnutridos mediante um aumento da oxidação relativamente ao seu controle (G<sub>7</sub> veículo), em concentrações menores de picrotoxina no meio de incubação do que a concentração necessária de picrotoxina para estimular a oxidação da glicose em ratos do grupo G<sub>25</sub>. Considerando as referências da literatura, as quais mostram maior susceptibilidade à picrotoxina em ratos jovens (VELISKOVA e VELISEK, 1992; PERICIC et al., 1996), é possível concluir que o perfil ontogênético para os parâmetros convulsivantes, causados pela picrotoxina “*in vivo*”, parece manter-se para as observadas alterações no metabolismo da glicose “*in vitro*”. Na fase adulta, embora se preserve no estudo “*in vitro*” um aumento da oxidação da glicose, com concentrações menores de picrotoxina no grupo desnutrido, quando comparado com o grupo G<sub>25</sub> (que não apresentou aumento da oxidação de glicose com as concentrações de picrotoxina estudadas), mesmo o grupo desnutrido necessita de concentrações maiores de picrotoxina quando comparado ao desnutrido



imaturo, configurando também no desnutrido, uma alteração da susceptibilidade idade-dependente.

#### 4.1.3 Efeitos da picrotoxina sobre a peroxidação lipídica em cérebro de ratos controle e desnutridos

Estudos mostram que a proteína da dieta é importante para os mecanismos antioxidantes e que a desnutrição protéica pode levar ao aumento do dano oxidativo ao diminuir defesas antioxidantes do organismo (WANG et al., 2002).

Pela sua susceptibilidade à injúria, o tecido cerebral parece ser particularmente vulnerável, especialmente durante o desenvolvimento (ROUGEMONT et al., 2002).

O expressivo aumento da peroxidação lipídica observado, neste trabalho, em cérebro e cerebelo de ratos desnutridos, previamente injetados com picrotoxina (figura 3.6 AB), comparativamente ao seu controle sem picrotoxina, reforça a reação diferenciada dos ratos desnutridos quanto aos efeitos oxidantes da mesma (figura 3.7 AB). É possível que o maior metabolismo energético induzido pela droga/convulsão nos ratos desnutridos, conforme evidenciado pela maior oxidação da glicose *“in vitro”* (figura 3.5 AB), tenha aumentado a produção de espécies reativas de oxigênio e, associada à provável insuficiência de ativação de mecanismos de defesa, tenha levado, portanto, à aumentada peroxidação. Por outro lado, em ratos controle, foi observado efeito inverso, apontando para a possível mobilização de mecanismos antioxidantes (figura 3.6 AB).

A observação de que, em situação basal, ambos os grupos não apresentam diferenças significativas quanto à peroxidação lipídica, contribui para o fortalecimento das constatações de que, em alguns parâmetros, em situações basais, parece manter-se o equilíbrio na desnutrição. As conseqüências de uma limitação anormal de nutrientes durante um período específico do desenvolvimento cerebral podem permanecer subliminarmente, ou apenas manifestar-se como uma predisposição, até que o sistema seja estressado por circunstâncias emocionais ou ambientais não usuais (MORGANE et al., 2002).

#### 4.1.4 Efeitos da picrotoxina injetada *"in vivo"* sobre a oxidação *"ex vivo"* do acetato e da glicose em córtex cerebral de ratos controle e desnutridos

Estudos sobre as complexas interações neurônio-glia no cérebro são importantes para a compreensão dos aspectos fisiológicos normais, uma vez que o desenvolvimento de doenças psiquiátricas e neurológicas é acompanhado de alterações nestes processos (SONNEWALD e KONDZIELLA, 2003). Em função dos comprovados efeitos da desnutrição sobre o SNC e sua possível relação com o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (SUSSER e LIN, 1992; SUSSER et al., 1996; HOEK et al., 1998; HACKET e IYPE, 2001; DIOP et al., 2003), avaliar interações neuronais e gliais frente à desnutrição pode contribuir para o esclarecimento de mecanismos envolvidos nos descritos efeitos.

A compartimentalização do metabolismo cerebral (WAAGEPETERSEN et al., 2003), a exemplo dos estudos sobre os metabólitos do acetato e da glicose por meio da  $^{13}\text{C}$  NMRS espectroscopia (HASSEL et al., 1995; QU et al., 2000; TAYLOR et al., 1996; SONNEWALD e KONDZIELLA, 2003), permite inferir alterações metabólicas também mediante estudo da oxidação do acetato e da glicose.

Ao avaliar os efeitos da picrotoxina sobre a oxidação do acetato e da glicose em fatias de córtex cerebral e de hipocampo, este estudo objetivou verificar alterações metabólicas neuronais e astrocitárias, nestas condições, em ratos controle e desnutridos. A picrotoxina injetada 24 horas antes da avaliação do efeito sobre o metabolismo do acetato (parâmetro glial) e da glicose (provavelmente mais neuronal) em ratos imaturos (P25), embora não tenha interferido na oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  em ambos os grupos ( $G_{25}$  e  $G_7$ ), ocasionou um aumento na oxidação do acetato (figura 3.8 A e B), sugerindo uma aumentada atividade astrocitária, sem alteração do metabolismo da glicose, o que, adicionalmente, poderia representar que os neurônios não foram afetados nesta fase pós-administração da picrotoxina. Estudos desenvolvidos com cainato (MÜLLER et al., 2000; QU et al., 2003) evidenciam que nesta fase ocorrem maiores alterações no metabolismo do acetato e que, em fase mais tardia (2 semanas após a convulsão), ocorrem alterações do metabolismo da glicose, o que é apontado como efeito tempo-dependente da convulsão

sobre os metabólitos do acetato e da glicose. Estas respostas são sugeridas por Sonnewald e Kondziella (2003) como sendo de efeito protetor das células gliais sobre o neurônio em uma fase precoce (24 horas após a convulsão), ou, alternativamente, como um atraso do hipermetabolismo neuronal decorrente de dano glial.

A não observação de efeito adicional da desnutrição sobre o metabolismo do acetato e da glicose, 24 horas após a aplicação da picrotoxina, sugere não haver alterações metabólicas neuronais e astrocitárias diferenciadas entre os grupos no período considerado.

Já a administração crônica de picrotoxina ocasionou efeitos sobre a oxidação da glicose em fatias de córtex apenas em ratos desnutridos no período avaliado (figura 3.9 A e B), sem evidenciar diferenças na oxidação do acetato em ambos os grupos. Estes resultados poderiam ser interpretados como uma maior sensibilidade dos ratos desnutridos à picrotoxina, já evidenciada em outros parâmetros. Além disso, concordando com a proposição de Sonnewald e Kondziella (2003) que consideram que as células gliais poderiam inicialmente estar prevenindo dano neuronal, em fases mais precoces pós-administração de convulsivantes, com aumento da metabolização do acetato, o efeito tardio sobre o aumento do metabolismo da glicose em ratos desnutridos no presente trabalho, em fase na qual ainda não se detectou aumento da atividade neuronal em ratos controle, poderia indicar que a capacidade de proteção glial dos ratos controle excede a dos desnutridos.

Obviamente, apenas a oxidação do acetato e da glicose não constitui parâmetro conclusivo quanto aos efeitos da picrotoxina e da desnutrição sobre as interações neurônio-glia. Análises de espectroscopia de ressonância nuclear magnética poderiam avaliar os metabólitos de ambos os nutrientes, e contribuir mais significativamente para evidenciar as inter-relações metabólicas.

#### 4.1.5 Efeitos da desnutrição sobre o “*kindling*” induzido por picrotoxina

O “*kindling*” químico é amplamente utilizado como modelo experimental de epilepsia e epileptogênese. Este fenômeno é caracterizado pela progressiva intensificação de

atividade convulsivante após administrações repetidas de doses subconvulsivantes de diferentes estimulantes do SNC (MASON e COOPER, 1972; BRUNO et al., 2003), incluindo a picrotoxina (SHANDRA et al., 1996).

O uso do procedimento de “*kindling*” foi realizado na proposição de verificar se a encontrada sensibilidade aumentada à picrotoxina, em modelo agudo de convulsão em ratos de 25 dias, e discutida no item 4.1.1, é mantida para este modelo em ratos em desenvolvimento.

A administração diária de picrotoxina (i.p.) em dose sub-convulsivante, não interferiu no ganho de massa corporal de ratos em desenvolvimento (figura 3.10), não caracterizando, portanto, o efeito direto do antagonista GABA<sub>A</sub> sobre este parâmetro de desenvolvimento dos ratos.

A diferença na susceptibilidade à picrotoxina em ratos, relacionada ao sexo, é descrita na literatura, que mostra que fêmeas adultas apresentam maior susceptibilidade (PERICIC et al., 1986, 1996) do que machos e do que ratos imaturos de ambos os sexos. Já em ratos jovens, de ambos os sexos, não se observa diferença. Ratos adultos machos, por sua vez, apresentam menor susceptibilidade do que ratos imaturos (VELISKOVA e VELISEK, 1992) de ambos os sexos (PERICIC et al., 1996). Estes dados sugerem que as diferenças na sensibilidade à picrotoxina relacionada ao sexo, sejam idade-dependentes.

As diferenças, encontradas no presente trabalho, mostram uma dependência do tratamento nutricional e do sexo na susceptibilidade ao “*kindling*”, em ratos em desenvolvimento (figura 3.11). Ratas do grupo controle (G<sub>25</sub>) em desenvolvimento apresentam maior susceptibilidade à picrotoxina, demonstrada pela rápida indução do “*kindling*” comparativamente aos ratos machos (figura 3.11). O amadurecimento hormonal de ambos os grupos poderia, justamente, ter provocado estes efeitos, já descritos para indução aguda de convulsão por picrotoxina para ratos adultos, uma vez que hormônios gonadais afetam o limiar para convulsões induzidas por picrotoxina (PERICIC et al., 1996). Assim como o desenvolvimento da puberdade e do processo maturacional em ratas controle pode ter levado ao aumento da expressão de estrógenos [descrita como pró convulsivante

(MAGGI e PEREZ, 1985)], o amadurecimento dos ratos controle e consequente aumento da expressão da testosterona [descrita como anticonvulsivante (SCHWARTZ-GIBLIN et al., 1989)] pode haver retardado o processo de sensibilização e “*kindling*” nos ratos machos.

Já as fêmeas desnutridas apresentam uma diferença menos acentuada, embora estatisticamente significativa, em relação aos machos desnutridos. Em ambas as situações o retardamento da puberdade poderia, por sua vez, haver causado estes efeitos e, também as diferenças relativamente aos seus controles normonutridos. Diferentemente do padrão de indução aguda de convulsão, identificado em ratos de 25 dias, no qual ratos desnutridos de ambos os sexos são mais sensíveis à picrotoxina (figura 3.1), no procedimento do “*kindling*”, ratas controle são mais rapidamente sensibilizadas do que ratas desnutridas, enquanto que nos ratos machos a maior sensibilidade, relativamente ao controle, se mantém também neste procedimento (figura 3.11).

Vários pesquisadores mostram o retardamento da puberdade em função da desnutrição. Em modelo de desnutrição intrauterina, foram identificados padrões de puberdade retardados, medidos classicamente pelos sinais clínicos, tais como separação balano-prepucial, (ENGELBREGT et al., 2000) e alterada função testicular, mostrada por diminuídos níveis de testosterona (DELEMARRE-van de WAAL, 2002) em ratos machos, e retardamento da abertura vaginal em ratas submetidas ao modelo de desnutrição intra-uterina (ENGELBREGT et al., 2000), mostrando que a desnutrição precoce durante um período crítico de desenvolvimento, pode ter efeitos a longo prazo sobre o desenvolvimento da puberdade, incluindo maturação gonadal (DELEMARRE-van de WAAL, 2002).

Adicionalmente, é conhecido que o estresse pré-natal rompe o ambiente materno normal, resultando na supressão do surgimento da testosterona fetal nos dias 18 e 19 da gestação, o qual é necessário para a expressão posterior e manutenção do comportamento sexual (WARD e WEISZ, 1980, 1984; WARNER et al., 1991). Outro período para a diferenciação cerebral masculina situa-se entre os dias P1-10, quando o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) do leite tem importante papel neste processo no rato (GROSVENOR et al., 1993; KOLDOVSKY e THORNBURG, 1987). Ratos privados da

lactação precoce exibem, quando adultos, reduzida fertilidade, diminuição do peso dos ductos deferentes e vesícula semínifera, reduzidos níveis de frutose na vesícula seminal e próstata e alterado comportamento sexual (CARLOS et al., 1996).

Embora nosso modelo de desnutrição não constitua privação do aleitamento precoce, a composição lactacional, em termos protéicos, e o volume, são afetados negativamente pela desnutrição protéica materna (PINE et al., 1994; PASSOS et al., 2000).

Diferenças relativas ao sexo na resposta de administração de drogas que interferem na transmissão GABAérgica, foram descritas na literatura (PEREZ, 1986; MANEV et al., 1987; THOMAS e YANG, 1991; KOKKA et al., 1992; FINN e GEE, 1994). A existência de diferenças sexuais na farmacodinâmica de convulsivantes relacionados ao sistema GABAérgico, está em consonância com estudos sugerindo que a neurotransmissão GABAérgica é sexualmente dimórfica (FRANKFURT et al., 1984; MANEV e PERICIC, 1987; JÜPTNER e HIEMKE, 1990). Além disso, não se pode excluir totalmente que as diferenças encontradas entre os sexos possam ser atribuídas também à possibilidade de diferenças farmacocinéticas, como sugerido por Pericic e Bujas (1997) para ratos adultos.

Além de remeter novamente às implicações para compreensão de mecanismos convulsivantes relativamente aos sexos, os presentes resultados reforçam as possíveis conseqüências terapêuticas ligadas ao dimorfismo sexual/nutricional sobrepostos.

#### 4.2 Sensibilidade ao ácido quinolínico

Em contraposição à maior sensibilidade ao antagonista de receptor GABA<sub>A</sub> picrotoxina (figura 3.1 e 3.2), a desnutrição ocasionou menor sensibilidade à ação convulsivante do ácido quinolínico (figura 3.12). Ratos desnutridos aos 25 dias de idade requerem maiores doses para promover efeito convulsivante do que ratos controle (figura 3.12). Dados de Rotta et al. (2003a) mostrando que a desnutrição crônica diminui a sensibilidade a convulsões induzidas por ácido quinolínico aos 75 dias de idade, denotam que os efeitos da desnutrição precoce sobre este parâmetro, não são revertidos pela idade em situação de manutenção de déficit nutricional. Considerando ambos os estudos, não é

possível afirmar que o efeito da desnutrição perinatal sobre este parâmetro seja permanente, porém, é possível que este período seja decisivo para desencadeá-lo.

A diminuída união de glutamato  $\text{Na}^+$  independente, em membranas sinápticas de córtex cerebral em ratos desnutridos de 75 dias, também descrita por Rotta et al. (2003a), aponta para uma diminuição da atividade glutamatérgica, o que, por sua vez, poderia explicar a menor sensibilidade dos ratos adultos ao ácido quinolínico. Este resultado poderia ser considerado como uma explanação possível para os dados encontrados em ratos de 25 dias de idade, uma vez que uma diminuída união  $\text{Na}^+$ -independente de [ $^3\text{H}$ ]glutamato em membranas celulares também foi observada em ratos de 21 dias de idade (ROTTA, 2003b).

A captação de glutamato não foi afetada pela desnutrição, assim como observado também em ratos de 21 dias de idade, em fatias de córtex cerebral (ROTTA, 2003b), nem pela administração i.c.v. de ácido quinolínico em fatias de córtex cerebral e em fatias de hipocampo (figura 3.13), aparentemente excluindo este parâmetro como uma causa da alterada sensibilidade ao ácido quinolínico. A captação de glutamato por fatias de hipocampo foi mais elevada do que em fatias de córtex cerebral, em todos os grupos estudados (figura 3.13), podendo estar relacionada à maior expressão de GLT-1 em hipocampo do que em córtex cerebral, como descrito por LEHRE et al. (1995).

Este trabalho evidenciou um diferenciado perfil farmacológico induzido pela desnutrição, demonstrado pela maior sensibilidade à ação convulsivante da picrotoxina e menor sensibilidade à ação convulsivante do ácido quinolínico, em ratos de 25 dias de idade, sugerindo uma sensibilidade específica sujeita às propriedades das drogas, sendo seletivamente modificada pela desnutrição. É amplamente documentado o fato de que a desnutrição em roedores altera significativa e seletivamente a sensibilidade a uma variedade de drogas atuando mediante diversos sistemas de neurotransmissores (BUTLER et al., 1994; ALMEIDA et al., 1996). Portanto, o polimorfismo encontrado na literatura sugere que o efeito da desnutrição é específico para o modelo de convulsão, isto é, pode ser devido às diferentes alterações provocadas nos diversos sistemas de neurotransmissores pela desnutrição e/ou na interação dos sistemas; das propriedades e foco de ação dos diferentes

agentes neurotóxicos ou procedimentos convulsivantes, assim como no período que é imposta a restrição nutricional ou período experimental.

#### 4.3 Captação de GABA e ontogenia

A estabilização dos circuitos neuronais durante o desenvolvimento pós-natal depende de uma série de fatores envolvendo a orientação dos processos neuronais pré e pós-sinápticos, e da especialização e estabilização de elementos sinápticos. A transformação dos cones de crescimento para um elemento sináptico envolve a maturação da maquinaria bioquímica dos neurotransmissores (VARJU et al., 2001). A transição entre os padrões de sinalização GABAérgicos embrionários para adultos, pode ser mediada, em parte, por mudanças nas subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> (MARIC et al., 1997; OWENS et al., 1999) e, provavelmente envolva alterações na expressão de componentes relacionados à síntese, armazenamento, liberação (SZABÓ et al., 1994; SOMOGYI et al., 1995) e recaptação de GABA.

A expressão ontogenética dos GATs, assim como o transitório aumento da expressão de GAT-1 em células neuronais e astrocitárias (YAN et al., 1997), e o pico acima de níveis adultos em fases mais tardias da maturação cortical (YAN et al., 1997; HACHIYA e TAKASHIMA, 2001; MINELLI et al., 2003b) está em consonância com outros estudos demonstrando que, em córtex cerebral de ratos em desenvolvimento, a captação de GABA excede transitóriamente os níveis encontrados em adultos (COYLE e ENNA, 1976; HITZEMANN e LOH, 1978; REDBURN et al., 1978; WONG e McGEER, 1981; BLAKELY et al., 1991). A maturação do GAT-1 segue a mesma ordenação espacial da sinaptogênese inibitória e precede o total estabelecimento dos padrões morfológicos das sinapses simétricas (YAN et al., 1997; MINELLI et al., 2003b), sugerindo um papel para o transporte de GABA mediado por GAT-1 na formação e maturação das sinapses GABAérgicas corticais (CONTI et al., 2004). Corrobora com esta idéia, o fato de que o desenvolvimento da sua expressão é coordenado com o de outras proteínas pré-sinápticas GABAérgicas, tais como, a enzima sintetizadora GAD (HACHIYA e TAKASHIMA, 2001; WOLFF et al., 1984) e



o transportador vesicular VGAT (MINELLI et al., 2003b). Além disso, o seu desenvolvimento é paralelo ao da subunidade  $\alpha 1$  do receptor GABA<sub>A</sub> (LAURIE et al., 1992; FRITSCHY et al., 1994) que participa na transmissão GABAérgica madura (CONTI et al., 2004).

Os resultados deste trabalho, relativamente à captação de GABA em ratos controle (figura 3.14 A e B), estão em consonância com estes estudos prévios, nos quais, em córtex em desenvolvimento, a captação de GABA transitoriamente excede os valores de adultos (COYLE e ENNA, 1976; REDBURN, 1977 *apud* CONTI, 2004; BLAKELY et al., 1991), declinando a valores similares aos ratos adultos entre a terceira e quarta semanas de vida (COYLE e ENNA, 1976; HITZEMANN e LOH, 1978).

A desnutrição causa um perfil diferenciado, com os ratos mantendo uma captação maior de GABA até P25, e, um declínio aparentemente mais lento para os valores de adultos. A maior captação de GABA por ratos desnutridos em P25, em comparação com o grupo controle na mesma idade, também é mostrada em P7, em condição de incubação contendo 25 $\mu$ M [<sup>3</sup>H]GABA, chegando a um padrão similar entre os grupos em P75, o que também pode indicar um atraso no perfil de desenvolvimento no grupo desnutrido (figura 3.14 A e B).

A utilização da  $\beta$ -alanina, um potente antagonista de GAT-3 (BORDEN et al., 1992), no meio de incubação, inibe a captação de GABA significativamente em ratos controle em P7, e este percentual diminui à medida que a maturação se processa (figura 3.15 A e B). Os maiores efeitos da  $\beta$ -alanina no período perinatal, descritos previamente por Wong e McGeer (1981), sugerem que o GAT-3 seja responsável pela maior parte do transporte de GABA em neocórtex. Esta conclusão está associada com o conhecimento de que GAT-1 é pouco expresso em idade pós-natal precoce, aumentando nas duas primeiras semanas de vida pós-natal para chegar a um padrão adulto aproximadamente em P30 (YAN et al., 1997; MINELLI et al., 2003a).

A detecção do alto percentual de inibição em fatias de córtex cerebral de ratos desnutridos em P7 e P25 (figura 3.15 A e B), pode indicar que o GAT-3 ainda seja altamente representado, ou tenha maior funcionalidade, diferindo dos controles, onde o perfil de

inibição induzido pelo antagonista de GAT-3,  $\beta$ -alanina, é menor em P25 e já atinge nesta idade o padrão adulto de inibição, indicando que nesta idade, GAT-1 já seja proporcionalmente mais expresso relativamente ao GAT-3 no grupo normonutrido, o que confere com a literatura (MINELLI et al., 2003a; CONTI et al, 2004).

Por outro lado, não houve diferença entre os grupos  $G_{25}$  e  $G_7$  na inibição da captação de GABA por L-DABA (figura 3.16 A e B). Os percentuais de inibição não diferiram, considerando a perspectiva ontogenética, como já descrito por Balcar e Johnston (1989), para ratos alimentados com ração comercial, assim como não diferiram considerando a perspectiva nutricional.

Analisando o percentual de inibição por L-DABA (figura 3.16 A e B) e  $\beta$ -alanina em P25 (figura 3.15 A e B), em ambos os grupos, como pode ser observado, embora os percentuais de inibição ocasionada por L-DABA não difiram entre os grupos, o percentual de inibição ocasionado por  $\beta$ -alanina é mais elevado no grupo desnutrido. Tomando estes dados conjuntamente, e considerando também que a captação de GABA é mais elevada no grupo desnutrido nas idades consideradas (figura 3.14 A e B), podemos deduzir que, a maior captação de GABA pelo grupo desnutrido provavelmente possa ser atribuída majoritariamente ao transporte através do GAT-3 em vez de GAT-1.

Um fato a ser considerado é o de que os GATs são sujeitos a mecanismos regulatórios, com um aumento no transporte correlacionado, entre outros fatores, a um aumento na expressão do transportador na superfície da membrana em resposta ao aumento da concentração extracelular de GABA (BERNSTEIN e QUICK, 1999; DEKEN et al., 2003). Mesmo que as concentrações de GABA utilizadas no meio de incubação tenham ocasionado este efeito, [o que aparentemente ocorreu, detectável pela observação do efeito das diferentes concentrações de GABA utilizadas sobre a captação de GABA (figura 3.14 A e B), assim como pelo percentual de inibição (figura 3.15 A e B)], não é possível deixar de observar que o grupo desnutrido reage diferentemente. Embora no modelo experimental utilizado seja difícil isolar modificações primárias dos GATs de mudanças adaptativas secundárias, induzida pelas concentrações de GABA extracelulares, torna-se plausível

especular que as diferenças observadas entre os grupos possam fazer parte de uma “reprogramação”, assim como sugerido para outros parâmetros (GRESSENS et al., 1997; DEL ANGEL-MEZA et al., 2001, 2002; STEIGER et al., 2002,2003), com manutenção do padrão imaturo de expressão dos transportadores em resposta à desnutrição.

São conhecidas as instâncias fisiológicas da expressão de GAT-3 em neurônios corticais no período precoce de desenvolvimento, em detrimento da localização predominantemente astrocitária, mais expressa em períodos posteriores (MINELLI et al., 2003a; CONTI et al, 2004). Sabe-se também, que a expressão de transportadores GAT-3 é mais intensa nos locais onde os receptores GABA<sub>A</sub> também o são (POULTER et al., 1992; FRITSCHY et al., 1994), receptores que, segundo Conti et al. (2004), estariam envolvidos na modulação da ação trófica de GABA, conferindo ao transportador GAT-3 um provável envolvimento nesta modulação. Vários autores estabeleceram uma correlação entre o papel neurotrófico de GABA no desenvolvimento precoce, com a conhecida ação excitatória do GABA neste período (ZISKIND-CONHAIM, 1998). A despolarização induzida por GABA leva a expressivo aumento nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular (BEN-Ari, 2001) o que pode levar aos efeitos tróficos de GABA ao estimular um aumento no BDNF (MARTY et al., 1996). O GABA também desempenha importante papel regulatório durante a maturação da atividade neural e é necessário para a alteração de excitatório para inibitório em retina ou rede hipocampal (GANGULY et al., 2001; SERNAGOR et al., 2003).

Já em neurônios maduros, ao abrir os canais de Cl<sup>-</sup>, o GABA hiperpolariza o potencial de membrana, diminuindo a atividade neuronal, e reduz Ca<sup>2+</sup> intracelular (van den POL, 1996). Porém, em situação de diferentes tipos de trauma neuronal, o GABA liberado na sinapse, assim como o aplicado exógenamente, exerce um efeito oposto, despolarizando neurônios e aumentando o Ca<sup>2+</sup> intracelular cerebral, aparentemente por um potencial despolarizante de Cl<sup>-</sup> reverso, o que resulta mais na entrada do que no movimento de saída de Cl<sup>-</sup>. Esta capacidade de aumentar o Ca<sup>2+</sup>, pode conferir ao GABA um papel durante a recuperação do trauma na modulação da expressão gênica (como segundo mensageiro na informação intracelular) (VACCARINO et al., 1992; BADING et al., 1993), direcionando e

aumentando o crescimento de neuritos regenerados ou influenciando os cones de crescimento (MATTSON e KATER, 1987; OBRIETAN e van den POL, 1996) [crescimento de neuritos é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (MATTSON e KATER, 1989)], e, possivelmente reduzindo a morte celular por concentrações citosólicas sub ótimas (FRANKLIN e JOHNSON, 1992). O GABA está relacionado com o aumento de crescimento e maturação sináptica no desenvolvimento precoce (SPOERRI, 1988; MICHLER, 1990; BARBIN et al., 1993) e pode desempenhar um papel após a injúria (van den POL, 1996).

Além disso, em situação de injúria isquêmica, Melone et al. (2003) mostraram a ocorrência da expressão de GAT-3 em neurônios corticais piramidais, sem alteração na expressão de GAT-1, indicando que durante a isquemia, a expressão de GAT-3 sofre uma reversão aos seus padrões imaturos (CONTI et al., 2004). A analogia sugere que a programação genética governando o desenvolvimento precoce possa ser reativada por condições patofisiológicas, como a isquemia, embora com conseqüências diferentes para o organismo (MELONE et al., 2003).

Se o efeito de maior inibição da  $\beta$ -alanina em ratos desnutridos jovens, observado neste trabalho (figura 3.15 AB), é atribuível aos GATs-3 localizados predominantemente nos padrões de expressão maduros, isto é, em astrócitos, ou em padrões imaturos, isto é, em neurônios, ainda permanece a esclarecer.

Embora GAT-3 neuronal no cérebro isquêmico (MELONE et al., 2003) possa desempenhar funções com diferentes conseqüências para o organismo, quando comparado ao neocórtex em desenvolvimento (CONTI et al., 2004) e estes, por sua vez, também possam diferir das funções do GAT-3 expresso na desnutrição, o estabelecimento de algumas relações permite algumas especulações. Com base na noção de que o GABA captado por neurônios GABAérgicos pode ser reutilizado como neurotransmissor, enquanto que o captado pela circunvizinha glia é metabolizado via GABA transaminase e ciclo do ácido tricarbóxico (SCHOUSBOE et al., 1983; SCHOUSBOE, 2003), e no provável envolvimento dos GAT-3 neuronais (no modelo mais imaturo) na modulação da ação trófica de GABA, seria plausível pensar que a maior inibição da  $\beta$ -alanina evidenciada neste

estudo, provavelmente atribuível à maior expressão de GAT-3 em ratos em desenvolvimento, constituiria uma resposta de característica adaptativa compensatória à agressão nutricional, modulando maturação neuronal e a formação de sinapses funcionais, mediante a reutilização do neurotransmissor GABA neste processo. Vários relatos mostram que a desnutrição precoce ocasiona anormalidades nos processos de diferenciação neuronal e sinaptogênese (GRESSENS et al., 1997), retardamento na migração das células granulares em córtex de ratos (DEL ANGEL-MEZA et al., 2001) e atraso no desenvolvimento dos padrões de atividade da GAD (DEL ANGEL-MEZA et al., 2002). A maior captação de GABA em ratos desnutridos de 25 dias e a provável maior expressão/funcionalidade de GAT-3, que, segundo Fritschy et al. (1994) e Poulter et al. (1992) é intensamente expresso em locais onde os receptores GABA<sub>A</sub> também estão mais densamente representados (receptores que, segundo Conti et al., 2004 estariam envolvidos na modulação da ação trófica de GABA), poderia ser um mecanismo adaptativo/compensatório na modulação da ação trófica de GABA em ratos desnutridos ainda nesta idade.

Na fase adulta (P75), os ratos desnutridos não apresentam níveis de captação diferenciados dos animais controle (figura 3.14 AB), assim como o percentual de inibição ocasionado por  $\beta$ -alanina é similarmente reduzido (figura 3.15 AB), indicando uma maior expressão de GAT-1 em detrimento de GAT-3, o que, se por um lado pode ser um indicador de que a sinalização GABAérgica tenha atingido o padrão maduro de desenvolvimento, por outro, pode não representar que a desnutrição ocasione apenas um atraso nos processos de maturação. A maturação cerebral envolve uma série de estágios sobrepostos temporalmente e que seguem uma seqüência precisa (MORGANE et al, 2002). O conceito relativo ao impacto da injúria precoce ao cérebro está baseado na concepção de que há períodos do desenvolvimento durante os quais o cérebro é particularmente vulnerável. Este período crítico representa uma única janela (“window of opportunity”) de desenvolvimento que não pode ser revertida ou repetida em um período posterior, e no qual o cérebro em desenvolvimento precisa produzir o padrão correto de conexões durante um período

limitado de tempo (MORGANE et al, 2002). Em vista da importância da programação cronológica do desenvolvimento em relação à organização integrada do SNC, desequilíbrios no desenvolvimento coordenado de neurotransmissores, por exemplo, mais do que lesões focais aparentes contribuem para alterações funcionais tardias (MORGANE et al., 2002). Por estas razões, associadas a indícios de que haja comprometimento permanente de padrões farmacológicos envolvendo o sistema GABAérgico, tais como reações ao etanol (CORDOBA et al., 1997; BORGHESE et al., 1998) e benzodiazepínicos (BRIONI et al., 1989; ALMEIDA et al., 1996; TONKISS et al., 2000), a aparente normalização dos níveis de captação de GABA em ratos adultos desnutridos, assim como a provável normalização da distribuição entre os dois tipos de GATs mais expressos no SNC, quais sejam GAT-1 e GAT-3 (demonstrada pelo percentual de inibição seletiva similar entre os grupos), constitui apenas um parâmetro a ser considerado no complexo sistema de neurotransmissão, e vários outros mecanismos podem estar relacionados à alterada neurotransmissão GABAérgica em ratos adultos.

Estudos sobre os efeitos da injúria nutricional, envolvendo a expressão ontogenética dos transportadores, sua localização (astrocitária ou neuronal) e sua implicação no processos de maturação neuronal, assim como, na gênese e/ou manutenção e/ou agravamento de acometimentos neurológicos, reforçam novamente a importância do foco na terapia farmacológica específica do desnutrido, associada à fase de desenvolvimento, dada a ênfase atual, por exemplo, no bloqueio seletivo de transportadores de GABA na epilepsia descrito por Schousboe (2003).

#### 4.4 Efeitos de altas concentrações extracelulares de potássio sobre o metabolismo cerebral do acetato, lactato e glicose em ratos controle e desnutridos

A ativação funcional em tecidos neurais aumenta a concentração  $[K^+]_e$  e o metabolismo energético em regiões ativadas (SOKOLOFF, 1981; 1993). A estimulação do metabolismo por meio da ativação funcional é dependente da atividade da  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase, que contribui para a manutenção de concentrações basais de  $K^+$ , que no cérebro “*in vivo*”,

situa-se normalmente em torno de 3mM. Este valor pode aumentar durante períodos de ativação neuronal para 12mM em excitação neuronal fisiológica (SOMJEN 1975, 1979) e pode atingir 50 a 80mM durante a convulsão, isquemia, hipoglicemia ou depressão cortical alastrante (HERTZ, 1977; ERECINSKA e SILVER, 1994).

Sabendo-se que altas concentrações de potássio extracelular constituem estímulo para o uso de nutrientes energéticos pelo SNC (PENG et al., 1996; SOKOLOFF et al., 1996; McDOUGAL et al., 1997; HASSEL e SONNEWALD, 2002; HERTZ e PENG, 2002) e mimetizam “*in vitro*” condição resultante de excitotoxicidade, e que o acetato é predominantemente metabolizado pelos astrócitos (BADAR-GOFFER et al., 1990; CERDAN et al., 1990, WANIEWSKI e MARTIN, 1998), células que desempenham papel crucial no fluxo de substratos energéticos para os neurônios, especialmente em condições de ativação neuronal (PELLERIN e MAGISTRETTI, 2003), ao avaliar o efeito das altas concentrações de potássio extracelular sobre o metabolismo do acetato, objetivou-se avaliar interferências da desnutrição sobre o metabolismo glial, sob condições de excitotoxicidade em fatias de estruturas cerebrais de ratos adultos.

A utilização de fatias de tecido cerebral, feita com o intuito de manter as interações anatômicas e funcionais entre astrócitos e neurônios, mostrou-se efetiva na captação e oxidação do acetato (figura 3.17 e 3.21), indicando que esta preparação preserva a atividade astrocitária.

Embora não se tenha observado efeito da desnutrição sobre a oxidação do acetato a  $\text{CO}_2$  (figura 3.17) em fatias de córtex cerebral, as concentrações fisiológicas mais elevadas (12mM) e supra-fisiológicas (20 e 50mM) de potássio, estimularam a oxidação do acetato quando comparadas com um meio contendo 2,7mM de potássio extracelular (figuras 3.17 e 3.18). Para investigar os mecanismos envolvidos nesta estimulação, foram feitas avaliações quanto à influência das concentrações extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a oxidação do acetato em um meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  e contendo 50mM de  $[\text{K}^+]_e$ , uma vez que é conhecido que altas  $[\text{K}^+]_e$  aumentam o influxo celular de  $\text{Ca}^{2+}$  (HERTZ e CODE, 1993 *apud* HUANG et al., 1994). Como não foram encontradas alterações na oxidação do acetato, comparando os meios

com concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  e meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 3.20), a hipótese de que o efeito das altas  $[\text{K}^+]_e$  seja devido à ativação intracelular de enzimas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  é inconsistente. Da mesma forma, na utilização da nifedipina ( $10\mu\text{M}$ ), inibidor dos canais L voltagem-sensíveis (HERTZ e CODE, 1993 *apud* HUANG et al., 1994) e decorrente inibição da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais que constituem a base para o grande aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na presença de  $[\text{K}^+]_e$  nos astrócitos (HUANG et al., 1994), não se observou alteração da estimulação do metabolismo do acetato pelas altas  $[\text{K}^+]_e$  (figura 3.20), reforçando a exclusão do  $\text{Ca}^{2+}$  como mecanismo.

Pelo fato de que a utilização de bumetanide ( $100\mu\text{M}$ ), inibidor do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (HUANG et al., 1994; WALZ, 2000) não haver provocado alterações na oxidação do acetato, é possível concluir também a não participação do transportador no estímulo à oxidação do acetato em altas  $[\text{K}^+]_e$  (figura 3.20).

Está bem estabelecido que altas  $[\text{K}^+]_e$  diminuem o  $[\text{Na}^+]_i$  astrocitário (TAKAHASHI et al., 1997), e que baixas  $[\text{Na}^+]_i$  estimulam a acetil-CoA-sintetase (CARROL, 1997). Com base nestas informações, para avaliar os efeitos do  $[\text{Na}^+]_i$  sobre a oxidação do acetato, foram verificados os efeitos da ouabaína ( $1\text{mM}$ ), inibidor da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (CLAUSEN et al., 1987) sobre a oxidação do acetato, objetivando inibir a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e aumentar o  $[\text{Na}^+]_i$ . Em presença de altas  $[\text{K}^+]_e$ , a ouabaína diminui a oxidação do acetato (figura 3.18), o que sugere que as altas  $[\text{K}^+]_e$  estimulam a oxidação do acetato ao diminuir  $[\text{Na}^+]_i$ . Corroborando com esta proposição, ao utilizar a monensina ( $10\mu\text{M}$ ), um ionóforo de  $\text{Na}^+$  (PRESSMAN e FAHIM, 1982; TAKAHASHI et al., 1997) no meio de incubação, com intenção de aumentar o  $[\text{Na}^+]_i$ , a monensina inibiu a oxidação do acetato (figura 3.18). Adicionalmente, ao diminuir o  $[\text{Na}^+]_e$  a oxidação foi estimulada (figura 3.19). Tomados conjuntamente, estes resultados sugerem que altas  $[\text{K}^+]_e$  estimulam a oxidação astrocitária de acetato, provavelmente ao diminuir as  $[\text{Na}^+]_i$ , e que a desnutrição, embora afete vários outros parâmetros cerebrais, não parece ter afetado o metabolismo do acetato frente a altas  $[\text{K}^+]_e$  em ratos adultos.

Por outro lado, no modelo de desnutrição mais agressivo utilizado, no qual não houve suplementação de L-metionina na ração dos animais, foi constatado um aumento da



oxidação do acetato, relativamente ao grupo normonutrido já em concentrações fisiológicas de  $[K^+]_e$  em fatias de cerebelo (figura 3.21 A), mostrando que o efeito da desnutrição sobre o metabolismo do acetato é dependente da severidade do modelo de desnutrição utilizado e da estrutura. Sabe-se que a diferenciação glial e neuronal e a sinaptogênese dependem da região do cérebro envolvida e seus períodos críticos de desenvolvimento (DEL ANGEL-MEZA et al., 2001). A maturação cerebelar ocorre predominantemente no período pós-natal, e há relatos de que o cerebelo é mais sensível a uma série de fatores ambientais adversos do que o resto do cérebro, durante o desenvolvimento pós-natal (HILLMAN e CHEN, 1981; SHAMBAUGH et al., 1996). É possível que estes fatores associados possam ter ocasionado a alteração do metabolismo do acetato, indicativo de alteração astrocitária. Já o metabolismo da glicose e do lactato foram ambos estimulados nos grupos  $G_{7/SSMET}$  e  $G_{25}$  pelas altas  $[K^+]_e$ , ocorrendo maior oxidação do lactato relativamente à glicose já em concentrações fisiológicas de potássio extracelular, uma vez que na utilização da glicose participam várias enzimas marca-passo, contrariamente à utilização do lactato (3.21 B).

Tomados conjuntamente, os efeitos da desnutrição sobre os sistemas glutamatérgico e GABAérgico, embora sistema-específicos, nos parâmetros testados podem refletir alterações na sua interação. Sabendo-se que a interação dinâmica entre sistemas excitatório e inibitório está envolvida nas funções cerebrais, a desnutrição, ao afetar esta interação, pode modificar a sensibilidade a drogas, inclusive as usadas com finalidades terapêuticas.

A maior sensibilidade à picrotoxina, antagonista de receptores  $GABA_A$ , evidenciada nos ratos desnutridos nos vários parâmetros estudados, aponta para alterações decorrentes da desnutrição no sistema GABAérgico que, se em condições basais são capazes de manter ou atingir uma certa homeostase por meio de prováveis mecanismos compensatórios e/ou adaptativos, em condições de interferência adicional agressiva no sistema, desencadeiam respostas mais expressivas, as quais denotam a “quebra” do

suposto equilíbrio dinâmico atingido e a fragilidade do padrão estabelecido e, em alguns dos aspectos avaliados, a imaturidade do sistema.

Parâmetros como a maior captação de GABA em ratos jovens e a provável expressão alterada dos transportadores em ratos desnutridos em desenvolvimento, contribuem para o fortalecimento da hipótese da imaturidade do sistema, e de que estes sejam mecanismos adaptativos na busca de maturação do SNC, dada a sua relação trófica. Estes resultados, face à ênfase atual no bloqueio de transportadores específicos de GABA no desenvolvimento de medicação anti-epiléptica (SCHOUSBOE et al., 2003, 2004), dão suporte à importância do desenvolvimento de estudos relacionados à terapia específica para epilepsia infantil, em um contexto de desnutrição.

A aparente normalização na expressão de transportadores e na captação de GABA em ratos de 75 dias se, por um lado pode ser indicativo de atraso no processo de amadurecimento e estabelecimento de padrões normais, por outro, constitui apenas um parâmetro, não significando a normalização de todo o sistema, uma vez que, no conceito de períodos críticos, eventos de cuja coordenação temporal integrada depende o estabelecimento de conexões adequadas no SNC, podem não ter sido estabelecidos, haja visto a manutenção de respostas diferenciadas de desnutridos adultos a drogas que atuam no sistema GABAérgico como benzodiazepínicos e etanol (BRIONI et al., 1989; CÓRDOBA et al., 1992, 1997; ALMEIDA et al., 1996; BORGHESE et al., 1998; TONKISS et al., 2000).

Respostas similares ao estímulo à oxidação do acetato por altas concentrações extracelulares de potássio, em córtex cerebral de ratos adultos controle e desnutridos, assim como no período precoce pós-picotoxina em ratos jovens, podem indicar que os astrócitos em ambos os grupos reagem prontamente na captação do potássio, o que estimula a oxidação do acetato. Contudo, a gravidade da desnutrição imposta, pode afetar a resposta ao potássio extracelular, exacerbando-a, denotando maior susceptibilidade ao potássio extracelular.

## 5 CONCLUSÃO

1. A desnutrição gestacional e pós-natal diminui a sensibilidade à ação convulsivante do ácido quinolínico administrado intracerebroventricularmente em ratos de 25 dias de idade;
2. A captação de glutamato por fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 25 dias de idade, não sofre alteração frente à desnutrição e/ou ácido quinolínico, o que exclui este mecanismo como fator correlacionado com a menor sensibilidade no grupo desnutrido;
3. Ratos desnutridos de 25 dias apresentam maior sensibilidade à picrotoxina, evidenciada pela menor dose que causa convulsão em 100% dos animais desnutridos, relativamente aos controle, e menor período de latência para manifestação da convulsão;
4. A picrotoxina (s.c.) causa aumento da captação de GABA em fatias de hipocampo de ratos desnutridos e controle de 25 dias de idade, avaliada após uma hora da administração da picrotoxina, sem afetar a captação em fatias de córtex cerebral;
5. A maior sensibilidade dos ratos desnutridos à picrotoxina pode estar correlacionada à maior captação basal de GABA aos 25 dias de idade, comparativamente aos controle, evidenciada em fatias de córtex cerebral e hipocampo;
6. A desnutrição altera o perfil ontogenético de captação de GABA por fatias de córtex cerebral, com manutenção de maior captação de GABA aos 25 dias, relativamente aos animais de 75 dias e posterior declínio para valores adultos similares aos dos animais controle;
7. A desnutrição afeta o perfil inibitório da  $\beta$ -alanina sobre a captação de GABA em ratos desnutridos de 7 e 25 dias;

8. Valores aumentados de captação de GABA, assim como percentual aumentado de inibição da captação por  $\beta$ -alanina em fatias de córtex cerebral de ratos desnutridos jovens, permitem inferir que a maior captação é atribuível principalmente ao GAT-3 em ratos desnutridos nas idades consideradas, comparativamente aos controle que já apresentam aos 25 dias valores de inibição similares aos dos adultos;
9. Valores similares de percentual de inibição por  $\beta$ -alanina, assim como de captação de GABA aos 75 dias, por fatias de córtex cerebral de ratos desnutridos e grupo controle, permitem inferir que a expressão e/ou funcionalidade de GAT-3 não difere entre os grupos nesta idade;
10. Valores similares de percentual de inibição da captação de GABA por L-DABA entre grupos de diferente tratamento nutricional, permitem inferir que a desnutrição não afeta a expressão e/ou funcionalidade dos GAT-1 em ratos de 7, 25 e 75 dias;
11. A desnutrição aumenta a susceptibilidade à ação da picrotoxina "*in vitro*" sobre a metabolização da glicose em fatias de córtex cerebral de ratos de 25 e 75 dias de idade;
12. O estímulo à oxidação da glicose, induzido pela picrotoxina "*in vitro*", é idade-dependente em ambos os grupos, sendo que ratos desnutridos de 75 dias são menos sensíveis do que ratos de 25 dias e, em ratos controle de 75 não se observa efeito da picrotoxina nas concentrações estudadas;
13. O estresse adicional à desnutrição imposto pela picrotoxina (s.c.), desencadeia aumento da peroxidação lipídica em cérebro e cerebelo de ratos de 25 dias de idade;
14. A susceptibilidade ao procedimento de "*kindling*" químico pela picrotoxina, em ratos em desenvolvimento, é sexo e tratamento nutricional dependente;
15. A picrotoxina estimula a oxidação do acetato a  $\text{CO}_2$ , mas não da glicose em período precoce pós picrotoxina (24 horas) em ratos em desenvolvimento, indicando o envolvimento astrocitário na resposta ao agente convulsivante, independente do tratamento nutricional;

16. A aplicação crônica de picrotoxina estimula a oxidação da glicose apenas em ratos desnutridos, sem afetar a oxidação do acetato;
17. Altas concentrações extracelulares de potássio aumentam a oxidação do acetato a  $\text{CO}_2$ , em fatias de córtex cerebral de ratos controle e desnutridos adultos, em função da diminuição da concentração intracelular de sódio;
18. A desnutrição afeta o metabolismo "*in vitro*" do acetato em cerebelo de ratos adultos, em modelo de déficit de L-metionina.

A desnutrição pré e pós-natal afeta respostas envolvendo os sistemas GABAérgico e glutamatérgico em situações de excitotoxicidade provocada por antagonista de receptor  $\text{GABA}_A$ , picrotoxina e por hiperestimulador do sistema glutamatérgico, ácido quinolínico, em ratos em desenvolvimento, assim como parâmetros ontogênicos ligados ao transporte de GABA. Altas concentrações extracelulares de potássio acarretam aumento da oxidação do acetato, em função da redução intracelular de sódio em ratos adultos controle e desnutridos, pré e pós-natalmente. Porém a severidade da restrição nutricional imposta é determinante na exacerbação do estímulo. Além disso, a desnutrição parece afetar a interação neurônio-glia em condições de excitotoxicidade.

## 6 PERSPECTIVAS

### 6.1 Dados preliminares

6.1.1 Baseados em dados preliminares que apontam para uma menor sensibilidade de ratas desnutridas adultas comparativamente às controle, porém maior sensibilidade relativamente a ratos imaturos de ambos os sexos, está em andamento a continuidade da avaliação da susceptibilidade a convulsões induzidas por picrotoxina, tanto em animais adultos desnutridos machos, quanto em fêmeas, comparativamente a ratos controle de ambos os sexos. Esta avaliação deverá trazer novas informações a respeito do efeito da desnutrição sobre o sistema GABAérgico em perspectiva ontogenética e sexualmente dimórfica. Os dados preliminares, além de representarem, possivelmente, as modificações hormonais induzidas pela desnutrição, poderiam representar adicionalmente alterações das subunidades  $\alpha$  descritas por Steiger et al. (2003) em ratos desnutridos de 90 dias de idade, sub-unidade esta que determina, em parte, segundo Bell-Horner et al. (2000) maior sensibilidade à picrotoxina.

6.1.2 Dados preliminares (ANEXO 3 - artigo em preparação) mostram maior imunoconteúdo de GAT-3 em membranas plasmáticas cerebrais de ratos desnutridos de 7 dias, comparativamente aos controle, conferindo forte suporte à hipótese de que a maior captação de GABA por fatias de córtex cerebral de ratos desnutridos desta idade seja devida a estes transportadores. Dados relativos à imunodeteção de GAT-1, obtidos preliminarmente, indicam não haver diferença entre os grupos de tratamento nutricional aos 7, corroborando com a hipótese anterior. A ampliação do tamanho da amostra e a investigação do imunoconteúdo de GAT-3 e GAT-1 nas outras idades consideradas estão em andamento.

## 6.2 Outras perspectivas

6.2.1 Os resultados diferenciados relativos à indução de “*kindling*” por picrotoxina sexo e tratamento nutricional dependentes em ratos em desenvolvimento levam à perspectiva de análise dos efeitos da desnutrição relacionada a alterações na maturação hormonal;

6.2.2 A avaliação da atividade da GAD nos animais desnutridos e frente ao uso de picrotoxina, assim como a avaliação da liberação de GABA (vesicular e citosólico) e atividade da GABA-T, deverão complementar e contribuir para o esclarecimento da maior captação de GABA observada em ratos de 25 dias de idade;

6.2.3 A ampliação dos estudos envolvendo o metabolismo astrocitário e neuronal em ratos eutróficos e desnutridos, assim como o efeito de drogas convulsivantes (picrotoxina) sobre a astrocitose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.D.; VICTOR, M.; ROOPER, A.H. *Principles of Neurology*. New York:McGraw-Hill, 1997. p. 313.
- ADKINS, J.C.; NOBLE, S. Tiagabine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the management of epilepsy. *Drugs* 55:463-470, 1998.
- AKBAR, M.T.; RATTRAY, M.; WILLIAMS, R.J.; CHONG, N.W.S.; MELDRUM, B.S. Reduction of GABA and glutamate transporter messenger RNAs in the severe-seizure genetically epilepsy-prone rat. *Neuroscience* 85:1235-1251, 1998.
- AKBARIAN, S.; KIM, J.J.; POTKIN, W.P.; HETRICK, W.E.; BUNNEY JR.; JONES, E.G. Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. *Arch. Gen. Psychiatry* 53:425-436, 1996.
- ALAKUIJALA, A.; PALGI, M.; WEGELIUS, K.; SCHMIDT, M.; ENZ, R.; PAULIN, L.; SAARMA, M.; PASTERNAK, M. GABA receptor rho subunit expression in the developing rat brain. *Dev. Brain Res.* 154:15-23, 2005.
- ALMEIDA, M.F.; YAMASAK, E.N.; SILVEIRA, A.C.; GUEDES, R.C.; HOKOC, J.N. The GABAergic and cholinergic systems in the retina are differentially affected by postnatal malnutrition during the suckling period. *Nutr. Neurosci.* 4(3):223-38, 2001.
- ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20:389-402, 1996.
- AMARA, S.G.; ARRIZA, J.L. Neurotransmitter transporters: three distinct gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:337-344, 1993.
- AMARA, S.; FONTANA, A.. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41:313-318, 2002.
- AMARA, S.G.; KUCHAR, M. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu.Rev. Neurosci.* 16:73-93, 1993.
- AMOROSO, S.; SCHMIDT-ANTOMARCHI, H.; FOSSET, M.; LASDUNSKI, M. Glucose, sulfonyleureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Science* 247:852-854, 1990.
- ANDERSON, C.M.; SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia* 32:1-14, 2000.
- ANDRE, V.; MARESCAUX, C.; NEHLIG, A.; FRITSCHY, J.M. Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11:452-468, 2001.
- 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. U.S.A.* 94:4155-4160, 1997.
- ASADA, H.; KAWAMURA, Y.; MARUYAMA, K.; KUME, H.; DING, R.G.; KANBARA, N.; KUZUME, H.; SANBO, M.; YAGI, T.; OBATA, K.. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6496-6499, 1997.
- ASHCROFT, S.J.; ASHCROFT, F.M. Properties and functions of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Cell Signal* 2:197-214, 1990.
- ATTWELL, D.; BARBOUR, B.; SZATKOWSKI, M. Nonvesicular release of neurotransmitters. *Neuron* 11:401-407, 1993.
- AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; MORGANE, P.J.; BRONZINO, J.D. Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: rapid kindling. *Brain Res. Bull.* 27:815-818, 1991.
- AVOLI, M. Epileptiform discharges and a synchronous GABAergic potential induced by 4-aminopyridine in the rat immature hippocampus. *Neurosci. Lett.* 117:93-98, 1990.



AVOLI, M.; LOUVEL, J.; PUMAIN, R.; OLIVIER, A. Seizure-like discharges induced by lowering  $[Mg^{2+}]_o$  in the human epileptogenic neocortex maintained in vitro. *Brain Res.* 417:199-203, 1987.

BADAR-GOFFER, R.S.; BACHELARD, H.S.; MORRIS, P.G. Cerebral metabolism of acetate and glucose studied by  $^{13}N$ -m.r.spectroscopy: a technique for investigating metabolic compartmentation in the brain. *Biochem. J.* 266:133-139, 1990.

BADING, H.; GINTY, D.; GREENBERG, M. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signalling pathways. *Science* 260:181-186, 1993.

BALCAR, V.J.; JOHNSTON, G.A.R. Ontogeny of high affinity uptake of GABA studied in 'minislices' (tissue prisms of rat cerebral cortex). *Dev. Brain Res.* 49:295-299, 1989.

BALE, J.F. Jr. Viral encephalitis. *Med. Clin. North Am.* 77:25-42, 1993.

BARBIN, G.; POLLARD, H.; GAIARSA, J.; BEN-ARI, Y. Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 152:150-154, 1993.

BARKER, E.L.; MOORE, K.R.; RAKSHAN, F.; BLAKELY, R.D. Transmembrane domain I contributes to the permeation pathways for serotonin and ions in the serotonin transporter. *J. Neurosci.* 19:4705-4717, 1999.

BARKER, J.L.; MCBURNEY, R.N.; MATHERN, D.A. Convulsant-induced depression of amino acid responses in cultures mouse spinal neurones studied under voltage clamp. *Brit. J. Pharmacol.* 80:619-629, 1983.

BARNARD, E.A.; SKOLNICK, P.; OLSEN, R.W.; MOHLER, H.; SIEHART, W.; BIGGIO, G.; BRAESTRUP, C.; BATESON, A.N.; LANGER, S.Z. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50:291-293, 1998.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Pública* 19(Sup.1):S181-S191, 2003.

BECKMAN M.L.; BERNSTEIN, E.M.; QUICK, M.W. Multiple G protein-coupled receptors initiate protein kinase C redistribution of GABA transporters in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19:RC9, 1999.

BECKMAN, M.L.; BERNSTEIN, E.; QUICK, M.W. Protein kinase C regulates the interaction between a GABA transporter and syntaxin 1A. *J. Neurosci.* 18:6103-6112, 1998.

BECKMAN, M.L.; QUICK, M.W. Neurotransmitter transporters: regulators of function and functional regulation. *J. Membr. Biol.* 164:1-10, 1998.

BEDI, K.S. Early-life undernutrition causes deficits in rat dentate gyrus granule cell number. *Experientia* 47:1073-1074, 1991b.

BEDI, K.S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 311:425-433, 1991a.

BEHAR, T.N.; SCHAFFNER, A.E.; COLTON, C.A.; SOMOGYI, R.; OLAH, Z.; LEHEL, C.; BARKER, J.L. GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 14:29-38, 1994.

BELAN, P.V.; KOSTYUK, P.G. Glutamate-receptor-induced modulation of GABAergic synaptic transmission on the hippocampus. *Plügers Arch. Eur. J. Physiol.* 444:26-37, 2002.

BELL-HORNER, C.L.; DIBAS, M.; HUANG, R.; DREWE, J.A.; DILLON, G.H. Influence of subunit configuration on the interaction of picrotoxin-site ligands with recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. *Mol. Brain Res.* 76, 47-55, 2000.

BEN-ARI, Y. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24:353-360, 2001.

BENNET, E.R.; SU, H.; KANNER, B.L. Mutation of arginine 44 of GAT-1, a (Na<sup>+</sup>) + Cl<sup>-</sup>) coupled gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain, impairs net flux but not exchange. *J. Biol. Chem.* 275:34106-34113, 2000.

BERN, C.; GARCIA, H.H.; EVANS, C.; GONZALES, A.E.; VERASTEGUI, M.; TSANG, V.C.; GILMAN, R.H. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin. Infect. Dis.* 29:1203-1209, 1999.

BERNATH, S.; ZIGMOND, M.J. Characterization of [ $^3$ H]GABA release from striatal slices: evidence for a calcium-independent process via the GABA uptake system. *Neuroscience* 27:563-570, 1988.

- BERNSTEIN, E.M.; QUICK, M.W. Regulation of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Transporters by extracellular GABA. *J. Biol. Chem.* 274:889-895, 1999.
- BIERVERT, C.; SCHROEDER, B.C.; KUBISH, C.; BERKOVIC, S.F.; PROPPING, P.; JENTSCH, T.J.; STEINLEIN, O.K. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403-406, 1998.
- BISMUTH, Y.; KAVANAUGH, M.P.; KANNER, B.I. Tyrosine 140 of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 plays a critical role in neurotransmitter recognition. *J. Biol. Chem.* 272:16096-16102, 1997.
- BLAKELY, R.D.; CLARK, J.A.; PACHOLCZYK, T.; AMARA, S.G. Distinct developmentally regulated brain mRNAs direct the synthesis of neurotransmitters transporters. *J. Neurochem.* 56:860-871, 1991.
- BORDEN, L.A. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem. Int.* 29:335-356, 1996.
- BORDEN, L.A.; DHAR, T.G.M.; SMITH, K.E.; BRANCHEK, T.A.; GLUCHOWSKIC, C.; WEINSHANK, R.L. Cloning of the human homologue of the GABA transporter GAT-3 and identification of a novel inhibitor with selectivity for this site. *Receptors Channels* 2:207-213, 1994.
- BORDEN, L.A.; SMITH, K.E.; GUSTAFSON, E.L.; BRANCHEK, T.A.; WEINSHANK, R.L. Cloning and expression of a beatine/GABA transporter from human brain. *J. Neurochem.* 64: 977-984, 1995.
- BORDEN, L.A.; SMITH, K.E.; HARTIG, P.R.; BRANCHEK, T.A.; WEINSHANK, R.L. 1992. Molecular heterogeneity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J. Biol. Chem.* 267: 21098-21104, 1992.
- BORGES, M.A. *Prevalência urbana da epilepsia: Estudo populacional em São José do Rio Preto, Brasil.* Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2002.
- BORGES, M.A.; de BARROS, E.P.; ZANETTA, D.M.; BORGES, A.P.P. Prevalência da epilepsia entre os índios Bakairi do estado do Mato Grosso, Brasil. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60(1):80-85, 2001.
- BORGES, M.A.; MIN, L.L.; GUERREIRO, C.A.M.; YACUBIAN, E.M.T.; CORDEIRO, J.A.; TOGNOLA, W.A.; BORGES, A.P.P.; ZANETTA, D.M.T. Urban prevalence of epilepsy-populatonal study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq. Neuropsiquiatr.* (62(2):199-205, 2004.
- BORGHESE, C.M.; CÓRDOBA, N.E.; LAINO, C.H.; ORSINGHER, O.A.; RUBIO, M.C.; NISELMAN, V. Lack of tolerance to the anxiolytic effect of diazepam and pentobarbital following chronic administration in perinatally undernourished rats. *Brain Res. Bull.* 46: 237-244, 1998.
- BORMANN, J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:16-19, 2000.
- BORMANN, J. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11:112-116, 1988.
- BOURGEAIS, B. Temporal lobe epilepsy in infants and children. *Brain Dev.* 20:135-141, 1998.
- BOWERY, N.G. GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 10:401-407, 1989.
- BRADFORD, H.F. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 47:477-511, 1995.
- BRIONI, J.D.; CÓRDOBA, N.; ORSINGHER, O.A. Decreased reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. *Behav. Brain Res.* 34:159-162, 1989.
- BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LA FRANCE, R.J.; MORGANE, P.J. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Res.* 515:45-50, 1990.
- BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LA FRANCE, R.J.; CHESTER, J.S.; MORGANE, P.J. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. *Brain Res.* 384:348-54, 1986.
- BRONZINO, J.D.; LAFRANCE, A.-R.J.; MORGANE, P.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. I. Synaptic transmission measures. *Exp. Neurol.* 112:206-215, 1991.
- BRUCE, A.J.; BAUDRY, M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic. Biol. Med.* 18:993-1002, 1995.
- BRUNO, A.N.; OSES, J.P.; AMARAL.O.; COITINHO, A.; BONAN, C.D.; BATTASTINI, A .M.O.; SARKIS, J.J.F. Changes in nucleotide hydrolisis in rat blood serum induced by pentylentetrazol-kindling. *Mol. Brain Res.* 114:140-145, 2003.

- BUHR, A.; WAGNER, C.; FUCHS, K.; SIEGHART, W.; SIEGEL, E. Two novel residues in M2 of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor affecting gating by GABA and picrotoxin affinity. *J. Biol. Chem.* 276:7775-7781, 2001.
- BUREAU, M.; OLSEN, R.W. Multiple distinct subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric-A receptor protein show different ligand-binding affinities. *Mol. Pharmacol.* 37:497-502, 1990.
- BUTLER, P.D.; SUSSER, E.S.; BROWN, A.S.; KAUFMANN, C.A.; GORMAN, M.D. Prenatal nutritional deprivation as a risk faktor in schizophrenia: preclinical evidence. *Neuropsychopharmacology* 11:227-35, 1994.
- CAMMACK, J.N.; RAKHILIN, S.V.; SCHWARTZ, E.A. A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. *Neuron* 13:949-960, 1994.
- CARLOS, C.P.; LEMONICA, L.P.; KEMPINAS, W.G.; PEREIRA, O.C.M. Does the male reproductive performance depend on the early lactation milk in rats? *Physiol. Behav.* 59:147-152, 1996.
- CARLSON, H.; RONNE-ENGSTROM, E.; UNGERSTEDT, U.; HILLERED, L. Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. *Neurosci. Lett.* 140:30-32, 1992.
- CARROL, P.T. Evidence to suggest that extracellular acetate is accumulated by rat hippocampal cholinergic nerve terminals for acetylcholine formation and release. *Brain Res.* 753:47-55, 1997.
- CASADO, M.; BENDAHAN, A.; ZAFRA, F.; DANBOLT, N.C.; ARAGÓN, C.; GIMÉNEZ, C.; KANNER, B.I. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *Biol. Chem.* 268:27313-27317, 1993.
- CERDAN, S.; KÜNNECKE, B.; SEELIG, J. Cerebral metabolism of [1,2-<sup>13</sup>C]acetate as detected by in vivo and in vitro <sup>13</sup>CNMR. *J. Biol. Chem.* 265:1216-1226, 1990.
- CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 66:460S-463S, 1997.
- CHANG, Y.; WANG, R.; BAROT, S.; WEISS, D.S. Soichiometry of a recombinant GABA<sub>A</sub> receptor. *J. Neurosci.* 16:5415-5424, 1996.
- CHAPA, F.; KÜNNECKE, B.; CALVO, R.; ESCOBAR DE REY, F.; MORREALE DE ESCOBAR, G.; CERDAN, S. Adult-onset hypothyroidism and cerebral metabolism of [1,2-<sup>13</sup>C]acetate as detected by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Endocrinology* 136:296-305, 1995.
- CHAPMAN, A. Glutamate and epilepsy. *J. Nutr.* 130:1043S-1045S, 2000.
- CHATTON, J. -Y.; MARQUET, P.; MAGISTRETTI, P.J. A quantitative analysis of L-glutamate-regulated Na<sup>+</sup> dynamics in mouse cortical astrocytes: implications for cellular bioenergetics. *Eur. J. Neurosci.* 12:3483-3853, 2000.
- CHATTON, J.-Y., PELLERIN, L., MAGISTRETTI, P.J. GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12456-12461, 2003.
- CHAUDHRY, F.A.; REIMER, R.J.; BELLOCHIO, E.E.; DANBOLT, N.C.; OSEN, K.K.; EDWARDS, R.H.; STORM-MATISEN, J. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 18:8733-9750, 1998.
- CHEN, G.; TROMBLEY, P.Q.; VAN DER POL, A. N. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 494:451-464, 1996.
- CHERUBINI E.; CONTI, F. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* 24:155-162, 2001.
- CHESNUT, T.J.; SWANN, J.W. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in immature hippocampus. *Epilepsy Res.* 2:187-195, 1998.
- CHIU, C.S.; JENSEN, K.; SOKOLOVA, I.; WANG, D.; LI, M.; DESHPANDE, P.; DAVIDSON, N.; MODY, I.; QUICK, M.W.; QUAKE, S.R. LESTER, H.A. Number, density, and surface/cytoplasmic distribution of GABA transporters at presynaptic structures of knock-in mice carrying GABA transporter subtype 1-green fluorescent protein fusions. *J. Neurosci.* 22:10251-10266, 2002.
- CINTRA, L.; DIAZ-CINTRA, S.; GALVAN, A.; KEMPNER, T.; MORGANE, P.J. Effects of protein udernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Res.* 532:271-277, 1990.

- CINTRA, L.; GRANADOS, L.; AGUILLAR, A.; KEMPNER, T.; DEBASSIO, W.; GALLER, J.; MORGANE, P.; DURAN, P.; DIAZ-CINTRA, S. Effect of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rat of four age groups. *Hippocampus* 7:184-191, 1997.
- CLARK, J.A.; AMARA, S.G. Stable expression of a neuronal gamma-aminobutyric acid transporter, GAT-3, in mammalian cells demonstrates unique pharmacological properties and ion dependence. *Mol. Pharmacol.* 46:5050-557, 1994.
- CLARK, J.A.; DEUTCH, A.Y.; GALLIPOLI, P.Z.; AMARA, S.G. Functional expression and CNS distribution of a  $\beta$ -alanine-sensitive neuronal GABA transporter. *Neuron* 9:337-348, 1992.
- CLAUSEN, T.; EVERTS, M.E.; KJELSEN, K. Quantification of the maximum capacity for active sodium-potassium transport in rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond)* 388:163-181, 1987.
- COLOMBO, J.P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, U.; PERRITAZ, R. Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in rats. *Annal. Nutr. Metab.* 36:23-33, 1992.
- CONDIE, B.G.; BAUN, G.; GOTTLIEB, D.I.; CAPECCHI, M.R. Cleft palate in mice with a targeted mutation in the gamma-aminobutyric acid-producing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94:11451-11455, 1997.
- CONNOLLY, C.N.; WOOLTORTON, J.R.; SMART, T.G.; MOSS, S.J. Subcellular localization of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor  $\beta$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:9899-9904, 1996.
- CONRADT, M.; STOFFEL, W. Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J. Neurochem.* 68:1244-1251, 1997.
- CONSTANTI, A. The mixed effect of picrotoxin on the GABA dose/conductance relation recorded in lobster muscle. *Neuropharmacology* 17:159-167, 1978.
- CONTI, F.; DEBIASI, S.; MINELLI, A.; MELONE, M. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17:254-258, 1996.
- CONTI, F.; MINELLI, A.; DEBIASI, S.; MELONE, M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol. Neurobiol.* 14:1-18, 1997.
- CONTI, F.; MINELLI, A.; MELONE, M. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res. Rev.* 45:196-212, 2004.
- CORDERO, M.L.; ORTIZ, J.G.; SANTIAGO, G.; NEGRON, A.; MOREIRA, J.A. Altered GABAergic and glutamatergic transmission in audiogenic seizure-susceptible mice. *Mol. Neurobiol.* 9:253-258, 1994.
- CORDOBA, N.E.; BORGHESE, C.M.; AROLFO, M.P.; ORSINGER, O.A. Reduced tolerance to certain pharmacological effects of ethanol after chronic administration in perinatally undernourished rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57:659-663, 1997.
- CORDOBA, N.E.; CUADRA, G.R.; BRIONI, J.D.; ORSINGER, O. Perinatal protein deprivation enhances the anticonflict effect measured after chronic ethanol administration in adult rats. *J. Nutr.* 22:1536-1541, 1992.
- CORNFORD, E.M.; SHAMSA, K.; ZEITZER, J.M.; ENRIQUEZ, C.M.; WILSON, C.L.; BEHNKE, E.J.; FRIED, I.; ENGEL, J. Regional analyses of CNS microdialysate glucose and lactate in seizure patients. *Epilepsia* 43:1360-1371, 2002.
- COREY, J.L.; DAVIDSON, N.; LESTER, H.A.; BRECHA, N.; QUICK, M.W. Protein kinase C modulates the activity of a cloned  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular distribution of the transporter. *J.Biol. Chem.* 269:14759-14767, 1994.
- COTMAN, C.W.; KAHLE, J.S.; MILLER, S.E.; ULAS, J.; BRIDGES, R.J. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacol.* 7:75-85, 1995.
- COYLE, J.T.; ENNA, S.J. Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain Res.* 111:119-133, 1976.
- D'AMBROSIO, R.; GORDON, D.S.; WINN, H.R. Differential role of KIR channel and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pump in the regulation of extracellular  $\text{K}^+$  in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 87:87-102, 2002.
- DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J. Nutr.* 130:1026S-1031S, 2000.

- DALBY, N.O. GABA-level increasing and anticonvulsant effects of three different GABA uptake inhibitors. *Neuropharmacology* 39:2399-2407, 2000.
- DALBY, N.O. Inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 479:127-137, 2003.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65:1-105, 2001.
- DANIELL, L.C. N-Methyl-D-aspartate increases cytoplasmic free calcium in mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 30:539-545, 1991.
- DAS, P.; BELL-HORNER, C.L.; MACHU, T.K.; DILLON, G.H. The GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin inhibits 5-hydroxytryptamine type 3A receptors. *Neuropharmacology* 44:431-438, 2003.
- DAUNCEY, M.J.; BICKNELL, R.J. Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life. *Nutr. Res. Rev.* 12:231-253, 1999.
- DeBIASI, S.; VITELLARO-ZUCARELLO, L.; BRECHA, N.C. Immunoreactivity for the GABA transporter-1 and GABA transporter-3 is restricted to astrocytes in the rat thalamus: a light and electron-microscopic immunolocalization. *Neuroscience* 83:815-828, 1998.
- DE BITTENCOURT, P.R.M.; ADAMOLEKUM, B.; BHARUCHA, N.; CARPIO, A.; COSSIO, O.H.; DANESI, M.A.; DUMAS, M.; MEINARDI, H.; ORDINARIO, A.; SENANAYAKE, N.; SHAKIR, R.; SOTELO, J. Epilepsy in the tropics: I. Epidemiology, socioeconomic risk factors and etiology. *Epilepsia* 37:1121-1127, 1996.
- DEKEN, S.L.; WANG, D.; QUICK, M.W. Plasma membrane GABA transporters reside on distinct vesicles and undergo rapid regulated recycling. *J. Neurosci.* 23:1563-1568, 2003.
- DEKEN, S.L.; BECKMAN, M.; BOOS, L.; QUICK, M.W. Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nat. Neurosci.* 3:998-1003, 2000.
- DEL ANGEL-MEZA, A. R.; RAMÍREZ-CORTES, L.; ADAME-GONZÁLES, I.G.; BURGOS GONZÁLEZ, I.; BEAS-ZÁRATE, C. Cerebral GABA release and GAD activity in protein- and tryptophan-restricted rats during development. *Int. J. Devl. Neuroscience* 20: 47-54, 2002.
- DEL ANGEL-MEZA, A.R.; RAMIREZ-CORTES, L.; OLIVERA-CORTES, E.; PEREZ-VEGA, M.I.; GONZALEZ-BURGOS, I. A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19:447-453, 2001.
- DELEMARRE-VAN DE WAAL, H.A.; VAN COEVERDEN, S.C.; ENGBREGT, M.T. Factors affecting onset of puberty. *Horm. Res.* 57 Suppl 2:15-18, 2002.
- DEMARQUE, M.; REPRESA, A.; BECQ, H.; KHALILOV, I.; BEN-ARI, Y.; ANIKSZTEJN, L. Paracrine intercellular communication by a Ca<sup>2+</sup>- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* 36:1051-1061, 2002.
- DE ONIS, M.; BLÖSSNER, M.; BORGHI, E.; FRONGILLO, E.A.; MORRIS, R. 2004. Estimates of global prevalence of childhood underweight in 1990 and 2015. *JAMA* 291:2600-2606, 2004.
- DE SOUZA, K.B.; FEOLI, AM.; KRUGER, AD.; DE SOUZA, M.R.; ROTTA, L.N.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L. Effects of undernutrition on glycine metabolism in the cerebellum of rats. *Ann. Nutr. Metab.* 48:246-50, 2004.
- DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; GALVAN, A.; AGUILAR, A.; KEMPNER, T.; MORGANE, P.J. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 310:356-364, 1991.
- DIAZ-CINTRA, S.; GARCIA-RUIZ, M.; CORKIDI, G.; CINTRA, L. Effects of prenatal and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.* 662:117-126, 1994.
- DIBAS, M.I.; GONZALES, E.B.; DAS, P.; BELL-HORNER, C.L.; DILLON, G.H. Identification of a key residue within the second transmembrane domain that confers use-facilitated block by picrotoxin in glycine  $\alpha$ 1 receptors. *J. Biol. Chem.* 277:9112-9117, 2002.
- DIOP, A.G.; de BOER, H.M.; MANDLHATE, C.; PRILIPKO, L.; MEINARDI, H. The global campaign against epilepsy in Afrika. *Acta Tropica* 87:149-159, 2003.

- DOMOKI, F.; PERCIACCANTE, J.V.; VELTKAMP, R.; BARI, F.; BUSIJA, D.W. Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal-vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs. *Stroke* 30:2713-2718, 1999.
- DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:421-31, 1990.
- DUMOULIN, A.; ROSTAING, P.; BEDET, C.; LEVI, S.; ISAMBERT, M.F.; HENRY, J.P.; TRILLER, A.; GASNIER, B. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J. Cell. Sci.* 112:811-823, 1999.
- DUNLOP, D.S.; VAN ELDEN, W.; LAJTHA, A. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of rat brain. *Brain Res.* 99:303-308, 1975.
- DURING, M.J.; RYDER, K.M.; SPENCER, D.D. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature* 376:174-177, 1995.
- DURING, M.J.; SPENCER, D.D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 341:1607-1610, 1993.
- DURKIN, M.M.; SMITH, K.E.; BORDEN, L.A.; WEINSHANK, P.L.; BRANCHEK, T.A.; GUSTAFSON, E.L. Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in the brain: an in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* 33:7-21, 1995.
- DZHALA, V.I.; STALEY, K.J. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J. Neurosci.* 23:1840-1846, 2003.
- EDMONDS, B.; GIBB, A., J.; COLQUHOUN, D. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu. Rev. Physiol.* 57:495-519, 1995.
- EGWIN, P.O.; CHO, B.H.; KUMMEROW, F.A. Effects of postnatal protein undernutrition on myelination in rat brain. *Comp. Biochem. Physiol. A* 83:67-70, 1986.
- ELOQAYLI, H.; DAHL, C.B.; GÖTESTAM, G.; UNSGARD, G.; SONNEWALD, U. 2004. Changes of glial-neuronal interaction and metabolism after a subconvulsive dose of pentylenetetrazole. *Neurochem. Int.* 45:739-745, 2004.
- ELOQAYLI, H.; DAHL, C.B.; GÖTESTAM, K.G.; UNSGARD, G.; HADIDI, H.; SONNEWALD, U. Pentylenetetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain. *J. Neurochem.* 85:1200-1207, 2003.
- ENGELBREGT, M.J.T.; HOUDIJK, M.C.A.M.; POPP-SNIJDERS, C.; DELEMARRE-VAN DER WALL, H.A. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Res.* 48: 803-807, 2000.
- ERECINSKA, M., SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43:37-7, 1994.
- ERLANDER, M.G.; TOBIN, A. J. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem. Res.* 16:215-226, 1991.
- ETTER, A.; CULLY, D.F.; LIU, K.K.; REISS, B.; VASSILATIS, D.B.; SCHAEFER, J.M.; ARENA, J.P. Picrotoxin blockade of invertebrate glutamate gated chloride channels: subunit dependence and evidence for binding within the pore. *J. Neurochem.* 72:318-326, 1999.
- EULER, G.V.; LIU, Y. Glutamate and glycine decrease the affinity of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding in the presence of Mg<sup>2+</sup>. *Eur. J. Pharmacol.* 2454:233-239, 1993.
- EVANS, J.E.; FROSTHOLM, A.; ROTTER, A. Embryonic and postnatal expression of four gamma-aminobutyric acid transporter mRNAs in the mouse brain and leptomeninges. *J. Comp. Neurol.* 376:431-446, 1996.
- EVANS, M.C.; MELDRUM, B.S. Regional brain glucose metabolism in chemically-induced seizures in the rat. *Brain Res.* 297:235-245, 1984.
- FAIRMAN, W.A.; VANDEBERG, 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.
- FARRAR, S.J.; WHITING, P.J.; BONNERT, T.P.; MCKERNAN, R.M. Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J. Biol. Chem.*, 274:10100-10104, 1999.

- FERNANDES, M.J.; DUBE, C.; BOYET, S.; MARESCAUX, C.; NEHLIG, A. Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:195-209, 1999.
- FERRENDELLI, J.A.; BLANK, A.C.; GROSS, R.A. Relationships between seizure activity and cyclic nucleotide levels in brain. *Brain Res.* 200:93-103, 1980.
- FIACCO, T.A.; ROSENE, D.L.; GALLER, J.R.; BLATT, G.J. Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. *J. Comp. Neurol.* 456:350-360, 2003.
- FINN, D.A.; GEE, K.W. The estrous cycle, sensitivity to convulsants and the anticonvulsant effect of a neuroactive steroid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271:164-170, 1994.
- FOLBERGROVA, J.; INGVAR, M.; NEVANDER, G.; SIESJO, B.K. Cerebral metabolic changes during and following fluorothyl-induced seizures in ventilated rats. *J. Neurochem.* 44:1419-1426, 1985.
- FONNUM, F. Determination of transmitter amino acid turnover. P. 201-207, in: BOULTON, P.A.; BARKER, G.B.; WOOD, J.D. (eds), *Neuromethods, series I: neurochemistry*, vol. 3: amino acids, Humana, Clifton, 1985.
- FORBES, W.B.; STERN, W.C.; TRACY, C.A.; RESNICK, O.; MORGANE, P.J. Effect of chronic protein malnutrition on experimental induced seizures in the rat. *Exp. Neurol.* 62:475-481, 1978.
- FORMAN, S.D.; SILVA, A.C.; DEDOUSIS, N.; BARBIER, E.L.; FERNSTROM, J.D.; KORETSKY, A.P. Simultaneous glutamate and perfusion fMRI responses to regional brain stimulation. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 10:1064-1070, 1998.
- FRAHM, C.; DRAGUHN, A. GAD and GABA transporter (GAT-1) mRNA expression in the developing rat hippocampus. *Dev. Brain Res.* 132:1-13, 2001.
- FRANCK, G.; SADZOT, B.; SALMON, E.; DEPRESSEUX, J.C.; GRISAR, T.; PETERS, J.M.; GUILLAUME, M.; QUAGLIA, L.; DELFIORE, G.; LAMOTTE, D. Regional cerebral blood flow and metabolic rates in human focal epilepsy and status epilepticus. *Adv. Neurol.* 44:935-958, 1986.
- FRANKFURT, M.; FUCHS, E.; WUTTKE, W. Sex differences in gamma-aminobutyric acid and glutamate concentration in discrete brain nuclei. *Neurosci. Lett.* 50:245-250, 1984.
- FRANKLIN, J.; JOHNSON, E. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevations of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci.* 15:501-508, 1992.
- FRITSCHY, J.-M.; PAYSAN, J.; ENNA, A.; MOHLER, H. Switch in the expression of rat GABAA receptor subtypes during postnatal development: an immunocytochemical study. *J. Neurosci.* 14:5302-5324, 1994.
- FRIZZO, M.E.S.; LARA, D.R.; PROKOPIUK, A.S.; VARGAS, C.R.; SALBEGO, C.R.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22:353-363, 2002.
- FUETA, Y.; AVOLI, M. Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Epilepsy Res.* 12:207-215, 1992.
- FUETA, Y.; VASILETS, L.A.; TAKEDA, K.; KAWAMURA, M.; SCHWARTZ, W. Down-regulation of GABA-transporter function by hippocampal translation product: its possible role in epilepsy. *Neuroscience* 118:371-378, 2003.
- 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.
- GADEA, A.; LOPEZ-COLOME, A. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J. Neurosci. Res.* 63, 461-468, 2001.
- GAJANANA, A.; THENMOZHI, V.; SAMUEL, P.P.; REUBEN, R. A community-based study of subclinical flavivirus infections in children in an area of Tamil Nadu, India, where Japanese encephalitis is endemic. *Bull. World Health Org.* 73:237-244, 1995.
- GALLO, V.; GHIANI, C.A. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:252-258, 2000.
- GANGULY, K.; SCHINDER, A.F.; WONG, S.T.; POO, M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521-532, 2001.

- GASPARY, H.L.; WANG, W.; RICHERSON, G.B. Carrier-mediated GABA release activates GABA receptors on hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 80:270-281, 1998.
- GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* 45:233-238, 1998.
- GIETZEN, D.W.; DIXON, K.D.; TRUONG, B.G.; JONES, A.C.; BARRET, J.A.; WASHBURN, D.S. Indispensable amino acid deficiency and increased seizure susceptibility in rats. *AM. J. Physiol.* 271:R1-R7, 1996.
- GOMEZA, J.; CASADO, M.; GIMENEZ, C.; ARAGON, C. Inhibition of high affinity gamma-aminobutyric acid uptake in primary astrocyte cultures by phorbol esters and phospholipase C. *Biochem. J.* 275:435-439, 1991.
- GORGI, A.; MADEJA, M.; STRAUB, H.; KÖHLING, R.; SPECKMANN, E.-J. Lowering of the potassium concentration induces epileptiform activity in guinea-pig hippocampal slices. *Brain Res.* 908:130-139, 2001.
- GOSLAN, H.; BEM-ARI, Y. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol Sci.* 6(11):368-374, 1995.
- GRESSENS, P.; MUAKU, S.M.; BESSE, L.; NSEGBE, E.; GALLEGU, J.; DELPECH, B.; GAULTIER, C.; EVRARD P.; KETELSLEGERS, J.M.; MAITER, D. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Dev. Brain Res.* 103:21-35, 1997.
- GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A.V. Contribution of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res.* 12:141-149, 1992.
- GROSVENOR, C.E.; PICCIANO, M.F.; BAUMRUCKER, C.R. Hormones and growth factors in milk. *Endocrinol. Rev.* 14:710-728, 1993.
- GUASTELLA, J.; NELSON, N.; NELSON, H.; CZYZYK, L.; KEYNAN, S.; MIEDEL, M.C.; DAVIDSON, N.; LESTER, H.A.; KANNER, B.I. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 259:1303-1306, 1990.
- GURLEY, D.J.; AMIN, P.C.; ROSS, D.S.; WEISS, D.S.; WHITE, G. Point mutations in the M2 region of the alpha, beta, or gamma subunit of the GABA<sub>A</sub> channel that abolish block by picrotoxin. *Recept. Channels* 3:13-20, 1995.
- HABLITZ, J.J.; HEINEMANN, U. Alterations in the microenvironment during spreading depression associated with epileptiform activity in the immature rat neocortex. *Dev. Brain Res.* 46:243-252, 1989.
- HABLITZ, J.J.; HEINEMANN, U. Extracellular K<sup>+</sup> and Ca<sup>+</sup> changes during epileptiform discharges in the immature rat neocortex. *Dev. Brain Res.* 356:299-303, 1987.
- HACKET, R.J.; HACKET, L.; BHAKTA, P. The prevalence and associated factors of epilepsy in children in Calicut District, Kerala, India. *Acta Paediatrica* 86:1257-1260, 1997.
- HACKETT, R.; IYPE, T. Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries. *Seizure* 10, 554-558, 2001.
- HACHIYA, Y.; TAKASHIMA, S. Development of GABAergic neurons and their transport in human temporal cortex. *Pediatr. Neurol.* 25:390-396, 2001.
- HALES, C.N.; BARKER, D.J.P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35:595-601, 1992.
- HALL, A.; KHANH, L.N.; SON, T.H.; DUNG, N.Q.; LANDSDOWN, R.G.; DAR, D.T.; HANH, N.T.; MOESTUE, H.; KHOI, H.H.; BUNDY, D.A. An association between chronic undernutrition and educational test scores in Vietnamese children. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55:801-804, 2001.
- HANFORTH, A.; TREIMAN, D.M. Functional mapping of the late stages of status epilepticus in the lithium-pilocarpine model in rat: a [<sup>14</sup>C]-2-deoxyglucose study. *Neuroscience* 64:1075-1089, 1995.
- HASSEL, B.; SONNEWALD, U. Effects of potassium and glutamine on metabolism of glucose in astrocytes. *Neurochem. Res.* 27:167-171, 2002.
- HASSEL, B.; SONNEWALD, U.; FONNUM F. Glial-neuronal interactions as studied by cerebral metabolism of [2-<sup>13</sup>C]acetate e [1-<sup>13</sup>C]glucose: an ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopy study. *J. Neurochem.* 64:2773-2782, 1995.
- HERNANDEZ-SANCHEZ, C.; BASILE, A .S.; FEDOROVA, I.; ARIMA, H.; STANNARD, B.; FERNANDEZ, A.M.; ITO, Y.; LEROITH, D. Mice transgenically overexpressing sulfonylurea receptor 1 in telencephalo resist seizure induction and excitotoxic neuron death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3549-3554, 2001.



- HERRON, C.E.; WILLIAMSON, R.; COLLINBRIDGE, G.L. A selective *N*-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 61:255-260, 1985.
- HERTZ, L. Drug-induced alterations of ion distribution at cellular levels of the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 29:35-65, 1977.
- HERTZ, L. Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog. Neurobiol.* 13:277-323, 1979.
- HERTZ, L.; PENG, L. Amobarbital inhibits-stimulated glucose oxidation in cerebellar granule neurons by two mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 446:53-61, 2002.
- HEYES, M.P.; WYLER, A.R.; DEVINSKY, O.; YERGEY, J.A.; MARKEY, S.P.; NADI, N.S. Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. *Epilepsia* 31:172-177, 1990.
- HILGEMANN, D.W.; LU, C.C. GAT1(GABA: Na+Cl-) cotransport function: Database reconstruction with an alternative access model. *J. Gen. Physiol.* 114:459-475, 1999.
- HILLMAN, D.E.; CHEN, S. Vulnerability of cerebellar development in malnutrition. I. Quantification of layer volume and neuron numbers. *Neuroscience* 6:1249-1262, 1981.
- HIRAO, T.; MORIMOTO, K.; YAMAMOTO, Y.; WANATABE, T.; SATO, H.; SATO, K.; SATO, S.; YAMADA, N.; TANAKA, K.; SUWAKI, H. Time-dependent and regional expression of GABA transporter mRNAs following amygdala-kindled seizures in rats. *Mol. Brain Res.* 54:49-55, 1998.
- HITZEMANN, R.J.; LOH, H.H. High affinity GABA and glutamate transport in developing nerve ending particles. *Brain Res.* 159:29-40, 1978.
- HOEK, H.W.; BROWN, A.S.; SUSSER, E. The Dutch famine and schizophrenia disorders. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* 33:373-379, 1998.
- HOKOC, J.N.; VENTURA, A.L.; GARDINO, P.F.; DE MELLO, F.G. Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. *Brain Res.* 532:197-202, 1990.
- HORTON, N.; QUICK, M.W. Syntaxin 1A up-regulates GABA transporter expression by subcellular redistribution. *Mol. Membr. Biol.* 18:39-44, 2001.
- HORWITZ, W. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists AOAC*, Washington, DC USA, 1980.
- HUA, Y. H.; HU, J.H.; ZHAO, W.J.; FEI, J.; YU, Y.; ZHOU, X.G.; MEI, Z.T.; GUO, L.H., Overexpression of  $\alpha$ -aminobutyric acid transporter subtype I leads to susceptibility to kainic acid-induced seizures in transgenic mice. *Cell Res.* 11:61-67, 2001.
- HUANG, L-T.; LAI, M-C.; WANG, C-L.; WANG, C-A.; YANG, C-H.; HSIEH, C-S.; LIOU, C-W.; YANG, S-N. Long-term effects of early malnutrition and status epilepticus: assesment by spatial navigation and CREB<sup>Serine-133</sup> phosphorylation. *Dev. Brain Res.* 145:213-218, 2003.
- HUANG, R.; PENG, L.; CHEN, Y.; HAJEK, I.; ZHAO, Z.; HERTZ, L. Signalling effect of elevated potassium concentrations and monoamines on brain energy metabolism at the cellular level. *Dev. Neurosci.* 16:337-351, 1994.
- HUFF, R.A.; VAUGHAN, R.A.; KUBAR, M.J.; UHL, G.R. Phorbol esters increase dopamine transporter phosphorylation and decrease transport Vmax. *J. Neurochem.* 68:225-232, 1997.
- IKEGAKI, N.; SAITO, N.; HASHIMA, M.; TANAKA, C. Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT-1, GAT-2, GAT-3) and their application to immunocytochemistry. *Mol. Brain Res.* 26: 47-54, 1994.
- IM, W.B.; PREGENZER, J.F.; BINDER, J.A.; DILLON, G.H.; ALBERTS, G.L. Chloride channel expression with the tandem construct of  $\alpha$ 6- $\alpha$ 2 GABA<sub>A</sub> receptor subunit requires a monomeric subunit of  $\alpha$ 6 or  $\alpha$ 2. *J. Biol. Chem.* 270:26063-26066, 1995.
- INGVAR, M. Cerebral blood flow and metabolic rate during seizures: Relationship to epileptic brain damage. *Ann. NY Acad. Sci.* 462:194-206, 1986.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus is in connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68:285-316, 1997.

- JAFFE, E.H., FIGUEROA, L., 2001. Glutamate receptor desensitization block potentiates the stimulated GABA release through external  $Ca^{2+}$ -independent mechanisms for granule cells of olfactory bulb. *Neurochem. Res.* 26:1177-1185, 2001.
- JANJUA, N.A.; MORI, A.; HIRAMATSU, M. Gamma-aminobutyric acid uptake is decreased in the hippocampus in a genetic model of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 8:71-74, 1991.
- JAYAKUMAR, A.R.; SUJATHA, R.; PAUL, V.; ASOKAN, C.; GOVINDASAMY, S.; JAYAKUMAR, R. Role of nitric oxide on GABA, glutamic acid, activities of GABA-T and GAD in rat brain cerebral cortex. *Brain Res.* 837:229-235, 1999.
- JEFFERYS, J.G.R.; MITCHELL, P.; O'HARA, L.; TILEY, C.; HARDY, J.; JORDAN, J.; LYNCH, S.J.; WADSWORTH, J. Ex vivo release of GABA from tetanus toxin-induced chronic epileptic foci decreased during the active seizure phase. *Neurochem. Int.* 18:373-379, 1991.
- JIN, H.; WU, H.; OSTERHAUS, G.; WEI, J.; DAVIS, K.; SHA, D.; FLOOR, E.; HSU, C-C.; KOPKE, R.D.; WU, J-Y. Demonstration of functional coupling between  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100:4293-4298, 2003.
- JÜPTNER, M.; HIEMKE, C. Sex difference in GABA receptor binding in rat brain measured by an improved in vitro binding assay. *Exp. Brain Res.* 81:297-302, 1990.
- JURSKY, F.; TAMURA, S.; TAMURA, A.; MANDIYAN, S.; NELSON, H.; NELSON, N. Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J. Exp. Biol.* 196:283-295, 1994.
- KADEKARO, M.; CRANE, A. M.; SOKOLLOF, L. Differential effects of electrical stimulation of sciatic nerve on metabolic activity in spinal cord and dorsal root ganglion in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4179-4183, 1983
- KANAANI, J.; LISSIN, D.; KASH, S.F.; BAEKKEKOV, S. The hydrophilic isoform of glutamate decarboxylase, GAD67, is targeted to membranes and nerve terminals independent of dimerization with the hydrophobic membrane-anchored isoform, GAD65. *J. Biol. Chem.* 274:37200-37209, 1999.
- KANAI, Y.; HEDIGER, M.A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471, 1992.
- KANG, T.C.; KIM, H.S.; SEO, M.O.; PARK, S.K.; KWON, H.Y.; KANG, J.H.; WON, M.H. The changes in the expressions of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in the gerbil hippocampal complex following spontaneous seizure. *Neurosci. Lett.* 310:29-32, 2001.
- KAVANAUGH, M.P.; ARRIZA, J.L.; NORTH, R.A.; AMARA, S.G. Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expression in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267:2207-2209, 1992.
- KEHOE, P.; MALLINSON, K.; BRONZINO, J.; MCCORMICK, C.M. Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Dev. Brain Res.* 132:23-31, 2001.
- KHURGEL, M.; IVY, G.O. Astrocytes in kindling: relevance in epileptogenesis. *Epilepsy Res.* 26:163-175, 1996.
- KIETZMANN, T.; KNABE, W.; SCHMIDT-KASTNER, R. Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 251:170-178, 2001.
- KISELEVSKI, Y.; ORGANESIA, N.; ZIMATKIN, S.; SZUTOWICZ, A.; ANGILEVSKI, S.; NIEZABIOWSKI, P.; URCZ W.; GRYLEWSKI, R.J. Acetate metabolism in brain mechanisms of adaptation to ethanol. *Med. Sci. Monit.* 9:178-182, 2003.
- KOKKA, N.; SAPP, D.W.; WITTE, U.; OLSEN, R.W. Sex differences in sensitivity to pentylenetetrazol but not in GABA receptor binding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:441-447, 1992.
- KOLDOVSKY, O.; THOMBURG, W. Hormones in milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 6:172-196, 1987.
- KONDZIELLA, D.; LUEDEMAN, W.; BRINKER, T.; SLETVOLD, O.; SONNEWALD, U. Alterations in brain metabolism, CNS morphology and CSF dynamics in adult rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res.* 927:35-41, 2002.
- KORPI, E.R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. *Progr. Neurobiol.* 67:113-159, 2002.

- KRALIC, J.E.; KORPI, E.R.; O'BUCLEY, T.K.; HOMANICS, G.E.; MORROW, A.L. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:1037-1045, 2002.
- KULLMANN, P.H.; ENE, F.A.; KANDLER, K. Glycinergic and GABAergic calcium responses in the developing lateral superior olive. *Eur. J. Neurosci.* 15:1093-1104, 2002.
- LA MANTIA, A.S. The usual aspects: GABA and glutamate may regulate proliferation in the neocortex. *Neuron* 15:1223-1225, 1995.
- LARA, D.R.; SCHMIDT, A .P.; FRIZZO, M.E.; BURGOS, J.S.; RAMIREZ, G.; SOUZA, D.O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.* 912, 176-180, 2001.
- LAURIE, D.J.; WISDEN, W.; SEEBURG, P.H. The distribution of thirteen GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNA in the rat brain: III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* 12:4151-4172, 1992.
- LAW, R.M.; STAFFORD, A.; QUICK, M.W. Functional regulation of gamma-aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275: 23986-23991, 2000.
- LEACH, J.P.; BRODIE, M.J. Tiagabine. *Lancet* 351:203-207, 1998.
- 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.
- LEHRE, K.P.; LEVY, L.M.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J.; DANBOLT, N. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15:1835-1853, 1995.
- LEINKUGEL, X.; KHALILOV, L.; MCLEAN, H.; CAILLARD, O.; GAIARSA, J.L.; BEN-ARI, Y.; KHAZIPOV, R. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv. Neurol.* 79:189-201, 1999.
- LESTER, H.A.; CAO, Y., MAGER, S. Listening to neurotransmitter transporters. *Neuron* 17:807-810, 1996.
- LEVITSKY, D.A.; STRUPP, B.J. Malnutrition and the brain: Changing concepts, changing concerns. *J. Nutr.* 125:2212S-2220S, 1995.
- LEVY, L.M.; LEHRE, K.P.; WALAAS, S.L.; STORM-MATHISEN, J.; DANBOLT, N.C. Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7:2036-2041, 1995.
- LEWIS, D.A.; PIERRI, J.N.; VOLK, D.W.; MELCHITZKY, D.S.; WOO, T.U. Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 46:616-626, 1999.
- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *New Eng. J. Med.* 330:613-622, 1994.
- LIU, Q.R.; LOPÉZ-CORCUERA, B.; MANDIYAN, S.; NELSON, H.; NELSON, N. Molecular characterization of four pharmacologically distinct  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 268: 2106-2112, 1993.
- LIU, Q.R.; LOPÉZ-CORCUERA, B.; NELSON, H.; MANDIYAN, S.; NELSON, N. Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and  $\beta$ -alanine in mouse brain. *Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.* 89:12145-12149, 1992.
- LOO, D.D.F.; ESKANDARI, S.; BOORER, K.J.; SARKAR, H.K.; WRTIGHT, E.M. Role of Cl<sup>-</sup> in electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J. Biol. Chem.* 275: 37414-37422, 2000.
- LÓPEZ-CORCUERA, B.; LIU, Q.R.; MANDIYAN, S.; NELSON, H.; NELSON, N. Expression of a mouse brain cDNA encoding novel  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter. *J. Biol. Chem.* 267, 17491-17493, 1992.
- LÖSCHER, W. New viisons in the pharmacology of anticonvulsion. *Eur. J. Pharmacol.* 342:1-13, 1998.
- LOW, K.; CRESTANI, F.; KEIST, R.; BENKE, D.; BRUNIG, I.; BENSON, J.A.; FRITSCHY, J.M.; RULICKE, T.; BLUETHMANN, H.; MOHLER, H.; RUDOLPH, U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290:131-134, 2000.
- LOWRY, H.O.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.

- LUEBKE, J., ST. JOHN, J., GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition results in increased frequency of miniature inhibitory synaptic currents in rat CA1 pyramidal cells. *Synapse* 37: 23-31, 2000.
- LUER, M.S.; RHONEY, D.H. Tiagabine: a novel antiepileptic drug. *Ann. Pharmacother.* 32:1173-1180, 1998.
- MABJEESH, N.J.; KANNER, B.I. Neither amino nor carboxyl termini are required for function of the sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J Biol. Chem.* 267:2563-2568, 1992.
- MACDONALD, R.; OLSEN, R.W. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:569-602, 1994.
- MAGER, S.; KLEINBERGER-DORON, N.; KESHET, G.I.; DAVIDSON, N.; KANNER, B.I.; LESTER, H.A. Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1. *J. Neurosci.* 16:5405-5414, 1996.
- MAGER, S.; NAEVE, J.; QUICK, M.W.; LABAREA, C.; DAVIDSON, N.; LESTER, H.A. Steady states, charge movements and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 10:177-188, 1993.
- MAGGI, A.; PEREZ, J. Role of female gonadal hormones in the CNS: Clinical and experimental aspects. *Life Sci.* 37:893-906, 1985.
- MAGISTRETTI, P.J.; PELERIN, L.; ROTHMANN, D.; SCHULMAN, R.G. Energy on demand. *Science* 283:496-497, 1999.
- MANEV, H.; PERICIC, D. Sex difference in the turnover of GABA in the rat substantia nigra. *J. Neural Transm.* 70:321-328, 1987.
- MANEV, H.; PERICIC, D.; ANIC-STOJILJKOVIC, S. Sex differences in the sensitivity of CBA mice to convulsions induced by GABA antagonists are age-dependent. *Psychopharmacology*, 91:226-229, 1987.
- 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. Dis.* 15:461-473, 2004.
- MARIC, D.; MARIC, I.; MA, W.; LAHOJUJI, F.; SOMOGYI, R.; WEN, X.; SIEGHART, W.; FRITSCHY, J.-M.; BARKER, J.L. Anatomical gradients in proliferation and differentiation of embryonic rat CNS accessed by buoyant density fractionation:  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  and  $\gamma 2$  GABA<sub>A</sub> receptor subunit coexpression by post-mitotic neocortical neurons correlates directly with cell buoyancy. *Eur. J. Neurosci.* 9:507-522, 1997.
- MARSHALL, F.H.; JONES, K.A.; KAUPMANN, K.; BETTLER, B. GABA<sub>B</sub> receptors – the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:396-399, 1999.
- MARTIN, D.C.; PLAGENHOEF, M.; ABRAHAM, J.; DENNISON, R.L.; ARONSTAM, R.S. Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem. Pharmacol.* 49:809-817, 1995.
- MARTY, S.; BERNINGER, B.; CAROLL, P.; THOENEN, H. GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* 16:565-570, 1996.
- MASON, C.R.; COOPER, R.M. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain damaged rats, with repeated small dose of pentylenetetrazol. *Epilepsia* 3:663-674, 1972.
- MATAGA, N.; NAGAI, N.; HENSH, T.K. Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7717-7721, 2002.
- MATHERN, G.W.; MENDOZA, D.; LOZADA, A.; PRETORIUS, J.K.; DEHNES, Y.; DANBOLT, N.C.; NELSON, N.; LEITE, J.P.; CHIMELLI, L.; BORN, D.E.; SAKAMOTO, A.C.; ASSIRATI, J.A.; FRIED, I.; PEACOCK, W.J.; OJEMANN, G. A.; ADELSON, P.D. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 52:453-472, 1999.
- MATSKEVITCH, I.; WAGNER, C.A.; STEGEN, C.; BROER, S.; NOLL, B.; RISLER, T.; KWON, H.M.; HANDLER, J.S.; WALDEGGER, S.; BUSCH, A. E.; LANG, F. Functional characterization of the betaine/gamma-aminobutyric acid transporter BGT-1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 274:16709-16716, 1999.
- MATTIA, D.; NAGAO, T.; ROGAWSKI, M.A.; AVOLI, M. Potassium channel activators counteract anoxic hyperexcitability but not 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology* 33:1515-1522, 1994.
- MATTSON, M.P.; KATER, S.B. Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J. Neurosci.* 7:4034-4043, 1987.

- MATTSON, M.P.; KATER, S.B. Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *Brain Res.* 478:337-348, 1989.
- MAUS, M.; GLOWINSKI, J.; PREMONT, J. GABA is toxic for mouse striatal neurons through a transporter-mediated process. *J Neurochem.* 82:763-773, 2002.
- MAZARATI, A.M.; HALASKI, E.; TELEGDY, G.; TOTH, G.; VARGA, J. ANP(1-28), BNP(1-32) and CNP(1-22) increase the severity of picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Life Sciences* 52:19-24, 1993.
- McDONALD, J.W.; JOHNSTON, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15:41-70, 1990.
- McDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:569-602, 1994.
- McDOUGAL Jr D.B.; COWSETE, B.R.; PUSATERI, M.E.; CARTER, J.G.; MANCHESTER, J.K.; CHI, M-Y.M.; LOWRY, O.H. Glutamate and potassium stimulation of hippocampal slices metabolizing glucose or glucose and pyruvate. *Brain Res.* 755:304-312, 1997.
- McINTIRE, S.L.; JORGENSEN, E.; KAPLAN, J.; HORVITZ, H.R. Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature (Lond)* 364:337-341, 1993.
- McINTIRE, S.L.; REIMER, R.J.; SCHUSKE, K.; EDWARDS, R.H.; JORGENSEN, E.M. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870-876, 1997.
- McKERNAN, R.M.; ROSAHI, T.W.; REYNOLDS, D.S.; SUR, C.; WAFFORD, K.A.; ATACK, J.R.; FARRAR, S.; MYERS, J.; COOK, G.; FERRIS, P.; GARRET, L.; BRISTOW, L.; MARSHALL, G.; MACAULAY, A.; BROWN, N.; HOWELL, O.; MOORE, K.W.; CARLING, R.W.; STREET, L.J.; CASTRO, J.L.; RAGAN, C.I.; DAWSON, G.R.; WHITING, P.J. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nature Neurosci.* 3:587-592, 2000.
- McLARNON, J.G.; CURRY, K. Quinoleate activation of N-methyl-aspartate ion channels in rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 116:341-346, 1990.
- McNAUGHT, K.S.P.; BROWN, G.C. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosome. *J. Neurochem.* 70:1541-1546, 1998.
- McNeil, N.I. The contribution of large intestine to energy supplies in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 39:338-342, 1984.
- MELDRUM, B.S.; CHAPMAN, A. G. Basic mechanisms of gabitril (tiagabine) and future potential developments. *Epilepsia* 40(Suppl. 9):S2-S6, 1999.
- MELDRUM, B.S. Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives. *Prog. Brain Res.* 135:3-11, 2002.
- MELDRUM, B.S. Epilepsy and  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int. Rev. Neurobiol.* 17:1-36, 1975.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130:1007S-1015S, 2000.
- MELDRUM, B.S. Metabolic factors during prolonged seizures and their relation to nerve cell death. *Adv. Neurol.* 34:261-275, 1983.
- MELDRUM, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44:S14-S23, 1994.
- MELDRUM, B.S.; AKBAR, M.T.; CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 36:189-204, 1999.
- MELONE, M.; COZZI, A.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; CONTI, F. Transient focal ischemia triggers neuronal expression of GAT-3 in the rat perilesional cortex. *Neurobiol. Dis.* 14:120-132, 2003.
- MICHLER, A. Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8:463-472, 1990.
- MINELLI, A.; ALONSO-NANCLARES, L.; EDWARDS, R.H.; DEFELIPE, J.; CONTI, F. Postnatal development of the GABA vesicular transporter VGAT in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 111:337-346, 2003b.
- MINELLI, A.; BARBARESI, P.; CONTI, F. Postnatal development of high-affinity plasma membrane transporters GAT2 and GAT3 in the rat cerebral cortex. *Dev. Brain Res.* 142, 7-18, 2003a.

- MINELLI, A.; BRECHA, N.C.; KARSCHIN C.; DEBIASI, S.; CONTI, F. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 15:7734-7746, 1995.
- MINELLI, A.; DE BIASI, S.; BRECHA, N.C.; ZUCARELLO,V.; CONTI, F. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 16:6255-6264, 1996.
- MODDEL, G.; GORJI, A.; SPECKMANN, E.-J. Background potassium concentrations and epileptiform discharges 1. Electrophysiological characteristics of neuronal activity. *Brain Res.* 959:135-148, 2003.
- MODY, I.; MACDONALD, J.F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Trends Pharmacol. Sci.* 16:356-359, 1995.
- MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; MEDEIROS DE SOUZA, A.L. POPKIN, B.M. The nutrition transition in Brazil. *Eur. J. Cl. Nutr.* 49:105-113. 2000.
- MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estudos Avançados – USP* 17(48):7-20, 2003.
- MORGANE, J.P.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26:471-483, 2002.
- MORGANE, P.J., AUSTIN-LAFRANCE, R., BRONZINO, J. TONKISS, J., DIAZ-CINTRA, S., CINTRA, L., KEMPNER, T., GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17:91-128, 1993.
- MOTT, D.D.; BRAGDON, A. C.; LEWIS, D.V.; WILSON, W.A. Baclofen has a proepileptic effect in the rat dentate gyrus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249:721-725, 1989.
- MOULARD, B.; PICARD, F.; HELLARD, S.; AGULHON, C.; WEILAND, S.; FAVRE, I.; BERTRAND, S.; MALAFOSSE, A.; BERTRAND, D. Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36:275-284, 2001.
- MÜLLER, B.; QU, H.; GARSETH, M.; WHITE, L.R.; AASLY, J.; SONNEWALD, U. Amino acid neurotransmitter metabolism in neurons and glia following kainate injections in rats. *Neurosci. Lett.* 279:169-172, 2000.
- NAITO, S.; UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44:99-109, 1985.
- NAKANO, K.; TAKAHASHI, S.; MIZOBUCHI, M.; KURODA, T.; MASUDA, K.; KITO, J. High levels of quinolinic acid in brain of epilepsy-prone E1 mice. *Brain Res.* 619:195-198, 1993.
- NAYAK, P.; CHATTERJEE, A.K. Dietary protein restriction causes modification in aluminium-induced alteration in glutamate and GABA system of rat brain. *BMC Neurosci.* 4:4, 2003.
- NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A., J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:748-755, 2002.
- NEEL, J.V. Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by progress. *Am. J. Hum. Genet.* 14:353-362, 1962.
- NELSON, H.; MANDIYAN, S.; NELSON, N. Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett.* 269:181-184, 1990.
- NELSON, M.T.; BLAUSTEIN, M.P. GABA efflux from synaptosomes: effects of membrane potential, external GABA and cations. *J. Membr. Biol.* 69:213-223, 1982.
- NEWLAND, C.F.; CULL-CANDY, S.G. On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurons of the rat. *J. Physiol.* 447, 191-213, 1992.
- NGUYEN, L.; MALGRANGE, B.; BREUSKIN, I.; BETTENDORF, L.; MOONEN, G.; BELACHEW, S.; RIGO, J.M. Autocrine/paracrine activation of the GABA<sub>A</sub> receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cell from postnatal striatum. *J. Neurosci.* 23:3278-3294, 2003.
- NICHOLLS, D.G.; ATWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Neurosci.* 21:53-58, 1990.

- NISHADI, R.; KATSUYOSHI, S.; BELA, K.; JAMES, S.; ZSOMBOR, L.; DAVID, B. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels prevents neuronal cell death after ischemia in neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 327:208-212, 2002.
- NISHIDA, C.; UAUY, R.; KUMANYIKA, S.; SHETTY, P. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutrition* 7(1A):245-250, 2004.
- NORENBERG, M.D.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161:303-290, 1979.
- NORENBERG, M.D.; VASTAG, M.; ZHOU, B.-G. GABA Transporters in cultured rat astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 74(Suppl.):S80, 2000.
- NUNES, M.L.; BATISTA, B.B.; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *Jornal de Pediatria* 78:39-44, 2002.
- OBRENOVITCH, T.P.; URENJAK, J.; ZILKHA, E.; JAY, T.M. Excitotoxicity in neurological disorders—the glutamate paradox. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18:281-287, 2000.
- OBRIETAN, K.; VAN DEN POL, A.N. Growth cone calcium elevation by GABA. *J. Comp. Neurol.* 372:167-175, 1996.
- O'NEAL, R.M.; KOEPPE, R.E. Precursors in vivo of glutamate, aspartate and their derivatives of rat brain. *J. Neurochem.* 13:835-847, 1966.
- OROZCO-SUAREZ, S.; BRUNSON, K.L.; FERIA-VELASCO, A.; RIBAK, C.E. Increased expression of gamma-aminobutyric acid transporter-1 in the telencéfalo of infant rats with corticotropin-releasing hormone-induced seizures but not in those with hyperthermia-induced seizures. *Epilepsy Res.* 42:141-157, 2000.
- ORREGO, H.; CARMICHAEL F.J.; ISRAEL, Y. New insights on the mechanisms of the alcohol-induced increase in portal blood flow. *Can. J. Physiol.* 66:1-9, 1988.
- OWENS, D.F.; BOYCE, L.H.; DAVIS, M.B.; KRIEGSTEIN, A.R. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J. Neurosci.* 16:6414-6423, 1996.
- OWENS, D.F.; KRIEGSTEIN, A.R. Developmental neurotransmitters? *Neuron* 36:989-991, 2002b.
- OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A.R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3:715-727, 2002a.
- OWENS, D.F.; LIU, X.; KRIEGSTEIN, A.R. Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signalling during early neocortical development. *J. Neurophysiol.* 82:570-583, 1999.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54:581-618, 1998.
- OSAWA, L.; SAITO, N.; KOGA, T.; TANAKA, C. Phorbol ester-induced inhibition of GABA uptake by synaptosomes and by *Xenopus* oocytes expressing GABA transporter (GAT-1). *Neurosci. Res.* 19:287-293, 1994.
- PAL, D.K.; CARPIO, A.; SANDER, J.W. Neurocysticercosis in developing countries. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 68:137:143, 2000.
- PALENCIA, G.; CALVILLO, M.; SOTELO, J. Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Epilepsia* 37:583-6, 1996.
- PALMER, A.A.; PRINTZ, D.J.; BUTLER, P.D.; DULAWZ, S.C.; PRINTZ, M.P. Prenatal protein deprivation in rats induces changes in prepulse inhibition and NMDA receptor binding. *Brain Res.* 996:193-201, 2004.
- PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr. Res.* 20:1603-1612, 2000.
- PATRYLO, P.R.; SPENCER, D.D.; WILLIAMSON, A. GABA uptake and heterotransport are impaired in the dentate gyrus of epileptic rats and humans with temporal lobe sclerosis. *J. Neurophys.* 85:1533-1542, 2001.
- PEDLEY, T.A.; FISHER, R.S.; FUTAMACHI, K.J.; PRINCE, D.A. Regulation of extracellular potassium concentration in epileptogenesis. *Fed. Proc.* 35:1254-1259, 1976.

- PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. Food for thought: challenging the dogmas. *Cerebr. Blood Flow Metab.* 28:1282-1286, 2003.
- PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10625-10629, 1994.
- PENG, L.; BERNHARD, H.J.J.; HERTZ, L. Pharmacological and developmental evidence that the potassium-induced stimulation of deoxyglucose uptake in astrocytes is a metabolic manifestation of increased Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Dev. Neurosci.* 18:353-359, 1996.
- PEREZ, J.; ZUCCHI, I.; MAGGI, A. Sexual dimorphism in the response of the GABAergic system to estrogen administration. *J. Neurochem.* 47:1798-1803, 1986.
- PERICIC, D.; BUJAS, M. Sex differences in the response to GABA antagonists depend on the route of drug administration. *Exp. Brain Res.* 115:1897-190, 1997.
- PERICIC D.; MANEV, H.; BUJAS, M. Gonadal hormones and picrotoxin-induced convulsions in male and female rats. *Brain Res.* 736, 174-179, 1996.
- PERICIC, D.; MANEV, H.; GEBER, J. Sex related differences in the response of mice, rats and cats to administration of picrotoxin. *Life Sciences* 38:905-913, 1986.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-356, 1977.
- PETRY, C.J.; OZANNE, S.E.; HALES, C.N. Programming of intermediary metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 185:81-91, 2001.
- PIGGOT, M.A.; PERRY, E.K.; SAHGAL, A.; PERY, R.H. Examination of parameters influencing [<sup>3</sup>H]MK-801 binding in postmortem human cortex. *J. Neurochem.* 58:1001-1008, 1992.
- PINE, A.P.; JESSOP, N.S.; OLDHAM, J.D. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 3. The effects of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. *Br. J. Nutr.* 72(6):815-830, 1994.
- PINES, G.; DANBOLT, N.C.; BJORAS, M.; ZHANG, Y.; BENDAHAN, A.; EIDE, L.; KOEPESELL, H.; STORM-MATHISEN, J.; SEEBERG, E.; KANNER, B.L. Cloning and expression of rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-467, 1992.
- PNAN, MS, 2<sup>a</sup>. ed.:Série B. Textos Básicos de Saúde, Brasília:2003.
- POPKIN, B.M. The Nutrition Transition in Low Income Countries: an Emerging Crisis. Presented at the Diet and Chronic Diseases in Countries in Socio-economic Transition Experimental Biology Conference, April 24-28, Anaheim, CA, 1994.
- POPKIN, B.M.; KEYOU, G.; ZHAI, F.; GUO, X.; MA, H.; ZOHOORI, N. The nutrition transition in China: a cross sectional analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47:333-46, 1993.
- POULTER, M.O.; BARKER, J.L.; O'CARROL, A.-M.; LOLAIT, S.J.; MAHAN, L.C. Differential and transient expression of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ -subunit mRNAs in the developing rat CNS. *J. Neurosci.* 12:2888-2900, 1992.
- POULTER, M.O.; BARKER, J.L.; O'CARROL, A.-M.; LOLAIT, S.J.; MAHAN, L.C. Co-existent expression of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 2 subunit messenger RNAs during embryogenesis and early postnatal development of the rat central nervous system. *Neuroscience* 53:1019-1033, 1993.
- PRESSMAN, B.C.; FAHIM, M. Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22:465-490, 1982.
- PRICE, L.P. New order from neurological disorders. *Nature* 399:A3-A5, 1999.
- PSARROPOULOU, C.; KOSTOPOULOS, G. Comparison of the effects of increased potassium and of adenosine on hippocampal neurons from normal and genetically epileptic tg/tg mice. *Epilepsia* 34:24-32, 1993.
- QU, H.; ELOQAYLI, H.; MÜLLER, B.; AASLY, J.; SONNEWALD, U. Glial-neuronal interactions following kainate injections in rats. *Neurochem. Int.* 42:101-106, 2003.
- QU, H.; HÄBERG, A.; HARALDSETH, O.; UNSGÄRD, G.; SONNEWALD, U. <sup>13</sup>C MR spectroscopy study of lactate as substrate for rat brain. *Dev. Neurosci.*, 22:429-436, 2000.



- QUICK, M.W.; HU, J.; WANG, D.; ZHANG, H.Y. Regulation of a  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter by reciprocal tyrosine and serine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:15961-15967, 2004.
- RAJASEKARAN, K.; JAYAKUMAR, R.; VENKATACHALAM, K. Increased neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity triggers picrotoxin-induced seizures in rats and evidence for participation of nNOS mechanism in the action of antiepileptic drugs. *Brain Res.* 979 : 85-97, 2003.
- RADIAN, R.; OTTERSEN, G.P.; STORM-MATHISEN, J.; CASTEL, M.; KANNER, B.I. Immunocytochemical localization of the GABA transporters in at brain. *Neurosci.* 10:1319-1330, 1990.
- RAMAMOORTHY, S.; GIOVANETTI, E.; QIAN, Y.; BLAKELY, R.D. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J. Biol. Chem.* 273:2458-2466, 1998.
- REDBURN, D.A.; BROOME, D.; FERKANY, J.; ENNA, S.J. Development of rat brain uptake and calcium-dependent release of GABA. *Brain Res.* 152:511-519, 1978.
- RIBAK, C.E.; TONG, W.M.; BRECHA, N.C. Astrocytic processes compensate for the apparent lack of GABA transporters in the axon terminals of cerebellar Purkinje cells. *Anat. Embryol.* 193:379-390, 1996b.
- RIBAK, C.E.; TONG, W.M.; BRECHA, N.C. GABA plasma membrane transporters, GAT-1 and GAT-3, display different distributions in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 367:595-60, 1996a.
- RICHERSON, G.B.; WU, Y. Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J. Neurophysiol.* 90:1363-1374, 2003.
- RIOUX, L.; NISSANOV, J.; LAUBER, K.; BILKER, W.B.; ARNOLD, S.E. Distribution of microtubule-associated protein MAP2-immunoreactive interstitial neurons in the parahippocampal white matter in subjects with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 160:149-155, 2003..
- RITTER, B.; ZHANG, W. Early postnatal maturation of GABA-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse. *Eur. J. Neurosci.* 12:2975-2984, 2000.
- ROBELLO, M.; AMICO, C.; BUCOSSO, G.; CUPELLO, A.; RAPALLINO, M.V.; MELLUNG, S. Nitric oxide and GABA<sub>A</sub> receptor function in the rat cerebral cortex and cerebellar granule cells. *Neuroscience* 74:99-105, 1996.
- ROTHSTEIN, J.D.; DYKES-HOBERG, M.; PARDO, C.A.; BRISTOL, L.A.; JIN, L.; KUNCL, R.W.; KANAI, Y.; HEDIGER, M.A.; WANG, Y.; SCHIELKE, J.P.; WELTY, D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686, 1996.
- ROTHSTEIN, J.D.; MARTIN, L.; LEVEY, A. I.; DYKES-HOBERG, M.; JIN, L.; WU, D.; NASH, N.; KUNCI, R.W. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725, 1994.
- ROTTA, L.N. Efeitos da má nutrição protéica sobre parâmetros glutamatérgicos em SNC de ratos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003b.
- ROTTA, L.N.; SCHMIDT, A.P.; MELLO E SOUZA, T.; NOGUEIRA, C.W.; SOUZA, K.B.; IZQUIERDO, I.A.; PERRY, M.L.S.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem. Res.* 28:1181-1186, 2003a.
- ROUGEMONT, M.; DO, K.Q.; CASTAGNE, V. New model of glutathione deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 70:774-783, 2002.
- SAGNÉ, C.; EL MESTIKAWI, S.; ISAMBERT, M.F.; HAMON, M.; HENRY, J.P.; GIROS, B.; GASNIER, B. Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome database. *FEBS Lett.* 417:177-183, 1997.
- SARANSAARI, P.; OJA, S.S. Characteristics of GABA release modified by glutamate receptors in mouse hippocampal slices. *Neurochem. Intern.* 43, 453-459, 2003.
- SARUP, A.; LARSSON, O.M.; BOLVIG, T.; FROLUND, B.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; SCHOUSBOE, A. Effects of 3-hydroxy-4-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,2-benzisoxazol (*exo*-THPO) and its *N*-substituted analogs on GABA transport in cultured neurons and astrocytes and by four cloned mouse GABA transporters. *Neurochem. Int.* 43:445-451, 2003a.
- SARUP, A.; LARSSON, O.M.; SCHOUSBOE, A. GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. *Curr. Drug. Targets- CNS, Neurological Disord.* 2:269-277, 2003b.
- SATO, K.; BETZ, H.; SCHLOSS, P. The recombinant GABA transporter GAT1 is downregulated upon activation of protein kinase C. *FEBS Lett.* 375:99-102,1995.

- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 7(8):389-400, 1993.
- SCHAUMAN, B.A. Family history of seizures in post-traumatic and alcohol associated seizure disorders. *Epilepsia* 35:48-52, 1994.
- SCHMIDT, A.P.; LARA, D.R.; MARASCHIN, J. F.; PERLA, A.S.; SOUZA, D.O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864, 40-43, 2000.
- SCHMIEDEN V.; GRENNINGLOH, G.; SCHOFIELD, P.R.; BETZ, H. Functional expression in *Xenopus* oocytes of the strychnine binding 48 kd subunit of the glycine receptor. *EMBO J.* 8:695-700, 1989.
- SCHOUSBOE, A. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Res.* 28:347-352, 2003.
- SCHOUSBOE, A.; LARSSON, O.M.; WOOD J.D.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Transport and metabolism of GABA in neurons and glia: implications for epilepsy. *Epilepsia* 24:531-538, 1983.
- SCHOUSBOE, A.; SARUP, A.; BAK, L.K.; WAAGEPETERSEN H.S.; LARSSON, O.M. 2004. Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Int.* 45:521-527, 2004.
- SCHOUSBOE, A.; WESTERGAARD, N.; WAAGEPETERSEN H.S.; LARSSON, O.M.; BAKKEN, I.J.; SONNEWALD U. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21:99-105, 1997.
- SCHULTZ, P.L.; TONKISS, J.; MORGANE, P.J.; BRONZINO, J.D.; GALLER, J.R. Effects of an every other day rapid kindling procedure in prenatally protein malnourished rats. *Brain Res.* 682: 35-40, 1995.
- SCHWARTZ-GIBLIN, S.; KOROTZER, A.; PFAFF, D.W. Steroid hormone effects on picrotoxin-induced seizures in female and male rats. *Brain Res.* 476:240-247, 1989.
- SCHWARTZWELDER, H.S.; BRAGDON, A. C.; SUTCH, C.P.; AULT, B.; WILSON, W.A. Baclofen suppresses hippocampal epileptiform activity at low concentrations without suppressing synaptic transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237:881-887, 1986.
- SCORZA, F.A.; ARIDA, R.M.; PRIEL, M.R.; CALDERAZZO, L.; CAVALHEIRO, E.A. Glucose utilization during status epilepticus in an epilepsy model induced by pilocarpine. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60 (2-A):198-203, 2002.
- SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A.; MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* 122:1-29, 2001.
- SEILER, N. On the role of GABA in vertebrate polyamine metabolism. *Physiol. Chem. Phys.* 12:411-429, 1980.
- SEMYANOV, A.; KULLMANN, D.M. Relative picrotoxin insensitivity distinguishes ionotropic GABA receptor-mediated IPSCs in hippocampal interneurons. *Neuropharmacology* 43:726-736, 2002.
- SERNAGOR, E.; YOUNG, C.; EYLEN, S.J. Developmental modulation of retinal wave dynamics: shedding light on the GABA saga. *J. Neurosci.* 23:7621-7629, 2003.
- SHAMBAUGH, G.E.; LEE, R.J.; WATANABE, G.; ERFURTH, F.; KARNEZIS, A. N.; KOCH, A.E.; HAINES, G.K.; HALLORAM, M.; BRODY, B.A.; PESTELL, R.G. Reduced cyclin D1 expression in the cerebella of nutrition-deprived rats correlates with development delay and decreased cellular synthesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55:1009-1020, 1996.
- SHANDRA, A.A.; MAZARATI, A.M.; GODLEVSKY, L.S.; VASTYANOV, R.S. Chemical kindling: implications for antiepileptic drugs-sensitive and resistant epilepsy models. *Epilepsia* 37:269-274, 1996.
- SHEIKH, S.N.; MARTIN, D.I. Heteromers of glutamate decarboxylase isoforms occur in rat cerebellum. *J. Neurochem.* 66:2082-2090, 1996.
- SHINGAI, R. Durations and frequencies of free locomotion in wild type and GABAergic mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Res.* 38:71-83, 2000.
- SIEGEL, F.; BAUR, R.; TRUBE, G.; MOLER, H.; MALHERBE, P. The effect of subunit composition of rat brain GABA<sub>A</sub> receptors on channel function. *Neuron* 5 : 703-711, 1990.
- SIERRA-PAREDES, G.; GALÁN-VALIENTE, J.; VASQUEZ-ILLANES, M.D.; AGUILLAR-VEIGA, E.; SOTO-OTERO, R.; MENDEZ-ALVAREZ, E.; SIERRA-MARCUÑO, G. Extracellular amino acids in the rat hippocampus during picrotoxin threshold seizures in chronic microdialysis experiments. *Neurosci. Lett.* 248:53-56, 1998.

- SIERRA-PAREDES, G.; GALAN-VALIENTE, J.; VAZQUEZ-ILLANES, M.D.; AGUILAR-VEIGA, E.; SIERRA-MARCUNO, G. Effect of ionotropic glutamate receptors antagonists on the modification in extracellular glutamate and aspartate levels during picrotoxin seizures: a microdialysis study in freely moving rats. *Neurochem. Int.* 37:377-386, 2000.
- SILVA, A.V.; SANABRIA, E.R.; CAVALHEIRO, E.A.; SPREAFICO, R. Alterations of the neocortical GABAergic system in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: neuronal damage and immunocytochemical changes in chronic epileptic rats. *Brain Res. Bull.* 58:417-421, 2002.
- SILVIOLOTTI, L.; NISTRÌ, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36:35-92, 1991.
- SOGHOMONIAN, J.-J.; MARTIN, D.L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol. Sci.* 19:500-505, 1998.
- SOKOLOFF, L. Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1:7-36, 1981.
- SOKOLOFF, L. Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the central nervous system. *Dev. Neurosci.* 15:194-206, 1993.
- SOKOLOFF, L.; REIVICH, M.; KENNEDY, C.; DES ROSIERS, M.H.; PATLAK, C.S.; PETTIGREW, K.D.; SAKURADA, O.; SHINOHARA, M. The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 28:897-916, 1977.
- SOKOLOFF, L.; TAKAHASHI, S.; GOTOH, J.; DRISCOLL, B.F.; LAW, M.J. Contribution of astroglia to functionally activated energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 18:343-352, 1996.
- SOMJEN, G.G. Electrophysiology of neuroglia. *Ann. Rev. Physiol.* 37:163-190, 1975.
- SOMJEN, G.G. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 41:159-177, 1979.
- SOMOGYI, R.; WEN, X.; MA, W.; BARKER, J.L. Developmental kinetics of GAD family mRNAs parallel neurogenesis in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 15:2575-2591, 1995.
- SONNEWALD, U.; KONDZIELLA, D. Neuronal glial interaction in different neurological diseases studied by ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 16:424-429, 2003.
- SONNEWALD, U.; WESTERGAARD, N.; KRANE, J.; UNSGÅRD, G.; PETERSEN, S.B.; SCHOUSBOE, A. First direct demonstration of preferential release of citrate from astrocytes using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of cultured neurons and astrocytes. *Neurosci. Lett.* 128:235-239, 1991.
- SORIA, J.M.; VALDEOLMILLOS, M. Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells. *Cereb. Cortex* 12: 831-839, 2002.
- SOUDIEN, W.; VAN WIJNGAARDEN, I. The GABA transporter and its inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 7:1063-1079, 2000.
- SPERK, G.; SCHWARZER, C.; HEILMAN, J.; FURTINGER, S.; REIMER, R.J.; EDWARDS R.H.; NELSON, N. Expression of plasma membrane GABA transporters but not of the vesicular GABA transporter in dentate granule cells after kainic acid seizures. *Hippocampus* 13:806-815, 2003.
- SPERK, G.; SCHWARZER, C.; TSUNASHIMA, K.; FUCHS, K.; SIEGHART, W. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience* 80: 987-1000, 1997.
- SPOERRI, P. Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. *Synapse* 2:11-22, 1988.
- SPREAFICO, R.; TASSI, L.; COLOMBO, N.; BRAMERIO, M.; GALLI, C.; GARBELLI, R.; FERRARIO, A.; LO RUSSO, G. Inhibitory circuits in human dysplastic tissue. *Epilepsia* 4 (Suppl. 6):S168-S173, 2000.
- STEIGER, J.L.; ALEXANDER, M.J.; GALLER, J.R.; FARB, D.H.; RUSSEK, S.J. Effects of prenatal malnutrition on GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  and  $\beta_2$  mRNA levels. *Neuroreport* 13, 1731-1735, 2003.
- STEIGER, J.L.; GALLER, J.R.; FARB, D.H.; RUSSEK, S.J. Prenatal protein malnutrition reduces  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  and  $\gamma_2L$  GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the adult septum. *European J. Pharmacol.* 446, 201-202, 2002.

STERN, W.C.; FORBES, W.B.; RESNICK, O.; MORGANE, P.J. Seizure susceptibility and brain amine levels following protein malnutrition during development in the rat. *Brain Res.* 79:375-384, 1974.

STONE, T.W. Kynurenes in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog. in Neurob.* 64:185-218, 2001.

STONE, T.W.; PERKINS, M.N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in rat CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 72:411-412, 1981.

STORCK, T.; SCHULTE, S.; HOFMANN, K.; STOFFEL, W. Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Neurobiology* 89:10955-10959, 1992.

STORK, O.; JI, F.Y.; KANEKO, K.; STORK, S.; YOSHINOBU, Y.; MORIYA, T.; SHIBATA, S.; OBATA, K.. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Res.* 865:45-58, 2000.

SÜDHOF, T.C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375:645-653, 1995.

SUR, C.; WAFFORD, K.A.; REYNOLDS, D.S.; HADINGHAM, K.L.; BROMIDGE, F.; MACAULAY, A.; COLLISON, N.; O'MEARA, G.; HOWELL, O.; NEWMAN, R.; MYERS, J.; ATTACK, J.R.; DAWSON, G.R.; MCKERNAN, R.M.; WHITING, P.J.; ROSAHL, T.W. Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J. Neurosci.* 21: 3409-3418, 2001.

SUSDAK, P.D., JANSEN, J.A. A review of the preclinical pharmacology of tiagabine: a potent and selective anticonvulsant GABA uptake inhibitor. *Epilepsia* 36:612-626, 1995.

SUSSER, E.; NEUGEBAUER, R.; HOEK, H.W.; BROWN, A.S.; LIN, S.; LABOVITZ, D.; GORMAN, J.M. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch. Gen. Psychiatry* 53:25-31, 1996.

SUSSER, E.S.; LIN, S.P. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. *Arch. Gen. Psychiatry* 49:983-988, 1992.

SUTCH, R.J.; DAVIES, C.C.; BOWERY, N.G. GABA release and uptake measured in crude synaptosomes from genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS). *Neurochem. Int.* 34:415-425, 1999.

SZABÓ, G.; KATAROVA, Z.; GREENSPAN, R. Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development. *Mol. Cell Biol.* 14:7535-7545, 1994.

SZERB, J.C. Relationship between Ca<sup>2+</sup>-dependent and independent release of [H-3]GABA evoked by high K<sup>+</sup>, veratridine or electrical-stimulation from rat cortical slices. *J. Neurochem.* 32:1565-1573, 1979.

TABER, K.H.; FULLER, G.N.; STANLEY, J.C.; DE FRANCE, J.F.; WIGGINS, R.C. The effects of postnatal undernourishment on epileptiform kindling of dorsal hippocampus. *Experientia* 36:69-70, 1980.

TAKABA, H.; NAGAO, T.; YAO, H.; KITAZONO, T.; IBAYASHI, S.; FUJISHIMA, M. An ATP-sensitive potassium channel activator reduces infarct volume in focal cerebral ischemia in rats. *Am.J. Physiol.* 273:583-586, 1997.

TAKAHASHI, S.; SHIBATA, M.; FUKUUCHI, Y. Effects of increased extracellular potassium on influx of sodium ions in cultures rat astroglia and neurons. *Dev. Brain Res.* 104:111-117, 1997.

TAKAMORI, S.; RIEDEL, D.; JAHN, R. Immunolocalization of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 13:4904-4911, 2000.

TAMURA, S.; NELSON, H.; TAMURA, A.; NELSON, N. Short external loops as potential substrate binding site of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters. *J. Biol. Chem.* 270: 28712-28715, 1995.

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

TAVARES, R.G.; TASCA, C.I.; SANTOS, C.E.S.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O.; DUTRA-FILHO, C.S. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport* 27:249-253, 2000.

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

- TAYLOR, A.; MCLEAN, M.; MORRIS, P.; BACHELARD, H. Approaches to studies on neuronal/glial relationships by <sup>13</sup>C-MRS analysis. *Dev. Neurosci.* 8:434-442, 1996.
- TAYLOR, J.; DOCHERTY, M.; GORDON-WEEKS, P.R. GABAergic growth cones: release of endogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid precedes the expression of synaptic vesicles antigens. *J. Neurochem.* 54:1689-1699, 1990.
- TAYLOR, J.; GORDON-WEEKS, P.R. Calcium-independent  $\gamma$ -aminobutyric acid release from growth cones: role of  $\gamma$ -aminobutyric acid transport. *J. Neurochem.* 56:273-280, 1991.
- TELANG, S.; FULLER, G.; WIGGINS, R.; ENNA, S.J. Early undernutrition and [<sup>3</sup>H] $\gamma$ -aminobutyric acid binding in rat brain. *J. Neurochem.* 43:640-645, 1984.
- THEODORE, W.H. Cerebral blood flow and glucose metabolism in human epilepsy. *Adv. Neurol.* 79:873-881, 1999.
- THOMAS, J.; YANG, Y.-C. Allylglycine-induced seizures in male and female rats. *Physiol. Behav.* 49:1181-1183, 1991.
- THOMAZI, A.P.; GODINHO, G.F.; RODRIGUES, J.M.; SCHWALM, F.D.; FRIZZO, M.E.; MORIGUCHI, E.; SOUZA, D.O.; WOFCHUK, S.T. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing Dev.* 125:475-81, 2004.
- THOMSEN, C.; SORENSEN, P.O.; EGEBJERG, J. 1-(3-(9H-carbazol-9-yl)-1-propyl)-4-(2-methoxyphenyl)-4-piperidinol, a novel subtype selective inhibitor of the mouse type II GABA transporter. *Br. J. Pharmacol.* 345, 661-665, 1997.
- TIAN, F.F.; XIE, G.J.; YANG, Q.D. Kindling model of SD rats induced by injection of PTX intraperitoneally. *Hunan Yi Ke Xue Bao*, 26(6):525-6. ABSTRACT, 2001.
- TILLAKARATNE, N.J.; MEDINA-KAUWE, L.; GIBSON, K.M. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in neural and non-neural tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 112:247-263, 1995.
- TONKISS, J.; ALMEIDA, S.S.; GALLER, J.R. Prenatally malnourished female but not male rats show increased sensitivity to MK-801 in a DRL-task. *Behav. Pharmacol.* 9:49-60, 1998.
- TONKISS, J.; TRZCINSKA, M.; SCHULTZ, P.; VINCITORE, M.; GALLER, J.R. Prenatally protein malnourished rats are less sensitive to the amnesic effects of medial septal infusions of chlordiazepoxide. *Behav. Pharmacol.* 11, 437-446, 2000.
- TREIMAN, D.M., 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42S3:8-12, 2001.
- TWYMAN, E.; ROGERS, C.J.; MACDONALD, R.L. Pentobarbital and picrotoxin have reciprocal actions on single GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Neurosci. Lett.* 96:89-95, 1989.
- UEDA, Y.; TSURU, N. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res.* 20:213-219, 1995.
- UEDA, Y.; WILLMORE, L.J. Hippocampal  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter alterations following focal epileptogenesis induced in rat amygdala. *Brain Res. Bull.* 52:357-361, 2000.
- ULLENSVANG, K.; LEHRE, K.P.; STORM-MATHISEN, J.; DANBOLT, N.C. Differential development expression of the two rat brain glutamate transporter protein GLAST and GLT. *Eur. J. Neurosci.* 9:1646-1655, 1997.
- VACCARINO, F.; HAYWARK, M.; NESTLER, E.; DUMAN, R.; TALLMAN, J. Differential induction of immediate early genes by excitatory amino acid receptor types in primary cultures of cortical and striatal neurons. *Mol. Brain Res.* 12:233-241, 1992.
- VAN DEN BERG, C.J.; KRZALIC, L.J.; MELA, P.; WAELCSH, H. Compartmentation of glutamate metabolism in brain: evidence for existence of two different tricarboxylic acid cycles in brain. *Biochem. J.* 113:281-290, 1969.
- VAN DEN POL, A.N.; OBRIETAN, K.; CHEN, G. Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J. Neurosci.* 16(13):4283-4292, 1996.
- VARJU, P.; KATAROVA, Z.; MADARÁSZ, E.; SZABÓ, G. GABA signaling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res.* 305:239-246, 2001.
- VELISKOVA, J., VELISEK, L.S. Picrotoxin-induced tonic-clonic seizures and lethality are decreased by MK-801 in developing rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:291-295, 1992.

- VESCE, S.; BEZZI, P.; VOLTERRA, A. The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Sci. Prog.* 82:251-270, 1999.
- VOLK, D.W.; AUSTIN, M.C.; PIERRI, J.N.; SAMPSON, A.R.; LEWIS, D.A. GABA transporter-1 mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia: decreased expression in a subset of neurons. *A. J. Psychiatry* 158:256-265, 2001.
- WAAGEPETERSEN, H.S.; SONNEWALD, U.; SCHOUSBOE, A. Compartmentation of glutamine, glutamate and GABA metabolism in neurons and astrocytes: functional implications. *Neuroscientist* 9:398-403, 2003.
- WAAGEPETERSEN, H.S.; SONNEWALD, U.; SCHOUSBOE, A. The GABA Paradox: Multiple Roler as Metabolite, Neurotransmitter, and Neurodifferentiative Agent. *J. Neurochem.* 73:1335-1342, 1999.
- WALZ, W. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36:291-300, 2000.
- WANG, J.L.; STONER, G.D.; BRAY, T.M. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished rats. *J. Nutr. Biochem.*, 13:625-633, 2002.
- WANIEWSKI, R.A.; MARTIN, D.L., 1998. Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J. Neurosci.* 18:5225-5233, 1998.
- WARD, L.L.; WEISZ, J. Differential effects on maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female fetuses and their mothers. *Endocrinology* 114:1635-1644, 1984.
- WARD, L.L.; WEISZ, J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 207:3-11, 1980.
- WARNER, R.K.; THOMPSON, J.T.; MARKOWSKI, U.P.; LOUCKS, J.A.; BAZETT, T.J.; EATON, R.C.; HULL, E.M. Microinjection of the dopamine antagonist cis-flupenthixol into the MPOA impairs copulation, penile reflexes and sexual motivation in male rats. *Brain Res.* 540:177-182, 1991.
- WATASE, K.; HASHIMOTO, K.; KANO, M.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; INOUE, Y.; OKUYAMA, S.; SAKAGAWA, T.; OGAWA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M.; WADA, K.; TANAKA, K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10:976-988, 1998.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:25-33, 1990.
- WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma protein. *FEBS Letters* 187: 33-37, 1985.
- WEISS, L.C.; FELDON, J. Enviromental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology* (Berlin) 156:305-326, 2001.
- WEXLER, E.M.; STANTON, K.P.; NAWY, S. Nitric oxide depresses GABA<sub>A</sub> receptor function via coativation of cGMP-dependent kinase and phosphodiesterase. *J. Neurosci.* 18:2342-2349, 1998.
- WHITE, A.M.; PLATT, B. Gamma-aminobutyric acid-induced calcium signalling in rat superior collicular neurones. *Neurosci. Lett.* 334:79-82, 2002.
- WHITE, C.; GURLEY, D.A. Alpha subunits influence Zn block of gamma 2 containing GABA<sub>A</sub> receptor currents. *Neuroreport* 6:461-464, 1995.
- WHITE, H.S.; SARUP, A.; BOLVIG, T.; KRISTENSEN, A.S.; PETERSEN, G.; NELSON, N.; PICKERING, D.S.; LARSSON, O.M.; FROLUND, B.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; SCHOUSBOE, A. Correlation between anticonvulsant activity and inhibitory action on glial gamma-aminobutyric acid uptake of the highly selective mouse gamma-aminobutyric acid transporter 1 inhibitor 3-hydroxy-4-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,2-benzisoxazole and its N-alkylated analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:636-644, 2002.
- WITHWORTH, T.L.; QUICK, M.W. Substrate induced regulation of gamma-aminobutyric acid transporter trafficking requires tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276:42932-42937, 2001.
- WHO, 2003. Global Database on Child Growth and Malnutrition. Disponível em: <http://www.who.int/nutgrowthdb>. Uptated November 2003. Acessado em 15 de janeiro de 2005.

- WHO, 2001. Fact sheet N° 165. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentr/factsheets/fs165/en/>. Revisado em fevereiro de 2001. Acessado 15 de janeiro de 2005.
- WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S.J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.* 35:2085-2094, 1984.
- WILSON, M.A. Influences of gender, gonadectomy, and estrous cycle on GABA/BZ receptors and benzodiazepine responses in rats. *Brain Res. Bull.* 29:165-172, 1992.
- WILLOUGHBY, J.O.; MACKENZIE, L.; MEDVEDEV, A.; HISCOCK, J.J. Distribution of Fos-positive neurons in cortical and subcortical structures after picrotoxin-induced convulsions varies with seizure type. *Brain Res.* 683:73-87, 1995.
- WIND, T.; PREHN, J.H.; PERUCHE, B.; KRIEGLSTEIN, J. Activation of ATP-sensitive potassium channels decreases neuronal injury caused by chemical hypoxia. *Brain Res.* 751:295-299, 1997.
- WOLFF, J.R.; BOTTCHE, H.; ZETZSCHE, T.; OERTEL, W.H.; CHROMWALL, B.M. Development of GABAergic neurons in rat visual cortex as identified by glutamate decarboxylase-like immunoreactivity. *Neurosci. Lett.* 47:207-212, 1984.
- WONG, M.; YAMADA, K.A. Developmental characteristics of epileptiform activity in immature rat neocortex: a comparison of four in vitro seizure models. *Dev. Brain Res.* 128:113-120, 2001.
- WONG, P.T.-H.; MCGEER, E.G. Postnatal changes of GABAergic and glutamatergic parameters. *Dev. Brain Res.* 1:519-529, 1981.
- WOOD, J.D. The role of gamma-aminobutyric acid in the mechanism of seizures. *Prog. Neurobiol.* 5:77-95, 1975.
- WU, G.; BAZER, F.W.; CUDD, T.A.; MEININGER, C.J.; SPENCER, T.E. Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134(9):2169-72, 2004.
- WU, Y.; WANG, W.; RICHERSON, G.B. Vigabatrin induces tonic inhibition via GABA transporter reversal without increasing vesicular GABA release. *J. Neurophysiol.* 89:2021-2034, 2003.
- WU, W.L.; ZISKIND-CONHAIM, L.; SWEET, M.A. Early development of glycine- and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *J. Neurosci.* 12:3935-3945, 1992.
- XIA, Y.; POOSCH, M.S.; WHITTY, C.J.; KAPATOS, G.; BANNON, M.J. GABA transporter mRNA: in vitro expression and quantitation in neonatal rat and postmortem human brain. *Neurochem. Int.* 22:263-270, 1993.
- YAMADA K., JI, J.J., YUAN, H., MIKI, T., SATO, S., HORIMOTO, N., SHIMIZU, T., SEINO, S., INAGAKI, N.. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science* 292:1543-1546, 2001.
- YAMASAKI, E.; BARBOSA, V.D.; DE MELLO, F.G.; HOKOC, J.N. Gabaergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at early stages of postnatal development. *Int. J. Devl. Neuroscience* 17:201-213, 1999.
- YAN, X.X.; CARIAGA, W.A.; RIBAK, C.E. Immunoreactivity for GABA plasma membrane transporter, GAT-1, in the developing rat cerebral cortex: transient presence in the somata of neocortical and hippocampal neurons. *Dev. Brain Res.* 99, 1-19, 1997.
- YAN, X.X.; RIBAK, E. Developmental expression of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters (GAT-1 and GAT-3) in the rat cerebellum: evidence for a transient presence of GAT-1 in Purkinje cells. *Dev. Brain Res.* 111, 253-269, 1998.
- YOKOGOSHI, H.; HAYASE, K.; YOSHIDA, A. The quality and quantity of dietary protein affect brain protein synthesis in rats. *J. Nutr.* 122:2210-2217, 1992.
- ZHANG, D.; PAN, Z.H.; ZHANG, X.; BRIDEAU, A.D.; LIPTON, S.A. Cloning of a gamma-aminobutyric acid type  $\alpha$  receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92:11756-11760, 1995.
- ZHAO, W.J.; MA, Y.H.; FEI, J.; MEI, Z.T.; GUO, L.H. Increase in drug-induced seizure susceptibility of transgenic mice overexpressing GABA transporter-1. *Acta Pharmacol. Sin.* 24 :991-995, 2003.
- ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIES, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. *Brain Energy Metabolism*. In: Fundamental Neuroscience. Ed. Academic Press. Chapter 14:389-409, 1999.

ZISKIND-CONHAIM, L. Physiological functions of GABA-induced depolarizations in the developing rat spinal cord. *Dev. Neurobiol.* 5:279-287, 1998.

ZOMOT, E., KANNER, B.I. The interaction of the  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter GAT-1 with the neurotransmitter is selectively impaired by sulfhydryl modification of a conformationally sensitive cysteine residue engineered into extracellular loop IV. *J. Biol. Chem.* 278(44):42950-42958, 2003.

ZUBERI, S.M.; EUNSON, L.H.; SPAUSCHUS, A.; DE SILVA, R.; TOLMIE, J.; WOOD, N.W.; McWILLIAM, R.C.; STEPHENSON, J.P.; KULLMANN, D.M.; HANNA, M.G. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain* 122:817-825, 1999.



## **ANEXO 1**

ARTIGO CIENTÍFICO I - **Schweigert, I.D.**; Roehrig, C.; da Costa, F.; Scheibel, F.; Gottfried, C.J.S.; Rotta, L.N., Gonçalves, C.A.; Souza, D.O.; Perry, M.L.S. High extracellular K<sup>+</sup> levels stimulate acetate oxidation in brain slices from well and malnourished rats. *Neurochemical Research* Aug;29(8):1547-51 (2004).

## ANEXO 2

ARTIGO CIENTÍFICO II - **Schweigert, I.D.**; de Oliveira, D.L.; Scheibel, F.; da Costa, F.; Wofchuk, S.T.; Souza, D.O. and Perry, M.L.S. Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices. *Developmental Brain Research* Feb 8; 154(2):177-85 (2005).

### **ANEXO 3**

ARTIGO CIENTÍFICO III - **Schweigert, I.D.**; Vinadé, L.; da Costa, F.; Gravina, F.; Kawano, C.; Londero, L.G.; Rodrigues, J.M.; Souza, D. O. and Perry, M.L.S. Modified malnutrition-induced developmental pattern on the effect of GABA uptake inhibitors in rats. Em preparação.

## High Extracellular $K^+$ Levels Stimulate Acetate Oxidation in Brain Slices from Well and Malnourished Rats

Ingrid D. Schweigert,<sup>1,2</sup> Cintia Roehrig,<sup>1</sup> Fabiane da Costa,<sup>1</sup> Fernando Scheibel,<sup>1</sup> Carmen J. Silveria Gottfried,<sup>1,3</sup> Liane N. Rotta,<sup>1,4</sup> Carlos Alberto Gonçalves,<sup>1</sup> Diogo O. Souza,<sup>1</sup> and Marcos L. S. Perry<sup>1,5</sup>

(Accepted February 9, 2004)

We investigated the effect of high (12, 20, and 50 mM) extracellular  $K^+$  concentrations ( $[K^+]_0$ ) on  $[U-^{14}C]$  acetate oxidation to  $CO_2$  in cerebral cortex slices of control and perinatal malnourished rats. High  $[K^+]_0$  increased the acetate oxidation, compared with a medium containing 2.7 mM  $[K^+]_0$ . By investigating the mechanisms involved in this stimulation, it was shown that (i) ouabain (1 mM) and monensin (10  $\mu$ M) prevented this increase; (ii) in a medium with physiological  $[K^+]_0$  (2.7 mM), the decreasing of  $[Na^+]_0$  stimulated acetate oxidation. These results suggest that the stimulatory effect of  $[K^+]_0$  on acetate oxidation was due to the decreasing of  $Na_1$  levels. Considering that malnutrition could alter the activity of  $Na^+, K^+$ -ATPase and/or other pertinent proteins, its effect on acetate oxidation was investigated. The malnutrition, which altered the body and cerebral weight of rats, did not modify the acetate oxidation in any protocol.

**KEY WORDS:** Acetate oxidation; cerebral cortex; malnutrition; potassium concentration.

### INTRODUCTION

Extracellular acetate in the brain may be derived at least from three sources. (i) Acetate is produced by anaerobic bacterium in gut and is normally present at about 0.2–0.3 mM in blood (1). (ii) Ethanol is metabolized to acetate. Plasma acetate levels increase from 0.3 to 1 mM after a single intravenous dose of ethanol in humans (2). Kiselevski et al. (3) showed that acetate and acetyl-CoA synthetase were higher in cerebral cortex of rats treated daily with ethanol. (iii) In brain, acetylcholine is rapidly

metabolized by extracellular cholinesterase to acetate and choline.

Applications of the autoradiographic  $[^{14}C]$ deoxyglucose ( $[^{14}C]$ DG) method (4) for determination of local cerebral metabolic rates of glucose use (LCMRglc) in neural tissues have clearly established that local functional activation increases the extracellular  $K^+$  concentration  $[K^+]_0$  and the energy metabolism in activated regions (5,6). Stimulation of metabolism by functional activation is dependent on  $Na^+, K^+$ -ATPase (EC 3.6.1.37) activity, which contributes for maintaining the basal  $K^+$  level, which *in vivo* is about 3 mM. It can rise up to about 12 mM (functional activation) (7,8) or to 50–80 mM (seizures or spreading depression) (9–12). The increases in LCMRglc associated with functional activation are found mainly in neuropil or synapse-rich regions (13), but the spatial resolution of autoradiographic  $[^{14}C]$ DG method is limited to 100–200  $\mu$ m (14), and it is insufficient to identify the specific cellular elements in neuropil that contribute to increase LCMRglc.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências da Saúde, UNIJUÍ/Ijuí, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Centro de Ciências da Saúde, UNISINOS/São Leopoldo, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Curso de Farmácia, ULBRA/Canoas, RS, Brazil.

<sup>5</sup> Address reprint request to: Marcos L. S. Perry. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo CEP 90035-003, Porto Alegre/RS, Brazil. Tel: 55 51 3316 5551; Fax: 55 51 3316 5540; E-mail: mlsperry@excite.com

It, therefore, remained uncertain whether the function-driven increases in energy metabolism are confined to axonal and/or dendritic processes or include astrocytic processes enveloping the synapses.

Application of [ $^{14}\text{C}$ ]acetate to brain tissue results in rapid incorporation of the label in glutamine, with a higher specific activity than in glutamate. In contrast, experiments with [ $^{14}\text{C}$ ]glucose result in a rapid incorporation of label into glutamate and with a lower specific activity into glutamine (15,16). As glutamine is synthesized primarily within astrocytes (17), it has further been proposed that acetate is preferentially used by astrocytes than neurons (18). [ $^{13}\text{C}$ ]acetate is now routinely used to examine glial metabolism in brain, and NMR studies have verified the selective metabolism of acetate by astrocytes (19–21). Waniewski and Martin (22) showed that the [ $^{14}\text{C}$ ]acetate oxidation to  $\text{CO}_2$  by cortical astrocytes is 10 times higher than by synaptosomes, in which the acetate transport is insignificant.

Malnutrition modifies the morphologic, biochemical, and functional brain maturation (7,23). Considering that acetate is mainly metabolized in astrocytes, cells that play a crucial role in the flux of energy substrates to neurons (mainly in neuronal activation conditions), it is important to verify the effect of different  $[\text{K}^+]_0$  on acetate oxidation by brain slices from control and malnourished rats. The experimental model of malnutrition used in this study could alter the acetate metabolism directly, by affecting enzymes involved in acetate metabolism, including those involved in acetate oxidation to  $\text{CO}_2$  or indirectly, by affecting  $\text{K}^+$  transport into astrocytes (by  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase). It is known that increased  $[\text{K}^+]_0$  is a stimulus for use of energetic nutrients by CNS (4,8,24–26).

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

**Chemicals.** Hyamine hydroxide was purchased from J. T. Baker Chemical Company, (Phillipsburg, USA); [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] acetic acid and sodium salts (57.0 mCi/mmol) were from Amersham International (Berkinghamshire, UK); monensin and ouabain were from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used were of analytical grade.

**Diets.** The animals had free access to isocaloric diets (Table I) containing 25% or 7% protein (casein), salts, and vitamins as recommended by the Association of Official Analytical Chemists (27) and previously described by our group (28).

**Animals.** Albino Wistar rats were obtained from UFRGS Biochemistry Department. Prenatal and lactational malnutrition was induced by restricting to 7% the protein content of the mothers' diet (control group: 25% protein) during the entire gestation and lactational periods, whereas malnutrition up to 75 days was induced by maintaining the same 7% protein diet. The litter size was adjusted to eight pups per mother on the first postpartum day and they were maintained at 22°C on a 12 h light/12 h dark cycle until experimental age. The protocol concerning this research was used according to the guidelines of the Committee on

**Table I.** Percent (g/kg Diet) Nutritional Composition of the Diets

Component	Casein diet	
	25%	7%
Casein (87% protein)*	287	80.50
Fat (soybean oil)	150	150
Carbohydrate (corn starch)	501.5	708
Salt mix <sup>†</sup>	40	40
Vitamin mix <sup>‡</sup>	10	10
Non-nutritive fiber	10	10

*Note:* Salt and vitamin compositions are according to Horwitz (21). Energy for both diets: 4.3 kcal/g diet in both diets.

\* Casein, purity 87% (from Farmaquímica, Porto Alegre, Brazil) supplemented with 0.15% L-methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil).

<sup>†</sup> Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil) mg/100 g of ration: NaCl, 557; KCl, 3.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1556;  $\text{MgSO}_4$ , 229;  $\text{CaCO}_3$ , 1526;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 108;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 16;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.2;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1.9;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.09.

<sup>‡</sup> Vitamin mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100g of ration: vitamin A, 4; vitamin D, 0.5; vitamin E, 10; menadione, 0.5; choline, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacin, 4; pantothenic acid, 4; riboflavin, 0.8; thiamin, 0.5; pyridoxine, 0.5; folic acid, 0.2; biotin, 0.04; vitamin B12, 0.003.

Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

**Tissue Preparations.** The rats were killed by decapitation, and their brains were quickly removed and the slices prepared in total time of about 2 min. The cerebral cortices were cut into 0.3-mm slices using a Macllwain tissue chopper.

**Incubation System.** For the measurement of  $\text{CO}_2$  production, between 40 to 50 mg of cerebral cortex slices were incubated in 1.0 ml Dulbecco's phosphate-buffered saline, pH 7.2, containing 1.0 mM acetate + 0.2  $\mu\text{Ci}$  [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]acetate. The standard reaction mixture for  $\text{CO}_2$  production contained 17.7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 115 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.49 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 1.0 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . When KCl content was raised, NaCl concentration was decreased equivalently to maintain the osmolality. Dulbecco's phosphate-buffered is a medium with low  $\text{Na}^+$  in which sucrose replaces sodium chloride. Experiments with ouabain (1 mM) or monensin (10  $\mu\text{M}$ ) were carried out with  $[\text{K}^+]_0$  of 12, 2.7, and 50 mM, respectively. When the incubation medium was  $\text{CaCl}_2$ -free, the  $\text{MgCl}_2$  was increased to 10 mM. The  $\text{CO}_2$  production was linear from 30 to 120 min of the incubation period.

**Substrate Oxidation.** Incubations were carried out in flasks after contents were gassed with 100%  $\text{O}_2$  for 1 min and then sealed with rubber caps. The slices were incubated at 35°C during 1 h in a Dubnoff metabolic shaker (60 cycles/min) according to the method of Dunlop et al. (29). Incubation was stopped by adding 0.25 ml 50% TCA through the rubber cap. Then, 0.1 ml of 1 M hyamine hydroxide was injected into the central wells. The flasks were shaken for a further 30 min at 35°C to trap  $\text{CO}_2$ . After, the contents of the central well were transferred to vials and assayed for  $\text{CO}_2$  radioactivity in a liquid-scintillation counter. All the results were expressed considering the initial specific activity of the incubation medium. These values are nominal because the intracellular specific activity of acetate is unknown.

**Protein Measurement.** The protein was measured by the method of Lowry et al. (30) using bovine serum albumin as standard.

**Statistical Analysis.** Data were analyzed statistically by ANOVA and by the Duncan multiple-range test and by the Student's *t* test when indicated, with the level of significance set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

The gestational and postnatal malnutrition caused significant reduction in body weight (in grams) from the first postnatal day (from  $6.11 \pm 0.67$  to  $5.41 \pm 0.57$ ;  $P < 0.01$ , Student's *t* test). As showed in Table II, the corporal weight of malnourished rats was only 27% of the corporal weight of control rats at adult age (80 days) and the reduction in cerebral weight in malnourished rats was about 26%, comparing with well-nourished rats. The protein concentration in cerebral cortex of adult rats was not altered by malnutrition.

We investigated the effect of different  $[K^+]_0$  on  $[U-^{14}C]$  acetate oxidation to  $CO_2$ , in cerebral cortex of well and malnourished rats. As shown in Fig. 1, acetate oxidation to  $CO_2$  was not modified by the diet. However, the highest extracellular potassium concentration (12, 20, and 50 mM  $[K^+]_0$ ) increased the acetate oxidation, compared with a medium containing 2.7mM  $[K^+]_0$  (Figs. 1 and 2).

The addition of an inhibitor of  $Na^+,K^+$ -ATPase, (ouabain at 1mM) to the incubation system containing 12 mM  $[K^+]_0$  decreased the acetate oxidation to  $CO_2$  in slices of cerebral tissue from well and malnourished rats (Fig. 2). Considering this result, we decided to verify the effect of monensin ( $Na^+$  ionophore) on the acetate oxidation in an incubation system containing 2.7 mM  $[K^+]_0$ . As shown in Fig. 2, monensin (10  $\mu$ M) decreased the acetate oxidation to  $CO_2$  in cerebral cortex of rats of both diet groups.

The acetate oxidation to  $CO_2$  in a system containing 2.7 mM  $[K^+]_0$  and low  $Na^+$  concentration was twice higher than in the medium with the same  $[K^+]_0$  but with normal  $Na^+$  concentration, in cerebral slices of both well and malnourished rats (Fig. 3).

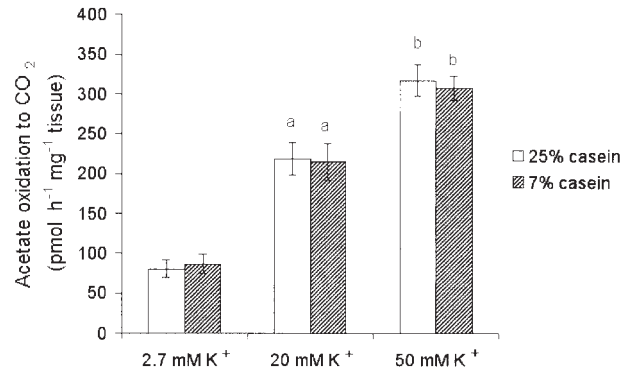
## DISCUSSION

In the current study, we verified the effect of different  $[K^+]_0$  on acetate oxidation to  $CO_2$  in cerebral cortex

**Table II.** Effect of Pre- and Postnatal Malnutrition on Body and Cerebral Weights and Protein Concentration in Cerebral Cortex of Adult Rats

Parameters	Diet	
	25%	7%
Body weight (g)	$365.4 \pm 29.5$	$95.0 \pm 4.3^{**}$
Cerebral weight (mg)	$1415 \pm 53$	$1050 \pm 57^{**}$
Protein content (mg%)	$12.7 \pm 1.51$	$12.1 \pm 0.81$

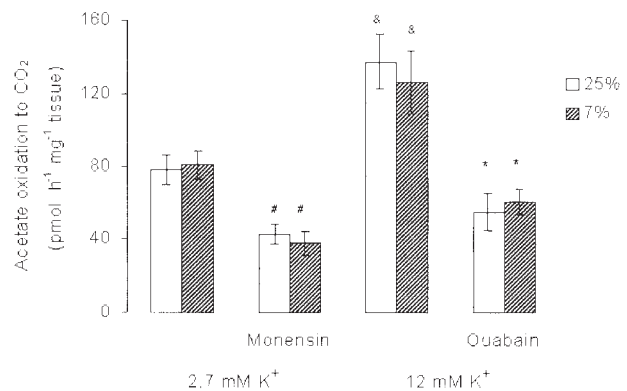
Note: Data are expressed as mean  $\pm$  SDM.  $^{**}P < 0.01$  compared to 25% (Student's *t* test) ( $n = 10$  to each group).



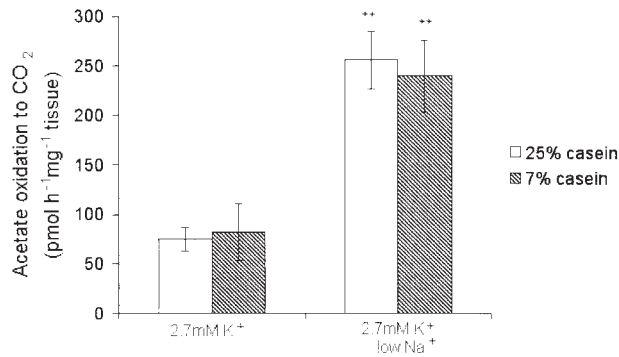
**Fig. 1.** Effect of high extracellular  $K^+$  concentrations on acetate oxidation to  $CO_2$  in cerebral cortical slices obtained from well and malnourished rats. Bars are mean  $\pm$  S.D. from two independent experiments ( $n = 8$  in each group). (a) Different from 2.7 mM  $K^+$  ( $P < 0.01$ ); (b) different from 2.7 and 20 mM  $K^+$  ( $P < 0.01$ ).

slices of well and malnourished rats. Acetate has been used as a probe to study brain metabolism and it is preferentially metabolized in a "small" glutamate pool that is rapidly converted to glutamine, whereas glucose enters in a "large" glutamate pool (16). Waniewski and Martin (22) showed that astrocytes acetate uptake is 10 times higher than in synaptosomes. Thus, it has been proposed that acetate is metabolized mainly by astrocytes (18,19). Here, we used tissue slices for maintaining the functional and anatomical interactions between astrocytes and neurons. In Fig. 1, it is shown that the brain slices take up and oxidize acetate, indicating that this preparation preserves the astrocytic activity.

Figure 1 also indicates that acetate oxidation was stimulated by increasing  $[K^+]_0$ . Thus, further experiments aimed to investigate the mechanisms of this stimulation.



**Fig. 2.** Effect of monensin (10  $\mu$ M) and ouabain (1 mM) on acetate oxidation to  $CO_2$  in cerebral cortical slices obtained from well and malnourished rats. Results are mean  $\pm$  SDM from two independent experiments ( $n = 8$  in each group). (#) Different from 2.7 mM  $K^+$  without monensin ( $P < 0.01$ ); (&) different from 2.7 mM  $K^+$  ( $P < 0.01$ ); (\*) different from 12 mM  $K^+$  without ouabain ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 3.** Effect of low Na<sup>+</sup> concentration on acetate oxidation to CO<sub>2</sub> in cerebral cortical slices obtained from well and malnourished rats. Data are mean ± SDM (n = 8 in each group) for two independent experiments. (\*\*). Different from 2.7 mM K<sup>+</sup> (P < 0.01).

To verify the influence of extracellular Ca<sup>2+</sup> on acetate oxidation, we measured the CO<sub>2</sub> production from acetate in a Ca<sup>2+</sup>-free medium containing 50 mM [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub>. We found no difference in acetate oxidation, comparing to the medium with physiological Ca<sup>2+</sup> concentration (data not shown). It is well-known that high [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> increases Ca<sup>2+</sup> cell influx (31); thus, our results discard that the effect of high [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> on acetate oxidation was due to intracellular enzyme activation by Ca<sup>2+</sup>.

It is well established that high [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> decreases astrocytic [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> (14) and that low [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> stimulates acetyl-CoA synthetase (32). We performed further experiments in order to study the [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> effect on acetate oxidation. We measured the effect of ouabain on acetate oxidation, aiming to inhibit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and to increase [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>; in presence of high [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub>, ouabain decreased acetate oxidation (Fig. 2), which could suggest that high [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> stimulated acetate oxidation by decreasing [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. By using monensin (Na ionophore; 14), we intended to increase [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>; indeed, monensin inhibited acetate oxidation (Fig. 2). Finally, by decreasing [Na<sup>+</sup>]<sub>0</sub>, the oxidation was stimulated (Fig. 3).

All together, our findings suggest that high [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> stimulated astrocytic acetate oxidation probably by decreasing [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. Importantly, although the perinatal nutritional insult modified significantly the cerebral and body weight, it did not alter the acetate oxidation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Blanver-Farmoquímica for providing the fiber used in diet composition. This research was supported by CNPq, FINEP, CAPES, PROSPEQUFRFGS, FAPERGS, and PRONEX (41960904-366/96 to D. O. G. Souza).

## REFERENCES

- Orrego, H., Carmichael, F. J., and Israel, Y. 1988. New insights on the mechanism of the alcohol-induced increase in portal blood flow. *Can. J. Physiol.* 66:1-9.
- McNeil, N. I. 1984. The contribution of large intestine to energy supplies in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 39:338-342.
- Kiselevski, Y., Organesian, N., Zimatkin, S., Szutowicz, A., Angielski, S., Niezabiowski, P., Uracz, W., and Gryglewski, R. J. 2003. Acetate metabolism in brain mechanisms of adaptation to ethanol. *Med. Sci. Monit.* 9(5):178-182.
- Hertz, L. and Peng, L. 2002. Amobarbital inhibits-stimulated glucose oxidation in cerebellar granule neurons by two mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 446:53-61.
- Sokoloff, L. 1981. Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1:7-36.
- Sokoloff, L. 1993. Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the nervous system. *Dev. Neurosci.* 15:194-206.
- Morgan, B. G. L. and Naismith, D. J. 1992. The effect of early postnatal Undernutrition on the growth and development of the rat brain. *Br. J. Nutr.* 48:15-23.
- Peng, L., Bernhard, H. J. J., and Hertz, L. 1996. Pharmacological and developmental evidence that the potassium-induced stimulation of deoxyglucose uptake in astrocytes is a metabolic manifestation of increase Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Dev. Neurosci.* 18: 353-359.
- Hertz, L. 1977. Drug-induced alterations of ion distribution at cellular level of the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 29: 35-65.
- Erecinska, M. and Silver, I. A. 1994. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43:37-71.
- Somjen, G. G. 1975. Electrophysiology of neuroglia. *Ann. Rev. Physiol.* 37:163-190.
- Somjen, G. G. 1979. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 41:159-177.
- Kadekaro, M., Crane, A. M., and Sokoloff, L. 1983. Differential effects of electrical stimulation of sciatic nerve on metabolic activity in spinal cord and dorsal root ganglion in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4179-4183.
- Takahashi, S., Shibata, M., and Fukuuchi, Y. 1997. Effects of increased extracellular potassium on influx of sodium ions in cultured rat astroglia and neurons. *Dev. Brain Res.* 104:111-117.
- O'Neal R. M. and Koeppel, R. E. 1966. Precursors in vivo of glutamate, aspartate and their derivatives of rat brain. *J. Neurochem.* 13:835-847.
- Vans Den Berg, C. J., Krzalić, L. J., Mela, P., and Waelsch, H. 1969. Compartmentation of glutamate metabolism in brain: evidence for existence of two different tricarboxylic acid cycles in brain. *Biochem. J.* 113:281-290.
- Norenberg, M. D. and Martinez-Hernandez, A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161:303-310.
- Fonnum, F. 1985. Determination of transmitter amino acid turnover. Pages 201-237, in Boulton A. A., Baker, G. B., and Wood, J. D. (eds.), *Neuromethods, series 1: neurochemistry, vol. 3: amino acids, Humana, Clifton, NJ.*
- Badar-Goffer, R. S., Bachelard, H. S., and Morris, P. G. 1990. Cerebral metabolism of acetate and glucose studied by <sup>13</sup>n.m.r. spectroscopy: a technique for investigating metabolic compartmentation in the brain. *Biochem. J.* 266:133-139.
- Cerdan, S., Künnecke, B., and Seelig, J. 1990. Cerebral metabolism of [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]acetate as detected by in vivo and in vitro <sup>13</sup>C NMR. *J. Biol Chem.* 265:12916-1226.
- Chapa, F., Künnecke, B., Calvo, R., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., and Gerdán, S. 1995. Adult-onset hypothyroidism

- and cerebral metabolism of (1,2-<sup>13</sup>C)acetate as detected by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Endocrinology* 136:296–305.
22. Waniewski, R. A. and Martin D. L. 1998. Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J. Neurosci.* 18(14):5225–5233.
  23. Galler, J. R., Shumsky, J. S., and Morgane, P. J. 1997. Malnutrition and brain development. Pages 196–212, in Walker, W. D., and Watkins J. B. (eds.), *Nutrition in pediatrics*. B. C. Decker, London.
  24. Sokoloff, I., Takahashi, S., Gotoh, J., Driscoll, B. F., and Law, M. J. 1996. Contribution of astroglia to functionally activated energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 18:343–352.
  25. Hassel, B. and Sonnewald, U. 2002. Effects of potassium and glutamine on metabolism of glucose in astrocytes. *Neurochem. Res.* 27:167–171.
  26. McDougal, D. B., Jr., Cowsette, B. R., Pusateri, M. E., Carter, J. G., Manchester, J. K., Chi, M-Y. M., and Lowry, O. H. 1997. Glutamate and potassium stimulation of hippocampal slices metabolizing glucose or pyruvate. *Brain Res.* 755:304–312.
  27. Horwitz, W. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
  28. Rotta, L. N., Silva, C. G., Perry, M. L. S., and Trindade, V. M. T. 1999. Undernutrition decreases serine palmitoyltransferase activity in developing rat hypothalamus. *Ann. Nutr. Metabolism.* 43:152–158.
  29. Dunlop, D. S., Van Elden, W., and Lajtha, A. 1975. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of brain rat. *Brain* 99:303–318.
  30. Lowry, H. O., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
  31. Hertz, L., and Code, W. E. 1993. Calcium channel signaling in astrocytes. Pages 205–213, in Godfraind, T., Govoni, S., Paoletti, R., and Vanhoutte, P. M. (eds.), *Calcium antagonist pharmacology and clinical research*. Kluwer Academic, Dordrecht.
  32. Carrol, P. T. 1997. Evidence to suggest that extracellular acetate is accumulated by rat hippocampal cholinergic nerve terminals for acetylcholine formation and release. *Brain Res.* 753:47–55.



Research report

# Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices

Ingrid D. Schweigert<sup>a,b</sup>, Diogo L. de Oliveira<sup>a</sup>, Fernando Scheibel<sup>a</sup>, Fabiane da Costa<sup>a</sup>, Susana T. Wofchuk<sup>a</sup>, Diogo O. Souza<sup>a</sup>, Marcos L.S. Perry<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600 anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup>*Departamento de Ciências da Saúde, UNIJUÍ, RS, Brazil*

Accepted 24 October 2004

Available online 15 December 2004

## Abstract

It is widely known that a complex interaction between excitatory and inhibitory systems is required to support the adequate functioning of the brain and that significant alterations induced by early protein restriction are complex, involving many systems. Based on such assumptions, we investigated the effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation followed by offspring protein restriction on some GABAergic and glutamatergic parameters, which mediate inhibitory and excitatory transmission, respectively. The sensitivity of young malnourished rats to convulsant actions of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin (PCT; s.c.) and to *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor agonist quinolinic acid (QA; i.c.v) and also  $\gamma$ -amino-*n*-butyric acid (GABA) and glutamate uptake by cortical and hippocampal slices were evaluated in P25 old rats. Early protein malnutrition induced higher sensitivity to picrotoxin, which could be associated with the observed higher GABA uptake by cortical, and hippocampal slices in malnourished rats. In contrast, we observed lower sensitivity to quinolinic acid in spite of unaltered glutamate uptake by the same cerebral structures. Picrotoxin enhanced GABA uptake in hippocampus in well- and malnourished rats; however, it did not affect cortical GABA uptake. Our data corroborate our previous report, showing that malnutrition depresses the glutamatergic activity, and point to altered modulation of GABAergic neurotransmission. Such findings allow us to speculate that malnutrition may affect the excitatory and inhibitory interaction.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Theme:* Development and regeneration

*Topic:* Nutritional and prenatal factors

*Keywords:* Protein malnutrition; GABA and glutamate uptake; Cerebral cortex; Hippocampus; Picrotoxin; Quinolinic acid

## 1. Introduction

Nutritional inadequacy is among the main non-genetic factors affecting brain development [43]. In the framework of such nutritional inadequacy, early protein malnutrition adversely affects the central nervous system (CNS) maturation, resulting in long-lasting or even permanent deleterious effects [33,42]. In rodents, such abnormalities are manifested in different brain regions [37]. In early postnatal undernourished infants, for example, Cordero et al. [12] showed a decrease in the arborization and span of the basilar

*Abbreviations:* AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate; GAD, Glutamate decarboxylase; GAT, GABA transporter; mIPSCs, Miniature inhibitory postsynaptic currents; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; PCT, Picrotoxin; QA, Quinolinic acid

\* Corresponding author. Fax: +55 51 3316 5540.

*E-mail address:* [mlsperry@excite.com](mailto:mlsperry@excite.com) (M.L.S. Perry).

dendrites, indicating that undernutrition during the first months of postnatal life could affect the growth of pyramidal cells. In humans, there is sound evidence, mostly epidemiological, that malnutrition could contribute to raise the prevalence of epilepsy in children in developing countries [22,28].

Although most nutrients may affect brain maturation, proteins appear to be the most critical ones [43]. Prenatal protein malnutrition causes alterations on developmental time course of dentate granule cell birth in the dentate gyrus [16,17], on the morphology of hippocampal cells [20,21], on the number and distribution of neurotransmitters receptors [24] and on the performance of rats in behavioral tasks involving hippocampus [65], and increases the frequency of miniature inhibitory postsynaptic current (mIPSC) in CA1 pyramidal cells [36]. Besides such alterations, it is also known that protein deprivation affects catecholaminergic, cholinergic, serotonergic [72], glutamatergic [49] and GABAergic [36,56,57] neurotransmission systems.

Once brain functions depend on the dynamic interaction between excitatory (e.g., glutamatergic) and inhibitory (e.g., GABAergic) inputs, the modulation of  $\gamma$ -amino-*n*-butyric acid (GABA) release by glutamatergic and/or GABAergic terminals containing glutamate receptors is of utmost importance for the maintenance of the balance between excitation and inhibition. For instance, the glutamate receptor-induced modulation of GABAergic synaptic transmission has been thought of as being involved in glutamate-induced seizures and neuronal damage [5]. Saransaari and Oja [50] showed that the ionotropic receptor agonist kainate, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) increase the receptor-mediated basal GABA release with no effect on  $K^+$ -stimulated GABA release.

There are accumulating evidences for the GABAergic system sensitivity to malnutrition. Steiger et al. [56,57] showed that prenatal protein malnutrition selectively alters GABA<sub>A</sub> receptor mRNA levels in rat hippocampus and septum. Early undernutrition significantly influenced characteristics of [<sup>3</sup>H]GABA binding in rat brain cerebral cortex and hippocampus [64] and delayed developmental pattern of glutamate decarboxylase (GAD) activity [18]. Changes in reactivity to drugs acting via GABA<sub>A</sub> receptor such as ethanol [8,13] and benzodiazepines [1,9,67] induced by early undernutrition raises the question of whether this insult could affect the action of other therapeutic compounds on brain tissue.

Concerning the glutamatergic system, Tonkiss et al. [66] provided behavioral evidence that the excitatory amino acid system may be altered in prenatally protein malnourished rats. Fiacco et al. [25] found increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. Those authors [25] observed increases in

[<sup>3</sup>H]kainate binding density that may be compensatory to the decreased glutamate release accounted to mossy fiber plexus reduction reported at these ages in prenatally malnourished rats by Cintra et al. [11]. On the other hand, our laboratory showed that pre- and postnatal nutritional insult depressed some parameters of the glutamatergic system in 75-day-old rats, decreasing the sensitivity to QA-induced seizures, reducing the  $Na^+$ -independent glutamate binding in neural cell membranes, and decreasing the basal (but not  $K^+$ -stimulated) glutamate release from synaptosomal preparations [49].

Considering (i) the accumulating evidence for significant alterations in the GABAergic system in response to malnutrition; (ii) the data from our laboratory on the effect of protein malnutrition on the glutamatergic system; (iii) the fact that brain functions are based on the dynamic interaction between the excitatory and inhibitory systems, which, in their turn, are involved in many neurological disorders, including seizures and epilepsy, the present study was undertaken to evaluate the effects of gestational and postnatal malnutrition on some parameters of the GABAergic and glutamatergic systems. Accordingly, we evaluated the sensitivity of P25 old rats to the convulsing actions of the GABAergic antagonist picrotoxin and of quinolinic acid (QA), which is an over stimulator of the glutamatergic system. We also evaluated the GABA and glutamate uptake by cortical and hippocampal slices.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Chemicals

GABA and glutamic acid were from Sigma (St. Louis, MO, USA). 4-Amino-*n*-[2,3-<sup>3</sup>]butyric acid ([<sup>3</sup>H]GABA) (specific activity 94 Ci/mmol) and L-[2,3-<sup>3</sup>H] glutamic acid ([<sup>3</sup>H]Glu) (specific activity 49 Ci/mmol) were from Amersham International (Berkingshamshire, UK). All other reagents used were of analytical grade.

### 2.2. Animals and diets

Female Wistar rats were mated and maintained at 22 °C on a controlled 12:12 h light–dark cycle. A group of pregnant rats (G<sub>25</sub>—control group) was fed a 25% casein, whereas other group (G<sub>7</sub>) was fed a 7% casein diet, a high quality protein, which avoids additional effects of protein of low quality [23,75]. Both diets, given at libitum, were supplemented with 0.15% L-methionine, were isocaloric and contained similar amounts of fat (15%), cellulose (1%), minerals (4%) and vitamins (1.5%), as recommended by the Association of Official Analytical Chemists [30] and were maintained during the gestation and lactation (Table 1). After birth (postnatal 1—the day of birth was counted as postnatal day 0), litters size were adjusted to

Table 1  
Nutritional composition of diets

Component (g/kg/diet)	Casein Diet	
	25%	7%
Casein (87% protein) <sup>a</sup>	287	80.5
Fat (soybean oil)	150	150
Carbohydrate (corn starch)	501.5	708
Salt mix <sup>b</sup>	40	40
Vitamin mix <sup>c</sup>	10	10
Non-nutritive fiber	10	10

Salt and vitamin compositions are according to Horwitz [30]. Energy for both diets: 4.3 kcal/g diet in both diets.

<sup>a</sup> Casein, purity 87% (from Farmaquímica, Porto Alegre, Brazil) supplemented with 0.15% L-methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil).

<sup>b</sup> Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil) mg/100 g of ration: NaCl, 557; KI, 3.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1556; MgSO<sub>4</sub>, 229; CaCO<sub>3</sub>, 1526; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 108; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 16; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.2; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 1.9; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.09.

<sup>c</sup> Vitamin mixture (from Roche), mg/100 g of ration: Vitamin A, 4; Vitamin D, 0.5; Vitamin E, 10; Menadione, 0.5; Choline, 200; PABA, 10; Inositol, 10; Niacin, 4; Pantothenic acid, 4; Riboflavin, 0.8; Thiamin, 0.5; Pyridoxine, 0.5; Folic acid, 0.2; Biotin, 0.04; Vitamin B12, 0.003.

eight pups per dam, and at 21 days of age, offspring were weaned onto their respective dams diet until P25. The handling and care of the animals were conducted according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

### 2.3. Body and brain weights

Body weights were recorded weekly and whole brain, cerebellum and hippocampus weights were recorded at P25.

### 2.4. Picrotoxin (PCT)-induced seizure

Picrotoxin (a racemic mixture of picrotin and the active agent picrotoxinin) is thought to bind within the ion channel [27,45], blocks the GABA-gated Cl<sup>-</sup> channel [6] decreasing the mean channel open time [54] and the mean number of opening per burst [68]. The model of GABA-related convulsions is often used to evaluate the effectiveness of anticonvulsive drugs [46]; in this case, the model was used to evaluate the functional state of the GABA system following protein restriction. Picrotoxin was diluted in saline buffered to pH 7.4, and injected at P25 (1 mL/kg) subcutaneously (s.c.) in several doses. After injection, the animals were observed for 60 min and seizures were classified as: (1) minimal seizures characterized by clonuses of head muscles and forelimbs, with righting ability preserved, and (2) major seizures usually beginning with running followed by a loss of posture accompanied by the tonic phase and, after some seconds, occurrence of long-lasting (*status epilepticus*) clonic seizures of all limbs [69]. For dose–response curve of picrotoxin-induced

seizures, only major seizures were considered. The seizure latency was considered the time for the first long-lasting (*status epilepticus*) clonic seizures of all limbs.

### 2.5. Quinolinic acid induced seizure

Quinolinic acid, an endogenous compound produced by the metabolism of tryptophan, which may over stimulate the glutamatergic system, is involved in the pathogenesis of various CNS disorders [58] including the etiology of epilepsy [29,44,58]. QA binds to NMDA channel receptors [59], allowing its activation [40], which increases the intracellular calcium levels [15]. Additionally, recent studies from our group (see also Stone [58]) have shown that QA affects several parameters of the glutamatergic system, once it: (i) decreases glutamate uptake by cultured astrocytes [63]; (ii) decreases glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain [62]; and (iii) stimulates synaptosomal glutamate release [63]. Accordingly, QA is used by our group for experimental over stimulation of the glutamatergic system [32,51,70].

Surgery was performed at P23 for both groups (G<sub>25</sub> and G<sub>7</sub>). The animals were anesthetized with ketamine (G<sub>25</sub>=90 mg/kg; G<sub>7</sub>=70 mg/kg) and xilasine (12 mg/kg for both groups) and placed in a stereotaxic apparatus. The skin of the skull was removed and a 27-gauge, 6-mm guide cannula was placed unilaterally at 1 mm above the lateral ventricle (AP: -0.5 mm; L: -1.5 mm; V: -3.0 mm from the skull surface). The cannula was fixed with acrylic cement, xylocain was applied around the cut and animals were allowed to recover for about 48 h. For intracerebroventricular (i.c.v.) quinolinic acid administration (1.0 µl) at P25, a 30-gauge, 7-mm cannula was fitted into the guide and connected by a polyethylene tube to a 5-µl Hamilton micro syringe. The tip of the infusion cannula protruded 1.0 mm beyond the guide cannula towards the lateral brain ventricle. The animals were observed after administration for 10 min in Plexiglas chambers for the occurrence of tonic–clonic seizures. After observations, methylene blue (0.5 µl) was injected and the animals without dye in the lateral brain ventricle were discarded.

### 2.6. [<sup>3</sup>H]GABA uptake by cerebral cortex and hippocampus slices

In order to determine the adequate GABA concentration and incubation time for uptake assays, slices of hippocampus and parietal cortex were incubated with 25, 50 and 100 µM GABA for 5, 10, 15 and 30 min (data not shown). Based upon these previous data, the GABA concentration and incubation time used in the following GABA uptake assays were 25 µM and 15 min, respectively.

The animals were divided into four groups: G<sub>25</sub>–vehicle; G<sub>25</sub>–picrotoxin; G<sub>7</sub>–vehicle; G<sub>7</sub>–picrotoxin. They were injected at P25 with vehicle or picrotoxin s.c. (lowest

concentration that produced convulsion in 100% of the animals), killed by decapitation 15, 25 or 60 min after s.c. administration of picrotoxin or vehicle, the brains were immediately removed and submerged in Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.2. Parietal cerebral cortices were dissected and coronal slices (0.4 mm) were obtained from the parietal area using a Mc Illwain tissue chopper. Slices were transferred to multiwell dishes and washed with 1.0 ml HBSS. The same procedure was undertaken for the hippocampal GABA uptake assay, except that hippocampal dissection and slices incubation were performed only 60 min after s.c. administration. The uptake assay was assessed by adding 25  $\mu$ M [ $^3$ H]GABA in 300  $\mu$ L HBSS, at 37 °C. Incubation was stopped after 15 min by three ice-cold washes with 1 ml HBSS immediately followed by addition of 0.5 N NaOH, which was kept overnight. Aliquots of lysate were taken for determination of intracellular content of [ $^3$ H]GABA through scintillation counting. Sodium independent uptake was determined by using *N*-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride, being subtracted from the total uptake to obtain the sodium-dependent uptake. The experiments were done in triplicate.

### 2.7. [ $^3$ H]Glutamate uptake by cerebral cortex and hippocampus slices

The animals were divided into six groups: G<sub>25</sub>-naive; G<sub>25</sub>-vehicle; G<sub>25</sub>-quinolinic acid; G<sub>7</sub>-naive; G<sub>7</sub>-vehicle; G<sub>7</sub>-quinolinic acid.

They were killed by decapitation at P25 10 min after i.c.v. QA (lowest concentration which produces convulsions in 100% of the animals) or vehicle administration. The brains were immediately removed and submerged in HBSS. Parietal cerebral cortices and hippocampi were dissected as described for the GABA uptake assay. Glutamate uptake assay, performed according to our previous reports [26] was assessed by adding 100  $\mu$ M [ $^3$ H]Glu [61] in 300  $\mu$ L HBSS, at 37 °C. Incubation was stopped after 7 min for cortex and 5 min for hippocampus by two ice-cold washes with 1 mL HBSS, immediately followed by addition of 0.5 N NaOH, which was kept overnight. Intracellular [ $^3$ H]Glu content was determined by scintillation counting and sodium-dependent uptake was obtained by subtraction of sodium-independent uptake from the total uptake (as for GABA uptake assay). Experiments were performed in triplicate.

Table 2  
Effect of early malnutrition on body growth of developing rats (body weight in grams)

Group	P1	P7	P14	P21	P25
G <sub>25</sub>	6.25 $\pm$ 0.10	16.02 $\pm$ 0.27	31.77 $\pm$ 0.42	49.03 $\pm$ 0.65	67.37 $\pm$ 0.79
G <sub>7</sub>	5.41 $\pm$ 0.09*	9.13 $\pm$ 0.18**	13.14 $\pm$ 0.63**	19.03 $\pm$ 0.92**	23.17 $\pm$ 0.87**

Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 40$ ).

\* Differs from control at the same age at  $P < 0.05$  (Student's *t*-test).

\*\* Differs from control at the same age at  $P < 0.01$  (Student's *t*-test).

Table 3

Effect of pre- and postnatal malnutrition on brain, cerebellum and hippocampus weight in P25 rats

Group	Whole brain (mg)	Cerebellum (mg)	Hippocampus (mg)
G <sub>25</sub>	1245.0 $\pm$ 38.7	235.0 $\pm$ 13.7	74.8 $\pm$ 2.0
G <sub>7</sub>	799.0 $\pm$ 50.8*	175.0 $\pm$ 7.3*	66.4 $\pm$ 1.4*

Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 14$ ).

\* Differs from control ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test).

### 2.8. Protein determination

Protein was assessed using the Peterson method [47]. Briefly, this method consists in a simplification of the protein assay method described by Lowry et al. [35], which include sodium dodecylsulfate in the presence of NaOH and allows for immediate solubilization from proteolipids.

### 2.9. Statistical analysis

Seizures data were expressed as % of animals presenting seizures, and latency data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. in seconds for the first long-lasting clonic seizures (*status epilepticus*) of all limbs. Body and cerebral weights, litter size and glutamate and GABA uptake data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis of the data was performed by (i) Fisher's exact test for comparison of occurrence seizures; (ii) Pearson's Correlation Coefficient for dose-dependent latency for seizures; (iii) ANOVA for multiple groups comparison, followed by the Duncan's post hoc test for the neurotransmitters uptake and (iv) Student's *t*-test for latency time for seizures between dose groups, body and cerebral structure weights.  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Body and brain weight

At postnatal day 1, the mean weight of rats in the malnourished group was significantly lower than control ( $P < 0.05$ ). This was evident through the pre-weaning period up to P25 ( $P < 0.01$ ) (Table 2). Likewise, at P25, whole cerebral, cerebellum and hippocampus from malnourished group weighed significantly ( $P < 0.05$ ) less (36%, 25% and 11%, respectively) than from controls (Table 3). The mean litter size did not differ significantly between the groups



with  $10.90 \pm 0.37$  pups/litter in the  $G_{25}$  and  $9.90 \pm 0.83$  pups in the  $G_7$  group ( $n=20$  in each group).

### 3.2. Picrotoxin-induced seizures

In order to investigate the effect of malnutrition on the convulsive effect of picrotoxin, a seizure response-curve for picrotoxin was performed, both in control and malnourished rats. Picrotoxin was injected s.c. in a dose range (3.2, 4.0, 4.8, 5.6 and 6.4 mg/kg), as shown in Fig. 1A. The lowest dose that induced *status epilepticus* in 100% of rats was different in each group: 4.8 mg/kg in malnourished rats and 5.6 mg/kg in control rats ( $P<0.05$ ). The convulsion latency was also lower in the malnourished group ( $P<0.05$ ) (Fig.

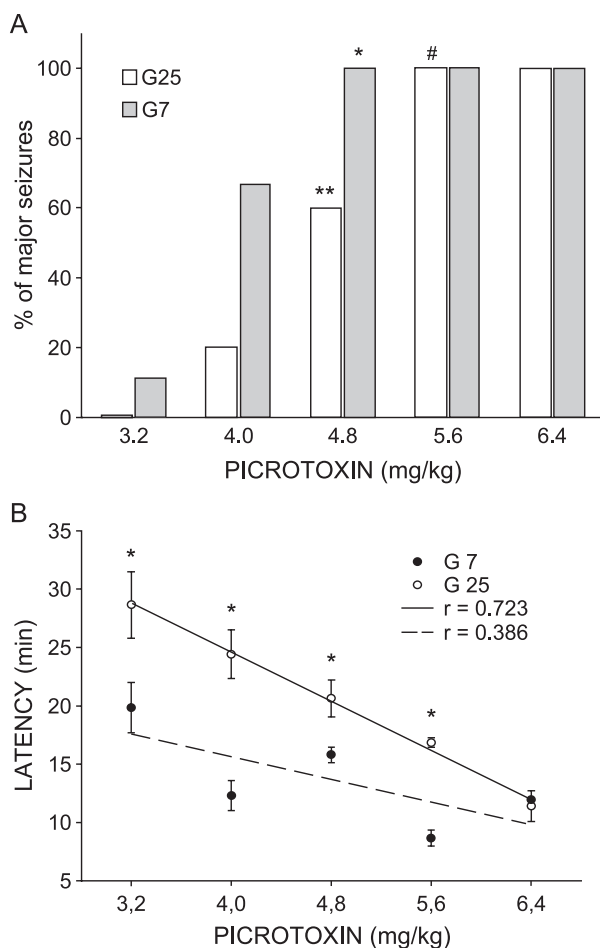


Fig. 1. (A) Picrotoxin-induced seizures. Rats were injected with picrotoxin and observed for 60 min for the presence of major seizures.  $n=9-10$  animals/group.  $^{\#}P<0.05$  as compared with  $G_{25}$  (3.2, 4.0, 4.8 mg/kg).  $^*P<0.05$  as compared with  $G_7$  (3.2 and 4.0 mg/kg).  $^{**}P<0.05$  as compared with  $G_7$  (4.8 mg/kg). Data are expressed as percentage of rats that presented major seizures and statistical analysis of the data was performed by Fisher's exact test. (B) Latency for picrotoxin-induced seizures. Rats were injected with picrotoxin and the seizure latency was considered the time for the first long-lasting (*status epilepticus*) clonic seizures of all limbs.  $n=9-10$  animals/group. Latency was expressed as mean  $\pm$  S.E.M.  $^*P<0.05$  significantly different from  $G_7$ , for the same dose ( $P<0.05$ , Student's  $t$ -test). Solid (—) and short dash (---) lines indicate the Pearson's correlation coefficient for dose-dependent latency for seizures.

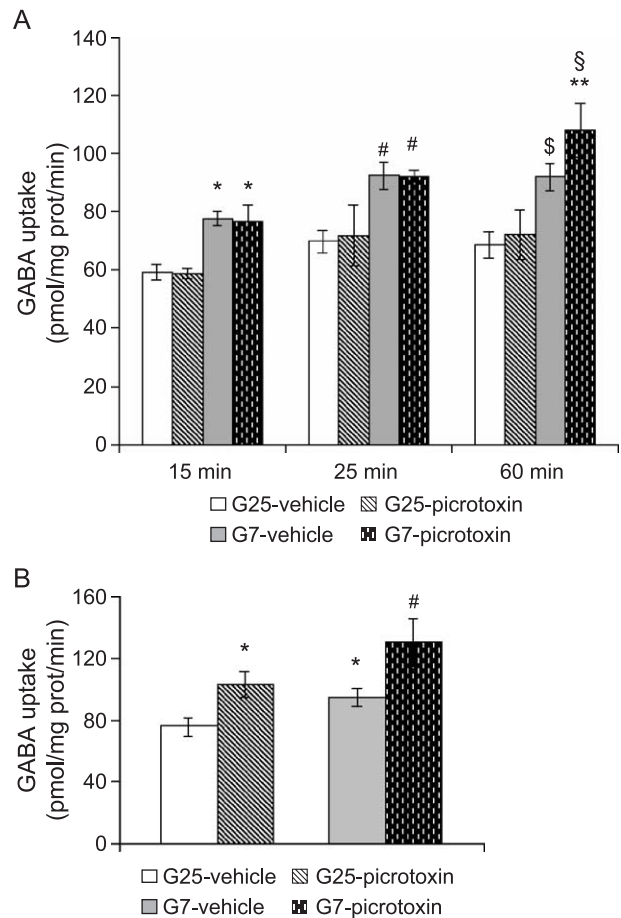


Fig. 2. (A) GABA uptake by cerebral parietal cortex slices of well- and malnourished rats. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. (bars) for six to eight animals of which slices were incubated 15, 25 and 60 min after picrotoxin injection. Experiments were done in triplicate. Significance of differences (one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test):  $^*P<0.05$  compared with  $G_{25}$ -vehicle and -picrotoxin 15 min;  $^{\#}P<0.05$  compared with  $G_{25}$ -vehicle and -picrotoxin 25 min;  $^{\S}P<0.05$  compared with  $G_{25}$ -vehicle 60 min;  $^{**}P<0.05$  compared with  $G_{25}$ -vehicle and -picrotoxin 60 min;  $^{\S}P<0.05$  compared with  $G_7$ -picrotoxin 15 min. (B) GABA uptake by hippocampus slices of well- and malnourished rats 60 min after picrotoxin or vehicle injection. Groups:  $G_{25}$ -vehicle;  $G_{25}$ -picrotoxin;  $G_7$ -vehicle;  $G_7$ -picrotoxin. Data are means  $\pm$  S.E.M. (bars) and obtained from three independent experiments, which were done in triplicate for eight animals per group. Significance of differences (one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test):  $^*P<0.05$  compared with  $G_{25}$ -vehicle;  $^{\#}P<0.05$  compared with  $G_7$ - and  $G_{25}$ -vehicle.

1B). Moreover, both groups displayed a dose-dependent latency time ( $r=0.723$ ,  $P<0.001$ ,  $G_{25}$ ;  $r=0.386$ ,  $P<0.05$ ,  $G_7$ ) (Fig. 1B).

### 3.3. [ $^3H$ ]GABA uptake

GABA uptake was performed in order to verify whether malnutrition and/or picrotoxin administration influenced GABA uptake by slices from cerebral cortex and hippocampus.

In cerebral cortex, we observed that malnutrition increased the uptake ( $P<0.05$ ) in all times spent after

vehicle/picrotoxin injection. Picrotoxin had no effect for any of the two groups (Fig. 2A). There was no difference in the GABA uptake for the same group at different incubation times except for the G<sub>7</sub>-picrotoxin group, i.e., picrotoxin effect was higher in cerebral cortical slices of malnourished rats which were incubated 60 min after picrotoxin injection in comparison with those which were incubated 15 min after picrotoxin (Fig. 2A).

In hippocampal slices (incubated only 60 min after picrotoxin/vehicle injection), malnutrition also increased GABA uptake. In this structure, however, picrotoxin increased GABA uptake for both malnourished and well-nourished rats (Fig. 2B).

### 3.4. Quinolinic-acid-induced seizures

In order to investigate the effect of malnutrition on the convulsing effect of QA, a seizure response-curve for QA was performed (in a dose range of 36, 72, 145, 194 and 242 nmol), as shown in Fig. 3. The lowest QA dose causing seizures in all animals was higher ( $P < 0.05$ ) in malnourished (242 nmol) than in the control group (145 nmol).

### 3.5. [<sup>3</sup>H]Glutamate uptake

Considering that astrocytic sodium-dependent glutamate transport is the most important process for maintaining extracellular glutamate concentrations below toxic levels [2,14] and that the QA-induced seizures is a pharmacological strategy to evaluate excitotoxicity by overstimulation of the glutamatergic system [58,62,63], here, we investigated the effect of malnutrition on [<sup>3</sup>H]Glu uptake by slices from cerebral cortex and hippocampus, 10 min after

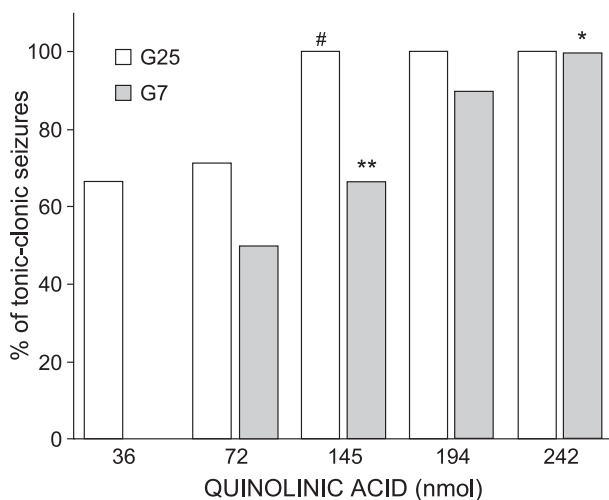


Fig. 3. Quinolinic-acid-induced seizures. Rats were injected with quinolinic acid and observed for 10 min for the presence of tonic-clonic seizures.  $n=8-10$  animals/group. # $P < 0.05$  as compared with G<sub>25</sub> (72 and 36 nmol). \* $P < 0.05$  as compared with G<sub>7</sub> (72 and 145 nmol). \*\* $P < 0.05$  as compared with G<sub>25</sub> (145 nmol). Data are expressed as percentage of rats that presented tonic-clonic seizures and statistical analysis of the data was performed by Fisher's exact test.

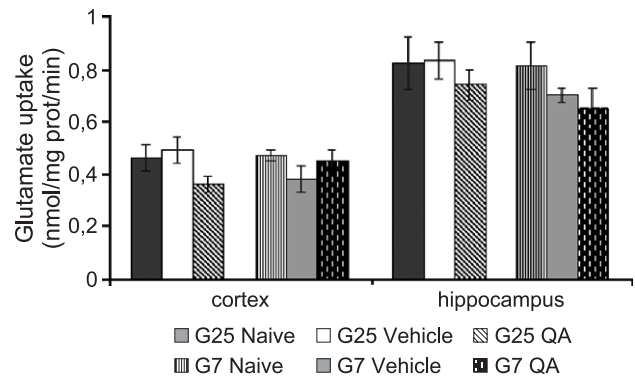


Fig. 4. Glutamate uptake by rat cerebral parietal cortex and hippocampus slices 10 min after QA or vehicle injection. Incubation time: 7 and 5 min, respectively. Groups: G<sub>25</sub>-naive; G<sub>25</sub>-vehicle; G<sub>25</sub>-QA; G<sub>7</sub>-naive; G<sub>7</sub>-vehicle; G<sub>7</sub>-QA. Data are means  $\pm$  S.E.M. and obtained from four independent experiments, which were done in triplicate for 12 animals/group for cortex uptake. Hippocampus uptake experiments were done also in triplicate for 6 animals/group in two independent experiments. There was no difference between groups in the same cerebral structure using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

QA i.c.v. injection. There was neither effect of malnutrition nor QA in any of those cerebral structures (Fig. 4).

## 4. Discussion

Body and cerebral weight gain in malnourished animals is reduced by dams protein restriction during gestation and lactation periods followed by pups protein restriction [19,7] a finding which was also supported by what was observed in our model.

In this work, malnourished rats were more sensitive to the convulsing action of picrotoxin (Fig. 1A and B) than control rats. Several studies with recombinant receptors [38,55,71] or animal models with specific GABA<sub>A</sub> receptor gene-knockout or knock-in strategy [31,34,39,60] indicate that the subunit composition confers a unique pharmacological profile and that alterations in subunit-specific genes expression may contribute to alterations in GABA<sub>A</sub> receptor function [57]. Besides, the sensitivity to picrotoxin is notably enhanced in GABA<sub>A</sub> receptors lacking  $\alpha$ -subunits; in contrast,  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ -expressing receptors are relatively less sensitive to picrotoxin than  $\beta$   $\gamma$ -expressing receptors [6]. Steiger et al. [56,57] showed selective changes in GABA<sub>A</sub> receptor mRNA levels in RNA derived from hippocampal formation and septum, but not from the neocortex in prenatally malnourished rats. Although differences in  $\alpha$ -subunit mRNA expression in hippocampus were not found by Steiger et al. [57] in 30-day-old rats and only in adult rats, a significant  $\beta_2$  upregulation was found in 30-day-old rats. In an attempt to explain the higher sensitivity of malnourished rats to picrotoxin, it is reasonable to speculate that protein malnutrition induced alterations in GABA<sub>A</sub> receptor subunit [56,57] and that the different profiles of picrotoxin inhibitory characteristics across several GABA<sub>A</sub>

receptors subunit configurations [6,53] may underlie our findings. This higher sensitivity to picrotoxin in 25-day-old malnourished rats, in its turn, could be related to this upregulation. This interpretation, however, must be cautiously considered, since the regional and ontogenic differences showed by Steiger et al. [56,57] in malnourished rats may be reproduced in other brain structures and other factors may also be involved.

The higher basal GABA uptake levels on hippocampal and cerebral cortex slices induced by malnutrition (Fig. 2A and B) can be associated with the higher sensitivity to the convulsing action of picrotoxin (Fig. 1), since the higher uptake of GABA could decrease extracellular GABA levels, leading to the observed increase in the sensitivity to picrotoxin. In that respect, recently, Zhao et al. [76] have found increased picrotoxin-induced seizure in overexpressing GABA transporter (GAT)-1 transgenic mice, which suggests that GABA transporters might play an important role in epileptogenesis.

As picrotoxin increased hippocampal GABA uptake in both control and malnourished rats while it had no effect on GABA cortical uptake, we could assume that: (i) malnutrition affects different structures in many ways and/or intensity, with hippocampus being severely affected [3,4,10,33,43] and (ii) a distinct regional pattern of neuronal involvement in PCT-induced seizures is suggested [48,73].

Moreover, the developmental profile of GATs, which can contribute to determine the factors that regulate the development of GABA-mediated signaling, could also be considered. The reason for such an assumption is that the maturation of GAT-1, which appears to be the quantitatively prevalent GABA transporter [52], reaches adult pattern only at P30–45 [74] and early in the development GAT-3 probably accounts for the largest fraction of GABA transport in the neonatal cortex [41], whereas GAT-2 is low at early postnatal ages and did not change significantly during postnatal development [41]. This ontogenic pattern, which is under study in our group, may be altered by malnutrition that, in turn, could lead to the observed effects on GABA uptake in our study. Alternatively, malnutrition could have altered the number of functional transporters, which may be considered to explain the observed effects on GABA uptake.

In contrast to the higher sensitivity to the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin (Fig. 1), malnutrition induced lesser sensitivity to the convulsant action of the NMDA-agonist QA (Fig. 3). Malnourished rats at P25 required higher QA doses to promote convulsing effect than well-nourished ones (Fig. 3). The findings from Rotta et al. [49] showing that chronic malnutrition decreases the sensitivity to QA-induced seizures at P75 denote that early nutritional insult on this parameter is not reverted by aging, when protein deprivation keeps on. Considering both studies, we cannot affirm that perinatal nutritional deprivation effect on this parameter is long lasting but that this period being decisive to unchain it.

The decreased glutamate binding in brain from P75-day-old malnourished rats also described by our group [49] points to a decrease in the glutamatergic activity which, in turn, could explain the lesser sensitivity of adult rats to QA. Consequently, this result may be considered as a possible explanation for our findings with P25-day-old malnourished rats, since reduced Na<sup>+</sup>-independent [<sup>3</sup>H]glutamate binding in cellular membranes were also observed by our group in P21-day-old malnourished rats (unpublished data).

The glutamate uptake was not affected by malnutrition (as well as observed by our group for 21-day-old rats in parietal cortex slices, unpublished data), nor by QA i.c.v injection both in cerebral parietal cortex and hippocampal slices (Fig. 4), apparently ruling out this parameter as a cause of the altered sensitivity to QA.

In this paper, we observed a distinct pharmacological profile induced by malnutrition, demonstrated by the higher sensitivity to the convulsing action of picrotoxin and lower sensitivity to the convulsing action of QA. Additionally, malnutrition increased the GABA uptake by cortical and hippocampal slices, with no effect on glutamate uptake. These results together and the knowledge that dynamic interaction of excitatory and inhibitory inputs are involved in brain functions, lead us to speculate that, by affecting this interaction, malnutrition could modify the sensitivity to drugs, including those used with therapeutic purposes. Further understanding of regulatory mechanism may provide pharmacological target by which neurotransmission may be manipulated providing novel therapeutic issues in neurological disorders in a context of malnutrition.

## Acknowledgments

We are grateful to Blanver-Farmoquimica for providing the fiber used in diet composition. This research was supported by: CNPq, FINEP, CAPES, PROSPEQ/UFRFGS, FAPERGS and PRONEX (41960904-366/96 to D.O.G. Souza).

## References

- [1] S.S. Almeida, J. Tonkiss, J.R. Galler, Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20 (1996) 389–402.
- [2] C.M. Anderson, R.A. Swanson, Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions, *Glia* 32 (2000) 1–14.
- [3] K.S. Bedi, Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.* 311 (1991) 425–433.
- [4] K.S. Bedi, Early-life undernutrition causes deficits in rat dentate gyrus granule cell number, *Experientia* 47 (1991) 1073–1074.
- [5] P.V. Belan, P.G. Kostyuk, Glutamate-receptor-induced modulation of GABAergic synaptic transmission on the hippocampus, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 444 (2002) 26–37.

- [6] C.L. Bell-Horner, M. Dibas, R. Huang, J.A. Drewe, G.H. Dillon, Influence of subunit configuration on the interaction of picrotoxin-site ligands with recombinant GABA<sub>A</sub> receptors, *Mol. Brain Res.* 76 (2000) 47–55.
- [7] N. Bennis-Taleb, C. Remacle, J.J. Hoett, B. Reusens, A low protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring, *J. Nutr.* 129 (1999) 1613–1619.
- [8] C.M. Borghese, N.E. Córdoba, C.H. Laino, O.A. Orsingher, M.C. Rubio, V. Niselman, Lack of tolerance to the anxiolytic effect of diazepam and pentobarbital following chronic administration in perinatally undernourished rats, *Brain Res. Bull.* 46 (1998) 237–244.
- [9] J.D. Brioni, N. Córdoba, O.A. Orsingher, Decreased reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats, *Behav. Brain Res.* 34 (1989) 159–162.
- [10] L. Cintra, S. Diaz-Cintra, A. Galvan, T. Kempner, P.J. Morgane, Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups, *Brain Res.* 532 (1990) 271–277.
- [11] L. Cintra, L. Granados, A. Aguilar, T. Kempner, W. DeBassio, J. Galler, P.J. Morgane, P. Duran, S. Diaz-Cintra, Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups, *Hippocampus* 7 (1997) 184–191.
- [12] M.E. Cordero, E. D'Acuña, S. Benveniste, R. Prado, J.A. Nuñez, M. Colombo, Dendritic development in neocortex of infants with early postnatal life undernutrition, *Pediatr. Neurol.* 9 (1993) 457–464.
- [13] N.E. Cordoba, C.M. Borghese, M.P. Arolfo, O.A. Orsingher, 1996 Reduced tolerance to certain pharmacological effects of ethanol after chronic administration in perinatally undernourished rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57 (1996) 659–663.
- [14] N.C. Danbolt, 2001 Glutamate uptake, *Prog. Neurobiol.* 65 (2001) 1–105.
- [15] L.C. Daniell, *N*-Methyl-D-aspartate increases cytoplasmic free calcium in mouse hippocampus, *Neuropharmacology* 30 (1991) 539–545.
- [16] W.A. Debassio, T.L. Kemper, J.R. Galler, J. Tonkiss, Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cells generation in the hippocampal formation, *Brain Res. Bull.* 35 (1994) 57–61.
- [17] W.A. Debassio, T.L. Kemper, J. Tonkiss, J.R. Galler, Effect of prenatal deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus, *Brain Res. Bull.* 41 (1996) 379–383.
- [18] A.R. Del Angel-Mesa, L. Ramírez-Cortes, I.G. Adame-González, I. Burgos González, C. Beas-Zárate, Cerebral GABA release and GAD activity in protein- and tryptophan-restricted rats during development, *Int. J. Dev. Neurosci.* 20 (2002) 47–54.
- [19] M. Desai, N.J. Crowther, A. Lucas, C.N. Hales, Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers, *Br. J. Nutr.* 76 (1996) 591–603.
- [20] S. Diaz-Cintra, L. Cintra, A. Galvan, A. Aguilar, T. Kempner, P.J. Morgane, Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentate, *J. Comp. Neurol.* 310 (1991) 356–364.
- [21] S. Diaz-Cintra, M. Garcia-Ruiz, G. Corkidi, L. Cintra, Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages, *Brain Res.* 662 (1994) 117–126.
- [22] A.G. Diop, H.M. de Boer, C. Mandlhate, L. Prilipko, H. Meinardi, The global campaign against epilepsy in Africa, *Acta Trop.* 87 (2003) 149–159.
- [23] P.O. Egwin, B.H. Cho, F.A. Kummerow, Effects of postnatal protein undernutrition on myelination in rat brain, *Comp. Biochem. Physiol.*, A 83 (1986) 67–70.
- [24] T.A. Fiacco, C. Fitzgerald, G.J. Blatt, D.L. Rosene, J.R. Galler, Effects of prenatal protein malnutrition on excitatory aminoacids receptors in rat hippocampus, entorhinal cortex, and neocortex, *Soc. Neurosci.* 24 (1998) (Abst #42.10), p 94.
- [25] T.A. Fiacco, D.L. Rosene, J.R. Galler, G.J. Blatt, Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition, *J. Comp. Neurol.* 456 (2003) 350–360.
- [26] M.E.S. Frizzo, D.R. Lara, A.S. Prokopiuk, C.R. Vargas, C.R. Salbego, M. Wajner, D.O. Souza, Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal an excitotoxic conditions, *Cell. Mol. Neurobiol.* 22 (2002) 353–363.
- [27] D. Gurley, J. Amin, P.C. Ross, D.S. Weiss, G. White, Point mutations in the M2 region of the alpha, beta or gamma subunit of the GABA<sub>A</sub> channel that abolish block by picrotoxin, *Recept. Channels* 3 (1995) 13–20.
- [28] R. Hackett, T. Iype, Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries, *Seizure* 10 (2001) 554–558.
- [29] M.P. Heyes, A.R. Wyler, O. Devinsky, J.A. Yergey, S.P. Markey, N.S. Nadi, Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures, *Epilepsia* 31 (1990) 172–177.
- [30] W. Horwitz, Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists AOAC, 1980 Washington, DC, USA.
- [31] J.E. Kralic, E.R. Korpi, T.K. O'Bucley, G.E. Homanics, A.L. Morrow, Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 1037–1045.
- [32] D.R. Lara, A.P. Schmidt, M.E. Frizzo, J.S. Burgos, G. Ramirez, D.O. Souza, Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents, *Brain Res.* 912 (2001) 176–180.
- [33] D.A. Levitsky, B.J. Strupp, Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns, *J. Nutr.* 125 (1995) 2212S–2220S.
- [34] K. Low, F. Crestani, R. Keist, D. Benke, I. Brunig, J.A. Benson, J.M. Fritschy, T. Rulicke, H. Bluethmann, H. Mohler, U. Rudolph, Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety, *Science* 290 (2000) 131–134.
- [35] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [36] J. Luebke, J. St. John, J.R. Galler, Prenatal protein malnutrition results in increased frequency of miniature inhibitory synaptic currents in rat CA1 pyramidal cells, *Synapse* 37 (2000) 23–31.
- [37] N.V. Lukoyanov, J.P. Andrade, Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation, *Behav. Brain Res.* 112 (2000) 85–97.
- [38] R.L. McDonald, R.W. Olsen, GABA receptor channels, *Annu. Rev. Neurosci.* 17 (1994) 569–602.
- [39] R.M. McKernan, T.W. Rosahi, D.S. Reynolds, C. Sur, K.A. Wafford, J.R. Atack, S. Farrar, J. Myers, G. Cook, P. Ferris, L. Garret, L. Bristow, G. Marshall, A. Macaulay, N. Brown, O. Howell, K.W. Moore, R.W. Carling, L.J. Street, J.L. Castro, C.I. Ragan, G.R. Dawson, P.J. Whiting, Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype, *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 587–592.
- [40] J.G. McLarnon, K. Curry, Quinoleate activation of *N*-methyl-aspartate ion channels in rat hippocampal neurons, *Neurosci. Lett.* 116 (1990) 341–346.
- [41] A. Minelli, P. Barbaresi, F. Conti, Postnatal development of high-affinity plasma membrane transporters GAT2 and GAT3 in the rat cerebral cortex, *Dev. Brain Res.* 142 (2003) 7–18.
- [42] P.J. Morgane, R. Austin-LaFrance, J. Bronzino, J. Tonkiss, S. Diaz-Cintra, L. Cintra, T. Kempner, J.R. Galler, Prenatal malnutrition and development of the brain, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17 (1993) 91–128.
- [43] J.P. Morgane, D.J. Mokler, J.R. Galler, Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26 (2002) 471–483.
- [44] K. Nakano, S. Takahashi, M. Mizobuchi, T. Kuroda, K. Masuda, J. Kitoh, High levels of quinolinic acid in brain of epilepsy-prone E1 mice, *Brain Res.* 619 (1993) 195–198.



- [45] C.F. Newland, S.G. Cull-Candy, On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurons of the rat, *J. Physiol.* 447 (1992) 191–213.
- [46] D. Pericic, H. Manev, M. Bujas, Gonadal hormones and picrotoxin-induced convulsions in male and female rats, *Brain Res.* 736 (1996) 174–179.
- [47] G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346–356.
- [48] K. Rajasekaran, R. Jayakumar, K. Venkatachalam, Increased neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity triggers picrotoxin-induced seizures in rats and evidence for participation of nNOS mechanism in the action of antiepileptic drugs, *Brain Res.* 979 (2003) 85–97.
- [49] L.N. Rotta, A.P. Schmidt, T. Mello e Souza, C.W. Nogueira, K.B. Souza, I.A. Izquierdo, M.L.S. Perry, D.O. Souza, Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain, *Neurochem. Res.* 28 (2003) 1181–1186.
- [50] P. Saransaari, S.S. Oja, Characteristics of GABA release modified by glutamate receptors in mouse hippocampal slices, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 453–459.
- [51] A.P. Schmidt, D.R. Lara, J.F. Maraschin, A.S. Perla, D.O. Souza, Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice, *Brain Res.* 864 (2000) 40–43.
- [52] A. Schousboe, Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission, *Neurochem. Res.* 28 (2003) 347–352.
- [53] A. Semyanov, D.M. Kullmann, Relative picrotoxin insensitivity distinguishes ionotropic GABA receptor-mediated IPSCs in hippocampal interneurons, *Neuropharmacology* 43 (2002) 726–736.
- [54] G. Sierra-Paredes, J. Galán-Valiente, M.D. Vázquez-Illanes, E. Aguillar-Veiga, R. Soto-Otero, E. Mendez-Alvarez, G. Sierra-Marcuño, Extracellular amino acids in the rat hippocampus during picrotoxin threshold seizures in chronic microdialysis experiments, *Neurosci. Lett.* 248 (1998) 53–56.
- [55] F. Sigel, R. Baur, G. Trube, H. Moler, P. Malherbe, The effect of subunit composition of rat brain GABA<sub>A</sub> receptors on channel function, *Neuron* 5 (1990) 703–711.
- [56] J.L. Steiger, J.R. Galler, D.H. Farb, S.J. Russek, Prenatal protein malnutrition reduces  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  and  $\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the adult septum, *Eur. J. Pharmacol.* 446 (2002) 201–202.
- [57] J.L. Steiger, M.J. Alexander, J.R. Galler, D.H. Farb, S.J. Russek, Effects of prenatal malnutrition on GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  and  $\beta_2$  mRNA levels, *NeuroReport* 13 (2003) 1731–1735.
- [58] T.W. Stone, Kynurenes in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance, *Prog. Neurobiol.* 64 (2001) 185–218.
- [59] T.W. Stone, M.N. Perkins, Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in rat CNS, *Eur. J. Pharmacol.* 72 (1981) 411–412.
- [60] C. Sur, K.A. Wafford, D.S. Reynolds, K.L. Hadingham, F. Bromidge, A. Macaulay, N. Collison, G. O'Meara, O. Howell, R. Newman, J. Myers, J.R. Attack, G.R. Dawson, R.M. McKernan, P.J. Whiting, T.W. Rosahl, Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice, *J. Neurosci.* 21 (2001) 3409–3418.
- [61] R.A. Swanson, J. Liu, J.W. Miller, J.D. Rothstein, K. Farrell, B.A. Stein, N.C. Longuemare, Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes, *J. Neurosci.* 17 (1997) 932–940.
- [62] R.G. Tavares, C.I. Tasca, C.E.S. Santos, M. Wajner, D.O. Souza, C.S. Dutra-Filho, Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain, *NeuroReport* 27 (2000) 249–253.
- [63] R.G. Tavares, C.I. Tasca, C.E.S. Santos, L.B. Alves, L.O. Porciuncula, T. Emanuelli, D.O. Souza, Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes, *Neurochem. Int.* 40 (2002) 621–627.
- [64] S. Telang, G. Fuller, R. Wiggins, S.J. Enna, Early undernutrition and [<sup>3</sup>H]γ-aminobutyric acid binding in rat brain, *J. Neurochem.* 43 (1984) 640–645.
- [65] J. Tonkiss, J. Galler, P.J. Morgane, J.D. Bronzino, R.J. Austin-LaFrance, Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 678 (1993) 215–227.
- [66] J. Tonkiss, S.S. Almeida, J.R. Galler, Prenatally malnourished female but not male rats show increased sensitivity to MK-801 in a DRL-task, *Behav. Pharmacol.* 9 (1998) 49–60.
- [67] J. Tonkiss, M. Trzcinska, P. Schultz, M. Vincitore, J.R. Galler, Prenatally protein malnourished rats are less sensitive to the amnesic effects of medial septal infusions of chlordiazepoxide, *Behav. Pharmacol.* 11 (2000) 437–446.
- [68] E. Twyman, C.J. Rogers, R.L. MacDonald, Pentobarbital and picrotoxin have reciprocal actions on single GABA<sub>A</sub> receptor channels, *Neurosci. Lett.* 96 (1989) 89–95.
- [69] J. Veliskova, L.S. Velisek, Picrotoxin-induced tonic-clonic seizures and lethality are decreased by MK-801 in developing rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43 (1992) 291–295.
- [70] E.R. Vinadé, A.P. Schmidt, M.E. Frizzo, I. Izquierdo, E. Elisabetsky, D.O. Souza, Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice, *Brain Res.* 977 (2003) 97–102.
- [71] C. White, D.A. Gurley, Alpha subunits influence Zn block of gamma 2 containing GABA<sub>A</sub> receptor currents, *NeuroReport* 6 (1995) 461–464.
- [72] R.C. Wiggins, G. Fuller, S.J. Enna, Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems, *Life Sci.* 35 (1984) 2085–2094.
- [73] J.O. Willoughby, L. Mackenzie, A. Medvedev, J.J. Hiscock, Distribution of Fos-positive neurons in cortical and subcortical structures after picrotoxin-induced convulsions varies with seizure type, *Brain Res.* 683 (1995) 73–87.
- [74] X.X. Yan, W.A. Cariaga, C.E. Ribak, Immunoreactivity for GABA plasma membrane transporter, GAT-1, in the developing rat cerebral cortex: transient presence in the somata of neocortical and hippocampal neurons, *Dev. Brain Res.* 99 (1997) 1–19.
- [75] H. Yokogoshi, K. Hayase, A. Yoshida, The quality and quantity of dietary protein affect brain protein synthesis in rats, *J. Nutr.* 122 (1992) 2210–2217.
- [76] W.J. Zhao, Y.H. Ma, J. Fei, Z.T. Mei, L.H. Guo, Increase in drug-induced seizure susceptibility of transgenic mice overexpressing GABA transporter-1, *Acta Pharmacol. Sin.* 24 (2003) 991–995.

# **Modified Malnutrition-Induced Developmental Pattern on the Effect of GABA Uptake Inhibitors in Rats**

**Ingrid D. Schweigert<sup>1,2</sup>, Lúcia Vinadé<sup>1</sup>, Fabiane da Costa<sup>1</sup>, Fernanda S. Gravina<sup>1</sup>, Cristina Kawano<sup>1</sup>, Lisiane G. Londero<sup>1</sup>, Juliana M. Rodrigues<sup>1</sup>, Diogo O. Souza<sup>1</sup> and Marcos L. S. Perry<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>**Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;**

<sup>2</sup>**Departamento de Ciências da Saúde, UNIJUÍ, Ijuí, RS, Brazil.**

**\*Corresponding author:**

**Marcos L. S. Perry**

Departamento de Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Ramiro Barcelos, 2600 anexo  
CEP 90035-003 – Porto Alegre – RS – Brazil  
Phone: +55 51 3316 5551  
Fax: +55 51 3316 5540  
E-mail: [mlsperry@excite.com](mailto:mlsperry@excite.com)

## ABSTRACT

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) where its action is terminated by high affinity transporters (GATs) located in GABAergic neurons and surrounding glial cells. GAT-1 and GAT-3 are the major GABA transporters. GAT-1 is expressed primarily in cortical neurons of adult rats, whereas GAT-3 is expressed mostly in astrocytes. However, GAT-3 in neonate rats is also found in neurons where it probably accounts for the largest fraction of GABA transport at this age. Several steps of brain development, including ontogenic changes in the GABAergic system are altered by protein malnutrition. Thus, considering that GATs are predominantly glial or neuronal with a described developmental profile of expression and that malnutrition affects the GABAergic system, we are interested whether malnutrition could lead to altered developmental GATs expression pattern or not. We assess the effect of gestational and postnatal malnutrition on GABA uptake in slices of cerebral cortex at P7, P25 and P75-80, in the presence of specific GATs inhibitors:  $\beta$ -alanine (GAT-3 antagonist) and L-DABA (classical inhibitor of neuronal GABA transport with high affinity for GAT-1 and GAT-2, but less potent for GAT-3). In addition, immunodetection of GAT-3 and GAT-1 in cerebral crude membrane preparation was assessed. The results obtained with inhibitors showed a unique developmental profile of GATs expression. GABA uptake in P7 control rats exceeds adult levels and decline towards adult activity by P25, whereas malnutrition causes an altered profile. Malnourished rats maintained a high level of GABA uptake until P25 with an apparent delayed decline toward adult values (P75), where it reached a similar lower level between groups.  $\beta$ -alanine inhibited GABA uptake significantly in P7 control rats, this inhibition decreased as maturation proceeded, i.e., it is lower at P25 reaching here the adult pattern of P75. On the other hand, L-DABA inhibited GABA uptake at the same manner in an ontogenic and nutritional point of view. Malnourished rats showed higher GAT-3 immunocontent in membrane preparation at P7, but did not show any difference in GAT-1 at this stage. Altogether these results may indicate that high GABA uptake in malnourished rats is predominantly due to GAT-3 at early stages.

**Keywords:** Malnutrition, GABA uptake, GATs, cerebral cortex, ontogeny.

## 1 INTRODUCTION

Besides biosynthesis, release and receptor interaction, the inactivation of gamma-aminobutyric acid (GABA) transmission by high affinity transporters (GATs) in GABAergic neurons and surrounding glial cells is a required condition for a physiological activity of the brain (reviewed in Gadea and Lopez-Colome, 2001; Cherubini and Conti, 2001). Four  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dependent high affinity plasma membrane transporters have been cloned and characterized: GAT-1, GAT-2, GAT-3 and BGT-1 (Guastella et al., 1990; López-Corcuera et al., 1992; Liu et al., 1992, 1993; Borden, 1996; Borden et al., 1992, 1994, 1995; Clark et al. 1992). GAT-1 and GAT-3 are exclusively expressed in the brain and are the major GABA transporters in the central nervous system (CNS) (Durkin et al., 1995; Ikegaki et al., 1994; Minelli et al., 1995, 1996; Yan and Ribak, 1998, Dalby, 2003; Chatton, et al., 2003; Liu et al, 1993).

GAT-1, the most abundant GABA transporter in adult rat cerebral cortex, is primarily located in neurons, but is also present in glial cells (Gadea and Lopez-Colome, 2001; Minelli et al., 1995). GABA transport mediated by GAT-1 on the development of cortical transmission is synchronized with other GABAergic presynaptic proteins, such as, the enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD), the vesicular transporter VGAT and the  $\alpha 1$  subunit of  $\text{GABA}_A$  receptor (as reviewed in Conti et al., 2004). GAT-3 appears to be preferentially expressed in astroglial cells of adult rats (Minelli et al., 1996, 2003a; DeBiasi, 1998; Ribak et al., 1996 a, b). Although GAT-3 is expressed in astrocytes in the adult neocortex, at perinatal ages it is specially found in cortical GABAergic neurons (Minelli et al, 2003). At this age, the level of released GABA is high and it may act as a trophic factor for neuronal development via GAT-3 - mediated reversal transport (as reviewed in Conti et al, 2004). In addition, GAT-3 is abundantly expressed at the same cortical layers where  $\text{GABA}_A$  receptors are densest, suggesting yet a trophic action through a receptor – mediated mechanism.

Moreover, the developmental profile of GATs can contribute to determine the factors regulating the development of GABA-mediated signaling. Studies using immunoreactivity show that the maturation of GAT-1 reaches adult pattern only a P30-45 (Yan, et al., 1997), whereas GAT-3 increased rapidly in the first week and reached adult

pattern at P20. Thus, early in development GAT-3 probably accounts for the largest fraction of GABA transport in the neonatal cortex (Minelli et al., 2003).

It is well known that early protein malnutrition adversely affects CNS maturation (Morgane et al., 1993, 2002; Levitsky and Strupp, 1995). Several ontogenic steps of brain development including neuronal proliferation and migration, brain growth spurt and myelination are altered by protein malnutrition (Gressens et al. 1997). In a model of early protein malnutrition, i.e., first two weeks of gestation – mimicking an acute nutritional insult that may occur in early pregnancy, Gressens et al. (1997) observed abnormal brain developmental pattern with delayed astrocytogenesis, decreased programmed cell death (a critical developmental step necessary for normal brain development), abnormal synaptogenesis and neuronal differentiation. Del Angel-Meza and collaborators (2001) showed a delay in granule cell migration in cerebellar cortex of rats submitted to different models of malnutrition. Regarding the GABAergic system, there is accumulating evidences for significant alterations in response to malnutrition, including ontogenic changes in the mRNA level of configuration of certain GABA<sub>A</sub> receptors subunits (Steiger et al, 2003; 2002). A delayed developmental pattern of GAD activity was also observed by Del Angel-Meza and collaborators (2002).

Considering that four identified GATs are predominantly glial or neuronal, that there is a developmental profile of GATs expression and evidences that malnutrition affects the GABAergic system in many ways, arises the question if malnutrition could lead to an altered developmental GATs expression pattern. To investigate this question we use two selective GATs inhibitors:  $\beta$ -Alanine, a potent GAT-3 antagonist and L-DABA (L-diaminobutyric acid), which displays high affinity for GAT-1 as well as GAT-2, but is less potent for GAT-3 (Borden et al., 1992) and is classically used as a general inhibitor of neuronal GABA transport (Schousboe, 2003). We assessed the effect of these transporter inhibitors on GABA uptake in cerebral parietal cortex slices from gestational and postnatal malnourished rats at P7, P25 and P75-80.

## **2 EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **2.1 Chemicals**

$\gamma$ -amino-n-butyric acid (GABA), L-2,4-diamino-n-butyric acid (L-DABA) and 3-aminopropionic acid ( $\beta$ -Alanine) were from Sigma (St. Louis; USA). The radioisotope 4-Amino-n-[2,3-<sup>3</sup>] butyric acid (specific activity 94 Ci/mmol) was from Ammersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire,UK). Anti-GAT-1 and anti-GAT-3 polyclonal antibodies were from Chemicon International (Temecula, CA). All other reagents used were of analytical grade.

## **2.2 Animals and diet**

Female Wistar rats were mated and maintained at 22°C on a controlled 12 h light-dark cycle. A group of pregnant rats (G<sub>25</sub>- control group) was fed a 25% casein diet, whereas the other group (G<sub>7</sub>- malnourished group) was fed a 7% casein diet (Schweigert et al., 2004, 2005). Both diets were *ad libitum*, supplemented with 0.15% L-methionine, isocaloric and contained similar amounts of fat (15 %), cellulose (1%), minerals (4%) and vitamins (1.5%), as recommended by the Association of Official Analytical Chemist (Horwitz, 1980). The diets were maintained during gestation and lactation. After birth (postnatal 1- the day of birth of rats was counted as postnatal day 0), litters size were adjusted to 8 pups per dam and at 21 days of age, offspring were weaned onto their respective dams diet until P75-80. Only male animals were used. The handling and care of the animals were according to the Guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from the School of Veterinary Medicine and Animal Science - University of São Paulo, Brazil.

## **2.3 Protein estimation and body/brain weight**

Body and brain weights were taken and recorded on P7, P25 and P75-80. Estimation of protein content in total cortex and in membrane preparation was according to the method described by Peterson (1977).

## **2.4 [<sup>3</sup>H] GABA uptake assays**

Experiments of uptake were according to Frizzo et al. (2002) and Thomazi et al. (2004) performed for glutamate and adjusted for GABA uptake and inhibition. At P7, P25 and P75-80 the animals were sacrificed by decapitation, the brains immediately removed

and submerged in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.2, containing: 137mM NaCl; 0.63mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4.17mM NaHCO<sub>3</sub>; 5.36mM KCl; 0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.26mM CaCl<sub>2</sub>; 0.41mM MgSO<sub>4</sub>; 0.49mM MgCl<sub>2</sub> and 5,55mM glucose. Parietal cerebral cortices were dissected and coronal slices (0.4 mm) were obtained using a Mc Illwain tissue chopper. Slices were transferred to multiwell dishes, 1 ml HBSS at 37°C was added and allowed to equilibrate for 15 minutes. Following, pre-assay incubation was performed in 300 µL HBSS containing 1mM L-DABA or β-Alanine for 15 minutes. [<sup>3</sup>H]GABA 25µM or 100µM was added to initiate the assay, after a 15 minutes incubation period the assay was terminated by rapidly rinsing the slices three times with ice-cold HBSS and solubilization in 300 µL of 0.5 N NaOH, this lysate was kept overnight at room temperature. Aliquots of lysate were used to estimate protein concentration and measurement of [<sup>3</sup>H] GABA by scintillation counting. To measure sodium independent uptake (non-specific uptake), the same protocol above was used, although with differences in the temperature and medium used. Sodium-independent uptake was determined on ice, using N-methyl-D-glucamine instead of NaCl. The results were subtracted from the total uptake to obtain the specific one. Both, specific and non-specific, uptakes were performed in triplicate.

## **2.5 Measurement of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity**

To evaluate the integrity and viability of slices after the pre-incubation/incubation period, an aliquot of the supernatant of each incubation condition was withdrawn and frozen for determination of LDH leakage. LDH activity was evaluated using an assay kit (Doles Reagents, São Paulo, Brazil), which measures the amount of a colored complex derived from the NADH formed by the enzymatic reaction using a spectrophotometric method (510nm).

## **2.6 Crude membrane preparation**

Crude membrane fraction was processed according to a modification of Minelli and collaborators (1996), briefly, cerebral hemispheres homogenized in ice-cold homogenization buffer containing 0.32M sucrose, 1mM EDTA, 0.25mM dithiothreitol (DTT), 0.5mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1µg/ml leupeptin in 4mM

Tris-HCl (pH 7.4). The homogenate was cleared at 1,000 x g for 15 minutes at 4°C and the resultant supernatant was centrifuged again at 7,000 x g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was centrifuged at 100,000 x g for 1h at 4°C. The resulting crude membrane pellet was washed by centrifugation in 25mM Hepes containing a protease inhibitor cocktail. Aliquots were taken for protein estimation and for electrophoresis in 2x concentrated sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8).

## **2.7 Electrophoresis and immunoblotting**

Proteins (30 µg/lane) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 7.5% mini-gels (Laemmli, 1970). Following electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad mini Trans-Blot system according with Towbin et al. (1979). Membranes were blocked for 2 hours in 2% bovine serum albumin (BSA) or 5 % non-fat milk, 0.05% Tween-20 in Tris buffered saline (pH 7.4) and incubated at least 2 hours with primary antibody 1:400 anti-GAT-1 or anti-GAT-3 (Chemicon International, Temecula, CA). Subsequently, membranes were incubated for additional 2 hours with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000 anti-rabbit, Amersham). Membranes were then developed with ECL (Amersham). Analysis of the intensity of the bands and measurement of total area of obtained peaks were performed using the public domain image analysis program ImageJ (available at <http://rsb.info.nih.gov/> ).

## **2.6 Statistical analysis**

Statistical analysis of the data was performed by (i) ANOVA for multiple groups comparison, followed by the Duncan's post hoc test for GABA uptake; (ii) Student t-test for body and cerebral weights,  $P < 0.05$  was considered significant.

# **3 RESULTS**

## **3.1 Body and brain weights**

Average of body and brain weight in the malnourished group was significantly lower than control throughout the pre-weaning period up to P75 (Table 1,  $P < 0.05$ ), but



protein concentration in cerebral cortex did not differ. The litter size did not differ significantly between groups with  $10.9 \pm 1.8$  (mean  $\pm$  standard deviation) pups / litter in the G<sub>25</sub> and  $9.9 \pm 2.2$  pups in the G<sub>7</sub> group (n=20 in each group).

### **3.2 GABA uptake by cerebral cortex slices**

GABA uptake at P7 in control rats was higher than in other ages studied and declined toward adult levels already at P25 (Fig. 1A and B), whereas in the malnourished group there was maintenance of high GABA uptake levels until P25. Although there is a decline from P7 to P25 on GABA uptake in this group, it did not reach adult values (Fig. 1A and B). Gestational and postnatal protein malnutrition induced higher GABA uptake by cerebral cortex slices at P7 (with 25 $\mu$ M [<sup>3</sup>H] GABA in incubation medium) and P25 (with both [<sup>3</sup>H] GABA concentration). At P75 both groups had a similar uptake pattern (Fig. 1A and B). The observed similar proportional profile of uptake with different GABA concentrations in the incubation medium, was nearly 3.31 times higher in the slices incubated with 100  $\mu$ M GABA in both diet groups (Fig. 1A and B). Slices did not present any significant leakage, less than 3% of the cytosolic marker LDH, indicating the absence of damage in our assay conditions (data not shown).

### **3.3 GABA uptake inhibition by $\beta$ -alanine and L-DABA**

GABA uptake inhibition by  $\beta$ -alanine is higher at P7 in the control group as compared with P25 and P75, where the inhibition percentual is significantly decreased and exhibit equal values (Fig. 2A). Otherwise, GABA uptake inhibition in the malnourished group keeps itself at higher levels at P7 and P25, decreasing only at P75. At P25  $\beta$ -alanine displays significantly different inhibition pattern between groups, with higher inhibition in the malnourished group (Fig. 2 A and B).

In contrast, L-DABA displays the same inhibition percentual pattern in the same group at different ages and in the same age in different diet groups as well (Fig. 3A and B).

### **3.4 Immunoblotting**

Immunocontent of GAT-3 in crude membrane preparation of P7 malnourished rats had a 35 % increase in comparison with controls at same age, while GAT-1 was not altered by the type of diet at this age (Fig. 4).

#### 4 DISCUSSION

Our results regarding GABA uptake in control rats (Fig. 1A and B) agree with previous findings that in the developing cortex GABA uptake transiently increases (Coyle and Enna, 1976; Blakely et al., 1991, Redburn et al., 1978) then decline towards adult level by 3 – 4 weeks after birth (Coyle and Enna, 1976; Hitzemann and Loh, 1978).

Malnutrition causes a different profile: rats maintain high GABA uptake until P25 and an apparent delayed decline towards adult values. The higher GABA uptake by malnourished rats at P25 in comparison with the same age control group, as reported previously (Schweigert et al, 2005), is also noticed at P7 in 25 $\mu$ M [<sup>3</sup>H] GABA. GABA uptake reached a similar pattern between groups at P75, which can also point to a delayed developmental profile in the malnourished group (Fig. 1A and B).

$\beta$ -alanine, a potent GAT-3 antagonist (Borden et al., 1992), inhibited GABA uptake significantly in P7 control rats and this percentage decreases as maturation proceeds. Wong and McGeer (1981) described higher effect of  $\beta$ -alanine at perinatal ages and suggest that GAT-3 is accounted for the largest fraction of GABA transport in the neocortex. This conclusion is associated to the knowledge that GAT-1 mRNA is low at early postnatal age and increases steadily in the first two postnatal weeks to reach the adult pattern approximately at P30 (Yan et al., 1997, Minelli et al., 2003).

The facts that we found a high similar GABA uptake inhibition at P7 and P25 in cerebral cortex slices of malnourished rats (Fig. 2A and B), and higher GAT-3 immunocontent in cerebral membranes (Fig. 4) may indicate that GAT-3 is still highly representative in P25 malnourished rats, differently from control group where the inhibition profile induced by GAT-3 antagonist  $\beta$ -alanine is lower at P25 and reached adult pattern already at this age. L-DABA, otherwise, inhibited GABA uptake at the same manner in an ontogenic and/or nutritional point of view, in agreement with earlier studies by Balcar and Johnston (1989). These results and the observation that GAT-1 immunocontent is

unaffected by malnutrition at P7 and P25 suggest that the high GABA uptake in malnourished rats is predominantly due to GAT-3.

We should also consider that GATs are subject to regulatory mechanisms with an improvement in transport correlated with an increase in surface transporter expression in response to increasing extracellular GABA concentrations (Bernstein and Quick, 1999). Even if there is an effect of extracellular GABA, which seems apparent when we compare the effect on uptake in both GABA concentrations in the incubation medium and could influence the inhibition percentual (Fig. 1A and B; 2A and B), it is not misunderstanding that malnourished rats react differently. Although it is, in our experimental model, difficult to isolate primary modification of GATs from secondary adaptative changes induced by extracellular GABA, it is tempting to speculate that it may be part of a “reprogramming” with maintainance of its immature pattern occurring as a response to malnutrition, as we can see in delay/alterations of several other parameters involving neurotransmission in malnourished rats (Gressens et al. 1997, Steiger et al, 2003, Del Angel-Meza et al., 2001 , Del Angel-Meza et al., 2002).

The physiological instance of cortical neurons expressing GAT-3 in early development is known. After ischemic injury Melone et al. (2003) showed a markedly novel GAT-3, but not GAT-1, cortical pyramidal neurons expression, indicating that during ischemia GAT-3 expression undergoes a reversion to its immature pattern (Conti et al, 2004). Whether the highest inhibition effects of  $\beta$ -alanine in P25 malnourished rats, are due to GAT-3 localized predominantly in the mature expression pattern, i.e., in astrocytes, or in an immature pattern (neurons) remains to be cleared. It also arises the question whether there is an adaptative compensatory modulating response to malnutrition based on the notion that GABA taken up into GABAergic neurons may be reutilized as a neurotransmitter, while that taken up into surrounding glia is lost trough metabolism via GABA transaminase and the tricarboxylic acid cycle (Schousboe, 2003; Schousboe et al, 1983) or not.

The higher GABA uptake by developing malnourished rats (P7) and the higher GAT-3 immunocontent - which is probably expressed in the very same layers where GABA<sub>A</sub> receptors are densest as described by Fritschy (1994) and Poulter (1992), and involved in modulation of GABA's trophic action as suggested by Conti (2004) - could be

an adaptative/compenstory mechanism in modulating GABA's trophic action in malnourished rats already at this age.

Another question that arrives from our results is the apparently normalization of GABA uptake (and probably GAT-3 expression as evidenced by similar inhibition) at P75 which could express a "delay" in GABAergic mature function, but considering other maintained altered reactions of adult rats to drugs that acts at GABAergic system, like benzodiazepines and ethanol (Tonkiss et al., 2000; Borghese et al., 1998, Cordoba et al., 1996; Almeida et al., 1996, Brioni et al., 1989), we must consider that this is only one parameter and several other mechanism may be responsible for altered GABAergic neurotransmission in adult rats.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Blanver-Farmoquimica for provinding the fiber used in diet composition. This research was supported by: CNPq, FINEP, CAPES, PROSPEQ/UFRFGS, FAPERGS, and PRONEX (41960904-366/96 to D. O. G. Souza).

## **REFERENCES**

- Almeida, S.S., Tonkiss, J., Galler, J.R., 1996. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20:389-402.
- Balcar, V.J., Johnston, G.A.R. 1989. Ontogeny of high affinity uptake of GABA studied in 'minislices' (tissue prisms of rat cerebral cortex. *Dev. Brain Res.* 49:295-299.
- Bernstein E.M., Quick, M.W., 1999. Regulation of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Transporters by Extracellular GABA. *J. Biol. Chem.* 274:889-895.
- Blakely, R.D., Clark, J.A., Pacholczyk, Amara, S.G., 1991. Distinct, developmentally regulated brain mRNAs direct the synthesis of neurotransmitters transporters. *J. Neurochem.* 56:860-871.
- Borden, L.A. 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem. Int.* 29:335-356.
- Borden, L.A., Smith, K.E., Hartig, P.R., Branchek, T.A., Weinshank, R.L. 1992. Molecular heterogeneity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J. Biol. Chem.* 267: 21098-21104.

- Borghese, C.M., Córdoba, N.E., Laino, C.H., Orsingher, O.A., Rubio, M.C., Niselman, V., 1998. Lack of tolerance to the anxiolytic effect of diazepam and pentobarbital following chronic administration in perinatally undernourished rats. *Brain Res. Bull.* 46: 237-244.
- Brioni, J.D., Córdoba, N., Orsingher, O.A., 1989. Decreased reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. *Behav. Brain Res* 34:159-162.
- Chatton, J.Y., Pellerin, L., and Magistretti, P.J., 2003. GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: Implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12456-12461.
- Cherubini E. and Conti, F. 2001. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* 24:155-162.
- Clark, J.A., Deutch, A.Y., Gallipoli, P.Z., Amara, S.G. 1992. Functional expression and CNS distribution of a  $\beta$ -alanine-sensitive neuronal GABA transporter. *Neuron* 9:337-348.
- Conti, F., Minelli, A., Melone, M., 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain. Res. Rev.* 45:196-212.
- Cordoba, N.E., Borghese, C.M., Arolfo, M.P., Orsingher, O.A., 1996. Reduced tolerance to certain pharmacological effects of ethanol after chronic administration in perinatally undernourished rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57: 659-663.
- Coyle, J.T., Enna, S.J., 1976. Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain Res.* 111:119-133.
- Dalby, N.O., 2003. Inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 479:127-137.
- DeBiasi, S., Vitellaro-Zucarello, L., and Brecha, N.C. 1998. Immunoreactivity for the GABA transporter-1 and GABA transporter-3 is restricted to astrocytes in the rat thalamus: a light and electron-microscopic immunolocalization. *Neuroscience* 83:815-828.
- Del Angel-Meza, A .R., Ramírez-Cortes, L., Adame-González, I.G., Burgos González, I., Beas-Zárate, C., 2002. Cerebral GABA release and GAD activity in protein-and tryptophan-restricted rats during development. *Int. J. Dev. Neuroscience* 20: 47-54.
- Del Angel-Meza, A.R., Ramirez-Cortes, L. ,Olivera-Cortes, E., Perez-Vega, M.I., Gonzalez-Burgos, I. , 2001. A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19:447-453.
- Durkin, M.M., Smith, K.E., Borden, L.A., Weinshank, P.L., Branchek, T.A., Gustafson, E.L., 1995. Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in the brain: an in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* 33:7-21.
- Fritschy, J.M., Paysan, J., Enna, A., Mohler, H., 1994. Switch in the expression of rat GABA<sub>A</sub> receptor subtypes during postnatal development: an immunocytochemical study. *J. Neurosci.* 14:5302-5324.

- Frizzo, M.E.S; Lara, D.R.; Prokopiuk, A.S.; Vargas, C.R.; Salbego, C.R.; Wajner, M; Souza, D.O. 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal an excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22:353-363.
- Gadea, A., Lopez-Colome, A., 2001. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J. Neurosci. Res.* 63:461-468.
- Gressens, P., Muaku, S.M., Besse, L., Nsegbe, E., Gallego, J., Delpech, B., Gaultier, C., Evrard P., Ketelslegers, J.M, Maiter, D., 1997. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Dev. Brain Res.* 103:21-35.
- Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Miedel, M.C., Davidson, N., Lester, H.A., Kanner, B.I., 1990. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249, 1303-1306.
- Hitzemann, R.J., Loh, H.H., 1978. High affinity GABA and glutamate transport in developing nerve ending particles. *Brain Res.* 159:29-40.
- Horwitz, W. (1980). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists AOAC*, Washington, DC USA.
- Ikegaki, N., Saito., N, Hashima, M., Tanaka, C. 1994. Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT-1, GAT-2, GAT-3) and their application to immunocytochemistry. *Mol. Bain Res.* 26: 47-54.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Levitsky, D.A., Strupp, B.J., 1995. Malnutrition and the brain: Changing concepts, changing concerns, *J. Nutr.* 125:2212S-2220S.
- Liu, Q.R., Lopéz-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H., Nelson, N., 1993. Molecular characterization of four pharmacologically distinct  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J.Biol. Chem.* 268:2104-2112.
- Liu, Q.R., Lopéz-Corcuera, B., Nelson, H., Mandiyan, S., Nelson, N., 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and  $\beta$ -alanine in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:12145-12149.
- Lopéz-Corcuera, B., Liu, Q.R., Mandyan, S., Nelson, H., Nelson, N, 1992. Expression of a mouse brain cDNA encoding novel  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter. *J. Biol. Chem.* 267:17491-17493.
- Melone, M., Cozzi, A., Pellegrini-Giampietro, Conti, F. 2003. Transient focal ischemia triggers neuronal expression of GAT-3 in the rat perilesional cortex. *Neurobiol. Dis.* 14:120-132.
- Minelli, A., Barbaresi, P., Conti, F., 2003. Postnatal development of high-affinity plasma membrane transporters GAT2 and GAT3 in the rat cerebral cortex. *Dev. Brain Res.* 142:7-18.
- Minelli, A., Brecha., N.C., Karschin C., DeBiasi, S., and Conti, F. 1995. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 15:7734-7746.

- Minelli, A., De Biasi, S., Brecha, N.C., Zucarello, V., and Conti, 1996. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 16:6255-6264.
- Morgane, J.P., Mokler, D.J., Galler, J.R., 2002. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26:471-483.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kempner, T., Galler, J.R., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17: 91-128.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-356.
- Poulter, M.O., Barker, J.L., O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., Mahan, L.C., 1992. Differential and transient expression of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ -subunit mRNAs in the developing rat CNS. *J. Neurosci.* 12:2888-2900.
- Redburn, D.A., Broome, D., Ferkany, J., Enna, S.J., 1978. Development of rat brain uptake and calcium-dependent release of GABA. *Brain Res.* 152:511-519.
- Ribak, C.E., Tong, W.M., Brecha, N.C., 1996a. GABA plasma membrane transporters, GAT-1 and GAT-3, display different distributions in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 367:595-606.
- Ribak, C.E., Tong, W.M., Brecha, N.C., 1996b. Astrocytic processes compensate for the apparent lack of GABA transporters in the axon terminals of cerebellar Purkinje cells. *Anat. Embryol.* 193:379-390.
- Schousboe, A. 2003. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Res.* 28:347-352.
- Schousboe, A., Larsson, O.M., Wood J.D., Krosgaard-Larsen, P. 1983 Transport and metabolism of GABA in neurons and glia: implications for epilepsy. *Epilepsia* 24:531-538.
- Schweigert, I.D., de Oliveira, D.L., Scheibel, F., da Costa, F., Wofschuk, S.T., Souza, D.O., Perry, M.L.S., 2005. Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices. *Dev. Brain Res.* 154:177-185.
- Schweigert, I.D., Roehrig, C., da Costa, F., Scheibel, F., Gottfried, C.J.S., Rotta, L.N., Gonçalves, C.A., Souza, D.O., Perry, M.L.S. 2004. High extracellular K<sup>+</sup> levels stimulate acetate oxidation in brain slices from well and malnourished rats. *Neurochem. Res.* 29:1539-1543.
- Steiger, J.L., Alexander, M.J., Galler, J.R., Farb, D.H., Russek, S.J., 2003. Effects of prenatal malnutrition on GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  and  $\beta_2$  mRNA levels. *Neuroreport* 13: 1731-1735.
- Steiger, J.L., Galler, J.R., Farb, D.H., Russek, S.J., 2002. Prenatal protein malnutrition reduces  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  and  $\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the adult septum. *European J. Pharmacol.* 446:201-202.

Thomazi, A.P.; Godinho, G.F.; Rodrigues, J.M.; Schwalm, F.D.; Frizzo, M.E.; Moriguchi, E.; Souza, D.O.; Wofchuk, S.T., 2004 Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev.* 125:475-81.

Tonkiss, J., Trzcinska, M., Schultz, P., Vincitore, M., Galler, J.R., 2000. Prenatally protein malnourished rats are less sensitive to the amnestic effects of medial septal infusions of chlordiazepoxide. *Behav. Pharmacol.* 11:437-446.

Towbin, H, Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.

Wong, P.T.H., McGeer, E.G., 1981. Postnatal changes on GABAergic and glutamatergic parameters. *Dev. Brain Res.* 1:519-529.

Yan, X.X. , Ribak, E., 1998. Developmental expression of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters (GAT-1 and GAT-3) in the rat cerebellum: evidence for a transient presence of GAT-1 in Purkinje cells. *Dev. Brain Res.* 111:253-269.

Yan, X.X., Cariaga, W.A., Ribak, C.E., 1997. Immunoreactivity for GABA plasma membrane transporter, GAT-1, in the developing rat cerebral cortex: transient presence in the somata of neocortical and hippocampal neurons. *Dev. Brain Res.* 99:1-19.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1-** GABA uptake by cerebral parietal cortex slices of well and malnourished rats incubated for 15 minutes with 25  $\mu\text{M}$  (**Fig A**) or 100  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]GABA (**Fig B**). Data are represented as mean  $\pm$  SEM (bars) and obtained from 4 independent experiments, which were done in triplicate for 12 animals per group and age. Different letters show significant difference between groups.  $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

**Figure 2 -** GABA uptake inhibition percentual in cerebral parietal cortex slices from well and malnourished rats, preincubated/incubated with  $\beta$ -Alanine (1mM) and incubated with 25  $\mu\text{M}$  (**Fig A**) or 100  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ] GABA (**Fig B**). Data represented mean  $\pm$  SEM (bars) of the inhibition percentual of specific uptake from each diet/age group and are from 4 independent experiments, done in triplicate for 12 animals per diet group/age. Different letters show significant differences between groups.  $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

**Figure 3 -** GABA uptake inhibition percentual in cerebral parietal cortex slices from well and malnourished rats, preincubated/incubated with L-DABA (1mM) and incubated with 25  $\mu\text{M}$  (**Fig A**) or 100  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]GABA (**Fig B**). Data represented mean  $\pm$  SEM (bars) of the inhibition percentual of specific uptake from each diet/age group and are from 4 independent experiments, done in triplicate for 12 animals per diet group/age. Different letters show significant differences between groups.  $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

**Figure 4 –** Immunoccontent of GAT-1 and GAT-3 in crude membrane extract. Immunoblotting of a membrane preparation (30  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) of malnourished (G7) and control (G25) rats at P7 probed with specific antibodies to GAT-1 or to GAT-3, both at 1:400.

Table 1– Effect of Pre and Postnatal Malnutrition on Body and Cerebral Weight and cerebral cortex (cxt) protein content

	Body weight (g)		Brain weight (mg)		Cerebral Cxt. protein (mg%)	
	G25	G7	G25	G7	G25	G7
P7	15.9 ± 1.3	9.0 ± 1.7**	587.8 ± 48.1	537.0 ± 30.1*	10.2 ± 1.4	9.8 ± 2.2
P25	67.4 ± 5.0	23.2 ± 5.5**	1245.0 ± 133.0	537.0 ± 30.1*	12.3 ± 1.1	13.6 ± 2.6
P75	365.4 ± 29.5	95.0 ± 4.3**	1415.0 ± 53.0	1050.0 ± 57.0**	13.1 ± 0.6	11.9 ± 1.6

*Note:* Data are expressed as mean ± SDM. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05 compared to G<sub>25</sub> (Student's *t* test) (n = 15-20 to each group).

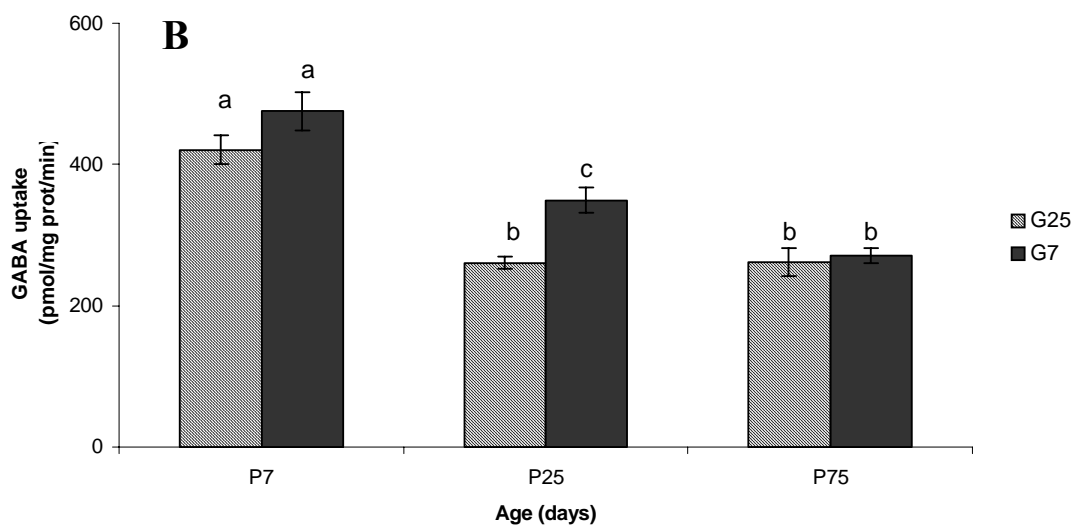
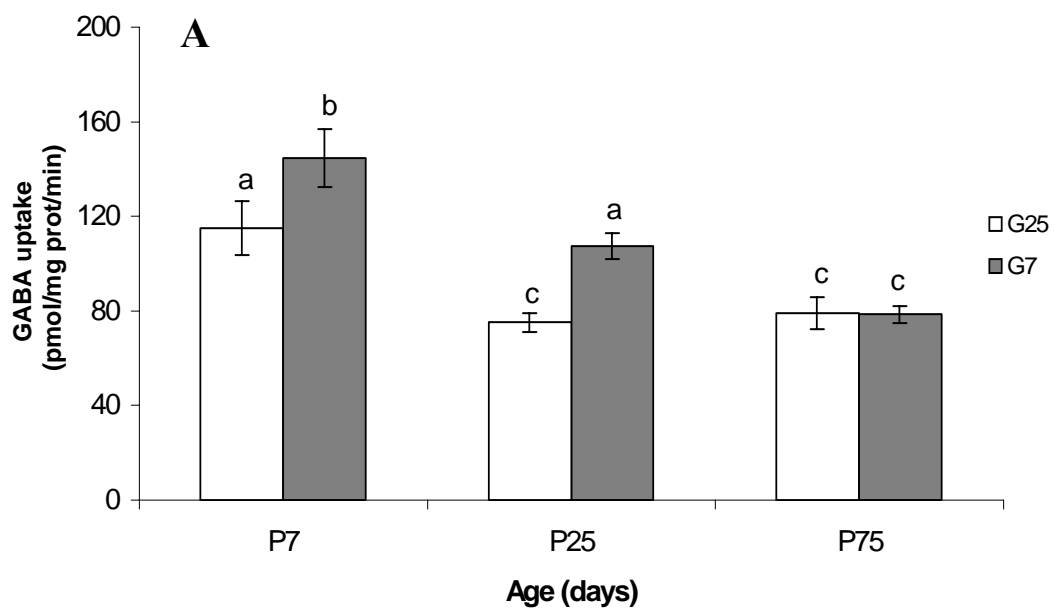


Figure 1 A and B -

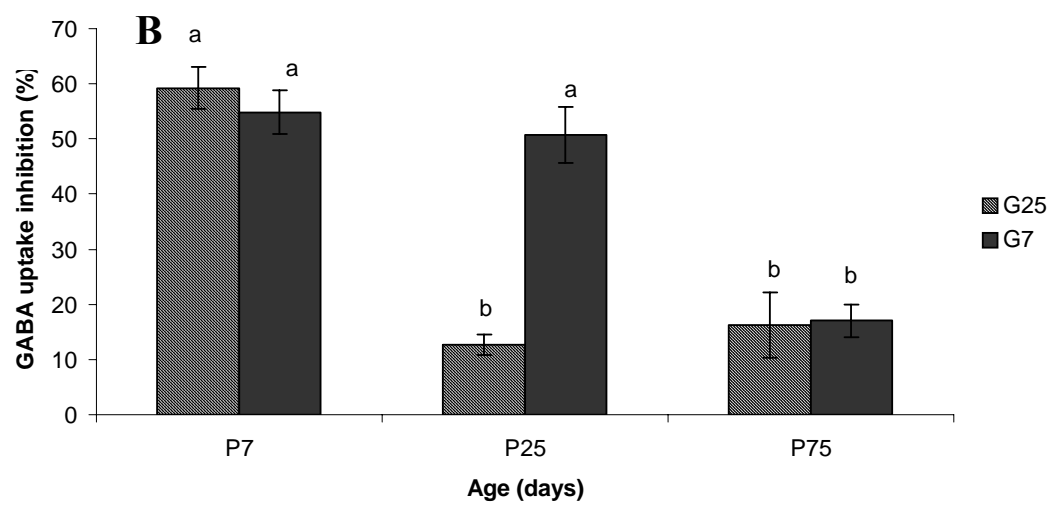
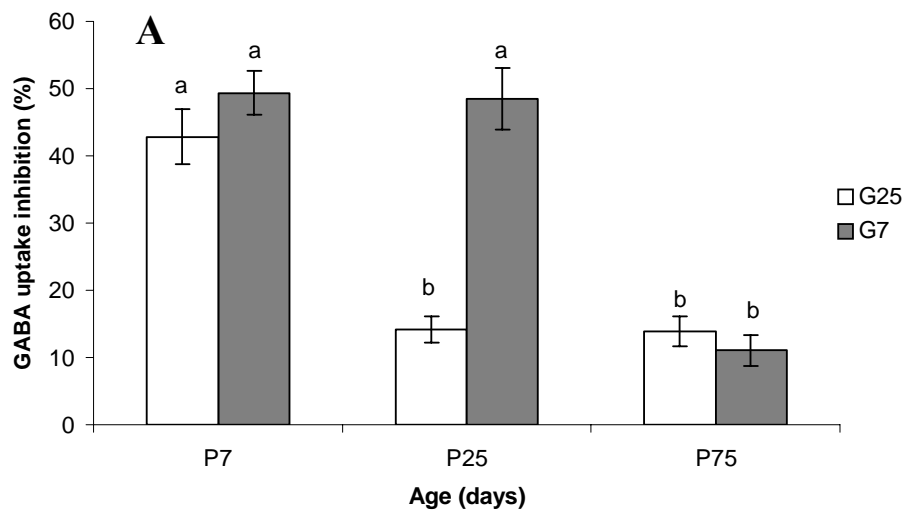


Figure 2 A and B -

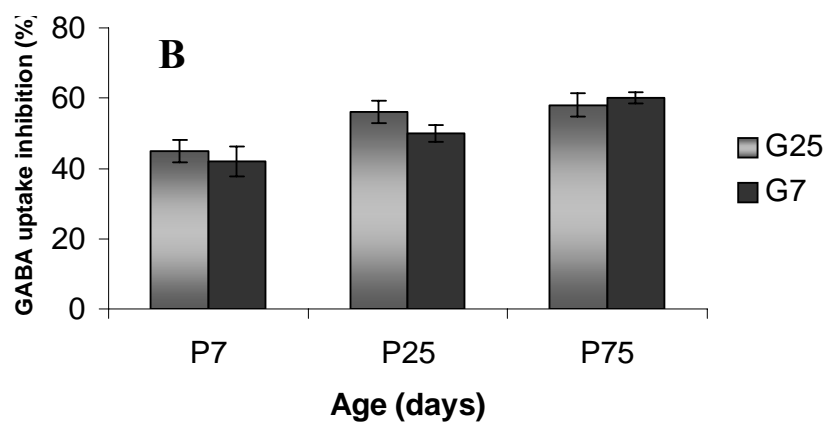
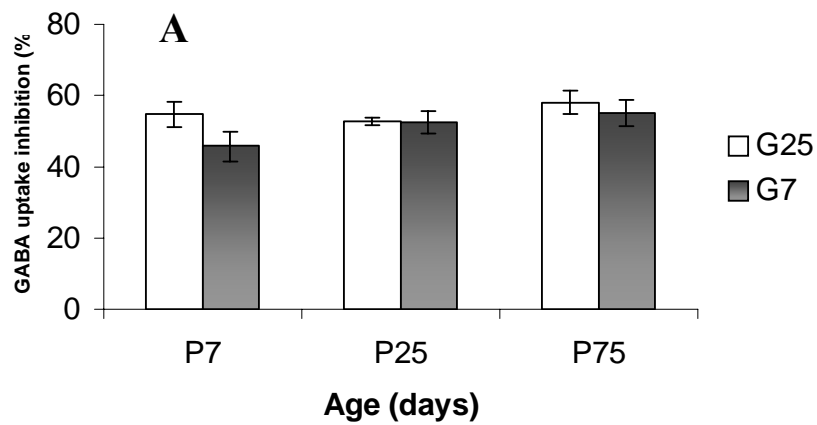


Figure 3 A and B -

## Immunoblotting P7

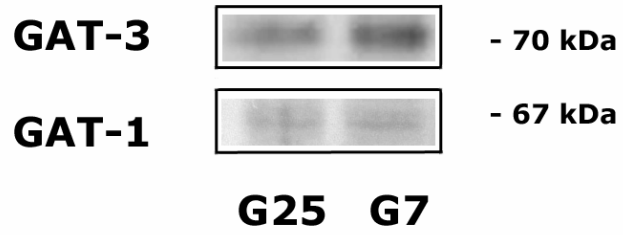


Figure 4 -