

***BERNARDO STUTZ XAVIER***

**SINALIZAÇÃO ASPARTÉRGICA  
EM RETINAS DE AVES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)**



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2007**

# **Livros Grátis**


<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**BERNARDO STUTZ XAVIER**

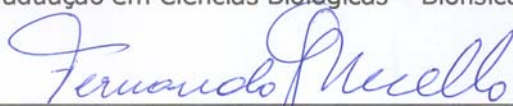
## Sinalização aspartérgica em retina de aves

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2007.



---

Narcisca Leal da Cunha e Silva, Doutora, IBCCF / UFRJ (Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biofísica)



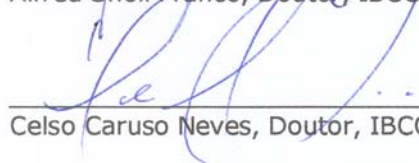
---

Fernando Garcia de Mello, Doutor, IBCCF / UFRJ (Orientador)



---

Alfred Sholl Franco, Doutor, IBCCF / UFRJ (Revisor)



---

Celso Caruso Neves, Doutor, IBCCF / UFRJ



---

Luciana Barreto Chiarini, Doutora, IBCCF / UFRJ



---

Rogério Arena Panizutti, Doutor, ICB / UFRJ

**UFRJ**

**Sinalização aspartérgica em retinas de aves**

**BERNARDO STUTZ XAVIER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadores: Edna Nanami Yamasaki e  
Fernando Garcia de Mello

Rio de Janeiro  
Julho/2007

Stutz, Bernardo

Sinalização aspartérgica em retinas de aves / Bernardo Stutz Xavier. - - Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2007.

xviii, 146 f. : il. ; 31 cm

Orientadores: Edna Nanami Yamasaki e Fernando Garcia de Mello  
Dissertação (mestrado) -- UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2007.

Referências bibliográficas: f. 109-146

1. D-aspartato. 2. Transportadores. 3.Heterotroca. 4. Retina. 5. Galinha. 6. Biofísica - Tese. I. Yamasaki, Edna Nanami. II. De Mello, Fernando Garcia. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Biofísica. IV. Título.

Projeto desenvolvido nos laboratórios de Neuroquímica e Neurobiologia da Retina, sob orientação da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Nanami Yamasaki e do prof Dr. Fernando Garcia de Mello. Ambos laboratórios são integrantes do Programa de Neurobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A bolsa de mestrado foi concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). O projeto contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

“As palavras são importantes, mas o que vale é o exemplo”

Esopo

Dedico esse trabalho aos meus pais, que me apoiaram e garantiram todo o suporte necessário para a formação do meu caráter, meu amadurecimento científico, profissional e pessoal. Esses que sempre serviram de bom exemplo; o exemplo de que o trabalho árduo tudo consegue.



## AGRADECIMENTOS

Aos chefes, Fernando e Maria Christina, eu nem sei bem por quê. Talvez por terem contribuído para o meu crescimento e amadurecimento científico. Sinto-me em dívida com eles, pelo apoio, pelas brigas, discussões, entendimentos, desentendimentos e puxões de orelha!

Ao prof José Luis do Nascimento, por ter cedido a molécula de PDC para os experimentos.

Ao amigo Alexandre Rodrigues, vulgo Khaled. Apesar de não nos vermos muito, essa figura também contribuiu bastante para a realização dessa tese. Agradeço também a amizade e as conversas produtivas.

Ao amigo novo, Maurício e Castro, alguém que sempre admirei suas idéias e inovações e seu modo de viver. Foi de grande ajuda nossas conversas e o seu empenho para comigo. Um amigo de verdade.

À minha tia Ana, que além de exemplo a ser seguido, sempre ajudou e contribuiu bastante para os meus estudos. Obrigado, tia!

Aos meus irmãos, Bruno, Breno e Bianca, pelo apoio, admiração e carinho.

Aos mais próximos: Raquel, que foi muito compreensiva e carinhosa nessa fase; Lili, parceira leal e sempre animada; Tatá, que me ajudou com as referências da tese (e outras coisas também) e o Bolota, que já foi mais próximo, mas nunca deixou de ser amigo.

Aos amigos do laboratório Rose (Velha Raposa do Oeste) e Nilson (Gordinho), duas pessoas que despontaram como ícones de admiração e boa conduta.

Aos meus amigos mais próximos (Tchurminha!) pelos inúmeros momentos de alegria e o apoio nessa fase de trabalho intenso. Vivi, Gabi, Érika, Marina, Java, Paulo, Gabriela e Thaissa, fora os anexos...

À professora Leny Cavalcante, que serviu como exemplo a ser perseguido, pelas suas aulas interessantes.

Ao prof Alfred Sholl, que corrigiu a tese.

Ao pessoal do Lab do prof Sergio T. Ferreira, da Bioquímica, que mantém uma relação agradável com o Lab de Neuroquímica.

Por fim, aos meus pais, que sem eles nada disso poderia ser.

## SUMÁRIO

	Página
Agradecimentos.....	vii
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xviii
1 Introdução.....	19
1.1 Informação visual e retina como modelo de estudo.....	19
1.2 Sistema glutamatérgico.....	26
1.2.1 Produção de glutamato.....	26
1.2.2 Liberação de glutamato.....	28
1.2.2.1 Exocitose.....	28
1.2.2.2 Liberação de glutamato por células gliais.....	33
1.2.3 Sinalização.....	35
1.2.3.1 Receptores ionotrópicos.....	35
1.2.3.1.1 Receptores não-NMDA.....	37
1.2.3.1.2 Receptores de NMDA.....	38
1.2.3.2 Receptores metabotrópicos.....	40
1.2.3.3 Receptores de glutamato na retina.....	41
1.2.4 Reciclagem de glutamato e o ciclo glutamato-glutamina.....	43
1.2.5 Transporte e depuração de glutamato.....	44
1.2.5.1 Transportadores de membrana.....	45
1.2.5.1.1 Transportadores de alta afinidade.....	45
1.2.5.1.2 Biofísica do transporte.....	50
1.2.5.1.3 Transportadores de baixa afinidade.....	56
1.2.5.1.3.1 Sistema independente de sódio e trocador glutamato-cistina.....	57
1.2.5.1.3.2 Trocadores de baixa afinidade.....	58
1.2.5.2 Carreadores intracelulares.....	58

1.2.5.2.1 Transporte glutamatérgico mitocondrial.....	58
1.2.5.2.2 Transporte glutamatérgico vesicular.....	58
1.2.6 Importância da depuração de glutamato.....	59
1.3 Sistema aspartérgico.....	61
1.3.1 Considerações estereo-químicas sobre D-aminoácidos.....	60
1.3.2 Produção de D-aspartato.....	62
1.3.3 D-aspartato em tecidos animais.....	62
1.3.4 D-aspartato como precursor de NMDA.....	62
1.3.5 Liberação de D-aspartato.....	63
1.3.6 D-aspartato e o sistema nervoso central.....	64
1.3.7 D-aspartato e o sistema endócrino.....	67
1.3.8 Depuração e degradação de D-aspartato.....	68
2 Objetivos.....	69
3 Materiais e métodos.....	70
3.1 Materiais.....	70
3.2 Soluções.....	71
3.2.1 Solução Hanks, pH 7,4.....	71
3.2.2 Solução Hanks sem Na <sup>+</sup> , pH 7,4.....	71
3.2.3 Solução Hanks Hanks sem Mg <sup>2+</sup> , pH 7,4.....	71
3.2.4 Solução Hanks sem Ca <sup>2+</sup> , pH 7,4.....	72
3.2.5 Salina sem Ca <sup>2+</sup> e sem Mg <sup>2+</sup> (CMF).....	72
3.2.6 Tampão borato, pH 9.....	73
3.3 Procedimentos.....	73
3.3.1 Obtenção de cultura mista, enriquecida de neurônio e purificada de glia, de embrião de galinha.....	73
3.3.1.1 Cultura mista densa.....	73
3.3.1.2 Cultura enriquecida de neurônio.....	74
3.3.1.3 Cultura purificada de glia.....	74
3.3.4 Experimentos de liberação de <sup>3</sup> H-D-asp.....	74
3.3.5 Dosagem de D-asp endógeno por HPLC.....	75
3.3.6 Dosagem de proteína.....	76

3.3.7 Dosagem de LDH.....	76
3.3.8 Análise estatística.....	76
4 Resultados.....	77
4.1 Agentes despolarizantes e a liberação de <sup>3</sup> H-D-asp.....	78
4.2 Possível envolvimento de receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos de glutamato no processo de liberação de <sup>3</sup> H-D-asp.....	81
4.3 O trocador glutamato-cistina não está envolvido na liberação de <sup>3</sup> H-D-asp.....	85
4.4 Transportadores de aminoácidos excitatórios e a liberação de <sup>3</sup> H-D-asp.....	86
4.5 Neurônios e não células gliais são os responsáveis pela liberação de D-asp na retina.....	91
4.5.1 Dosagem de LDH em culturas de células.....	93
4.6 Liberação endógena de D-asp em retinas de aves, medida por HPLC.....	94
5 Conclusões.....	96
6 Discussão.....	98
7 Referências Bibliográficas.....	109

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Diagrama do olho humano e suas várias estruturas.....	19
2 Os tipos celulares presentes na retina humana.....	21
3 Cones de macaco marcados com corante fluorescente verde.....	25
4 Vias de formação e destino do glutamato.....	27
5 Exocitose de glutamato.....	30
6 <i>Pool</i> de vesículas de um neurônio.....	31
7 Visão geral da sinapse glutamatérgica.....	32
8 Receptores de glutamato e suas subunidades.....	36
9 Representação gráfica dos receptores ionotrópicos de glutamato.....	37
10 Localização sináptica dos EAATs .....	49
11 Posíveis modelos dos EAATs.....	50
12 Análogos de glutamato e aspartato .....	56
13 Diversas formas de liberação de D-asp em células PC12 e seus sub- clones	64
14 Concentração de D-asp no embrião de galinha e no rato pós-natal.....	65
15 Liberação de D-aspartato induzida por glutamato.....	78
16 Efeito da veratridina na liberação de D-asp.....	79
17 Efeito do KCl na liberação de D-asp.....	80
18 Efeito da estriquinina e picrotoxina na liberação de D-asp.....	81
19 Efeitos de agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato na liberação de D-asp.....	82
20 Efeito de antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato na liberação de D-asp.....	83
21 Efeito do <i>trans</i> -ACPD na liberação de D-asp.....	84
22 O trocador glutamato-cistina não está envolvido na liberação de D-asp.....	86
23 Efeito da retirada de íons Na <sup>+</sup> sobre a liberação de D-asp.....	87
24 Efeito da retirada de íons Ca <sup>2+</sup> sobre a liberação de D-asp.....	88
25 Efeito da temperatura sobre a liberação de D-asp.....	89
26 A molécula de L- <i>trans</i> -PDC induz liberação de D-asp.....	90

27 Liberação de D-asp em culturas de células.....	92
28 Dosagem de LDH em cultura de células.....	94
29 Liberação endógena de D-asp.....	95
30 Resumo da liberação de <sup>3</sup> H-D-aspartato em explantes de E13.....	107
31 Modelo de liberação de D-asp na retina de galinha.....	108

**LISTA DE TABELAS**

Tabela	Página
1 Modulação endógena extracelular da função do receptor de NMDA.....	40
2 Solução Hank's.....	71
3 Solução Hank's sem Na <sup>+</sup> .....	71
4 Solução Hank's sem Mg <sup>2+</sup> .....	71
5 Solução Hank's sem Ca <sup>2+</sup> .....	72
6 Solução sem cálcio e magnésio.....	72
7 Tampão Borato.....	73

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**<sup>3</sup>H-D-asp:** [2,3-<sup>3</sup>H]-D-aspartato

**ACTH:** hormônio adrenocorticotrófico

**AMPA:** ácido  $\alpha$ -amino-3-hydroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

**AMP<sub>c</sub>:** adenosina 5' monofosfato cíclica

**ATPA:** ácido 2-amino-3-(5-*tert*-butil-3-hidroxi-4-isoxazol)-propiónico

**BSA:** albumina sérica bovina

**CMF:** salina livre de cálcio e magnésio

**D-asp:** D-aspartato

**D-aspO:** D-aspartato oxidase

**DMEM:** meio de Eagle modificado por Dulbecco

**DNQX:** 6,7-Dinitroquinoxialina-2,3-diona

**E#:** dia embrionário #

**EAAC1:** carreador de aminoácidos excitatórios subtipo 1

**EAAT:** transportador de aminoácido excitatório

**EGTA:** ácido tetra-acético etileno glicol

**GABA:** ácido  $\gamma$ -amino-butírico

**GH:** hormônio do crescimento

**GLAST:** transportador de glutamato e aspartato

**GLT-1:** transportador de glutamato 1

**GMP<sub>c</sub>:** guanosina 5' monofosfato cíclica

**GSH:** Glutationa reduzida

**HPLC:** cromatografia de alta performance

**IP<sub>3</sub>:** inositol trifosfato

**KA:** kainato

**K<sub>m</sub>:** constante de afinidade de Michaelis-Menthen

**LDH:** lactato desidrogenase

**L-glu:** L-glutamato

**LTP:** potenciação de longa duração

**MEM:** meio essencial mínimo



**mGluR:** receptor metabotrópico glutamatérgico  
**MK-801:** ciclohepteno-5,10-iminihidrogênio-maleato  
**NMDA:** N-metil-D-aspartato  
**PCP:** fenciclidina  
**PDC:** L-*trans*-pirrolidina-2,4-dicarboxilato  
**PE:** pós-eclosão  
**pH:** potencial de hidrogênio-íon  
**PLI:** *pool* de liberação Instantânea  
**PRL:** prolactina  
**RNA<sub>m</sub>:** RNA mensageiro  
**SFB:** soro fetal bovino  
**SN:** sistema nervoso  
**SNC:** sistema nervoso central  
**TBOA:** DL-Threo- $\beta$ -benzoxiaspartato  
**THA:** threo-3-hidroxi-aspartato  
**TSH:** hormônio tireoestimulante  
**TTX:** tetrodotoxina  
**VGLUT:** transportador vesicular de glutamato

## RESUMO

O aspartato (asp), junto com o glutamato, desempenha funções excitatórias no sistema nervoso central (SNC), sendo também responsável pela liberação de diversos neurotransmissores. Entretanto, a liberação de aspartato parece ser dependente somente de glutamato, num processo independente de ativação dos receptores glutamatérgicos. Essa liberação é causada, aparentemente, por uma heterotroca (glutamato/aspartato) e consiste em uma sinalização neuronal até então não descrita na literatura. Na retina de galinha, apenas o glutamato foi capaz de induzir a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  em explantes de 13 dias (estimulado/basal =  $6 \pm 0.6$ ). A liberação desse neurotransmissor não é promovida por eventos de despolarização ( $1,6 \pm 0.15$ ). Como esperado, agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato não foram capazes de promover o efluxo de  $^3\text{H-D-asp}$ , tão pouco o uso de agonistas para receptores metabotrópicos ( $0.4 \pm 0.15$ ). A aplicação de antagonistas (MK-801 e DNQX) não surtiu qualquer efeito na liberação induzida por glutamato ( $6.5 \pm 0.9$ ), caracterizando uma via diferente, independente da ativação dos receptores. Surgiu a idéia de que outros sítios de ligação de glutamato pudessem promover tal sinalização. Transportadores e trocadores foram investigados quanto à capacidade de liberarem D-asp. Os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), presentes na membrana de células do SNC, surgiram como possíveis responsáveis por tal fenômeno. Essa hipótese foi fortalecida pelos nossos achados de que a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  em nosso modelo é dependente de íons sódio e não de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e influenciada pela temperatura, ocorrendo a  $37^\circ\text{C}$  e sofrendo uma inibição de 91% a  $4^\circ\text{C}$ ; além de compostos seletivos para esses transportadores, como o PDC, induzirem a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  em culturas ( $8 \pm 0.3$ ). Além disso, o uso de diferentes protocolos de cultura de células de retina permitiu identificarmos que a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  é majoritariamente neuronal e não glial, onde este último tipo celular só parece promover tal efluxo em situações de alta despolarização. Por fim, demonstramos por HPLC que a liberação é realmente de D-asp e não de compostos secundários formados pelo metabolismo dessa molécula, e que essa liberação ocorre de forma endógena no tecido. Nossos dados caracterizam o processo de liberação de asp na retina de aves como um processo de heterotroca glutamato/aspartato, modulando assim a qualidade do sinal excitatório e, em conjunto com os dados da literatura que descrevem o aspartato como agonista endógeno seletivo do receptor glutamatérgico de NMDA, sugere a participação do D-aspartato na retina interna e na fisiologia da visão.

## ABSTRACT

The amino acids aspartate and glutamate are the major excitatory transmitters in the CNS including the retina, being responsible for the release of other neurotransmitter. However the process of aspartate release seems to be induced only by glutamate, in a manner that is independently of activation of glutamate receptors. Aspartate release is due to a heteroexchange of glutamate/aspartate and consists in a neuronal signaling pathway still not well-defined in the literature. In the chick retina, only glutamate was able to induce  $^3\text{H-D-aspartate}$  release from 13-days old chick retinal explants (stimulated/basal =  $6 \pm 0.6$ ). Depolarizing events did not induce this neurotransmitter release ( $1,6 \pm 0.15$ ). Neither glutamate ionotropic receptor agonists nor antagonists had any effect in this release ( $6.5 \pm 0.9$  for glutamate + antagonists). Even glutamate metabotropic agonist was not able to induce  $^3\text{H-D-aspartate}$  release, possibly due to a different signaling pathway ( $0.4 \pm 0.15$ ). Unusual glutamate sites emerged as potential candidates for promoting D-aspartate release in the chick retina. Transporters and exchangers were investigated for this capacity, especially excitatory amino acid transporters (EAATs), present in the plasma membrane of CNS cells. This hypothesis was confirmed by our findings that D-aspartate release is a sodium-dependent and calcium-independent process and it is influenced by changes in the temperature, occurring normally in  $37^\circ\text{C}$  and blocked (91%) in  $4^\circ\text{C}$  and also because competitive blockers of EAATs, like PDC, are capable of inducing D-aspartate efflux from retinal cells ( $8 \pm 0.3$ ). Nevertheless, different culture protocols showed that neurons but not glial cells are the major cell type responsible for D-aspartate release in the chick retina. Glial cells only showed little D-aspartate efflux in high depolarization conditions. Finally, HPLC experiments showed that in fact D-aspartate is released into the medium and not any other secondary compound formed by D-aspartate metabolism. Our data characterizes D-aspartate releasing process as a heteroexchange glutamate/aspartate, modulating the quality of the excitatory signal and together with previous studies that describe aspartate as a selective NMDA receptor agonist, suggests a role for this amino acid in the inner retina and in vision physiology.

## 1 Introdução

### 1.1 Informação visual e retina como modelo de estudo

Aves são animais orientados pela visão. Uma grande parte do seu sistema nervoso, conseqüentemente, é dedicado à recepção e processamento da informação visual. A função primordial do sistema nervoso é promover a interação do indivíduo com o ambiente que o cerca e isso é o que chamamos de percepção. A percepção começa com o estímulo de uma célula sensorial, que transforma esse estímulo em sinal elétrico, passando essa informação para outros neurônios, até os alvos em centros superiores. A informação visual começa na retina, localizada no fundo do globo ocular, com a transformação de um sinal luminoso em sinal elétrico pelos fotorreceptores (Fig1).

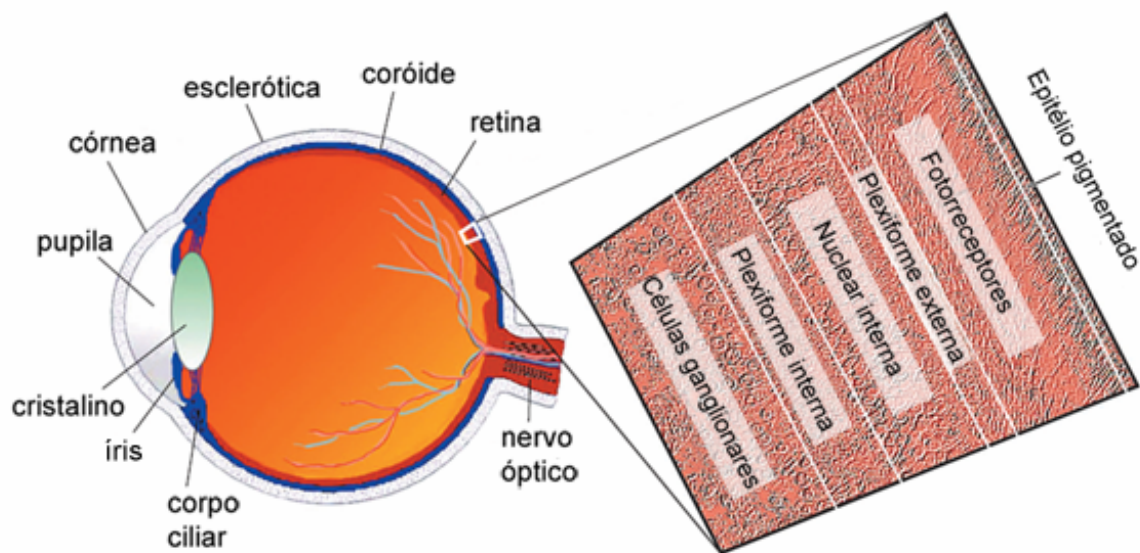


Fig 1 - Diagrama do olho humano e suas várias estruturas. Uma região é aumentada, revelando as diversas camadas da retina. Modificado de Kolb, 2003

A retina, assim como outras regiões do sistema nervoso central (SNC), deriva do diencéfalo a partir de evaginações conhecidas como divertículos ópticos. A

extremidade distal dilatada de cada um dos dois divertículos implantados na cabeça do embrião constituirá a vesícula óptica. Cada vesícula se invagina formando um cálice onde sua região interna dará origem ao epitélio neural e à porção externa do epitélio pigmentado. Inicialmente, ambas as paredes do cálice óptico possuem a espessura de uma célula apenas, mas as células da parede interna se dividem e formam uma camada neuroepitelial com várias células de espessura. Estas células denominadas neuroblastos têm potencial proliferativo e darão origem a todos os tipos celulares na retina (Altshuler et al., 1991). A histogênese da retina de vertebrados segue um gradiente espacial onde todos os tipos celulares são gerados e começam a se diferenciar a partir da região mais interna para regiões mais externas da retina. Além desse gradiente interno-externo, existe também um gradiente centro-periferia (Mann, 1964; Provis e Van Driel, 1985). Os primeiros tipos celulares a serem gerados na retina de mamíferos são as células ganglionares e horizontais, seguido pelos cones, células amácrinas, bastonetes, células bipolares e finalmente células de Muller (revisão em Marquardt e Gruss, 2002).

A retina dos vertebrados consiste em duas divisões principais: uma camada única de células neuroepiteliais, chamada epitélio retiniano ou epitélio pigmentado e de uma parte mais espessa formada por neurônios e células gliais, dita sensorial, também denominada retina neural. A camada sensorial da retina está organizada basicamente em camadas nucleares onde se localizam os corpos celulares (camada nuclear externa, camada nuclear interna e camada de células ganglionares) intercaladas por camadas plexiformes contendo prolongamentos celulares (camada plexiforme externa, camada plexiforme interna e camada de fibras do nervo óptico) (Fig 2) (Müller, 1856 apud Polyak, 1941). Em meio a esta organização laminar estão

presentes seis tipos neuronais e três tipos de células gliais, que foram descritos nos estudos pioneiros de Ramón y Cajal (1893). Na camada plexiforme externa estão presentes terminais sinápticos de células fotorreceptoras e prolongamentos celulares de células bipolares, interplexiformes e células horizontais. Na camada plexiforme interna encontram-se prolongamentos de células amácrinas, bipolares e os dendritos das células ganglionares (Fig 2). A informação na retina é transmitida de forma vertical, através dos fotorreceptores que transmitem a informação para as células bipolares e estas para as ganglionares; e de forma horizontal, com modulação de sinapses por células horizontais na camada plexiforme externa e amácrinas na plexiforme interna (Fig 2) (Kolb, 2003).

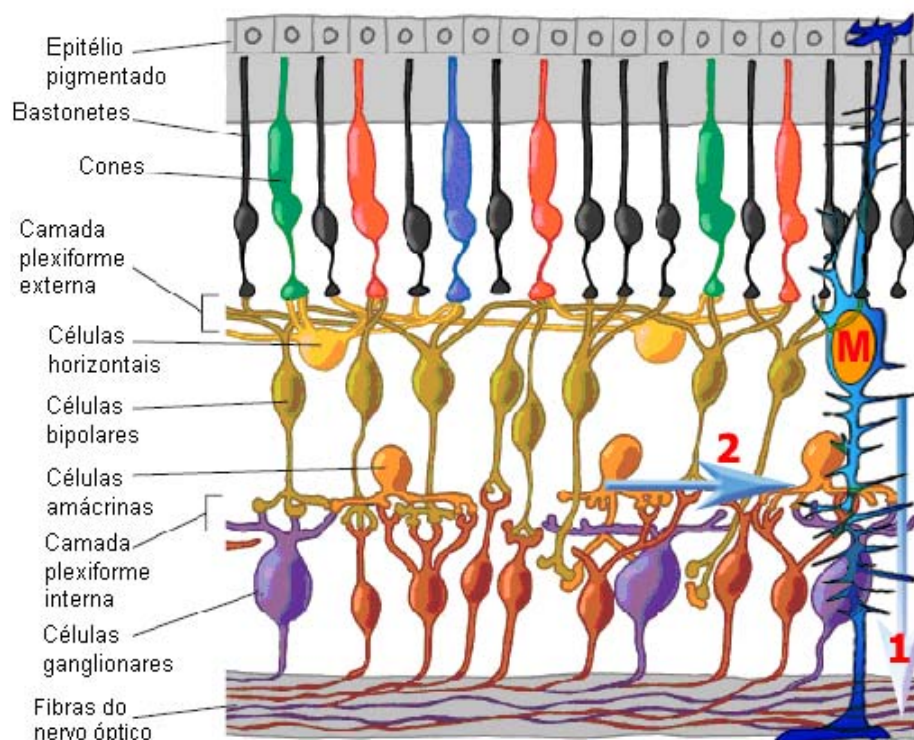


Fig 2 – Os tipos celulares presentes na retina humana. A seta 1 representa o fluxo vertical da informação visual, entre fotorreceptores, bipolares e ganglionares. A seta 2 representa o fluxo horizontal da informação visual, realizada pelas horizontais e amácrinas, que modulam o fluxo vertical. “M” representa a glia de Müller. Modificado de Kolb, 2003.

A camada nuclear externa é formada pelos corpos celulares das principais células retinianas capazes de transduzir a energia luminosa em sinal neural, os fotorreceptores. Estes são classificados basicamente em dois tipos, que podem ser diferenciados principalmente pela morfologia de seus segmentos externos: os cones e os bastonetes. Os primeiros, que na maioria das vezes possuem um segmento externo curto em forma de cone, são responsáveis pela visão fotópica (visão em alta intensidade luminosa), têm uma alta resolução temporal, sendo também responsáveis pela visão de cor, visto que existem diferentes populações de cones contendo diferentes fotopigmentos sensíveis a diferentes faixas do espectro luminoso. Os bastonetes são responsáveis pela visão escotópica (em baixa intensidade luminosa), possuem uma baixa resolução temporal e só possuem um tipo de pigmento visual, não apresentando portanto resolução espectral (Dowling, 1987).

A camada nuclear interna é composta por corpos celulares de quatro tipos celulares: localizadas mais externamente estão as células horizontais, que na maioria dos vertebrados estão representadas por dois subtipos morfológicos (Galego, 1971). As células bipolares têm seus corpos celulares localizados numa região mais central desta camada. Estas células são divididas basicamente em dois subtipos principais, um que faz contato exclusivo com bastonetes e outro com cones (Ramón y Cajal, 1893; Kolb, 1970, 1977). Os corpos celulares localizados na parte mais interna da camada nuclear interna pertencem às células amácrinas, chamadas assim por Ramón y Cajal por não apresentarem axônios, com seus dendritos estratificando na camada plexiforme interna. Estas células são responsáveis pela modulação horizontal da informação nesta camada, fazendo contatos com dendritos

de células bipolares, células ganglionares, células interplexiformes e com outras células amácrinas (Fig 2). As células amácrinas apresentam uma morfologia muito variada. Além dos corpos celulares destes 4 tipos neuronais, também está presente nesta camada um tipo de célula glial chamada célula de Müller, cujos prolongamentos se estendem por toda a retina formando as membranas limitantes externa e interna.

A camada nuclear mais interna na retina é a camada de células ganglionares formada pelas células que levam a informação visual, através de seus axônios, aos centros superiores. Encontram-se também nesta camada os corpos celulares de células amácrinas (Ramón y Cajal, 1893) ditas deslocadas, com seus dendritos estratificando na camada plexiforme interna.

Além das camadas acima descritas, ainda são encontrados na retina os segmentos externos dos fotorreceptores e as fibras do nervo óptico, compostas pelos axônios das células ganglionares. Com relação às células gliais, além da célula de Müller, duas outras células gliais comuns ao restante do sistema nervoso central também são encontradas na retina: a microglia, localizada na camada plexiforme interna, e os astrócitos fibrosos (na camada de fibras do nervo óptico e na camada de células ganglionares) e protoplasmáticos (camada plexiforme interna, nuclear interna, camada de células ganglionares e na camada de fibras do nervo óptico) (Polyak, 1941).

Os fotorreceptores são as principais células da retina com a propriedade de transformar o estímulo luminoso em sinal elétrico neuronal. A transdução se inicia com a absorção de um fóton de luz, que provoca uma alteração na configuração do



retinal 11-cis para todo trans, em um processo de isomerização. Esse pigmento está presente no segmento externo de cones e bastonetes (Fig 3). Durante este processo, o cromóforo passa por diversas conformações, entre elas a forma ativa Meta-rodopsina II, capaz de ativar a proteína G, transducina, localizada na membrana do disco óptico. A transducina se torna ativa trocando uma molécula de GDP por GTP, em seguida desloca suas subunidades alfa e beta que por sua vez ativa uma fosfodiesterase (PDE). Esta catalisa a transformação do GMPc em 5'-GMP. A diminuição intracelular de GMPc causa o fechamento dos canais catiônicos, resultando na hiperpolarização do fotorreceptor e conseqüente diminuição da liberação dos neurotransmissores. A hiperpolarização do fotorreceptor é o primeiro passo para a conversão do sinal luminoso em sinal neural.

A membrana do segmento externo dos fotorreceptores possui canais catiônicos sensíveis à concentração intracelular de GMP-cíclico. No escuro os níveis de GMP-cíclico encontram-se elevados e os canais mantêm-se abertos permitindo o influxo passivo de cátions conforme o gradiente de concentração, constituindo a “corrente de escuro”. Esta corrente despolariza a célula e permite alta taxa de liberação do neurotransmissor pelo terminal sináptico. A “corrente de escuro” é resultante do fluxo dos íons sódio (80%), cálcio (15%) e magnésio (5%).

A “corrente de escuro” flui do segmento externo para o segmento interno do fotorreceptor e posteriormente flui para o meio extracelular carregada por íons potássio, através de canais seletivos para este íon. A sódio-potássio ATPase mantém as concentrações intra-celulares destes íons, bombeando sódio para o meio extra-celular e potássio para o meio intra-celular, garantindo a manutenção do

gradiente eletroquímico para a contínua despolarização do fotorreceptor na ausência de luz.

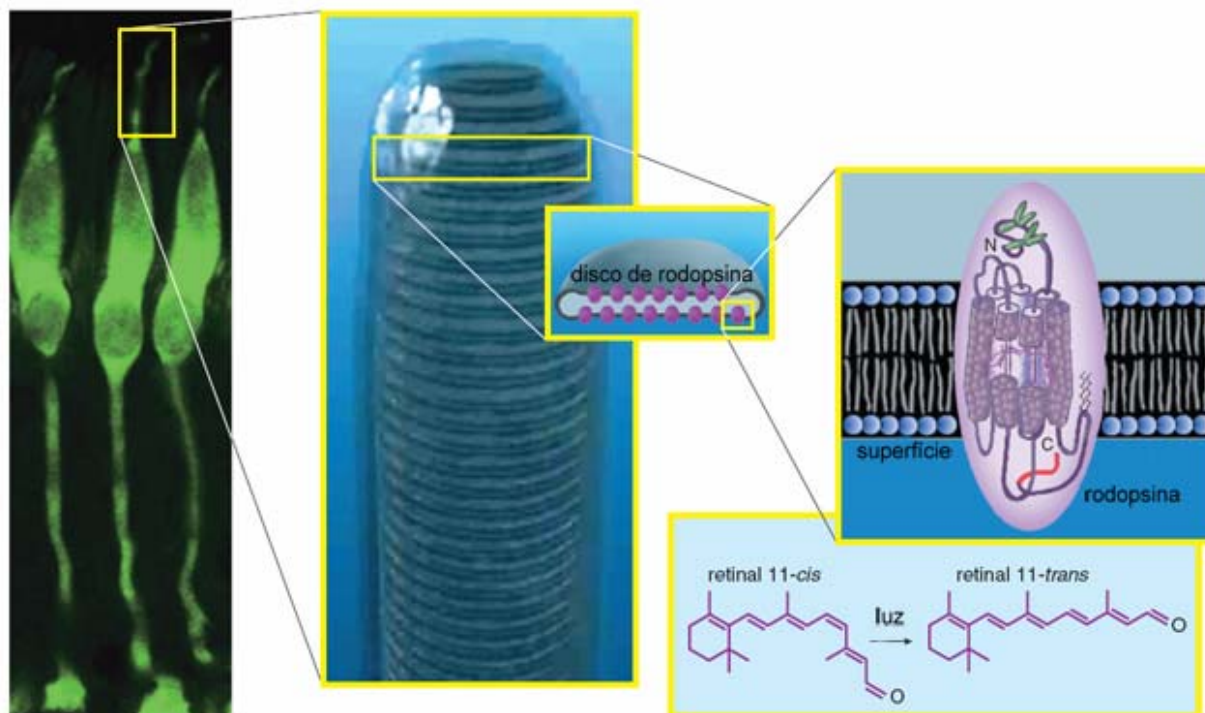


Fig 3 - Cones de macaco marcados com corante fluorescente verde. Segmentos externos ampliados permitem a visualização de estruturas em discos. Os discos são ricos em moléculas de rodopsina, uma molécula transmembrana que possui uma molécula de retinal na sua cadeia. Quando a luz incide sobre tal molécula, o retinal muda de sua conformação *cis* para conformação *trans*, mudando a conformação da rodopsina. Modificado de Kolb, 2003.

Por ser parte do SNC e possuir uma localização anatômica favorável para a sua manipulação, a retina desponta como um ótimo modelo de estudo. Sua estrutura bem definida e a descrição de diversos sistemas neuroquímicos semelhantes ao resto do sistema nervoso (SN) contribuem para a utilização desse tecido. A retina de galinha, particularmente, possui fácil acesso durante todos os estágios de desenvolvimento, garantindo uma preparação rápida e livre de contaminação por outras estruturas (Coulombre, 1955).

## 1.2 Sistema Glutamatérgico

L-Glutamato é considerado o principal mediador de sinais excitatórios no SNC e provavelmente participa da maioria dos processos relacionados ao seu funcionamento, como cognição, memória e aprendizado (para revisão, ver Fonnum, 1984; Ottersen e Storm-Mathisen, 1984; Collingridge e Lester, 1989; Headley e Grillner, 1990). O glutamato também tem papel importante no desenvolvimento do SNC incluindo formação e eliminação de sinapses, migração celular, diferenciação e morte celular (McDonald e Johnston, 1990; Komuro and Rakic, 1993; Rossi and Slater, 1993; Johnston, 1995; LaMantia, 1995; Vallano, 1998). A maioria absoluta dos neurônios e também células gliais possuem receptores de aminoácidos excitatórios em suas membranas plasmáticas (Hösli e Hösli 1993; Steinhauser e Gallo 1996; Shelton e McCarthy, 1999; Bergles et al., 2000). Além disso, glutamato também exerce funções fora do SNC, por exemplo no sistema endócrino (Moriyama, 2000 apud Danbolt, 2001). Na retina as principais células glutamatérgicas são os fotorreceptores, as células bipolares e as células ganglionares que formam a via radial da informação visual. Glutamato também está presente em células amácrinas e horizontais, mas não está claro se nestas atua como um neurotransmissor ou um intermediário metabólico, por exemplo, para síntese de GABA (Calaza et al., 2003).

### 1.2.1 Produção de Glutamato

A formação de glutamato ocorre como conseqüência do metabolismo da glicose e de aminoácidos e pode estar envolvida na formação de GABA, glutamina, peptídeos e proteínas, ou ser rapidamente estocado em vesículas para conseqüente liberação (Hassel e Dingle, 2006). Inicialmente, a via de glicólise e do ciclo de Krebs

promove a produção de  $\alpha$ -cetogluturato. Esse composto recebe um grupamento amino de outros aminoácidos por ação das transaminases e gera glutamato (Fig 4). A taxa de metabolismo de glicose no cérebro humano é cerca de  $0.4\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido, enquanto a formação de glutamato é cerca de  $0.8\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido (Shen et al., 1999). Isso significa que, virtualmente, toda glicose é metabolizada para gerar glutamato, já que uma molécula de glicose gera 2 moléculas de acetil-CoA e esta, no ciclo de Krebs, 2 moléculas de  $\alpha$ -cetogluturato. Outro componente do ciclo de Krebs, o oxaloacetato, pode receber um grupamento amino e gerar aspartato. A enzima que promove essa reação é a aspartato aminotransferase que, acredita-se, pode mediar também a formação de glutamato (Hassel e Dingledine et al., 2006).

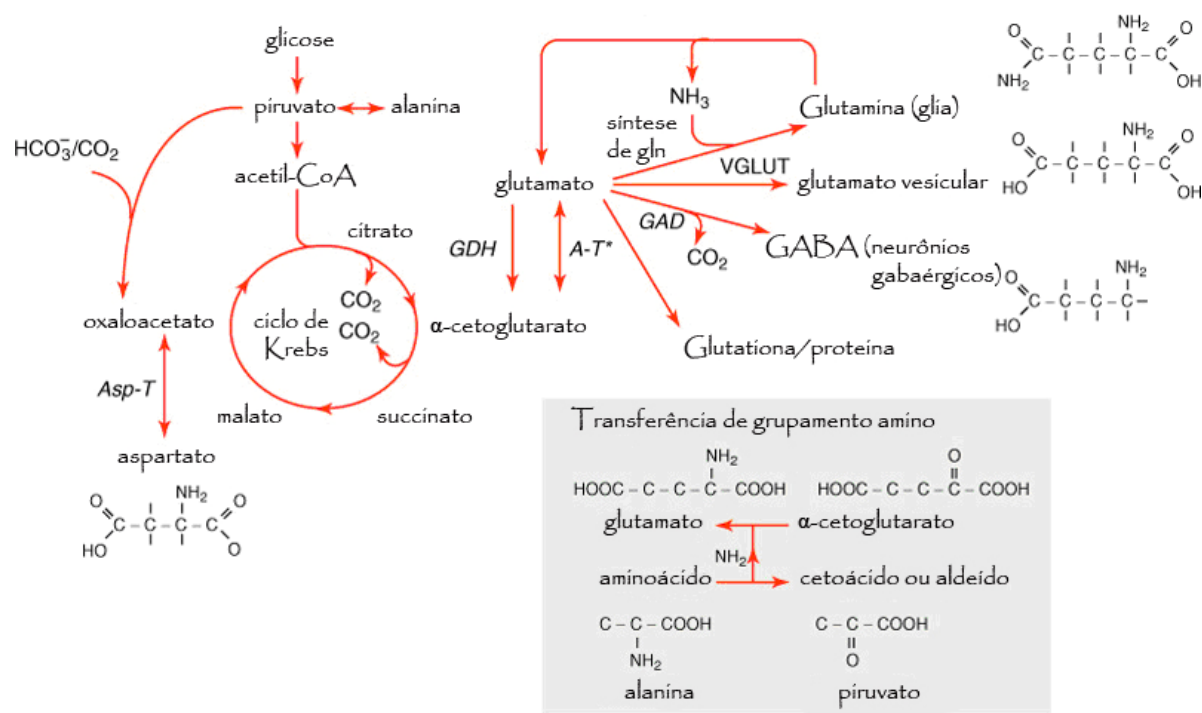


Fig 4 – Vias de formação e destino do glutamato. Esquema da via glicolítica, ciclo de Krebs e formação de glutamato e aspartato, dois aminoácidos excitatórios, formados por vias diferentes. Posteriormente o destino do glutamato é esquematizado nas diversas setas. Modificado de Hassel e Dingledine, 2006.

## 1.2.2 Liberação de Glutamato

### 1.2.2.1 Exocitose

Em neurônios em repouso o glutamato é estocado em vesículas sinápticas e é liberado pela fusão dessas estruturas com a membrana plasmática. Esse processo acontece em resposta à excitação neuronal e é chamado de exocitose (Südhof, 2004; Hassel e Dingledine, 2006). Primeiramente, as vesículas são carregadas com L-glutamato, por ação dos transportadores vesiculares (VGLUTs) descrita posteriormente no texto. As vesículas formam um agrupamento numa região do terminal axônico denominada zona ativa e tornam-se responsivas a íons  $\text{Ca}^{2+}$ . O número de vesículas por zona ativa pode variar de acordo com a localização. Uma célula bipolar da retina de peixe dourado pode apresentar aproximadamente 700 mil vesículas, com 60 zonas ativas diferentes por célula (von Gersdorff et al., 1996). Nos mamíferos esse número diminui. Um terminal axônico de um neurônio hipocampal, pode conter entre 100 a 200 vesículas, com 1 ou 2 zonas ativas. Quando um potencial de ação chega ao terminal axônico, canais de  $\text{Ca}^{2+}$ -voltage dependentes se abrem e ocorre um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dietrich et al., 2003). Após a fusão e formação do poro, induzidas por  $\text{Ca}^{2+}$ , as vesículas podem tomar 3 caminhos: são reabastecidas sem “descolarem” da membrana, o chamado *kiss'n'stay*; formam o poro e liberam rapidamente uma quantidade de neurotransmissor e também rapidamente desligam-se da membrana, o chamado 'kiss-and-run'; ou, por fim, fundem-se totalmente com a membrana e depois novas vesículas são endocitadas, denominado colapso total (Fig 5) (Südhof, 2004). Essa endocitose pode ser mediada por clatrina que forma um revestimento do endossoma, não mediada por clatrina, ou ainda uma reciclagem lenta através de compartimentos endossomais (Heuser e

Reese, 1973). Atualmente, a quantidade de vesículas sinápticas é dividido em 3 categorias: o *Pool* de Liberação Instantânea (PLI), o *Pool* de Reciclagem e o *Pool* de Reserva (Fig 6). O PLI está ancorado na zona ativa e 5 a 15 estimulações de alta frequência, poucos milissegundos de despolarização ou 1s de choque hipertônico normalmente acabam com esse *pool* (Elmqvist e Quastel, 1965; Mennerick e Matthews, 1996; Rosenmund e Stevens, 1996; Schneggenburger et al., 1999; Neves e Lagnado, 1999; Delgado et al., 2000; Richards et al., 2003). O *pool* de reciclagem compreende cerca de 5 a 20% das vesículas e é utilizado em frequências moderadas de estimulação, onde as vesículas liberam o neurotransmissor em poucos segundos e são reaproveitadas. Sua localização é difusa pelo terminal e não está na zona ativa (Richards et al., 2003; Kuromi e Kidokoro, 2003; de Lange et al., 2003). Por fim, o *pool* de reserva, encontra-se mais afastado da zona ativa. Compreende cerca de 80% das vesículas e só é utilizado em condições de extrema excitação, até mais de 30Hz, ou utilização de meio com alta concentração de íons  $K^+$  (Takei et al., 1996; de Lange et al., 2003). Provavelmente esse *pool* não é utilizado em condições fisiológicas. A utilização desse *pool* acontece com o esgotamento do *pool* de reciclagem, mas os mecanismos que dirigem essa mobilização ainda são desconhecidos (Rizzoli e Betz, 2005).

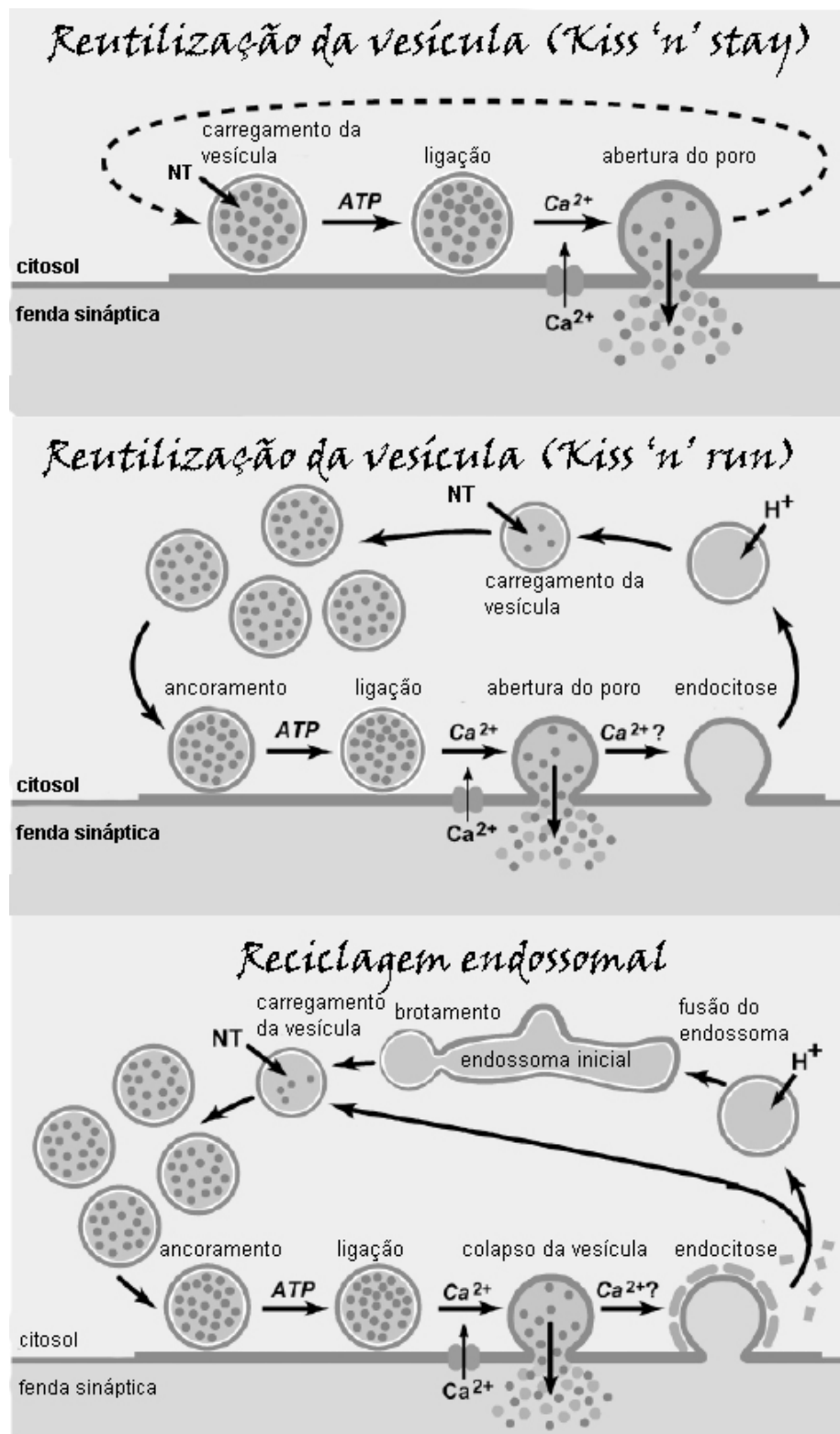


Fig 5 – Exocitose de glutamato. Esquema representando o carregamento da vesícula com neurotransmissor e as 3 possíveis formas de fusão de vesículas, *kiss'n'stay*, *kiss'n'run* e colapso total. Modificado de Südhof, 2004.

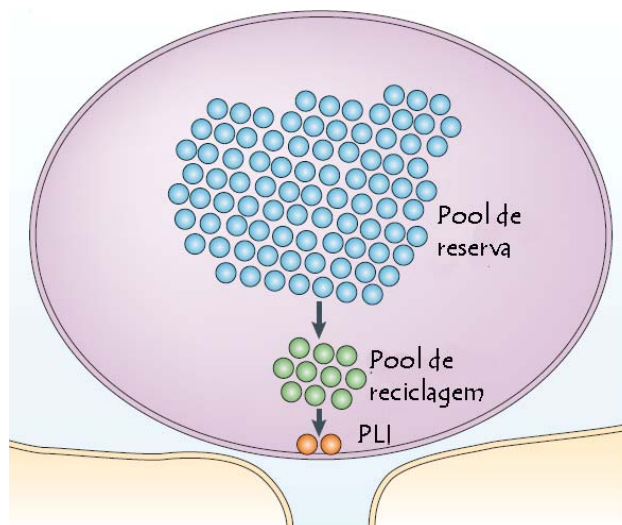


Fig 6 – *Pool* de vesículas de um neurônio. O *pool* de reserva representa cerca de 80-90% do total de vesículas. O *pool* de reciclagem cerca de 10-15% e o *pool* de liberação instantânea cerca de 1%. Modificado de Rizzoli e Betz, 2005.

Para entendermos como acontece a sinalização glutamatérgica é preciso entender como esse neurotransmissor se difunde através da fenda sináptica e encontra seus alvos. Uma vez liberado do terminal pré-sináptico, o glutamato rapidamente interage com receptores e transportadores. Com a difusão continuada, essa molécula continua a interagir com proteínas, por exemplo com receptores metabotrópicos ao longo da espinha dendrítica ou terminal nervoso até alcançar os transportadores gliais. O efeito sobre os alvos moleculares (receptores e transportadores) e a distância de difusão dependem da concentração de glutamato observada, ou seja, a quantidade de glutamato nos sítios de liberação. Além do mais, o glutamato liberado em uma sinapse pode levar à ativação de sinapses vizinhas (*intersynaptic cross-talk*) dependendo da sua concentração espaço-temporal. Aparentemente a ligação de glutamato aos seus transportadores leva a uma diminuição da concentração dessa molécula no meio extracelular e pode trazer competição à sinapse (Fig 7) (Jabaudon et al., 1999; Huang e Bergles, 2004).



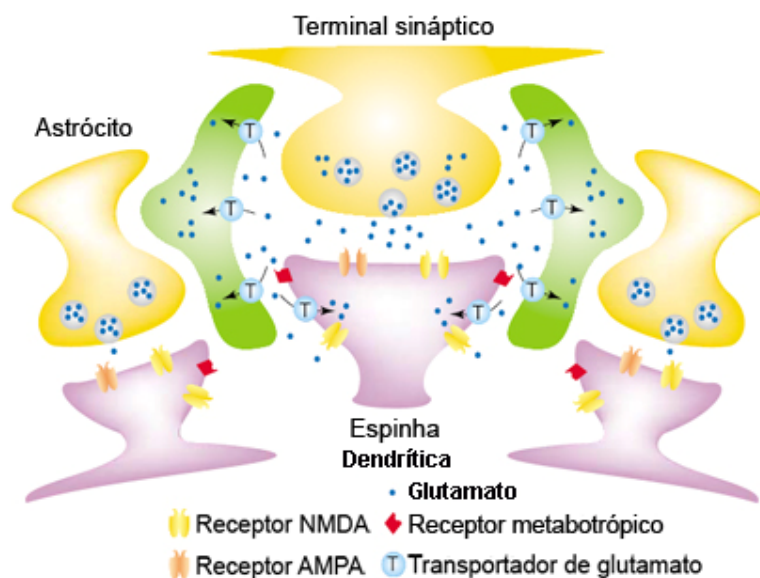


Fig 7 – Visão geral da sinapse glutamatérgica. Esquema representativo das suas estruturas e a difusão do neurotransmissor, ativando prontamente receptores do tipo AMPA e NMDA, e metabotrópicos gerais ao longo da espinha dendrítica, até chegar aos transportadores glias e neuronais. Modificado de Huang e Bergles, 2004.

O glutamato é liberado de diversas fontes e por diversos mecanismos. Apesar do foco principal de estudo até certo tempo ter sido a liberação sináptica por exocitose, é sugerido que a principal fonte de liberação seja a citoplasmática, independente de  $Ca^{2+}$  e insensível à tetrodotoxina, Botox (toxina botulínica) e toxina tetânica (Jabaudon et al., 1999; Südhof, 1995; Rossetto et al., 2001). Existem potenciais liberadores de glutamato no SNC: heterotrocadores (como os de L- cisteato, ascorbato e D e L-aspartato) e transportadores de cistina (sistema  $X_c^-$ ) que podem promover a liberação de glutamato (Baker et al., 2002a e b), além da liberação por reversão do transporte que ocorre em situações de despolarização (Choi e Rothman, 1990). Uma outra via de liberação, que na verdade ainda é muito especulada, seria a inserção de VGLUTs na membrana plasmática, que permitiria uma liberação de glutamato (Danbolt, 2001). Por fim, a ainda pouco entendida

liberação de aminoácidos excitatórios ativada por regulação do volume (Haskew et al., 2002). As células necessitam manter um volume celular constante frente a um estresse osmótico e para isso elas expressam uma variedade de proteínas que permitem regulação do volume (Strange et al., 1996, Kimelberg e Mongin, 1998). Vale ressaltar que apenas para os processos de exocitose e liberação por regulação do volume é necessária a presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e de ATP. Os outros processos ocorrem inclusive na ausência dessas moléculas (Danbolt, 2001).

#### 1.2.2.2 Liberação de glutamato por células gliais

Não só neurônios, mas também células gliais possuem os requisitos necessários para exocitose de glutamato (Attwell, 1994; Parpura et al., 1994, Bezzi et al., 1998; Araque et al., 2000; Innocenti et al., 2000; Pasti et al., 2001; Chen et al., 2006). Astrócitos são capazes de promover liberação de glutamato induzida por aumento de AMPc citosólico, promovendo mudanças na maturação das células gliais e estimuladas com ATP exógeno (Shiga et al., 2006). Além disso, foram detectados por RT-PCR de uma única célula, os RNAm para diversas proteínas da maquinaria de fusão vesicular como SNAPs, sinaptotagminas e sinaptobrevinas. Imunocitoquímica de alta resolução confirmou a presença dessas proteínas e estas tiveram seus níveis aumentados, principalmente v-SNARE e sinaptobrevina, após tratamento com db-AMPc, um indutor de aumento de AMPc citosólico (Zhang et al., 2004; Shiga et al., 2006). Gliossomas purificados que expressam GFAP, S-100, mas não marcadores neuronais nem microgliais ou de oligodendrócitos, foram capazes de promover liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato ( $^3\text{H}$ -D-asp) e glutamato endógeno de forma cálcio dependente e sensíveis à bafilomicina, sugerindo a exocitose como suposta

via de liberação (Stigliani et al., 2006). Atualmente, vários estudos ressaltam a importância da comunicação neuro-gliial para o estabelecimento e funcionamento correto de sinapses (Haydon, 2001; Ullian et al., 2001; Hansson e Rönnbäck, 2003, Ge et al., 2006), e a descrição da participação ativa das células gliais no contexto da sinapse nos leva a um modelo de sinapse “tripartite”, com a presença de células neuronais como o elemento pré-sináptico e pós-sináptico, mas também o envolvimento da glia nos processos de função, força e plasticidade sináptica.

Durante uma situação de isquemia, as células gliais têm papel importante na regulação da concentração de glutamato extracelular, pois possuem transportadores de alta afinidade para essa molécula. O transporte é dependente de íons  $\text{Na}^+$  e o gradiente é mantido pela atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (Bonvento et al., 2002; Camacho e Massieu, 2006). Em situações de isquemia prolongada, o metabolismo de glicose e a produção mitocondrial de ATP ficam alterados, ativa-se a via anaeróbica de glicólise e ocorre uma grande quebra de ATP endógeno (Sanchez-Carbente e Massieu, 1999; Garcia e Massieu, 2003). Nessa situação ocorre considerável liberação de aminoácidos excitatórios por parte das células gliais, devido aos seguintes processos: 1) atividade de canais sensíveis a volume (Phillis et al., 1997; Seki et al., 1999) e 2) reversão dos transportadores de alta afinidade (Phillis et al., 2000). A diminuição dos níveis celulares de ATP leva à falha na atividade de trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, levando a um colapso dos gradientes iônicos. O acúmulo intracelular de íons  $\text{Na}^+$  leva à liberação de compostos osmoticamente ativos, como glutamato e aspartato (Phillis et al., 1997; Estevez et al., 1999) e também promove reversão dos transportadores de alta afinidade (EAATs) (Phillis et al., 1999; Longuemare et al., 1999).

### 1.2.3 Sinalização

A sinapse glutamatérgica clássica é representada por uma comunicação entre um terminal pré-sináptico e um espícula dendrítica (para sinapses axo-dendríticas) ou um terminal axônico (para sinapses axo-axônicas). Entretanto, não só neurônios mas também astrócitos, oligodendrócitos e células microgliais apresentam diferentes tipos de receptores para glutamato.

Dois grandes famílias de receptores de glutamato foram identificados até hoje: receptores ionotrópicos que são canais de íons ativados pelo ligante, e metabotrópicos que são receptores acoplados à proteína G (Hollmann e Heinemann, 1994; Schoepfer et al., 1994; Borges e Dingledine, 1998; Nakanishi et al., 1998; Ozawa et al., 1998; Dingledine et al., 1999).

#### 1.2.3.1 Receptores ionotrópicos

Nessa classe de receptores, o sítio de ligação para glutamato e o canal iônico estão no mesmo complexo macromolecular. A ligação do agonista promove uma mudança conformacional na molécula que permite a abertura do canal e conseqüente fluxo iônico. Desde a descoberta da primeira subunidade de receptor de glutamato (GluR1) em 1989 mais de 16 genes que expressam proteínas relacionadas foram clonados até 1992 (Hollmann e Heinemann, 1994). Os receptores ionotrópicos dividem-se em duas grandes classes: os não-NMDA; AMPA e KA, que respondem ao ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA) e ao kainato, respectivamente e os receptores de NMDA, que respondem ao N-Metil-D-aspartato (Scatton, 1983). Essa ativação não é completamente seletiva, visto que AMPA é capaz de ativar alguns tipos de receptores de kainato e

kainato capaz de produzir correntes mantidas, devido à ativação de receptores do tipo AMPA (Keinänen et al., 1990; Patneau and Mayer, 1990; Herb et al., 1992).

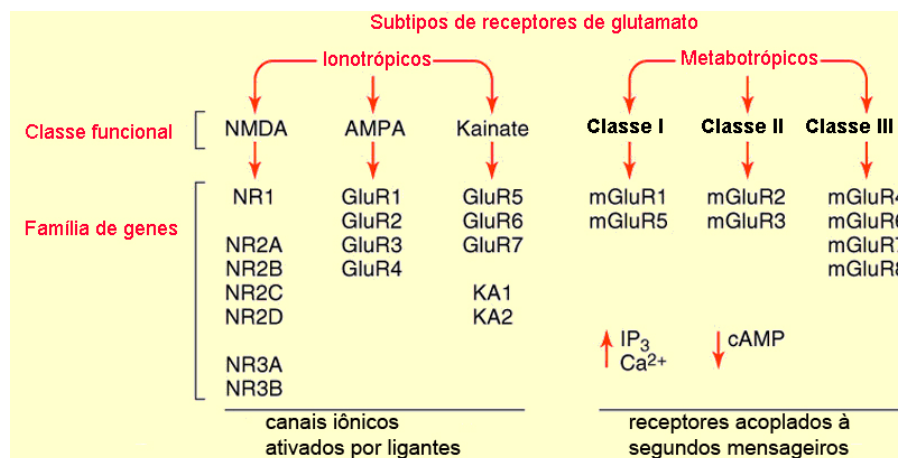


Fig 8 – Receptores de glutamato e suas subunidades. Modificado de Hassel e Dingledine et al., 2006.

A afinidade e a permeabilidade iônica são diferentes entre os tipos de receptores. Receptores de NMDA tem uma afinidade a glutamato com  $EC_{50}$  entre 0.4-1.8 $\mu$ M. Já o AMPA perto de 400 $\mu$ M (Dingledine et al., 1999). Atualmente 6 famílias de subunidades de receptores já foram descritas. Os receptores são tetrâmeros formados pelo conjunto de subunidades, o que garante diversas isoformas de receptores AMPA, KA e NMDA, com características eletrofisiológicas peculiares para cada receptor formado. Receptores AMPA possuem as subunidades GluR1-4, receptores de KA subunidades GluR5-7 e KA1 e KA2, e, por fim, os receptores NMDA possuem subunidades NR1, NR2<sub>A-D</sub>, NR3<sub>A-B</sub> (Fig 8). Os receptores ionotrópicos possuem 3 domínios transmembrana e um domínio que se insere na membrana mas depois volta ao citoplasma, não atravessando-a totalmente. É exatamente nesse sítio onde se insere a região de mutação Q/R nas subunidades



desses receptores pode ser bloqueada com ciclothiazida, que só possui efeito sobre receptores AMPA, e concanavalina A, que somente atua sobre receptores de KA (Trussel et al., 1993; Fletcher e Lodge, 1996). Subunidades GluR5 e GluR6 podem sofrer um processo de edição de RNAm que modifica os aminoácidos formadores do poro e modular a permeabilidade do canal (Sommer et al., 1991).

#### 1.2.3.1.2 Receptores de NMDA

Os receptores de glutamato do tipo NMDA possuem 3 famílias de subunidades: A subunidade NR1, que foi a primeira a ser clonada em ratos (Moriyoshi et al., 1991), a subunidade NR2, constituída do produto de 4 genes (NR2<sub>A-D</sub>) e por fim a NR3, constituída do produto de 2 genes (NR3<sub>A-B</sub>) (Shigemoto et al., 1993). O receptor é uma proteína tetramérica, formado por 2 subunidades NR1. A expressão de receptores homoméricos, possuindo somente a subunidade NR1, revelou receptores com características clássicas de NMDA: seletividade para agonistas e antagonistas, alta permeabilidade a íons  $\text{Ca}^{2+}$ , bloqueio por íons  $\text{Mg}^{2+}$  e modulação por glicina (Nowak et al., 1984; MacDermott et al., 1986; Johnson e Ascher, 1987; Moriyoshi et al., 1991; Nakanishi, 1992; Hollmann e Heinemann, 1994). Já a expressão de receptores homoméricos de subunidades NR2 não se mostrou funcional (Brandstätter et al., 1998). Entretanto, a formação de canais com subunidades NR1 e NR2 leva à formação de um receptor funcional com correntes maiores do que o homomérico NR1 (Ikeda et al., 1992; Kutsuwada et al., 1992; Monyer et al., 1992; Ishii et al., 1993). A abertura do canal requer a ligação do agonista: glutamato, aspartato ou NMDA, e do co-agonista: glicina ou D-serina (Wolosker et al., 1999), que promove o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , preferencialmente, e  $\text{Na}^+$ . A ativação máxima do receptor foi

descrita com ligação de duas moléculas de glutamato e 2 do co-agonista (Benveniste e Mayer, 1991; Clements e Westbrook, 1991) na subunidade NR1 (Dingledine et al., 1999). O receptor ionotrópico de NMDA é particularmente bem estudado, estando envolvido em diversas vias sinalizadoras: vias de dor e formação de memória (LTP), dentre outras. O receptor possui uma ativação lenta (10-50ms) (Wyllie et al., 1998) e demora muito mais para se desativar. Uma peculiaridade é que o poro do canal encontra-se bloqueado reversivelmente pelo íon  $Mg^{2+}$ . Esse bloqueio é voltagem-dependente, sendo necessária uma prévia despolarização (causada pela ativação dos receptores não-NMDA) para deslocar o íon  $Mg^{2+}$  do interior do poro e liberar o receptor de NMDA para sua total ativação. Várias drogas já foram descobertas e são largamente utilizadas para o estudo farmacológico e o envolvimento desses receptores em diversos processos fisiológicos. As drogas MK-801, ketamina e a fenciclidina (PCP) também exercem um bloqueio voltagem-dependente do canal. Esses compostos exibem graus diferentes de dependência de voltagem, possivelmente por se ligarem em sítios diferentes. De forma interessante, a família NR3 também possui um sítio de ligação de glicina/D-serina e a incorporação dessas subunidades na formação do canal reduz a permeabilidade a íons  $Ca^{2+}$ . Além disso, diversos componentes endógenos modulam a atividade do receptor de NMDA, são eles: dynorfinas,  $H^+$ , zinco, ácido araquidônico e poliaminas dentre outros. A tabela abaixo resume a ação de alguns agentes sobre os receptores de NMDA (Dingledine et al., 1999).



<b>MODULADOR</b>	<b>EFEITO</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>
Dynorfina	INIBIÇÃO	0.3µM
Pressão Osmótica	INIBIÇÃO	
Agentes Oxidantes	INIBIÇÃO	
Prótons	INIBIÇÃO	50-200Nm
Esteróides sulfatados	INIBIÇÃO	150µM
Zinco	INIBIÇÃO	0.2-2µM
Ácido Araquidônico	POTENCIAÇÃO	10µM
PACAP	POTENCIAÇÃO	<1µM
Poliaminas, Histamina	POTENCIAÇÃO	100µM
Agentes redutores	POTENCIAÇÃO	
Esteróides sulfatados	POTENCIAÇÃO	12µM

Tabela 1. Modulação endógena extracelular da função do receptor de NMDA. Modificado de Dingledine e colaboradores, 1999.

### 1.2.3.2 Receptores metabotrópicos

Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são homodímeros, membros da família C de receptores acoplados à proteína G e possuem envolvimento em diferentes processos, por exemplo na modulação da excitabilidade do SNC (Ossowska, 2005; Pilc e Ossowska 2007). Oito subtipos de mGluRs já foram descritos até hoje. Com base na homologia de suas seqüências e farmacologia, esse receptores foram divididos em 3 grupos: Grupo 1 (mGluR1 e mGluR5) são acoplados positivamente à fosfolipase C, o que leva a um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, IP<sub>3</sub> e DAG quando ativados (Hassel e Dingledine et al., 2006); Grupo 2 (mGluR 2 e mGluR 3) e Grupo 3 (mGluR 4 e mGluR6–8) são acoplados negativamente à adenilato ciclase e, quando ativados, acarretam uma diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, (Schoepp et al., 1992; Hassel e Dingledine et al., 2006; Pilc e Ossowska, 2007). A ligação de glutamato promove

uma mudança conformacional nos receptores homodiméricos e acoplamento dessa estrutura da proteína G a domínios intracelulares do receptor. A ligação do agonista estabiliza a conformação fechada do receptor e resulta numa ativação da proteína G que é dependente de uma ligação dissulfeto entre dois resíduos de cisteína presentes na alça de ligação do agonista (Kunishima et al., 2000; Rondart et al., 2006). Membros do grupo 2 e 3 possuem localização preferencialmente pré-sináptica (Schoepp, 2001), e podem servir de auto-receptor em algumas estruturas cerebrais (Cartmell e Schoepp, 2000). Já foi demonstrado que a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato pré-sinápticos leva à diminuição da liberação desse neurotransmissor, inibindo a transmissão excitatória, uma vez que todos os mGluR são capazes de inibir canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem, o que comprometeria a exocitose (Takahashi et al., 1996). Uma característica peculiar dos receptores metabotrópicos de glutamato é a sua sensibilidade à variação de voltagem. Recentemente foi mostrado que a dependência de voltagem reside no próprio receptor. Aparentemente a despolarização modifica a conformação tridimensional da segunda e terceira alça intracelular, afetando a sua associação com a proteína G (Ohana et al., 2006).

### 1.2.3.3 Receptores de glutamato na retina

Até a presente data, a maioria dos estudos de localização dos receptores ionotrópicos de glutamato na retina de aves e mamíferos foram realizados com hibridização *in situ*, o qual revela a expressão do RNAm, mas não da proteína nesses tecidos. Na retina de vertebrados, receptores de kainato medeiam a transmissão sináptica entre os fotorreceptores e as células bipolares do tipo OFF

(Huettner, 2003). Diferentes subtipos de células bipolares, b3 e b7, possuem receptores de kainato com propriedades fisiológicas diferentes. Em ambas as células esses receptores foram ativados com ácido 2-amino-3-(5-*tert*-butil-3-hidroxil-4-isoxazol)-propiónico (ATPA), sugerindo uma participação da subunidade GluR5. Entretanto, células b3 expressam tais receptores com recuperação lenta após a dessensibilização, causada por glutamato, enquanto células b7 recuperam-se mais rapidamente. Estudos de imunocitoquímica observaram marcação para esse receptor em células horizontais, amácrinas, ganglionares e bipolares (Peng et al., 1995). A transmissão de cones a um terceiro tipo de células bipolares foi descrito ser mediado por ativação de receptores do tipo AMPA (DeVries, 2000). Estudos de imunocitoquímica desenvolvidos por Qin e Pourcho (1996) demonstraram marcação para este receptor em células horizontais, amácrinas, ganglionares e poucos cones na retina de gatos. Células ganglionares do tipo  $\alpha$  expressaram diversas subunidades desse receptor, enquanto outros neurônios, principalmente células amácrinas, só tiveram expressão de uma subunidade (Brandstätter et al., 1998). Em retinas de rato, subunidades dos receptores de AMPA e KA já foram descritos em várias células. As subunidades GluR1-3 e GluR5 apresentaram imunomarcação em células horizontais, bipolares e amácrinas (Hughes et al., 1992; Peng et al., 1995; Qin e Pourcho 1996). Todas as subunidades de receptores de NMDA foram descritas na retina, entretando a expressão de NR2<sub>D</sub> só foi observada durante o desenvolvimento (Watanabe et al., 1994; Brandstätter et al., 1998). Esses receptores estão presentes em virtualmente todos os neurônios da camada nuclear interna e células ganglionares de ratos e, na retina de galinha, também foram observados nas camadas plexiforme interna e externa junto com receptores do tipo AMPA/KA,

ambos com um padrão puntiforme de marcação, sugerindo agregação desses receptores nas microregiões de sinapses (Bredariol e Hamassaki-Britto, 2001). Estudos de imunomarcação para glutamato e aspartato na retina apresentam um padrão difuso de marcação, apresentando reatividade em todas as classes de neurônios retinianos. Fotorreceptores mostraram uma marcação heterogênea para essas duas moléculas, mas a maioria apresentava marcação dupla para esses dois neurotransmissores. Praticamente todas as células horizontais eram imunopositivas para ambas moléculas. 82% das células bipolares também eram duplamente positivas, mas 10% apresentava marcação somente para glutamato e somente 0.1% para aspartato. O baixo número de células asp(+) e Glu(-) em células amácrinas também foi observado, representando 1.5% das células contra 81% de células duplamente marcadas. Esses dados mostram que o aspartato está mais localizado na retina interna, onde pode ter uma grande importância fisiológica (Sun e Crossland, 2000). Na retina, existe um subtipo específico de transportador de glutamato, o EAAT5. Em camundongos, esse transportador está presente em fotorreceptores e funciona como um receptor pré-sináptico em células bipolares do tipo OFF (Wersinger et al., 2006). Estudos da cinética eletrofisiológica demonstraram que ele se encontra próximo ao sítio de liberação de glutamato.

#### 1.2.4 Reciclagem de glutamato e o ciclo glutamato-glutamina

Após a captação astrocitária, o glutamato pode ser deaminado e gerar glutamina, pela ação da enzima ATP-dependente glutamina sintetase (Ottersen et al., 1992; Laake et al., 1995) ou pode ser convertido a  $\alpha$ -cetoglutarato por atividade da glutamato desidrogenase, ou ainda sofrer transaminação pelas transaminases. O

composto  $\alpha$ -cetoglutarato entra no ciclo de Krebs até gerar malato. Este composto pode continuar no ciclo de Krebs ou ser descarboxilado até gerar piruvato e este reduzido a lactato. Essa última via já foi demonstrada *in vitro* (McKenna et al., 1996). Glutamina e glutamato podem ser liberados por astrócitos e captados pelos neurônios. A glutamina é substrato para uma variedade de transportadores (o sistema A dependente de sódio: ASC e os transportadores N, assim como para o sistema 1 independente de sódio). A liberação de glutamina dos astrócitos ocorre pelos transportadores do sistema independente de sódio SN1, também conhecido como SNAT3, expressos somente nesse tipo celular. O transporte é bidirecional e ocorre com o simporte de íons  $\text{Na}^+$  e o antiporte de prótons (Chaudhry et al., 1999; Gu et al., 2000; Mackenzie e Erickson, 2004). Outra possível forma de liberação de glutamina seria através de transportadores de aminoácidos AST2 (Bröer et al., 1999), apesar dos baixos níveis dessa proteína no cérebro.

Os neurônios captam glutamina do meio extracelular por meio de transportadores específicos do sistema A: SNAT1 e SNAT2, largamente expressos em neurônios glutamatérgicos ao longo do SNC (Chaudhry et al., 2002a; Chaudhry et al., 2002b). O aumento dos níveis de AMPc intracelular leva a uma maior expressão de GLAST na superfície celular e a um aumento da captação de D-aspartato, confirmando demonstrações prévias de um aumento na captação de glutamato induzido pelo AMPc (Hertz et al., 1978; Schlag et al., 1998).

### 1.2.5 Transporte e depuração de glutamato

Glutamato, como todo neurotransmissor, precisa ter sua ação de sinalização terminada. Como não existe nenhuma enzima capaz de metabolizar

extracelularmente o glutamato, o processo responsável pela retirada desse aminoácido da fenda e do espaço extracelular é a captação feita pelos transportadores de glutamato. A difusão passiva também pode contribuir para esse processo, especialmente em sinapses pequenas. A não retirada desse neurotransmissor do fluido extracelular pode levar à excitotoxicidade devido à presença de receptores glutamatérgicos em todos os elementos celulares, como dendritos, terminais axônicos, corpos celulares e também células da glia. A retirada de glutamato não deve ser feita só na fenda sináptica, mas em todo o fluido extracelular a fim de se evitar danos (Choi, 1992; Wada, 1997).

Os sistemas de transporte são os responsáveis pela manutenção da baixa concentração de glutamato extracelular. Esse processo é feito por proteínas que utilizam o gradiente eletroquímico dos íons  $\text{Na}^+$  para acoplar o transporte de glutamato para o citoplasma. Neurônio e glia expressam transportadores de glutamato e a sua inibição leva a um aumento da concentração extracelular de glutamato e até à excitotoxicidade e morte neuronal (Choi, 1992; Jabaudon et al., 1999; Danbolt, 2001). Esses dois tipos celulares presentes no SNC expressam proteínas capazes de transportar glutamato. Algumas estão presentes na membrana citoplasmática e outras intracelularmente (Danbolt, 2001; Hassel e Dingledine, 2006).

#### 1.2.5.1 Transportadores de membrana

##### 1.2.5.1.1 Transportadores de alta afinidade

Esses transportadores eram chamados originalmente de “transportadores de alta afinidade dependentes de sódio”. São cinco subtipos e, com o tempo, foi visto que a

sua afinidade não era tão alta assim ( $K_m$  entre 1-100 $\mu$ M). Além disso eles eram dependentes não só de íons  $Na^+$ , mas de  $K^+$  também. Sua nomenclatura mudou para a usada atualmente: EAAT (*excitatory amino acid transporter*). Até o momento, são conhecidos 5 tipos de EAATs: o EAAT1, análogo em humanos ao transportador GLAST de roedores (Storck et al., 1992); o EAAT2, análogo ao transportador GLT-1 de camundongos (Pines et al., 1992); o EAAT3, análogo ao EAAC1 (Kanai e Hediger, 1992) e, finalmente, os EAAT 4 (Fairman et al., 1995) e EAAT 5 (Arriza et al., 1997). Todas essas proteínas promovem o transporte de L e D-glutamato, assim como também de L- e D-aspartato, dependente de íons  $Na^+$  e  $K^+$ . Estudos em retinas de salamandra sugerem ainda uma possível variação de *splicing* dos EAATs 1 e 2 (Ramachandran et al., 1993; Utsunomiya-Tate et al., 1997; Meyer et al., 1998 a,b; Münch et al., 1998; Matsumoto et al., 1999; Meyer et al., 1999). Os subtipos de EAATs possuem 50 – 60% de similaridade na seqüência de aminoácidos entre si, e cerca de 30 – 40% de identidade com transportadores de aminoácidos neutros (Transportadores de alanina-serina-cisteína: ASCT1 e 2) (Arriza et al., 1993; Utsunomiya-Tate et al., 1996). Curiosamente, transportadores de outros neurotransmissores como GABA, glicina, dopamina, serotonina, noradrenalina e taurina não apresentam qualquer similaridade com os transportadores de aminoácidos excitatórios EAATs (Borowski e Hoffman, 1995; Malandro e Kilberg, 1996; Povlock e Amara, 1997; Nelson, 1998; Masson et al., 1999, Saier, 1999). Análogos dos cinco tipos de EAATs foram clonados em diferentes espécies, incluindo homem (Arriza et al., 1994; Kanai et al., 1994); camundongo (Tanaka, 1993a; Kirschner et al., 1994a,b; Mukainaka et al., 1995; Sutherland et al., 1995; Maeno-Hikichi et al., 1997); rato (Tanaka, 1993b; Kanai et al., 1995, Kiryu et al., 1995;

Grewer et al., 2000); bovinos (Inoue et al., 1995); cães (Sato et al., 2000); salamandra (Eliasof et al., 1998); nematodos (Kawano et al., 1996, 1997; Radice e Lustigman, 1996) e insetos (Seal et al., 1998; Kawano et al., 1999; Donly et al., 2000). Além disso, a localização cromossômica para os EAATs 1,2 e 3 já foi determinada (Kirschner et al., 1994b, Smith et al., 1994; Li e Francke, 1995; Takai et al., 1995). A possível existência de um transportador neuronal, localizado no terminal axônico foi exaustivamente debatida por pesquisadores da área. Experiências descreviam o acúmulo de  $^3\text{H}$ -D-aspartato em terminais nervosos, atingido concentrações citoplasmáticas na faixa de milimolar, enquanto a externa mantinha-se na faixa de micromolar. Esse fato fica difícil de ser explicado descartando-se a idéia de um possível transportador. Posteriormente o cientista Vidar Gundersen, com trabalhos de localização de L-aspartato com um anticorpo específico e preparações de microscopia eletrônica, demonstrou a marcação para este aminoácido em terminais nervosos de fatias de hipocampo e até a sua incorporação em vesículas sinápticas (Gundersen et al., 1993; Gundersen et al., 1996, Gundersen et al., 1998; Gundersen e Storm-Mathisen, 2000). Apesar de neurônios hipocámpais possuírem RNAm para GLT-1 (Torp et al., 1994; Schmitt et al., 1996; Torp et al., 1997) e expressarem a proteína em cultura (Mennerick et al., 1998), aparentemente a incorporação de D-aspartato não parecia depender desse transportador, pois estudos de imunohistoquímica não detectaram GLT-1, GLAST ou EAAT4 nesses terminais (Danbolt, 2001). Esse resultado pode ser questionado supondo a existência de uma isoforma que não seria reconhecida pelo anticorpo. Hoje, sabe-se que neurônios e glia podem apresentar uma forma truncada do GLT-1, na região 3'. Esse transportador foi detectado por imunocitoquímica e pode representar o transportador



pré-sináptico neuronal (Utsunomiya-Tate et al., 1997; Danbolt, 2001, Chen et al., 2002, Chen et al., 2004). Uma segunda mutação para o transportador GLT-1 foi descrita, dando origem ao transportador GLT-1v (Schmitt et al., 2002; Chen et al., 2002). Essa nova mutação apresenta alta homologia na seqüência de aminoácidos com o GLT-1 $\alpha$ , diferindo-se apenas na região C-terminal. (Utsunomiya-Tate et al., 1997; Schmitt et al., 2002). A variação C-terminal funcional pode ser o responsável pela maioria da captação atribuída ao GLT-1, pois estudos anteriores não discriminavam as duas isoformas (Yi e Hazell, 2006).

Os diferentes tipos de transportadores (EAATs) apresentam diferentes localizações e funções. Os EAATs 1 e 2 são encontrados em astrócitos associados a contatos excitatórios. O EAAT3 e o EAAT4 são encontrados nos dendritos e corpos celulares dos neurônios do SNC (Fig 10). Esse último é expresso seletivamente nas células GABAérgicas, por exemplo nas células de Purkinje do cerebelo. O EAAT5 parece ser exclusivo de retina e está presente nos terminais pré-sinápticos (Shigeri et al., 2004). Ensaio de imunocitoquímica em retina de mamíferos demonstraram a existência de pelo menos 3 tipos de EAATs, além do EAAT5. As células de Müller apresentaram o EAAT1 (GLAST-1). Os cones e as células bipolares de cones apresentaram o EAAT2 (GLT-1). O EAAT3 (EAAC1) foi encontrado em células horizontais, amácrinas e ganglionares. Também em retinas de mamíferos foi sugerido que o GLAST seja o transportador mais importante envolvido no processo de remoção do glutamato (Revisão Amara e Fontana, 2002), apesar do GLT-1 ser responsável em grande parte pela captação no prosencéfalo (Tanaka et al., 1997), demonstrado com estudos de captação em homogenatos dessa região de camundongos KO para GLT-1. Além disso, ensaios de imunoprecipitação para GLT-1 mostraram que mais de 90% da

atividade de transporte pode ser reconstituída após precipitação em extratos de prosencéfalo (Danbolt et al., 1992; Haugeto et al., 1996).

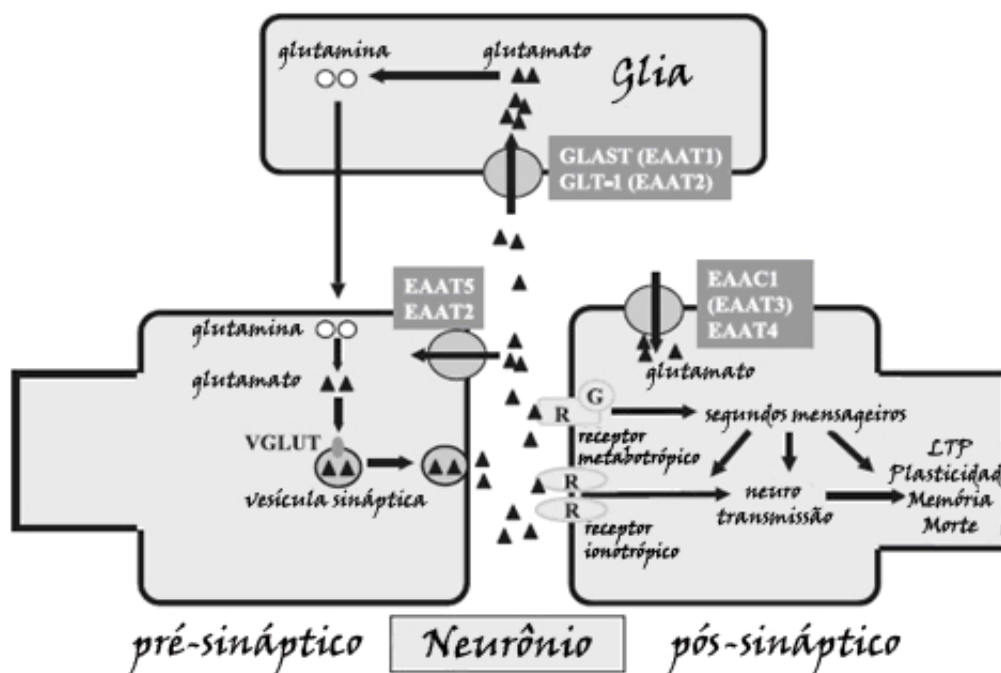


Fig 10 – Localização sináptica dos EAATs. O esquema também representa o ciclo de glutamato, desde sua liberação até a sua retirada da fenda. Modificado de Shigeri e colaboradores, 2004.

Os EAATs apresentam de 6 a 8 domínios transmembrana, com 1 a 2 alças de reentrância, com as partes C e N-terminal voltadas para o citoplasma. A topologia correta é disputada pelo grupo da cientista Susan Amara, nos EUA (Fig 11 A) (Seal e Amara, 1998; Seal et al., 2000; Leighton et al., 2002) e o grupo do cientista Baruch Kanner em Israel, baseado em estudos de mutagênese sítio-dirigida e acessibilidade de cisteína (Fig 11 B) (Grunewald et al., 1998; Kanner et al., 2001; Grunewald et al., 2002; Kanner e Borre, 2002). Os transportadores de aminoácidos excitatórios, envolvidos no processo de retirada do glutamato da fenda sináptica, também influenciam na ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos e NMDA

(Brasnjo e Otis, 2001; Huang e Bergles, 2004a,b). Estudos feitos com camundongos “knock out” para os genes de EAATs revelaram os efeitos da ausência dos transportadores: aumento de morte por epilepsia espontânea, maior susceptibilidade à lesão cortical aguda e falha na realização de tarefas simples (Revisão Amara e Fontana, 2002).

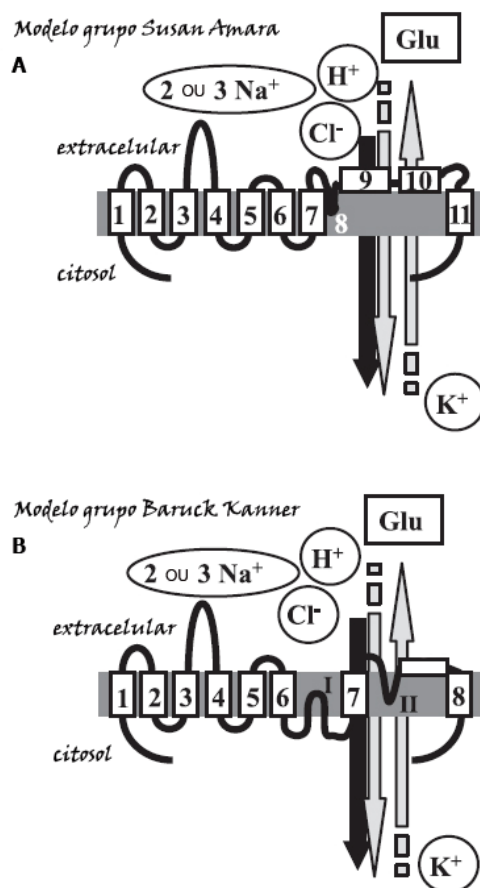


Fig 11 – Possíveis modelos dos EAATs. (A) representa o modelo defendido pelo grupo da Dr<sup>a</sup>. Susan Amara, e (B) o modelo proposto pelo grupo do Dr. Baruck Kanner. Modificado de Shigeri e colaboradores, 2004.

#### 1.2.5.1.2 Biofísica do transporte

O processo de captação de aminoácidos excitatórios é dirigido por um gradiente eletroquímico através da membrana. O transporte está acoplado a um gradiente de  $\text{Na}^+$ , o que permite a ligação do glutamato, de um próton e o transporte inverso de

um íon  $K^+$ , o que garante uma característica eletrogênica ao processo sendo este estimulado por um potencial de membrana negativo (Sarantis e Attwell, 1990; Szatkowski et al., 1991; Kanai et al., 1995). Além disso, o transporte de glutamato pode gerar um influxo de íons  $Cl^-$ , causado pela abertura de um canal iônico aparentemente acoplado ao transportador (Zerangue e Kavanaugh, 1996; Arriza et al., 1997), principalmente em retinas onde é predominante a presença do EAAT5. Rubídio e céσιο podem substituir o íon potássio, mas nenhum, além do lítio, pode substituir o íon  $Na^+$  (Danbolt et al., 1990; Barbour et al., 1991; Grunewald e Kanner, 1995). Assim que o complexo glutamato/sódio entra na célula, o íon potássio ou outro complexo sódio/glutamato deve sair para que se possa fechar o ciclo do transporte. O processo de transporte é reversível em qualquer etapa, gerando ciclos incompletos de transportes e heterotrocas. Além disso o transporte é simétrico e pode acontecer em todas as direções (Kanner e Marva, 1982). Na ausência de íons potássio o transporte se resume a uma troca de substrato externo pelo interno, ou seja, se houver ligação de glutamato no sítio externo (mais  $Na^+$  e  $H^+$ ) este pode soltar ou ser carregado para o citosol. Uma vez no citosol, ele pode ser liberado ou o processo inverso pode ocorrer. O processo de transporte é dependente de íons sódio e também sensível à temperatura. Contudo, a corrente iônica que pode ser gerada após o transporte não o é. O transporte utiliza o gradiente iônico de íons como o  $Na^+$ ,  $H^+$  e  $K^+$  como fontes de energia livre (Billups et al., 1996, Zerangue e Kavanaugh, 1996; Levy et al., 1998b). Os diferentes transportadores também apresentam estequiometrias diferentes para o processo de transporte: o EAAT1 carrega 3 íons  $Na^+$ . Os EAATs 2 e 3 carregam 3 íons  $Na^+$  e 1  $H^+$ , enquanto os EAATs 4 e 5 carregam 2 íons  $Na^+$  para o interior celular (Zerangue e Kavanaugh, 1996).

Estudos com transportadores humanos clonados, expressos em células COS-7, mostraram afinidades diferentes entre os EAATs. EAAT 1, 2 e 3 possuem valor de  $K_m$  de 48, 97 e 62 $\mu$ M, respectivamente (Arriza et al., 1994) e 20, 18 e 29 $\mu$ M quando expressas em oócitos de *Xenopus* (Arriza et al., 1994; Kanai et al., 1994). Ainda em oócitos de *Xenopus*, transportadores EAAT1 e 2 de ratos e EAAT3 de coelhos, apresentaram  $K_m$  de 11, 17 e 12 $\mu$ M e transportadores EAAT4 de humano e de ratos  $K_m$  de 3.3 e 1.3 $\mu$ M, respectivamente (Kanai e Hediger, 1992; Klöckner et al., 1993; Fairman et al., 1995; Levy et al., 1998b; Lin et al., 1998).

A primeira evidência de que o transporte de glutamato seria mais complicado do que simplesmente mobilizar glutamato e íons para uma determinada direção surgiu em estudos em cones da retina de salamandra. Foi observada a geração de uma corrente de  $Cl^-$ , dependente de íons  $Na^+$ . A princípio achava-se que o transporte poderia ativar ou estar associado a um canal de  $Cl^-$  (Sarantis et al., 1988). Hoje, porém, sabe-se que o próprio transportador funciona como um canal de ânions (Sonders e Amara, 1996; Fairman e Amara, 1999; Seal e Amara, 1999). Esse fluxo de cloreto é termodinamicamente independente do processo de transporte (Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1997; Wadich e Kavanaugh, 1998). Apesar da presença de  $Na^+$  ser fundamental para que o transporte e a condutância aos ânions ocorra, o inverso não é verdadeiro, ou seja, a ausência de ânions no meio não influencia no processo de transporte. Sob condições em que o transporte líquido de glutamato não é esperado, a condutância iônica continua a acontecer. Além disso, a temperatura influencia muito mais o transporte de glutamato do que o influxo de ânions. Essa observação corrobora o conceito de que os ânions passem pelo próprio transportador em vez de por um canal ativado pelo transporte. Essa

propriedade supracitada é muito mais proeminente em EAATs 4 e 5 e quase não existente em EAAT 2, pelo menos na presença de aminoácidos fisiologicamente relevantes (Billups et al., 1996). Ainda não está claro quais são as funções e conseqüências do influxo de íons  $\text{Cl}^-$ , porém estudos em retinas de salamandras mostraram que a presença de íons na parte citoplasmática pode diminuir a velocidade de transporte, pois lentificam a taxa de mudança conformacional da proteína do estado “out” para o estado “in” (Auger e Attwell, 2000). O EAAT 4 tem uma condutância a prótons, ativada por ácido araquidônico e glutamato (Fairman et al., 1998; Tzingounis et al., 1998). Além disso, foi descrito uma permeabilidade a cátions constitutiva em EAAT 1 de humanos, e não de EAAT 2, dependente de íons  $\text{Cl}^-$  (Vandenberg et al., 1995). O ciclo de captação de glutamato é um ciclo lento, com duração aproximada de 60 a 80ms (Wadiche e Kavanaugh, 1998; Auger e Attwell, 2000), apesar de um ciclo de 11.6ms a 36°C já ter sido descrito (Bergles e Jahr, 1998). Essa hipótese pode ser explicada com a teoria da heterotroca, uma vez que já foi descrito para GLT-1, por exemplo, a saída de  $^3\text{H}$ -glutamato de lipossomos, quando na presença de *L-trans*-pirrolidina-2,4-dicarboxilato (PDC), um inibidor competitivo do transporte (Volterra et al., 1996). Essa liberação de  $^3\text{H}$ -glutamato ocorreria por heterotroca e não por transporte propriamente dito, o que justificaria a observação de um ciclo mais rápido. O ciclo de transporte de glutamato já foi descrito em vários tipos celulares e em vários membros da família dos EAATs. Neurônios de Purkinje, que expressam grandes quantidades de EAAT4, apresentam uma corrente de ânions menor do que os outros subtipos, que não parecem diferir entre si (Auger e Attwell, 2000; Otis e Kavanaugh, 2000). Além disso, o transportador GLT-1 parece ser mais eficiente do que o GLAST, uma vez que a

probabilidade de uma molécula de glutamato ligada ser transportada é maior do que a probabilidade dessa molécula se desligar e não ser transportada. Parece que no GLAST essa relação não é favorável, ou seja, é mais provável que a molécula se desligue a ser transportada (Wadiche e Kavanaugh, 1998). Apesar de ser o GLT-1 o grande responsável pela captação de glutamato exógeno (Tanaka et al., 1997; Danbolt 2001; Huang et al., 2004a,b; Yi e Hazell, 2006), o EAAT4 apresenta uma afinidade maior para glutamato (Arriza et al., 1994; Fairman et al., 1995) além de uma corrente de ânions maior e menor sensibilidade a inibidores derivados do ácido kaínico (Bridges et al., 1999). Os primeiros estudos sobre captação de glutamato mostraram que esse processo era completamente independente de qualquer sistema de transporte, como o de glicina, GABA, catecolaminas e etc. (Logan e Snyder, 1971 apud Danbolt, 2001). Isso exigiria um sistema com uma certa seletividade para L-glutamato, porém não tão seletivo assim, uma vez que D- e L-aspartato e L-cisteato também são reconhecidos pelos transportadores. Hoje existe uma variedade de moléculas capazes de inibir e/ou competir pelo transporte de glutamato. O que garante a capacidade do glutamato de ativar sítios completamente diferentes em receptores, transportadores e enzimas é a flexibilidade da molécula. Existem estados conformacionais pouco menos prováveis do que o estado de menor energia a temperatura ambiente. Isso significa que boa parte do tempo, o glutamato possa ser encontrado numa conformação de maior nível energético, diferente da esperada (Bridges et al., 1991, Bridges et al., 1999; Bräuner-Osborne et al., 2000). Dentre os mais diversos inibidores estão o dihidrokainato e kainato, além de agonistas de receptores KA que são bloqueadores específicos de EAAT2 (Arriza et al., 1994); L-*trans*-pirrolidina-2,4-dicarboxilato (*trans*-PDC), inibidor competitivo de

todos os transportadores; Threo-3-hidroxi-aspartato (THA), inibidor competitivo de todos os EAATs, exceto o EAAT5 (Bridges et al., 1999; Shimamoto, 2000); e o composto DL-Threo- $\beta$ -benzoxiaspartato (TBOA) que foi primeiramente caracterizado como o inibidor não competitivo mais potente para o EAAT2 (Fig 12) (Lebrum et al., 1997; Shimamoto et al., 1998). Mais tarde verificou-se a ação do composto em todos os subtipos de EAATs, e que a forma L ainda é mais potente do que a forma D (Shimamoto et al., 2000). O termo inibidor não deve ser mal interpretado, uma vez que existem inibidores não competitivos e competitivos. Esses últimos não atrapalham a maquinaria de transporte, são transportados e podem gerar liberação de aminoácidos excitatórios por heterotroca, como por exemplo o composto PDC, que pode provocar excitotoxicidade por induzir liberação de glutamato e aspartato por heterotroca (Bridges et al., 1991; Blitzblau et al., 1996; Volterra et al., 1996, Stutz et al., 2007).



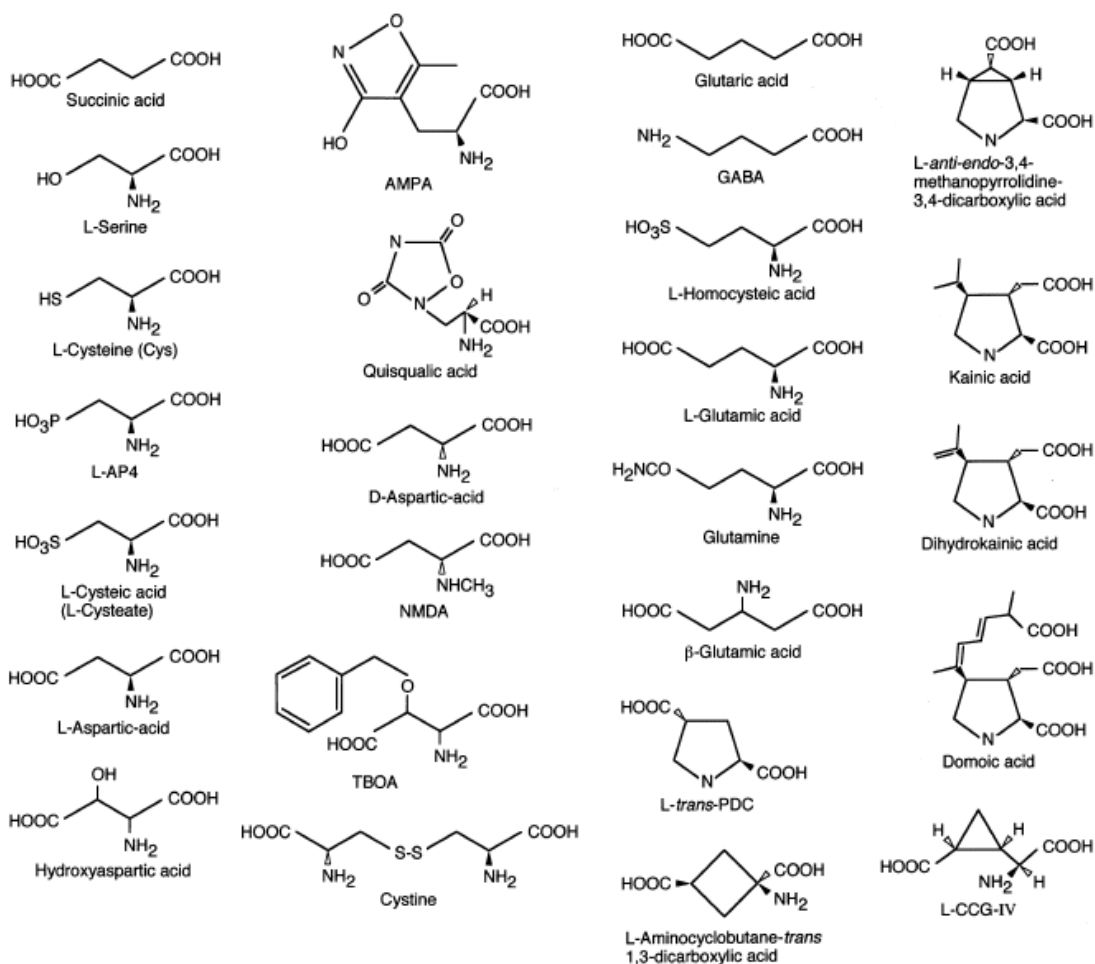


Fig. 12 - Análogos de glutamato e aspartato. As moléculas estão representadas na forma não protonada e nomeadas de acordo. Retirado de Danbolt, 2001.

#### 1.2.5.1.3 Transportadores de baixa afinidade

A captação de baixa afinidade apresenta  $K_m$  próximo a  $500\mu\text{M}$  (Danbolt, 1994) e ao contrário da captação de alta afinidade é independente de íons  $\text{Na}^+$ , sensível a D-Glutamato e a L-homocysteato (Benjamin e Quastel, 1976; Cox et al., 1977). Esse processo parece acontecer para suprir as necessidades metabólicas das células mas ainda é pouco caracterizado. Recentemente foi verificado que um transportador de aminoácidos neutros, o ASCT2, é capaz de transportar glutamato na sua forma protonada, com  $K_m$  de 1.6 mM.

#### 1.2.5.1.2.1 Sistema independente de sódio e trocador glutamato-cistina

Sistemas de transporte independentes de  $\text{Na}^+$  e dependentes de  $\text{Cl}^-$  foram descritos em tecidos e em células em culturas (Erecinska e Silver, 1990; Balcar e Li, 1992). Entretanto o principal sistema independente de sódio conhecido é o trocador glutamato-cistina. Cistina é a forma oxidada de cisteína (Cys-S-S-Cys) e esse transporte já foi demonstrado em cultura de células (Bannai e Kitamura, 1980, 1981; Cho e Bannai, 1990). Esse transporte utiliza o gradiente de glutamato através da membrana como força motriz para importação de cistina, que é utilizada na formação de glutathiona reduzida (GSH) (Cooper e Kristal, 1997; Dringen, 2000). Elevação da concentração extracelular de glutamato inibe a captação de cistina e pode ser um dos fatores que contribuem para o estresse oxidativo em situações que levam a um aumento de glutamato exógeno (Murphy et al., 1989; Cho e Bannai, 1990; Murphy et al., 1990). O transporte de cistina também acontece em células endoteliais e em eritrócitos (Ohtsuka et al., 1988; Miura et al., 1992). O cérebro possui diversos transportadores de cistina e, em sinaptossomos, a captação de cistina é realizada por 3 sistemas diferentes: um com  $K_m$  463 $\mu\text{M}$ , outro com  $K_m$  6,9 $\mu\text{M}$  e um terceiro de  $K_m$  327 $\mu\text{M}$  (Flynn e McBean, 2000). A expressão do transportador glutamato-cistina em tumores pode estar associada com a liberação freqüente de glutamato e isso representar um possível mecanismo pelo qual as células tumorais, e também macrófagos e microglia, induzem a morte nos neurônios vizinhos (Piani e Fontana, 1994; Ye et al., 1999).

#### 1.2.5.1.2.2 Trocadores de baixa afinidade

Trocadores de baixa afinidade de glutamato – ascorbato/glicina e GABA já foram descritos, porém pouco caracterizados (Bonanno et al.1993,1994; e para revisão ver Bonanno e Raiteri, 1994).

#### 1.2.5.2 Carreadores intracelulares

Uma vez no citoplasma, o glutamato é distribuído para as organelas por carreadores intra-citoplasmáticos.

##### 1.2.5.2.1 Transporte glutamatérgico mitocondrial

A maioria das enzimas para as quais o glutamato é substrato possui localização mitocondrial. Em concordância com esse fato, a mitocôndria possui dois sistemas de captação do glutamato citosólico: um simporte próton-glutamato e um antiporte glutamato-aspartato (Kramer e Heberger, 1986; Kramer e Palmieri, 1989). Esses transportadores são muito diferentes dos membranares.

##### 1.2.5.2.2 Transporte glutamatérgico vesicular

Nos terminais sinápticos, o glutamato é carregado para dentro das vesículas e utilizado como neurotransmissor. Apesar da evidência do glutamato ser estocado em vesículas ter sido obtida há 25 anos atrás (Disbrow et al., 1982) os transportadores vesiculares VGLUTs só foram descobertos anos depois (Ni et al., 1994; Bellocchio et al., 1998, 2000; Takamori et al., 2000). Como acontece para outros neurotransmissores, a captação vesicular de glutamato é dirigida por um gradiente de prótons, criado pela ação de uma ATPase. O VGLUT, como é chamado o

transportador vesicular, apresenta baixa afinidade para L-glutamato ( $K_m$  cerca de 1-3mM) (Takamori, 2006), porém é altamente seletivo para essa molécula, pois ainda não foi verificado carreamento de aspartato ou mesmo de D-glutamato por essa proteína. O transporte, ao contrário do membranar, é independente de sódio e potássio e pode ser estimulado por baixas concentrações de cloreto (Disbrow et al., 1982; Naito e Ueda, 1983, 1985; Fykse et al., 1992). Existem artigos contrários a essa idéia e que descrevem a localização de aspartato nas vesículas sinápticas por microscopia eletrônica. (Gundersen et al., 1998 e Gundersen e Strom-Mathisen, 2000). O transporte para dentro da vesícula acontece graças ao gradiente de prótons gerado pela  $H^+$ -ATPase vesicular, que bombeia prótons para o interior da vesícula e o fluxo desses íons para fora geram a energia necessária para o transporte de glutamato para o interior, fazendo a concentração desse aminoácido chegar a 0.1M (Moriyama et al. 1990; Tabb et al. 1992). Existem 3 tipos de transportadores vesiculares VGLUTs. VGLUT 1 e 2 são largamente expressos em neurônios glutamatérgicos pelo cérebro e retina. VGLUT3 é expresso em neurônios que não são primariamente glutamatérgicos (Gras et al., 2002) e também foi descrito em dendritos de alguns neurônios (Hertz, 2006), o que pode contribuir para a liberação não-sináptica de glutamato.

#### 1.2.6 Importância da depuração de glutamato

O equilíbrio entre as taxas de liberação e captação do glutamato mantém os níveis fisiológicos no meio extracelular. Condições patológicas como isquemia, anóxia e hipoglicemia são caracterizadas por alterações no metabolismo neuronal, resultando numa baixa produção de ATP. Sem ATP, a bomba de  $Na^+/K^+$  não funciona e eleva-

se o nível intracelular de  $\text{Na}^+$ , o que dificulta a ação do transportador que é dependente do simporte de íons  $\text{Na}^+$ . Esse fato gera um desequilíbrio na taxa liberação/captação e conseqüente aumento dos níveis extracelulares de glutamato, que podem ser lesivos dependendo da concentração extracelular atingida e do tempo de exposição das células ao neurotransmissor. A ativação exagerada de receptores ionotrópicos, principalmente dos receptores do tipo NMDA e conseqüente entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  leva a geração de radicais livres, contribuindo para o dano tecidual (Pellegrini-Giampietro 1994; Mitani e Tanaka 2003). Esse dado foi comprovado pelo efeito neuroprotetor exercido pelo antagonista do receptor NMDA (MK-801) na presença de grandes concentrações de glutamato (Choi, 1992). O aumento da concentração extracelular de glutamato e conseqüente excitotoxicidade parece estar envolvido em diversas doenças neurodegenerativas, como mal de Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica. Entretanto o excesso da função de transporte pode levar a situações de baixa sinalização glutamatérgica, por exemplo nos casos de esquizofrenia (Carlsson e Carlsson , 1990; Rothstein, 1995; Carlsson et al., 1999; Ingram et al., 2000). Atualmente os principais alvos farmacológicos para a disfunção da sinalização glutamatérgica são os receptores de glutamato. Entretanto, pesquisas recentes tentam modular a atividade de transportadores como uma estratégia para regular e permitir uma correta sinalização excitatória (Grewer e Rauen, 2005). Todo glutamato presente no citoplasma neuronal é rapidamente seqüestrado e estocado em vesículas para conseqüente liberação. A presença de sistemas de transportes influencia não somente o término da sinalização excitatória, mas também a quantidade de glutamato disponível no terminal pré-sináptico, sua difusão, o acesso desse neurotransmissor a receptores extrasinápticos e sua

reciclagem, pois todo glutamato glial entra no ciclo glutamato-glutamina (Rauen e Wiessner, 2000; Bridges e Esslinger, 2005).

### 1.3 Sistema aspartérgico

#### 1.3.1 Considerações estereo-químicas sobre D-aminoácidos

A configuração do carbono  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) é fundamental para todos os sistemas vivos. Os aminoácidos presentes em proteínas, exceto glicina, são ativos opticamente e possuem a mesma configuração estereoquímica do átomo de  $C\alpha$ . O prefixo L, presente no início da nomenclatura desses aminoácidos vem de mais de 1 século e meio atrás, quando Luis Pasteur, em 1851, observou que a asparagina, o primeiro aminoácido natural descoberto por Vauquelin e Robiquet em 1806 possuía a capacidade de desviar a luz plano polarizada para a esquerda, levando então o nome de levógira (Vauquelin e Robiquet em 1806; Pasteur 1851, revisto em D'Aniello, 2007). Partindo do mesmo princípio, substâncias capazes de desviar para a direita a luz plano polarizada, receberam o nome de destrógira, e a letra D no início do nome. Por não conseguirem detectar níveis de D-aminoácidos em plantas ou animais até a segunda metade do século 20, achava-se que apenas aminoácidos na forma L eram biologicamente ativos. Com a melhora de métodos enzimáticos e técnicas de cromatografia de alta performance (HPLC), aminoácidos na forma D foram descritos em bactérias, fungos, animais invertebrados e vertebrados (Meister, 1965; Corrigan, 1969).

### 1.3.2 Produção de D-aspartato

L-aspartato é convertido a D-aspartato pela ação da enzima aspartato racemase (Watanabe et al., 1998; Abe et al., 2006). L-aspartato pode ser produzido por aminotransferases que transferem o grupamento amino para o oxaloacetato, que é um intermediário do ciclo de Krebs (Hassel e Dingledine et al., 2006). D-asp pode ser formado por degradação de proteínas que contenham resíduos de D-asp, ou por isomerização espontânea de L-asparagina e L-aspartil, que além de D-asp geram um resíduo de isoaspartil (Fujii, 2002; Clarke, 2003; Homma, 2006).

### 1.3.3 D-aspartato em tecidos animais

D-aspartato está amplamente distribuído em tecidos animais e já foi descrito em moluscos (D'Aniello e Giuditta, 1977; D'Aniello e Giuditta, 1978; D'Aniello, 1995), anfíbios (Raucci et al., 2005), répteis (Assisi et al., 2001) e no cérebro de galinhas (Neidle e Dunlop, 1990), dentre outros. Além disso, também foi descrito em sistemas neuroendócrinos de camundongos (Morikawa et al., 2001), ratos (Masuda et al., 2003) e humanos (D'Aniello et al., 1998b). Em paralelo com estudos bioquímicos, foram realizadas imunomarcações utilizando o anticorpo contra D-asp, confirmando sua presença no cérebro de ratos (Wang et al., 2000) e também na retina (Lee et al., 1999), indicando que o D-asp possui uma participação no sistema nervoso e também no sistema endócrino.

### 1.3.4 D-asp como precursor de NMDA

Recentemente foi demonstrado a presença de NMDA no sistema neuroendócrino (D'Aniello et al., 2000a,b). NMDA sintético estimula os receptores ionotrópicos de

glutamato do tipo NMDA e no sistema endócrino está envolvido com a liberação de hormônios do hipotálamo e da hipófise. Já foi descrito que NMDA é capaz de induzir a liberação de hormônio luteinizante (LH) (D'Aniello et al., 2000a; Pampillo et al., 2002a), Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Gay e Plant, 1987), PRL (Downing et al., 1996; D'Aniello et al., 2000b). Há indícios de que NMDA seja produzido *in vivo* e *in vitro* e que o precursor para a formação dessa molécula seja o próprio D-asp, através da ação da NMDA metiltransferase (D'Aniello et al., 2000b; D'Aniello, 2007).

#### 1.3.5 Liberação de D-asp

Até o momento, as células mais bem estudadas quanto à liberação de D-asp são as células PC12. Ao contrário da liberação de dopamina, a liberação de D-asp é insensível a bloqueadores de canais de  $Ca^{2+}$  ou silenciamento de proteínas relacionadas com a fusão de vesículas. Nessas células ocorre um efluxo citoplasmático contínuo, que não parece ser causado por reversão do transporte induzido por glutamato. Ocorre também uma liberação induzida por abertura de canais de ânions sensíveis a volume, discutidos posteriormente no texto (Koyama et al., 2006; Homma 2006). Quando as células PC12 são submetidas a um meio hipotônico, altas quantidades de D-asp são liberadas por esses canais, que se abrem frente a esse estímulo (Fig 13 A e C). Bloqueadores desses canais inibem a liberação de D-asp. Uma variação espontânea das células PC12 dá origem aos tipos chamados MPT1 e 2068 (Ramachandran et al., 1993; Zheng et al., 1996). Ambos tipos de células possuem transportadores para glutamato e são capazes de captar D-asp exógeno (Adachi et al., 2004). Células 2068 pré-incubadas com  $^{14}C$ -D-asp,



promovem uma liberação de forma dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , estimulada por KCl ou ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo uma possível via excitotóxica (Fig 13 B e D) (Long et al., 2001).

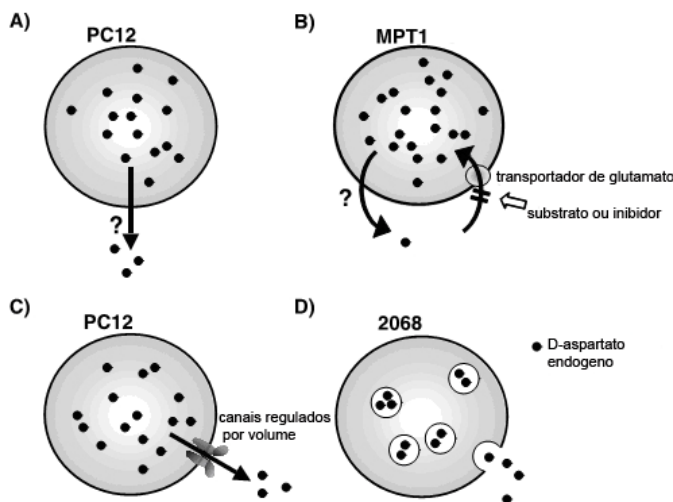


Fig 13 – Diversas formas de liberação de D-asp em células PC12 e seus sub- clones. Modificado de Homma, 2006.

### 1.3.6 D-aspartato e o sistema nervoso central

Na retina de embrião de galinha, ocorre uma concentração transiente de D-asp durante o dia embrionário 13 e 14 (aprox 245 nmol/g de tecido e 600nmol/g de tecido, respectivamente). Após esse estágio, a concentração dessa molécula cai drasticamente (aprox 30nmol/g de tecido) e permanece nesse patamar até o nascimento do pinto (Fig 14) (Dunlop et al., 1986; Hashimoto et al., 1993; Neidle e Dunlop, 1990). Esse fenômeno também ocorre no cérebro e retina de mamíferos. No cérebro atinge aproximadamente 300nmol/g de tecido em embriões de rato de 17 a 19 dias, e após esse período cai para 20nmol/g de tecido. A concentração de D-asp na retina de mamíferos não atinge o pico durante a vida embrionária, mas sim no período de 5 a 7 dias após o nascimento e depois decai (Dunlop et al., 1986; Neidle

e Dunlop, 1990). O pinto nasce com o sistema visual completo, o que acontece cerca de 6 dias após o pico de D-asp (Okuma e Abe, 1994).

Em diversos animais, a concentração de D-asp se equipara com a de outros aminoácidos excitatórios, como L-Glu, e pode participar ativamente da fisiologia da visão (D'Aniello 2007). Essa idéia é corroborada pelo estudo com retinas de *Sépiea officinalis* (D'Aniello et al., 2005), que mostraram que os níveis de D-asp diminuem quando o animal é deixado no escuro e esse fato é revertido se o animal volta a ser exposto à luz. Além disso, enzimas participantes da via de formação de degradação de D-asp também sofreram alterações com a mudança de claro e escuro.

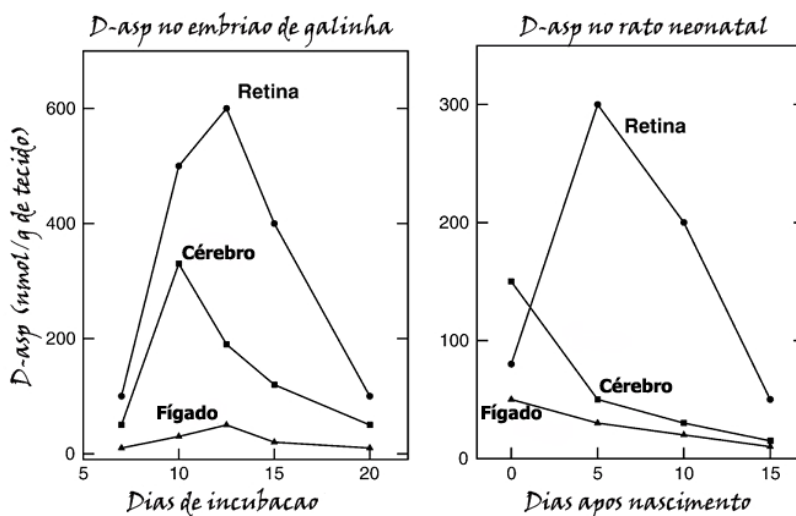


Fig 14 – Concentração de D-asp no embrião de galinha e no rato pós-natal. Painel da esquerda: Pico de D-asp durante o desenvolvimento da retina e do cérebro em embriões de galinha. Painel da direita: Pico de D-asp na retina de ratos durante o desenvolvimento. Modificado de D'Aniello 2007.

Contudo, diversas observações foram feitas e fortalecem a idéia de uma participação de D-asp na sinalização do processo visual, são elas:

1- Na retina de peixe dourado D-asp é capaz de potencializar a resposta de L-glutamato à luz em 15 vezes (Ishida e Gordon, 1981).

2- D-asp é um ativador seletivo do receptor de NMDA (Cha et al., 1986; Kubrusly et al., 1998).

3- D-asp é captado pelos transportadores de glutamato dependente de sódio (EAATs) (Kanai e Hediger, 1992; Danbolt 2001).

4- Liberação de D-asp endógeno ou  $^3\text{H-D-asp}$  de fatias de cerebelo ou culturas de astrócitos é induzida por estímulo despolarizante de  $\text{K}^+$  e dependente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Davies e Johnston, 1976; Malthe-Sorensen et al., 1979; Levi et al., 1982, Hopainen e Kontro, 1990).

5- Estudos com microscopia eletrônica demonstraram marcação para L-asp dentro de vesículas sinápticas (Gundersen et al., 1998).

6- Há expressão de D-aspartato oxidase (D-aspO) em várias regiões do SNC como hipocampo e córtex, e ela pode inativar o D-asp liberado sinápticamente (Wolosker et al., 2000).

7- Na retina de galinha, células bipolares, células da camada plexiforme interna e células amácrina são imunopositivas para L-aspartato (Calaza et al., 2001).

### 1.3.7 D-asp e o sistema endócrino

No animal adulto, a molécula de D-asp encontra-se em níveis elevados no sistema endócrino, estando presente na adeno-hipófise e glândulas pineal, hipófise e adrenal, além dos testículos (Hashimoto e Oka, 1997; Furuchi e Homma, 2005; D'Aniello 2007).

Na glândula pineal, D-asp encontra-se no citoplasma das células parenquimais, os pinealócitos, responsáveis pela produção de melatonina, sugerindo uma participação de D-asp nesse processo. Especificamente, D-asp inibe a liberação de melatonina induzida por noradrenalina em pinealócitos em cultura (Takigawa et al., 1998; Ishii et al., 1998).

Na hipófise, D-asp concentra-se muito mais na região anterior e estudos de co-localização com prolactina mostraram a presença de D-asp nas células produtoras de prolactina além do aumento de marcação estimulada por estrogênio. Essas células provavelmente produzem seu próprio D-asp pois não são capazes de captar essa molécula do meio, por não expressarem transportadores (Lee et al., 2001). Além disso, estudos com células em cultura derivadas de um tumor na hipófise, chamadas GH<sub>3</sub>, mostraram que uma parcela dessas células é capaz de secretar prolactina, assim como também é capaz de produzir D-asp. A incubação dessas células com D-asp exógeno aumentou a produção desse hormônio. Esses dados sugerem que o D-asp produzido pode atuar de forma autócrina ou parácrina e promover a produção hormonal de prolactina (Long et al., 2000; D'Aniello et al., 2000b, Pampillo et al., 2002b). Outros hormônios como GH, ACTH e TSH não sofreram alteração pela adição de D-asp.

A concentração de D-asp na glândula adrenal atinge um pico em ratos de 3 semanas, seguido de um rápido declínio (Hashimoto et al., 1995). Durante o período de pico encontramos maior marcação para D-asp nas camadas mais internas do córtex adrenal e nenhuma na região mais externa. Algumas células dessa região são capazes de captar D-asp, pois injeções intraperitoneais de D-asp aumentam a marcação para esse aminoácido. Além disso, o padrão de expressão de D-asp na glândula adrenal durante o desenvolvimento coincide com o padrão de expressão de transportadores de glutamato no mesmo tecido (Lee et al., 2001; Furuchi e Homma, 2005).

#### 1.3.8 Depuração e degradação de D-asp

Uma vez captado pelos transportadores membranares, o D-asp concentra-se no citoplasma e pode ser degradado. Mamíferos possuem uma enzima chamada D-aspartato oxidase (D-aspO), uma proteína dependente de flavina-adenina-dinucleotídeo localizada em peroxissomos que cataliza a deaminação oxidativa desse aminoácido, gerando oxaloacetato, peróxido de hidrogênio e íons amônio. Essa enzima parece não ser específica para D-asp, pois D-glutamato e NMDA também são reconhecidos e oxidados (Furuchi e Homma, 2005). Essa enzima encontra-se principalmente nos rins, fígado, cérebro e hipófise (Schell et al., 1997).

## 2 Objetivos:

- Caracterizar bioquimicamente o processo de liberação de D-asp na retina de galinha; as moléculas capazes de induzir, modular e/ou bloquear o processo de liberação.
- Verificar a liberação de D-asp em diferentes tipos de cultura de células.
- Comprovar que tal processo ocorre de forma endógena, sem adição de aspartato exógeno.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

Glutamato foi obtido de California Co. for Biochemical Research (Califórnia, EUA). Glicina foi obtida da Invitrogen (Califórnia, EUA). Veratridina, cisteína, D-aspartato, dopamina, adenosina, MK-801, DNQX, picrotoxina, estriquinina, Hepes, PPO, POPOP e fibra de vidro <2.3 µm foram obtidos da Sigma-Aldrich/RBI Chem. Co. (Missouri, EUA). [2,3-<sup>3</sup>H]-D-asp 0.25 mCi foi obtido da Amersham Bioscience (Buckinghamshire, Inglaterra). Meio mínimo essencial (MEM) e meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) foram obtidos da GIBCO™ (Nova York, EUA). Soro Fetal Bovino (SFB) Seromed® foi obtido da Soralis Ltda (Mato Grosso do Sul, Brasil). Tripsina foi obtida da Worthington Biochemical Co. (Nova Jersey, EUA). Placas de cultura da Corning® (Nova York, EUA), exceto para culturas de glia, que eram da TPP® (Trasadingen, Suíça). Kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay da Promega (Wisconsin, EUA). Todos os outros reagentes foram de pureza analítica. Retinas de pinto em diferentes idades foram utilizadas para o desenvolvimento do trabalho. Os embriões foram estagiados de acordo com Hamburguer e Hamilton (1951). Os ovos de galinha (*Gallus domesticus*) foram obtidos de uma granja local. Os animais foram decapitados e seus olhos enucleados. A retina foi retirada e utilizada de diferentes maneiras, de acordo com os protocolos experimentais e as substâncias testadas.

Os procedimentos para uso de animais estavam de acordo com o guia para manipulação e uso de animais de laboratório do National Institute of Health (NIH) e aprovado pela comissão de manipulação de animais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

## 3.2 Soluções

### 3.2.1 Solução Hanks, pH 7,4:

Soluto	Concentração final
NaCl	128mM
CaCl <sub>2</sub>	3mM
KCl	4mM
MgCl <sub>2</sub>	1mM
Hepes	20mM

### 3.2.2 Solução Hanks sem Na<sup>+</sup>, pH 7,4:

Soluto	Concentração final
Tris-HCl	128mM
CaCl <sub>2</sub>	3mM
KCl	4mM
MgCl <sub>2</sub>	1mM
Hepes	20mM

### 3.2.3 Solução Hanks sem Mg<sup>2+</sup>, pH 7,4:

Soluto	Concentração final



Tris-HCl	128mM
CaCl <sub>2</sub>	3mM
KCl	4mM
Hepes	20mM

#### 3.2.4 Solução Hanks sem Ca<sup>2+</sup>, pH 7,4:

Soluto	Concentração final
Tris-HCl	128mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
KCl	4mM
Hepes	20mM

#### 3.2.5 Salina sem Ca<sup>2+</sup> e sem Mg<sup>2+</sup> (CMF):

Soluto	Concentração final
NaHCO <sub>3</sub>	9.4mM
NaCl	131mM
KCl	4.1mM
Fosfato de sódio dibásico	0.92mM
Fosfato de fosfato monobásico	0.45mM
Glicose	12.2mM

### 3.2.6 Tampão borato, pH 9:

Soluto	Concentração final
Ác. Bórico	400mM

pH ajustado com NaOH.

Líquido de Cintilação: 4g de PPO + 0.1g de POPOP, diluídos em 1litro de tolueno.

Derivatizante: 1mg de o-phthalaldeido + 1mg de boc-cys diluídos em 100µl de metanol.

## 3.3 Procedimentos

3.3.1 Obtenção de cultura mista, enriquecida de neurônio e purificada de glia, de embrião de galinha.

Retinas de embrião de 9 dias (E9), dissecadas dentro do fluxo laminar para garantir o ambiente estéril, eram separadas dos demais tecidos oculares em CMF e dissociadas quimicamente com tripsina 0.05% por 12 minutos, a 37°C. Em seguida era realizada uma centrifugação rápida de 500 x G e o sobrenadante era descartado. A preparação era ressuspensa em meio de cultura e as células plaqueadas em densidades específicas para cada tipo de cultura. Todo o meio era trocado a cada dois dias e as culturas mantidas numa estufa a 37°C em atmosfera de 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>.

3.3.1.1 Cultura mista densa: 3.10<sup>6</sup> de células/cm<sup>2</sup>. O meio utilizado era MEM com 5% de soro fetal bovino (SFB).

3.3.1.2 Cultura enriquecida de neurônio:  $3.10^5$  de células/cm<sup>2</sup>. As placas eram previamente tratadas com poli-L-lisina por 2h, lavadas com água estéril 3 vezes e secadas a 37°C. O meio utilizado era MEM com 1% de SFB.

3.3.1.3 Cultura purificada de glia:  $6.10^5$  de células/cm<sup>2</sup>. Após atingir confluência, cerca de 2 semanas após o plaqueamento, as culturas eram tratadas com ácido ascórbico 4mM por 3h. Depois o meio era trocado e a cultura era mantida por mais 6 dias e utilizadas para experimentação. O meio utilizado era DMEM com 10% de SFB.

#### 3.3.4 Experimentos de liberação de <sup>3</sup>H-D-asp.

Embriões de 13 dias (E13) e animais pós-eclosão eram decapitados e suas retinas dissecadas em CMF, à temperatura ambiente. As retinas eram cortadas em explantes (pequenos pedaços), centrifugadas por 15 segundos e transferidas para uma placa de cultura de 35mm com 1 mL de meio MEM + Hepes 20mM contendo 0.2μCi de <sup>3</sup>H-D-asp. Para experimentos em culturas, apenas retirava-se o meio com soro e adicionava 1mL do meio, como descrito acima. 10μM de D-asp não radioativo era incluído para saturar o transporte de <sup>3</sup>H-D-asp para dentro da célula. Os explantes eram incubados, agitando-se a placa a cada 20 min, por 2 horas, a 37°C para captação do material radioativo. Terminado o tempo de incubação o tecido era recolhido e transferido para um tubo Falcon onde era acrescido de 2mL de solução Hanks 12mM de glicose (Hanks 12), sendo centrifugado e o sobrenadante descartado. O processo era repetido por mais 5 vezes. Ao fim, o pellet contendo os explantes era ressuspenso em solução Hanks 4mM de glicose (Hanks 4) e distribuído em poços próprios com filtros (fibra de vidro, <2.3 μm) previamente umedecidos com

Hanks 4 (do Nascimento et al., 1996). Após colocar os explantes nos poços, fazia-se uma lavagem a cada 5 minutos. Para experimentos em cultura, as lavagens eram feitas na própria placa de cultura. As soluções trocadas eram coletadas em tubos de ensaio e depois a radioatividade de cada solução, assim como a radiação que sobrou no interior das células após o estudo, era medida utilizando-se um cintilador líquido modelo Packard 1600 TR, com líquido de cintilação. As retinas ao final do estudo eram coletadas em um eppendorf e acrescidas de 1mL de água MilliQ. Eram congeladas e descongeladas 3 vezes para rompimento celular. A radiação era então medida para fornecer os dados de radioatividade total incorporada. Os dados foram representados graficamente como porcentagem do  $^3\text{H}$ -D-asp liberado em função do total (incorporado pelas células).

### 3.3.5 Dosagem de D-asp endógeno por HPLC.

O protocolo utilizado foi adaptado de Hashimoto e colaboradores (1992). Resumidamente, para realizarmos a dosagem de D-asp endógeno, os explantes obtidos como descrito no item 4, foram incubados na presença de glutamato por 10 min. O meio foi recolhido sendo adicionado TCA para uma solução final a 5%, para precipitação das proteínas. As amostras eram centrifugadas a 10000 x G por 3 min e o pellet descartado. Lavava-se o sobrenadante com 1ml de éter saturado com água (1:1) para cada 100 $\mu\text{l}$  da amostra, repetindo-se o procedimento por 3 vezes. Posteriormente as amostras eram incubadas a 50°C por 5 min para evaporar o éter residual. Para aplicação no aparelho de HPLC, 2 $\mu\text{l}$  da amostra eram diluídos em 23 $\mu\text{l}$  de água MilliQ, 30 $\mu\text{l}$  de tampão borato, 5 $\mu\text{l}$  de padrão ácido L-homocisteico (L-HCA) e 20 $\mu\text{l}$  do derivatizante e aplicava-se 20 $\mu\text{l}$  da amostra total. Os parâmetros da

cromatografia eram: pressão entre 110 e 120, excitação da fluorescência a 344nm e emissão a 443nm. 40 min de corrida em fase líquida.

### 3.3.6 Dosagem de Proteína.

As proteínas das amostras submetidas à análise por HPLC eram dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando uma curva padrão de BSA de 2 a 40µg. As amostras eram lidas em um espectrofotômetro Hitachi U-1500 (Califórnia, EUA) a 595nm.

### 3.3.7 Dosagem de LDH.

Para garantirmos que não ocorria morte neuronal quando estimulávamos as células com glutamato, experimentos para dosagem de LDH foram realizados. As células eram incubadas 10 min com glutamato 100µM, e o LDH era dosado 4h depois, de acordo com o protocolo do kit CytoTox 96<sup>®</sup> da Promega.

### 3.3.8 Análise Estatística.

Os dados foram analisados pelo teste t de student ou por análise de variância “one-way ANOVA”, seguido pelo pós-teste de Dunnett, que compara todas as colunas com a coluna controle. Todas as análises e gráficos foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 4.

#### 4 Resultados

Para caracterizarmos a liberação de D-asp na retina de galinhas, utilizamos a técnica de liberação de neurotransmissores radioativos. Esta metodologia permite quantificarmos a liberação de neurotransmissores marcados radioativamente com utilização de aparelhagem específica. Para a liberação de D-asp, usamos o composto [2,3-<sup>3</sup>H]-D-asp (<sup>3</sup>H-D-asp), que era previamente incorporado pelas células. A molécula de D-asp é utilizada para marcação do *pool* citosólico do neurotransmissor glutamato. Por ser carregada pelos transportadores EAATs, esse neurotransmissor entra nas mesmas células que são capazes de captar glutamato, porém mantém-se no citoplasma por não ser reconhecido pelos transportadores vesiculares. Foram utilizados embriões de 13 dias (E13) e animais pós-eclosão (PE). O embrião de 13 dias apresenta o pico de concentração de D-asp (Dunlop et al., 1986) e também o pico de liberação de <sup>3</sup>H-D-asp, em resposta ao glutamato. Entretanto, sistemas neuroquímicos embrionários podem sofrer inúmeras modificações após o nascimento, principalmente na retina, onde ocorre toda uma adaptação do sistema visual em resposta ao estímulo luminoso. Várias dessas mudanças são conhecidas, como a maturação das células ganglionares após a abertura dos olhos (Landi et al., 2007; Xu e Tian, 2007), dentre outras. Para garantir uma boa realização do estudo de liberação de D-asp na retina de galinha, utilizamos essas duas idades para os experimentos, levando em conta as diferenças neuroquímicas dos dois sistemas.

#### 4.1 Agentes despolarizantes e a liberação de $^3\text{H}$ -D-asp

Inicialmente, procuramos identificar moléculas neuroativas capazes de promover a liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp. Possíveis agentes despolarizantes foram os primeiros a serem utilizados pois seriam os mais prováveis indutores de liberação de qualquer neurotransmissor. Glutamato, veratridina e meio com alta concentração de íons  $\text{K}^+$  foram testados quanto à capacidade de liberarem D-aspartato.

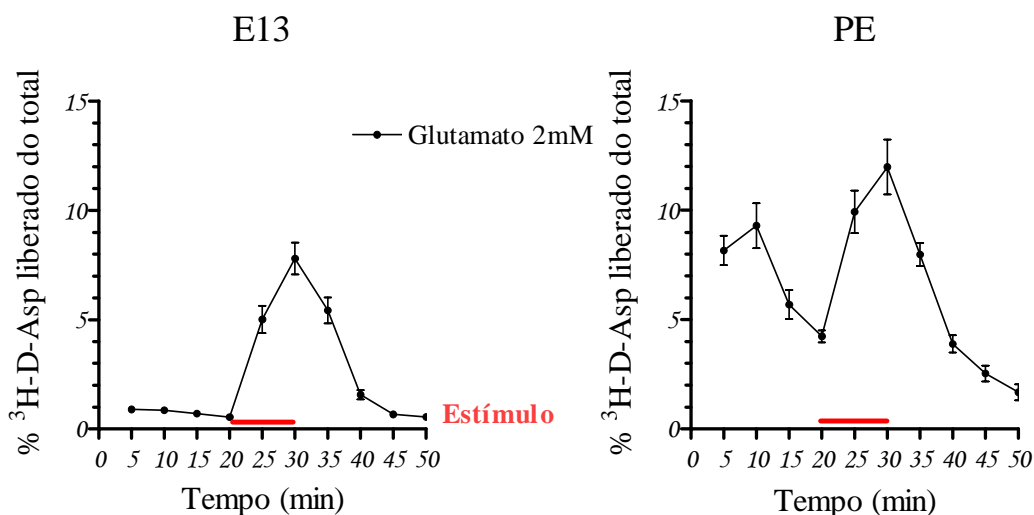


Fig 15 – Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato induzida por glutamato. Resumidamente, os explantes de animais E13 e pós-eclosão foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubadas com glutamato 2mM por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=8.

Ao usarmos o principal neurotransmissor excitatório do SNC, o glutamato, verificamos a liberação de aproximadamente 8% do *pool* de  $^3\text{H}$ -D-asp incorporado pelos explantes de retina de E13 de galinha (Fig 15). No animal PE a liberação proporcional foi maior, porém a relação estimulado/basal é menor, uma vez que já foi comprovado que retinas de animais adultos captam menos D-asp do que retinas de animais em idades embrionárias. Veratridina é uma molécula capaz de se ligar e abrir

canais de sódio voltagem-dependentes, induzindo uma entrada de íons  $\text{Na}^+$  nas células e facilitando a despolarização (Cestèle e Catterall, 2000). Surpreendentemente, a despolarização causada por veratridina não foi capaz de induzir uma liberação de D-asp radioativo (Fig 16).

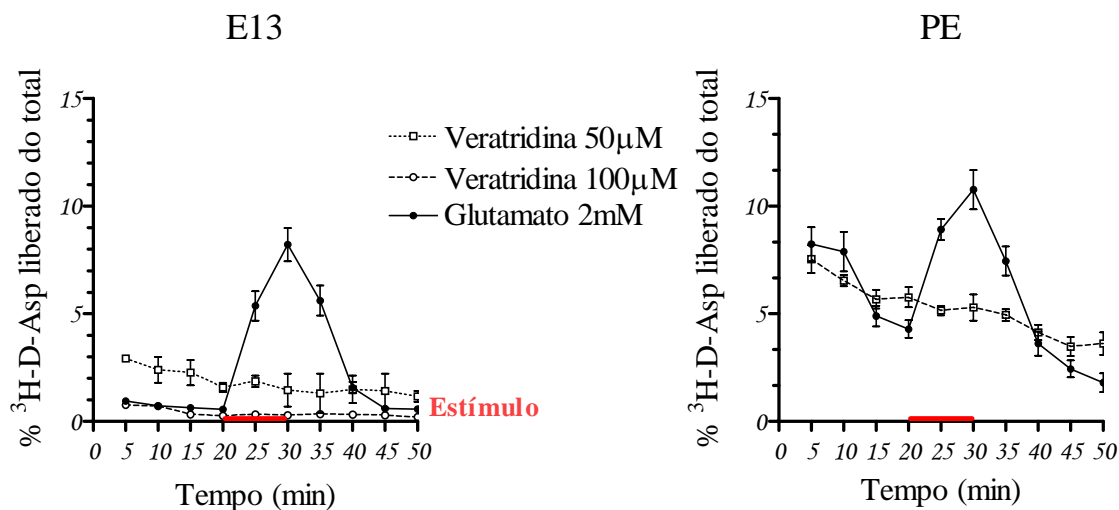


Fig 16 – Efeito da veratridina na liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato testada com veratridina 50 e 100 $\mu\text{M}$  e induzida por glutamato 2mM (controle positivo), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubadas com glutamato ou com veratridina por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação N=3.

Utilizamos uma solução de Hank's 4 modificada, com KCl 80mM, para verificarmos a possível liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp. A alta concentração de íons  $\text{K}^+$  no meio extracelular altera o gradiente eletroquímico do íon e força sua entrada na célula por canais iônicos também levando à uma despolarização celular. Esse protocolo é muito utilizado para esgotamento do *pool* de vesículas de um neurônio, pois promove intensa liberação vesicular de neurotransmissores (de Lange, 2003). Apesar disso, não verificamos liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp em explantes incubados com KCl, sugerindo



que eventos de despolarização sejam desnecessários, ou mesmo insuficientes para induzir uma liberação desse neurotransmissor (Fig 17).

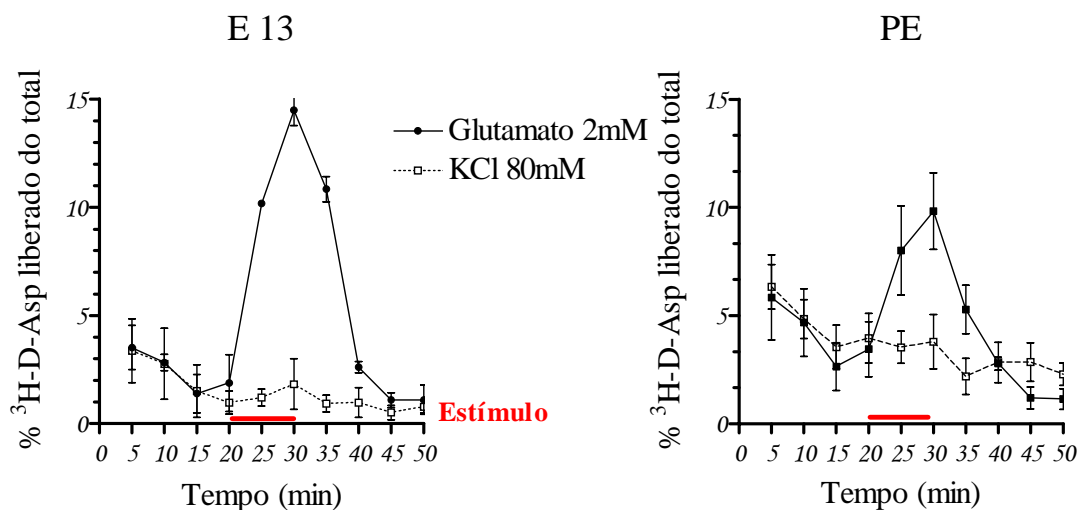


Fig 17 – Efeito do KCl na liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato testada utilizando-se meio com alto  $\text{K}^+$  (80mM) e induzida por glutamato 2mM (controle positivo), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubados com glutamato ou com meio com KCl 80mM por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação N=3 para E13 e N=2 para PE.

Moléculas antagonistas de receptores inibitórios, como os de GABA e glicina, podem provocar uma “desinibição” do sistema, facilitando a despolarização das células e a conseqüente liberação de neurotransmissores. Picrotoxina, um alcalóide antagonista não competitivo de receptores  $\text{GABA}_A$ ; e estriquinina, uma toxina que bloqueia receptores de glicina, foram utilizadas para facilitar a despolarização celular e observarmos a possível influência dessas substâncias na liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp (Fig 18).

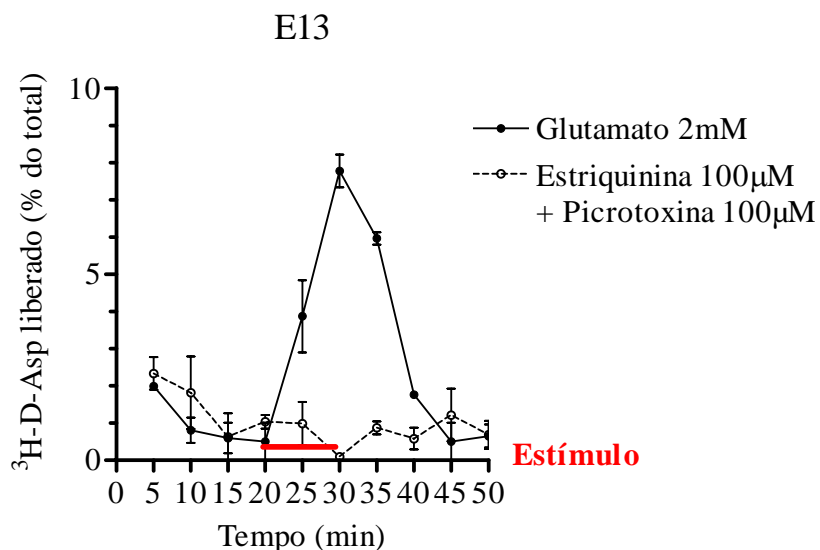


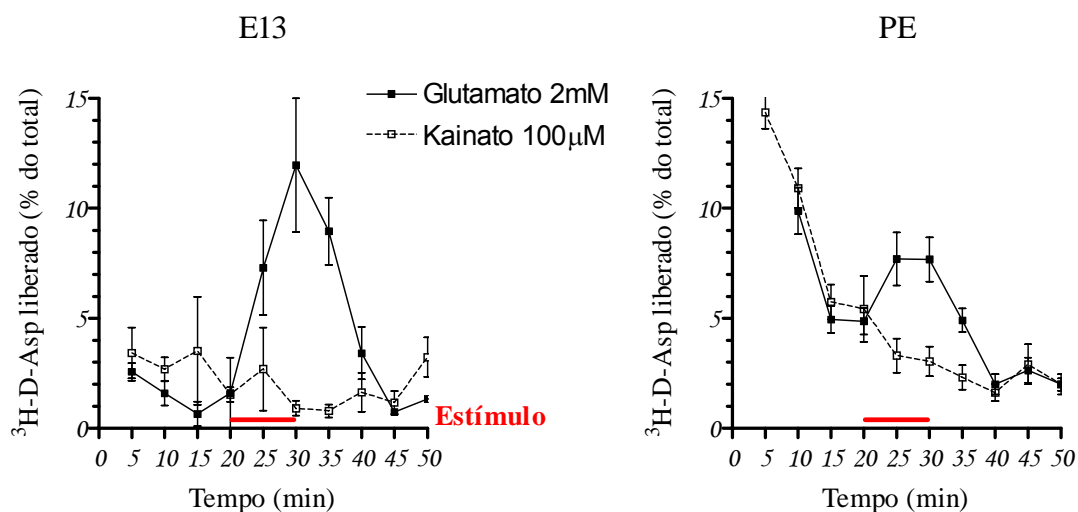
Fig 18 - Efeito da estriquinina e picrotoxina na liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato testada utilizando-se picrotoxina (100 $\mu\text{M}$ ) e estriquinina (100 $\mu\text{M}$ ), e induzida por glutamato 2mM (controle positivo), em explantes de retina de animais E13. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubadas com glutamato ou com picrotoxina + estriquinina por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=2.

O uso dessas substâncias em nada afetou a liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp, descartando a hipótese de balanço de cargas como possível indutor da liberação de aspartato.

#### 4.2 Possível envolvimento de receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos de glutamato no processo de liberação de $^3\text{H}$ -D-asp

Como mostrado no tópico anterior, nenhuma das estratégias utilizadas para induzir despolarização, além do glutamato, (Fig 15, 16 e 17) foi capaz de induzir uma liberação de D-asp. O próximo objetivo foi desvendar que tipo de sinalização glutamatérgica estaria envolvida na liberação do neurotransmissor de interesse. O glutamato pode ativar dois tipos de receptores, ionotrópicos e metabotrópicos. A ativação de receptores ionotrópicos leva à entrada de cátions e gera uma

despolarização na célula. Outros neurotransmissores são liberados devido à ativação desses receptores. Na retina de galinha, o principal neurotransmissor inibitório, GABA, é liberado por ativação desses receptores ionotrópicos, principalmente do tipo NMDA (Kubrusly et al., 1998; Calaza et al., 2003). Para testarmos o possível envolvimento desses receptores no processo de liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ , utilizamos agonistas dos receptores AMPA/KA (Kainato) e NMDA (NMDA) (Fig 19), assim como o uso de antagonistas não-competitivos DNQX (AMPA/KA) e MK-801 (NMDA) (Fig 20) na presença de glutamato. Assim, pudemos verificar se o efeito seria mimetizado com o uso dos agonistas e/ou bloqueado pelos antagonistas. Para experimentos com o agonista e antagonista do receptor de NMDA, a solução de Hank's não continha íons  $\text{Mg}^{2+}$  para evitarmos bloqueio do receptor de NMDA e possuía 2mM de glicina para garantir a presença do co-agonista desse receptor.



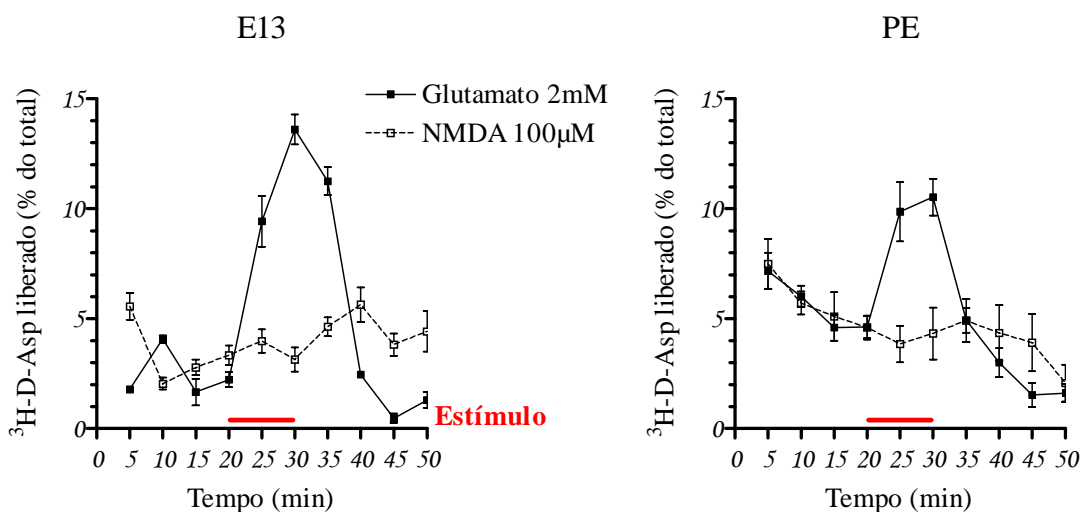


Fig 19 – Efeitos de agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato na liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato testada utilizando-se Kainato ou NMDA (100µM) e induzida por glutamato 2mM (controle positivo), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubados com glutamato ou com os agonistas por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=3.

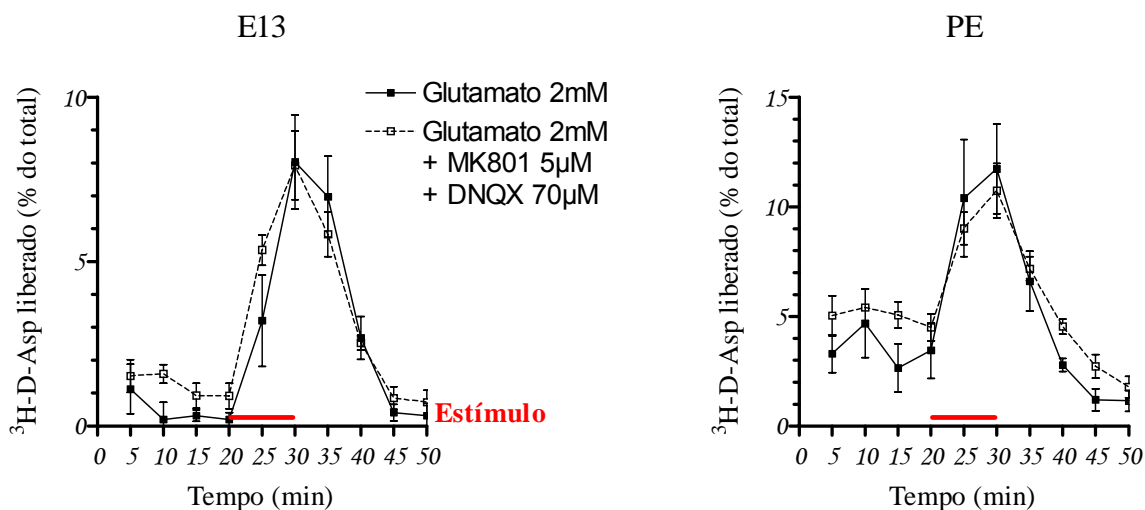


Fig 20 – Efeito de antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato na liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato induzida por glutamato 2mM na presença ou ausência de DNQX e MK-801 (70 e 5µM, respectivamente), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4 e incubados com glutamato; ou lavados 2x com Hank's 4, 2x com os antagonistas e incubados com glutamato 2mM por 10min ainda na presença dos bloqueadores. Após a incubação, os explantes foram novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=3.

Com estes dados, a hipótese de que a liberação de D-asp seria mediada pela ativação de receptores ionotrópicos de glutamato foi descartada. Outras moléculas-alvo do glutamato poderiam ser as responsáveis por essa sinalização. Por exemplo, a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato poderia levar a uma ativação da proteína-quinase dependente de cálcio (PKC), aumento dos níveis de IP<sub>3</sub> e DAG e diminuição dos níveis de AMPc (Hassel e Dingledine et al., 2006; Pilc e Ossowska, 2007). A ação desses receptores pode regular a liberação de neurotransmissores e até a excitabilidade neuronal. Para descartarmos o envolvimento de receptores metabotrópicos no processo de liberação de D-asp, utilizamos um agonista geral de receptores metabotrópicos (mGluRs), o *trans*-ACPD (Fig 21).

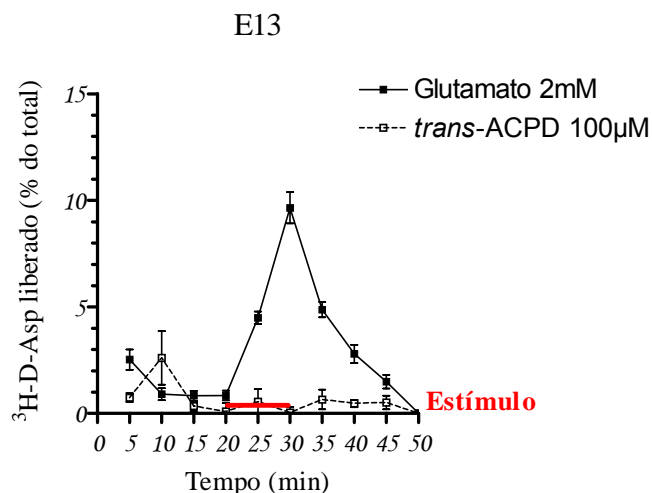


Fig 21 – Efeito do *trans*-ACPD na liberação de D-asp. Liberação de <sup>3</sup>H-D-aspartato testada utilizando-se *trans*-ACPD (100µM) e induzida por glutamato 2mM (controle positivo), em explantes de retina de animais E13. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubados com glutamato ou com *trans*-ACPD por 10min e novamente lavados com Hank's 4. A radioatividade liberada era medida em um cintilador líquido. N=2.

Como não verificamos nenhuma atividade do *trans*-ACDP no processo de liberação de <sup>3</sup>H-D-asp, podemos afirmar que a sinalização glutamatérgica capaz de promover a

liberação desse neurotransmissor não ocorre via ativação de nenhuma classe de receptores (NMDA, AMPA/KA ou metabotrópicos). Outros alvos do neurotransmissor glutamato são os transportadores e trocadores, que podem ter uma importância no processo de liberação de D-asp.

#### 4.3 O trocador glutamato-cistina não está envolvido na liberação de $^3\text{H}$ -D-asp

O principal sistema de transporte independente de sódio é o sistema  $\text{Xc}^-$ , representado pelo trocador glutamato-cistina (Cooper e Kristal, 1997; Dringen, 2000). O transportador tem alta afinidade por cistina, que é a forma oxidada da cisteína (Cys-S-S-Cys), e baixa afinidade para a própria cisteína. Em situações de alta concentração de glutamato extracelular, esse trocador promove liberação de cistina e captação de glutamato, promovendo uma troca, e vice-versa. Uma vez que o D-asp é reconhecido pelos transportadores do tipo EAAT (Danbolt, 2001), ele poderia também ser reconhecido por esses trocadores e liberado com um estímulo de alta cistina extracelular. Apesar de estimular a saída de glutamato, a alta concentração de cistina ou cisteína extracelular não levou a um aumento da liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp, descartando a possível participação desse transportador no processo de liberação daquele neurotransmissor (Fig 22).

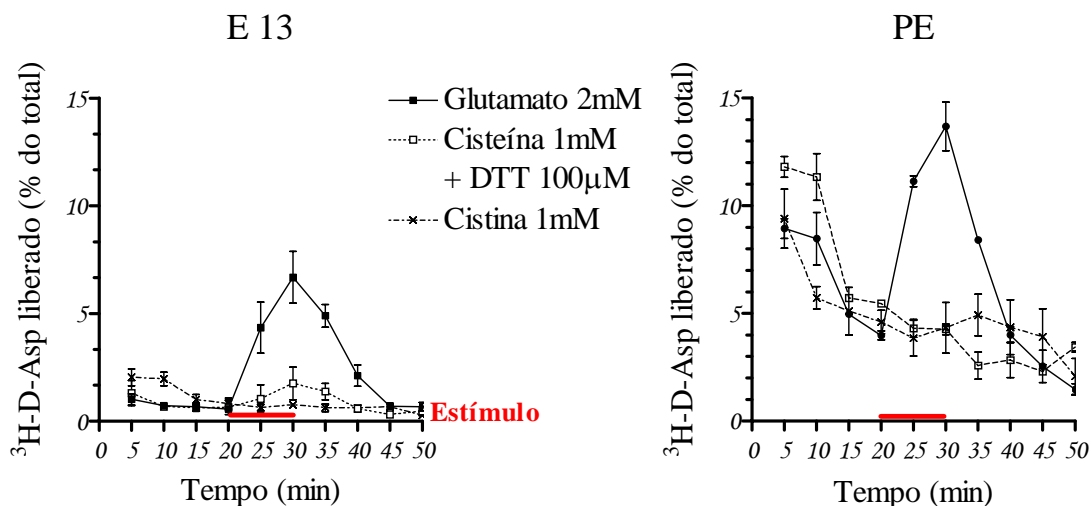


Fig 22 – O trocador glutamato-cistina não está envolvido na liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato testada com cistina e cisteína (1mM) e induzida por glutamato 2mM (controle positivo), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubados com glutamato ou com cistina ou cisteína por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=2.

#### 4.4 Transportadores do tipo EAAT e a liberação de $^3\text{H}$ -D-asp

Em situações de isquemia, devido ao colapso dos gradientes iônicos e despolarização generalizada, ocorre uma reversão dos transportadores, permitindo a extrusão de moléculas de neurotransmissor para o meio extracelular. Outro processo conhecido nessa situação é a liberação de neurotransmissores por canais que regulam o volume celular (Phillis et al., 1997; Seki et al., 1999; Phillis et al., 2000). Na retina de aves, a liberação de GABA ocorre por reversão dos transportadores do tipo GAT, induzidas por despolarização mediada pelos receptores de NMDA (Do Nascimento et al., 1996; Kubrusly et al., 1998). O transporte de alta-afinidade é dependente de íons  $\text{Na}^+$ , e a sua substituição por um composto osmoticamente ativo impediria a sua função transportadora. Para isso,

realizamos a liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp em uma solução de Hank's modificada, com Tris-HCl substituindo o NaCl.

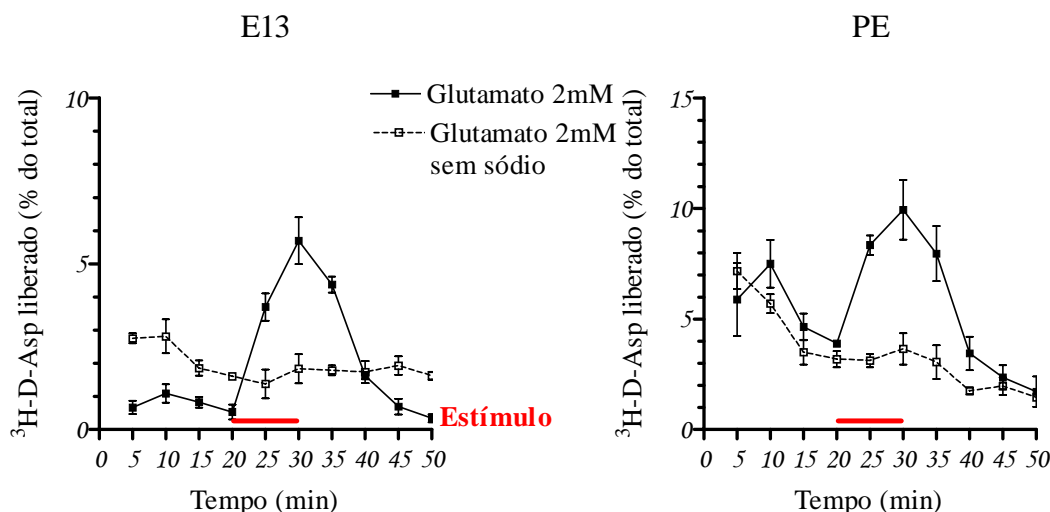


Fig 23 – Efeito da retirada de íons  $\text{Na}^+$  sobre a liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato testada utilizando-se glutamato 2mM em meio sem íons  $\text{Na}^+$  e induzida por glutamato 2mM em meio normal (controle positivo), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubados com glutamato com ou sem  $\text{Na}^+$  por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=3.

A ausência de íons  $\text{Na}^+$  do meio extracelular aboliu completamente a liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp (Fig 23), sugerindo uma possível participação de transportadores no processo. Os transportadores utilizam o gradiente de sódio como força motriz para o transporte, transportando de 2 a 3 íons  $\text{Na}^+$  para cada molécula de neurotransmissor (Zerangue e Kavanaugh, 1996). Além disso, esse tipo de liberação geralmente é independente de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , ao contrário do processo de liberação de neurotransmissores por fusão de vesículas. Experimentos realizados em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  mostraram que a liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp independe da presença desse íon (Fig 24).



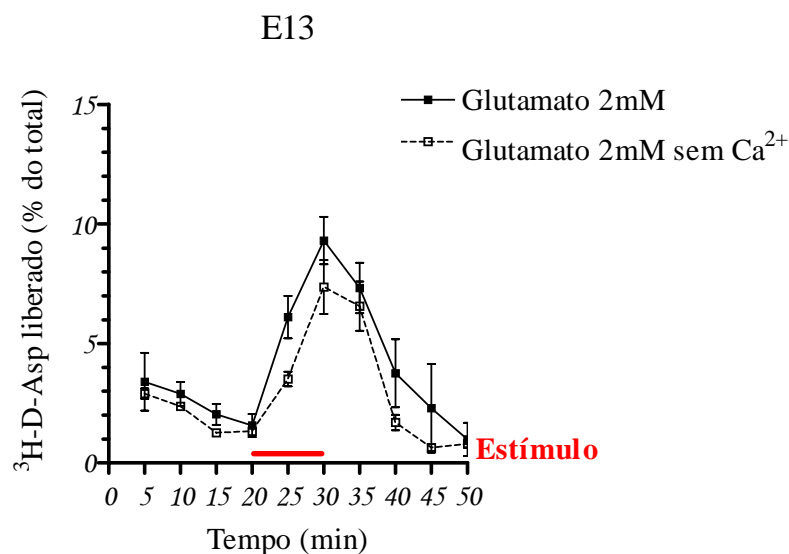


Fig 24 - Efeito da retirada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a liberação de D-asp. Liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato testada utilizando-se glutamato 2mM em meio sem íons  $\text{Ca}^{2+}$  e induzida por glutamato 2mM em meio normal (controle positivo), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubados com glutamato com ou sem  $\text{Ca}^{2+}$  por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média  $\pm$  SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=3.

É relevante ressaltarmos que o processo de liberação de neurotransmissores por ação de transportadores é abolido em baixas temperaturas, uma vez que transportadores são proteínas que promovem o deslocamento de neurotransmissores por consequência de mudanças conformacionais. Em baixas temperaturas, essas mudanças são dificultadas, o que compromete a atividade do transportador. A liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp na retina de animais E13 e PE foi completamente abolida quando os explantes eram incubados a  $4^\circ\text{C}$ , reforçando a suspeita de participação de transportadores no processo (Fig 25). Além disso, quando os explantes eram re-incubados a  $37^\circ\text{C}$ , na presença de glutamato, a liberação de  $^3\text{H}$ -D-asp ocorria normalmente (dados não mostrados)

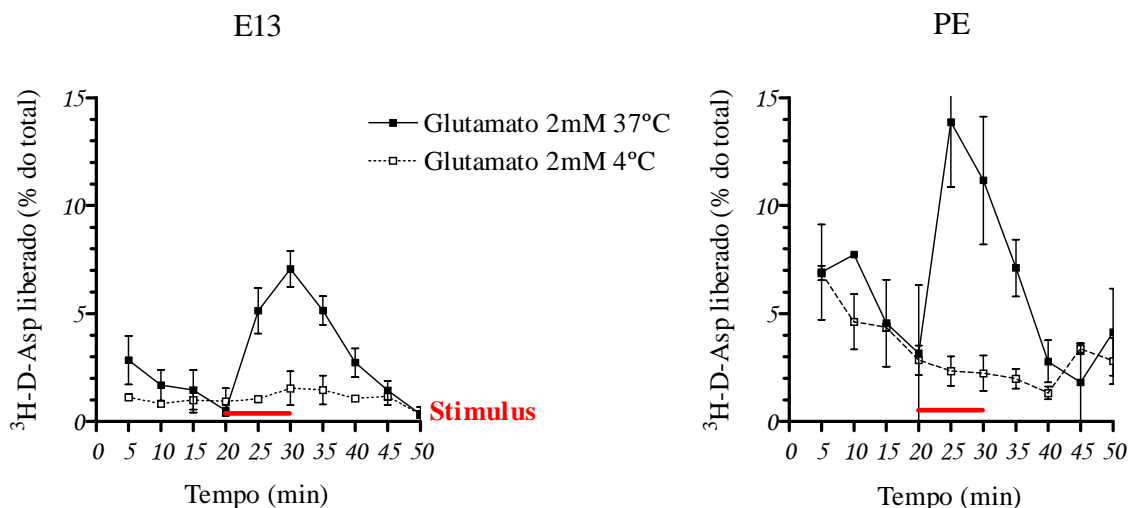


Fig 25 – Efeito da temperatura sobre a liberação de D-asp. Liberação de <sup>3</sup>H-D-aspartato testada utilizando-se glutamato 2mM em baixa temperatura (4°C) e induzida por glutamato 2mM a 37°C (controle +), em explantes de retina de animais E13 e pós-eclosão. Resumidamente, os explantes foram lavados 4x com solução Hank's 4, incubados com glutamato a 4 ou 37°C por 10min e novamente lavados com Hank's 4. Pontos representam a média ± SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=3 para e13 e N=2 para PE.

Os dois últimos resultados corroboram a idéia de uma possível participação de transportadores no processo. Esse fato nos levou a outras duas perguntas: esse transportador seria neuronal ou glial e que tipo de transportador seria? Os transportadores do tipo EAATs possuem representantes nesses dois tipos celulares. O tipo 1 e 2 tem expressão majoritariamente glial, apesar do 2 também ser encontrado em terminais de neurônios, enquanto os tipos 3, 4 e 5 possuem expressão neuronal (Danbolt, 2001; Shigeri et al., 2004). Existem vários inibidores dos EAATs, mas o único que possui um inibidor seletivo é o EAAT2, onde a molécula de dihidrokainato aparece como um bloqueador competitivo (Arriza et al., 1994). Para verificarmos se o responsável pela liberação de D-asp na retina de galinha é um transportador do tipo EAAT, utilizamos o inibidor competitivo PDC [gentilmente

cedida pelo grupo de neuroquímica do Dr. José Luis do Nascimento, da Universidade Federal do Pará (UFPA)]. Esse inibidor é transportado pelos EAATs, no lugar de glutamato e pode levar à liberação de aminoácidos excitatórios por heterotroca (Bridges et al., 1991; Blitzblau et al., 1996; Volterra et al., 1996). Para respondermos essa pergunta e também encaminharmos a questão do tipo celular responsável pela liberação de D-asp na retina, utilizamos como modelo experimental culturas mistas, culturas enriquecidas de neurônios e culturas purificadas de glia.

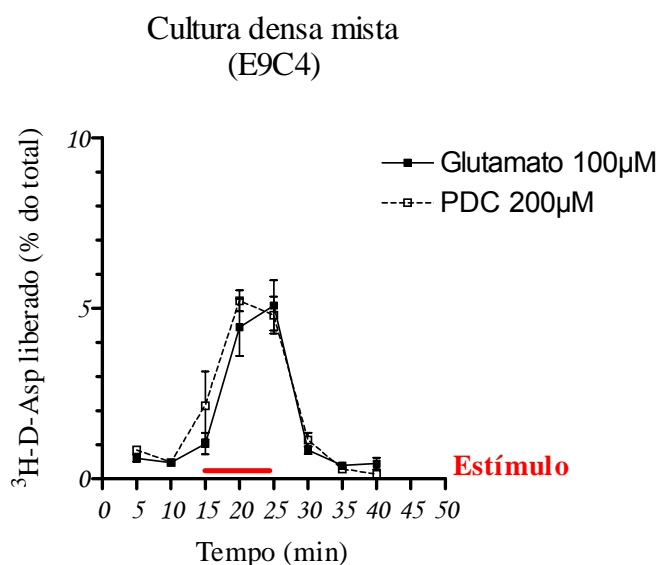


Fig 26 – A molécula de L-*trans*-PDC induz liberação de D-asp. Liberação de <sup>3</sup>H-D-aspartato testada utilizando-se L-*trans*-PDC (200µM) e induzida por glutamato 100µM (controle +), em culturas de células de retina de animais E9 mantidas por 4 dias *in vitro* (E9C4). Resumidamente, as culturas foram lavadas 3x com solução Hank's 4, incubadas com glutamato ou com L-*trans*-PDC por 10min e novamente lavadas com Hank's 4. Pontos representam a média ± SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=3.

Na retina de aves, a molécula de PDC também foi capaz de promover liberação de D-asp (Fig 26), sugerindo que essa liberação seja mediada pelos EAATs presentes na retina.

#### 4.5 Neurônios e não células gliais são os responsáveis pela liberação de D-asp na retina

Para verificarmos o envolvimento dos neurônios e das células gliais no processo de liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ , utilizamos o paradigma de cultura de células de retina. Com os diferentes protocolos de culturas, pudemos acompanhar a participação e a capacidade dos tipos celulares de liberar D-asp para o meio extracelular. Para efeito de controle positivo, foi realizada a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  induzida por glutamato, em culturas mistas, que contém neurônios e células gliais (Fig 27). Nossos resultados mostram que, como observado em explantes de retina,  $^3\text{H-D-asp}$  é liberado em culturas mistas estimuladas com glutamato 100uM, sendo o mesmo observado em culturas enriquecidas de neurônios, com níveis de liberação semelhantes. Entretanto, culturas purificadas de glia não foram capazes de promover liberação desse neurotransmissor quando incubadas com glutamato 100 $\mu\text{M}$ , apenas altas concentrações de glutamato ( $\geq 1\text{mM}$ ) foram capazes de induzir alguma liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  nessas culturas.

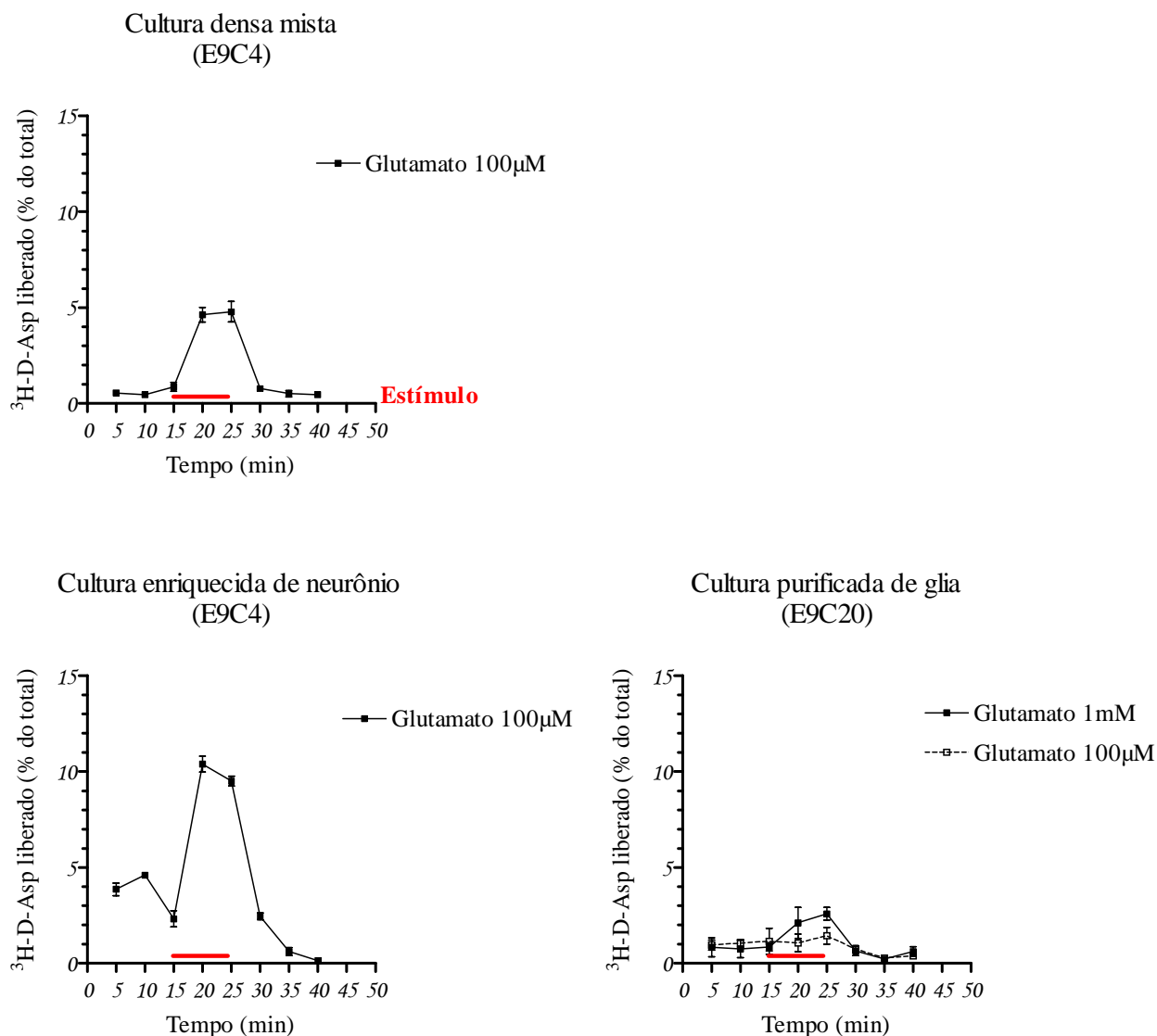


Fig 27 – Liberação de D-asp em culturas de células. Liberação de <sup>3</sup>H-D-aspartato induzida por glutamato 100µM em culturas de células de retina de animais E9 mantidas por 4 dias *in vitro* (E9C4) para cultura densa e enriquecida de neurônio e glutamato 100µM e 1mM em culturas purificadas de glia E9C20. Resumidamente, as culturas foram lavadas 3x com solução Hank's 4, incubadas com glutamato por 10min e novamente lavadas com Hank's 4. Pontos representam a média ± SEM. Barra vermelha representa duração da incubação. N=3.

Esse resultado comprova que a liberação de D-asp é majoritariamente neuronal, apesar da glia expressar grandes quantidades de transportadores e ser a principal responsável pela depuração de glutamato no SNC, principalmente por ação do

transportador GLT-1 (Danbolt et al., 1992; Haugeto et al., 1996). Como mencionado, a molécula de PDC é um competidor não-específico, sendo reconhecido por todos os tipos de EAATs. Esse fato agregado à não existência de inibidores seletivos para os subtipos de EAATs dificulta a indicação do(s) subtipo(s) de transportadores EAATs que possam estar envolvidos na liberação de D-asp.

#### 4.6 Dosagem de LDH em cultura de células

A fim de garantirmos que o aumento de radiação observada é devido à liberação e não rompimento celular causado por morte e/ou estresse, fizemos um experimento de dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). A LDH é liberada em situações de morte celular e sua atividade serve como uma medida indireta da morte celular. Culturas tratadas com 100 $\mu$ M de glutamato por 10 minutos, concentração capaz de promover liberação de  $^3$ H-D-asp, tiveram a atividade da enzima quantificada para verificarmos o possível efeito tóxico dessa concentração de glutamato. Como previsto, a concentração de glutamato utilizada nesse intervalo de incubação não parece ser tóxico para as células (Fig 28), comprovando que a liberação de  $^3$ H-D-asp acontece com a célula viável.

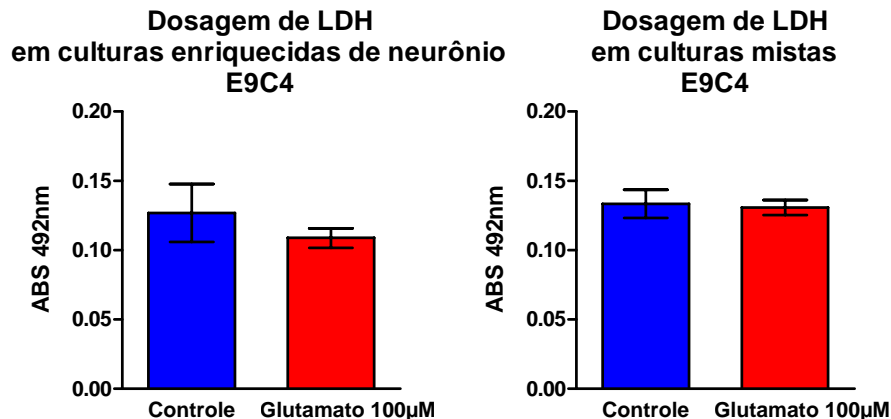


Fig 28 – Dosagem de LDH em cultura de células. A enzima foi dosada com o kit CytoTox 96<sup>®</sup> da Promega. As culturas foram incubadas por 10min com glutamato 100µM e o sobrenadante retirado para dosagem da enzima lactato desidrogenase. Média  $\pm$  SD. N=3).

#### 4.7 Liberação endógena de D-asp em retinas de aves, medida por HPLC.

A cromatografia de alta performance (HPLC) permite a separação de moléculas e sua resolução temporal. Utilizando uma coluna de fase reversa C18 e um protocolo adaptado de Hashimoto e colaboradores (1992), pudemos separar vários aminoácidos por hidrofobicidade e resolver cronologicamente essas moléculas. O protocolo de derivatização utilizado permite também a separação entre as formas D e L. Explantes de retinas, carregados previamente ou não com D-asp, foram incubados por 10 minutos com glutamato 2mM e o meio sobrenadante foi analisado no aparelho de HPLC.

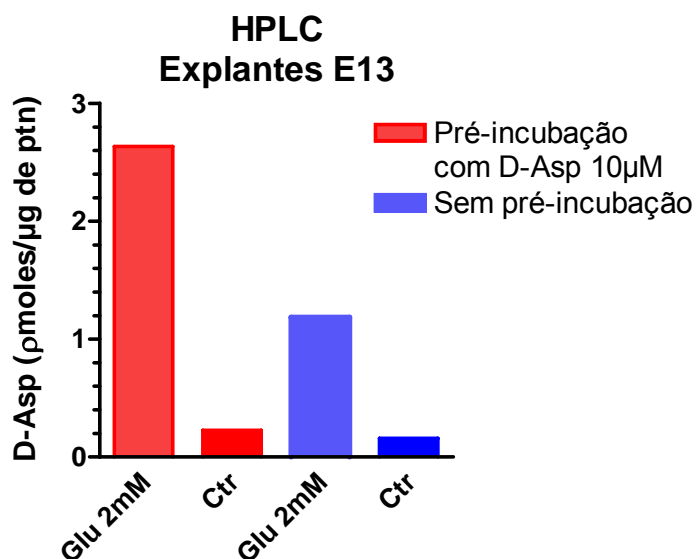


Fig 29 – Liberação endógena de D-asp. Liberação de D-aspartato endógeno induzida por glutamato 2mM em explantes de retina de animais E13. Resumidamente, os explantes foram lavados 3x com solução Hank's 4, incubados com D-asp 10µM (colunas vermelhas) ou não (colunas azuis) por 30min, lavados 3x com Hank's 4 e depois incubados com glutamato 2mM por 10min. O meio sobrenadante era recolhido e preparado para injeção no aparelho de HPLC. A proteína total de cada situação era dosada para fins de comparação entre as amostras. N=1.

Os experimentos de liberação de neurotransmissores marcados radioativamente podem gerar artefatos, tendo em vista que a prévia incorporação com a molécula radioativa é requerida para a realização da experiência. O resultado obtido através de HPLC comprova que ocorre liberação endógena de D-asp, validando os dados obtidos nas experiências anteriores além de permitir a quantificação de D-asp liberado com o estímulo (Fig 29).



## 5 Conclusões

- Dos neurotransmissores e substâncias testadas, apenas o glutamato foi capaz de induzir a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ .
- Agentes despolarizantes não foram capazes de promover o mesmo efeito.
- Essa sinalização independe da ativação dos receptores glutamatérgicos, ionotrópicos ou metabotrópicos.
- O sistema de transporte independente de sódio ( $X_c^-$ ) não está envolvido no processo de liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ .
- A dependência de íons sódio, influencia da temperatura e independência de íons cálcio no processo de liberação sugere a participação de um sistema de transporte como responsável pela liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ .
- O uso da molécula de PDC reforça a hipótese do envolvimento de transportadores no processo de liberação desse neurotransmissor
- A realização de experimentos em culturas de células sugere que a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  na retina seja majoritariamente neuronal.

- Comprovamos com experimentos de HPLC que a liberação de D-asp induzida por glutamato ocorre de forma endógena.
  
- Nossos resultados sugerem a existência de um heterotrocador glutamato/aspartato na retina, responsável pela troca de uma sinalização excitatória geral (glutamato) por uma sinalização NMDA exclusiva (aspartato).

## 6 Discussão

A liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  na retina de aves independe da ação de moléculas despolarizantes. O uso de agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato, veratridina, KCl, picrotoxina e estriquinina não tiveram qualquer efeito sobre essa liberação. O fato do KCl, que é amplamente usado como um agente despolarizante e promotor da liberação de neurotransmissores vesiculares não apresentar nenhum efeito sobre a liberação de D-asp pode ser um indício de que essa molécula não esteja presente em vesículas sinápticas e sim dispersa pelo citoplasma, apesar de existirem trabalhos que observam imunomarcação para aspartato dentro de vesículas sinápticas (Gundersen et al., 1998). A ausência de efeito da retirada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular sobre a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  também contribui para a conclusão de que essa molécula não esteja estocada em vesículas, já que sabidamente a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  é necessária para a liberação exocitótica clássica. Dentre os vários neurotransmissores e substâncias neuroativas testadas, o neurotransmissor glutamato foi o único capaz de induzir uma liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ . Na tentativa de esclarecermos qual a provável sinalização glutamatérgica responsável pela liberação de D-asp na retina, utilizamos agonistas e antagonistas seletivos para os receptores de glutamato. O uso de agonistas e antagonistas de receptores ionotrópicos do tipo não-NMDA (AMPA e KA) e NMDA (NMDA) não teve qualquer influência na liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ , tão pouco o uso de um agonista de receptores metabotrópicos de glutamato (trans-ACPD). Esse dado sugere que a sinalização promovida pelo glutamato, que é capaz de promover a liberação de D-asp, não ocorra por ativação desses receptores, mas provavelmente por ativação de

algum outro sítio. Observamos também que retinas de animais pós-eclosão (PE) sempre apresentaram uma resposta menor à mesma concentração de glutamato se comparadas a retinas de animais E13. Esse fato poderia ser causado pela maior quantidade de matriz extracelular e maior densidade celular na retina adulta, bem como a maturidade de células gliais que, dentre os muitos papéis desempenhados dentro do SNC, tem a importante função de regular os níveis extracelulares de neurotransmissores, principalmente os de glutamato, que em altas concentrações pode ser neurotóxico (Choi, 1992). Sendo assim, o glutamato extracelular adicionado poderia estar sendo absorvido por esse contingente de células gliais e/ou teria sua difusão dificultada, não chegando ao seu sítio de efeito. Uma outra hipótese para tentarmos explicar essa diferença seria o menor número de sítios ativos de ligação para essa molécula em idades mais avançadas, por exemplo se esse alvo sofresse alguma regulação durante o desenvolvimento e apresentasse uma queda na sua expressão em idades adultas: algum tipo de dessensibilização do sistema, diminuindo a resposta ao glutamato. A consequência disso seria um menor efeito sobre a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ , justamente como é observado. Outra característica importante é que a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  no animal PE parece ter um basal aumentado em relação a outras idades testadas. Existem evidências na retina de ratos que a luz é capaz de induzir alterações funcionais no receptor de NMDA, independente da mudança da composição das subunidades que compõem o receptor durante o desenvolvimento (Guenter et al., 2004). A alteração na função dos receptores de NMDA acabam por influenciar no balanço elétrico total do neurônio, o que pode aumentar o efluxo basal de neurotransmissores. Além disso, mudanças na composição protéica da membrana plasmática e adaptações

morfológicas são observadas em animais com acesso à luz (Landi et al., 2007; Xu e Tian, 2007), principalmente na retina interna, onde está a maior concentração de células aspartérgicas (Calaza et al., 2003).

Descartando-se a possível participação de receptores de glutamato no processo de liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ , os transportadores e trocadores presentes na membrana surgem como potenciais responsáveis pelo efluxo de D-asp. O trocador glutamato-cistina utiliza o gradiente de glutamato através da membrana como força motriz para importação de cistina, que é utilizada na formação de glutathiona reduzida (GSH) (Cooper e Kristal, 1997; Dringen, 2000). Em culturas de neurônios corticais, foi visto que o EAAT2 e o EAAT3 também promovem a captação de cistina do meio extracelular (Chen e Swanson, 2003). O aumento na concentração extracelular de cistina não levou a um aumento na liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ , provavelmente devido ao trocador glutamato/cistina não ser capaz de reconhecer D-asp (Cho e Bannai, 1990; Miura et al., 1992), ou por ter baixa expressão comparado aos outros sítios ligadores de glutamato na retina. Além disso, apesar dos EAAT2 e 3 serem capazes de captar cistina, até a data presente não foi descrita a capacidade desses transportadores de também funcionarem como trocadores glutamato/cistina. Transportadores membranares de alta-afinidade promovem a interrupção da sinalização de determinados neurotransmissores pela sua captação da fenda sináptica para o meio intracelular. Esse transporte é na verdade um simporte de íons  $\text{Na}^+$ . Como esses íons estão mais concentrados no meio extracelular do que no citoplasma, é gerado um gradiente eletroquímico para o interior celular. Esse gradiente possui uma energia livre de entrada, que é utilizada por esses transportadores para que possam ao mesmo tempo promover a passagem de moléculas cuja entrada não é favorável.

A direção de transporte pode ser modificada pelas propriedades elétricas das células. Células despolarizadas tendem a transportar neurotransmissores para fora (do Nascimento e de Mello, 1985) e não para dentro, pois o sentido do gradiente eletroquímico do sódio muda: no repouso é de entrada e depois da despolarização passa a ser de saída. Isso acaba por causar uma liberação de neurotransmissores para o meio extracelular e não a sua retirada de lá, por exemplo em situações de isquemia (Phillis et al., 1997; Seki et al., 1999; Phillis et al., 2000; Danbolt, 2001). A retirada de íons  $\text{Na}^+$  do meio extracelular aboliu o processo de liberação de  $^3\text{H-D-asp}$ . Esses transportadores, por serem proteínas, têm a sua função diminuída pela temperatura. Logo, em baixas temperaturas é esperado que o processo torne-se muito lento, o que na verdade seria a explicação para não observarmos liberação na condição experimental de  $4^\circ\text{C}$ . Inibidores não competitivos dos EAATs não atrapalham a maquinaria de transporte, são transportados e podem gerar liberação de aminoácidos excitatórios por heterotroca, como por exemplo o composto PDC, que pode provocar excitotoxicidade por induzir liberação de glutamato e aspartato por heterotroca. A liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  induzida por PDC sugere o envolvimento dos EAATs nesse processo (Bridges et al., 1991; Blitzblau et al., 1996; Volterra et al., 1996). Juntos, esses dados sugerem que a liberação de  $^3\text{H-D-asp}$  seja feita por meio de um transportador/trocador e não por via clássica exocitótica. Esse modo de liberação não corresponde ao descrito em fatias de glândula adrenal e células PC12 e seus subclones. Em fatias de células adrenais, a liberação é dependente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e é bloqueada na presença de EGTA (Wolosker et al., 2000). Em células PC12, que não possuem expressão de transportadores de glutamato, a liberação parece ocorrer de forma espontânea e contínua, porém independente de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de

proteínas do complexo de fusão de vesículas (Homma, 2006), caracterizando um efluxo citoplasmático como o observado em nossos experimentos. Entretanto, o mecanismo ainda não foi desvendado. Ocorre também um efluxo causado por atividade de um canal sensível a volume, na presença de estímulos hipotônicos (Koyama et al., 2006).

Outros neurotransmissores, como o GABA, na retina de aves são sabidamente liberados por reversão de seus transportadores (do Nascimento e de Mello, 1985 e Calaza et al., 2003). Também já foi descrita a liberação de glutamato de forma extrasináptica por ação do trocador glutamato/cisteína (Baker et al., 2002a e b, Shigeri et al., 2004). Esses dados nos levam a propor a existência de um transportador com capacidade de funcionar como um trocador glutamato/aspartato presente na retina de galinha. Os cinco subtipos de EAATs possuem peculiaridades na dinâmica de transporte e expressão ao longo do SNC. Na retina, encontram-se pelo menos 4 subtipos: o EAAT1, 2, 3 e 5. Sabendo disso, fica difícil inferir qual desses subtipos participaria do processo de liberação de D-asp. Além da dependência de íons  $\text{Na}^+$ , o processo de transporte também é dependente de íons  $\text{K}^+$ . Em contrapartida o processo de heterotroca continua a acontecer na ausência desse último íon. Esse fato pode nos dar mais um indício de que a liberação seja realmente mediada por troca e não por transporte caso realizemos experimentos na ausência de  $\text{K}^+$  (Pines e Kanner, 1990; Otis e Kavanaugh, 2000). A falta de bloqueadores específicos para os EAATs dificulta o isolamento do subtipo relevante para o processo de liberação, contudo algumas informações devem ser levadas em conta: O composto THA não é capaz de bloquear o EAAT 5, que é largamente expresso na retina. Se este subtipo for capaz de promover a liberação de D-asp para o meio, a adição de THA, ao

contrário de PDC, não será capaz de induzir esse efluxo. Esses experimentos serão realizados em breve e nos darão mais detalhes sobre a possível identidade do transportador responsável por tal sinalização. Estudos ao longo dos últimos anos, vêm demonstrando a importância da comunicação neuro-gliial para o correto estabelecimento de sinapses e seu funcionamento, além da modulação da função, força e da plasticidade sináptica por esse tipo celular. Essa capacidade de influenciar processos neuronais é devido ao fato das células gliais serem capazes de secretar moléculas biologicamente ativas, como as neurotrofinas e os neurotransmissores. A utilização de protocolos diferentes de culturas de células permitiu verificarmos se o neurotransmissor D-asp poderia ser liberado por essas células gliais na retina de embrião de galinha. Os resultados comprovaram que glutamato em concentrações capazes de estimular a liberação neuronal (glutamato 100 $\mu$ M), quando utilizados na cultura purificada de glia não foi capaz de liberar D-asp, que só respondeu com uma leve liberação em situações de alto glutamato extracelular ( $\geq 1$ mM). Essa liberação pode ser resultado de uma reversão dos transportadores gliais e não uma heterotroca, já que a adição de PDC em culturas de células gliais não resultou em efluxo de D-asp. Isso também explicaria a pequena liberação observada na presença de KCl 80mM, que poderia despolarizar as células gliais e causar uma reversão de seus transportadores. Com os ensaios de dosagem de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), provamos que as concentrações de glutamato usadas nas culturas não induzem ao aumento de  $^3$ H-D-asp extracelular devido à morte ou rompimento das células, pois os níveis da enzima estavam iguais à situação controle. Aparentemente a molécula de D-asp possui uma relevância para a fisiologia de visão. O grupo do cientista italiano Antimo D'Aniello



estuda o envolvimento da molécula de D-asp em diversos animais marinhos, incluindo *Octopus vulgaris* e *Sépiea officinalis*. Já foi descrito que a concentração de D-asp no sistema nervoso desses animais é tão alta quanto a de outros neurotransmissores clássicos, como L-glutamato e L-aspartato (D'Aniello e Giuditta, 1977 e 1978). Quando o animal é deixado no escuro, as concentrações de D-asp caem e retorna aos níveis normais quando reexposto à luz. Esse fato se deve à atividade de uma enzima chamada aspartato racemase que converte L em D-aspartato, que tem sua atividade comprometida quando no escuro, indicando uma via bioquímica de síntese de D-asp e sua possível participação na retina. Outra descoberta importante foi a enzima D-aspartato oxidase (D-aspO), presente no fígado, rins e no cérebro, onde encontra-se expressa principalmente em neurônios hipocámpais e corticais (Huang et al., 2006, D'Aniello, 2007). A D-aspO está presente na membrana e degrada D-asp gerando  $H_2O_2$  e  $NH_3$ . Ela possui capacidade oxidativa específica para D-asp e animais mutantes para essa enzima possuem déficits na produção de hormônios, principalmente melanocortina (Huang et al., 2006). Fica claro, a partir desses dados, que as vias bioquímicas de síntese e de degradação desse sinalizador começam a ser desvendadas.

A sinalização promovida pela molécula de D-aspartato foi inicialmente descoberta em 1986, onde verificaram a capacidade dessa molécula ativar seletivamente receptores de NMDA em retinas de peixe dourado, induzindo a liberação de GABA (Cha et al., 1986). Estudos recentes em gânglios cerebrais de *Aplysia limacine* relataram a capacidade de D-asp induzir ao acúmulo de AMPc nesses neurônios (Spinelli et al., 2006). Esses fatos sugerem que o D-asp possa atuar como um neurotransmissor e/ou neuromodulador e ter uma grande importância no processo

de transmissão sináptica não só na *Aplysia limacine*, mas também em outros animais.

No início dos experimentos surgiu uma dúvida sobre a liberação de D-asp. Como era realizada uma prévia incubação dos explantes com D-asp, essa molécula seria captada pelas células e seria metabolizada. O N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG) é o peptídeo mais abundante e largamente distribuído no sistema nervoso de mamíferos (Neale et al., 2005). Esse composto é formado pela união de uma molécula de aspartato, uma de glutamato e um radical N-acetil. Esse peptídeo é um co-transmissor em diversos neurônios, principalmente em terminais glutamatérgicos, GABAérgicos e acetilcolinérgicos e é um agonista seletivo de mGluR<sub>3</sub> (Wroblewska et al., 1997; Neale et al., 2000; Neale et al., 2005). Ao medirmos a radioatividade liberada, qualquer composto formado a partir da molécula de <sup>3</sup>H-D-asp seria erroneamente interpretado como D-asp. A utilização da técnica de HPLC comprovou que ocorre realmente uma liberação de D-asp endógeno, o que não exclui a hipótese de realmente ocorrer formação de NAAG a partir de D-asp. Na retina de galinha, Kubrusly e colaboradores, em 1998, sugeriram que o aspartato seria o principal mimetizador dos efeitos glutamatérgicos, sendo capaz de liberar <sup>3</sup>H-GABA de culturas além de ativar seletivamente o receptor glutamatérgico de NMDA (Kubrusly et al., 1998). Assim, percebemos que a liberação de aspartato por esse possível trocador é contextualizada dentro desses fatos. Sabemos que o glutamato é capaz de ativar diversos receptores já descritos (ionotrópicos e metabotrópicos) indiscriminadamente. As sinapses excitatórias ocorrem, em sua grande maioria, em pequenas regiões denominadas espículas dendríticas (Knott et al., 2006; Sobczyk e Svoboda, 2007). Isso, somado ao fato de asp estar presente no SNC e na retina de

diferentes espécies (Yaquib e Eldred, 1991, Hashimoto e Oka, 1997, Lee et al., 1999 e Sun e Crossland, 2000) leva-nos a crer que a troca glutamato/aspartato seria importante para uma sinalização NMDA exclusiva, sem ativação dos demais receptores. Como o processo de transporte é eletrogênico (Danbolt 2001), a despolarização criada no microambiente da espícula dendrítica pode ser suficiente para desbloquear o canal de NMDA e garantir assim a sua atividade.

Inicialmente pensava-se que o aspartato, assim como o glutamato, poderia também ser o neurotransmissor dos fotorreceptores. Essa suspeita foi colocada de lado quando estudos mostraram que o glutamato, em concentrações micromolares, era capaz de despolarizar células horizontais. Já o aspartato nas mesmas concentrações foi incapaz de despolarizar tais células (Lasater e Dowling, 1982). Além disso, tanto NMDA quanto asp são capazes de estimular células amácrinas e ganglionares na retina interna (Bloomfield e Dowling, 1985). Asp apresenta uma imunomarcagem forte na camada nuclear interna, presente em células amácrinas, bipolares, horizontais e até algumas ganglionares deslocadas. A camada de células amácrinas é a que possui o maior percentual de céls asp (+) e glu (-) (Sun e Crossland, 2000; Calaza et al., 2003). Portanto, parece que asp exerceria um papel mais proeminente na retina interna, constituindo um importante sinalizador fisiológico para a retina interna através da ativação seletiva do canal de NMDA, inclusive em células com receptores para NMDA sensíveis a dopamina (Do Nascimento et al., 1998, Castro et al., 1999). O fato dessas células responderem a asp não exclui a capacidade de também responderem a glutamato. O fator decisivo aqui será o neurotransmissor que chega ao neurônio pós-sináptico. Se glutamato, ocorrerá uma ativação ionotrópica geral (AMPA/KA e NMDA); se aspartato, uma ativação NMDA

exclusiva. Além disso, o neurotransmissor inicial pode ser trocado por outro. Wersinger e colaboradores (2006) demonstraram que a localização do transportador EAAT5 é neuronal, mais especificamente funcionando como um receptor pré-sináptico de glutamato em células bipolares do tipo OFF. Se esse transportador for o responsável pela heterotroca glutamato/aspartato, pode modificar o sinal e consecutivamente a resposta do neurônio pós-sináptico. Abaixo uma representação da provável via de liberação e atuação da molécula de D-asp no contexto da sinapse (Fig 31).

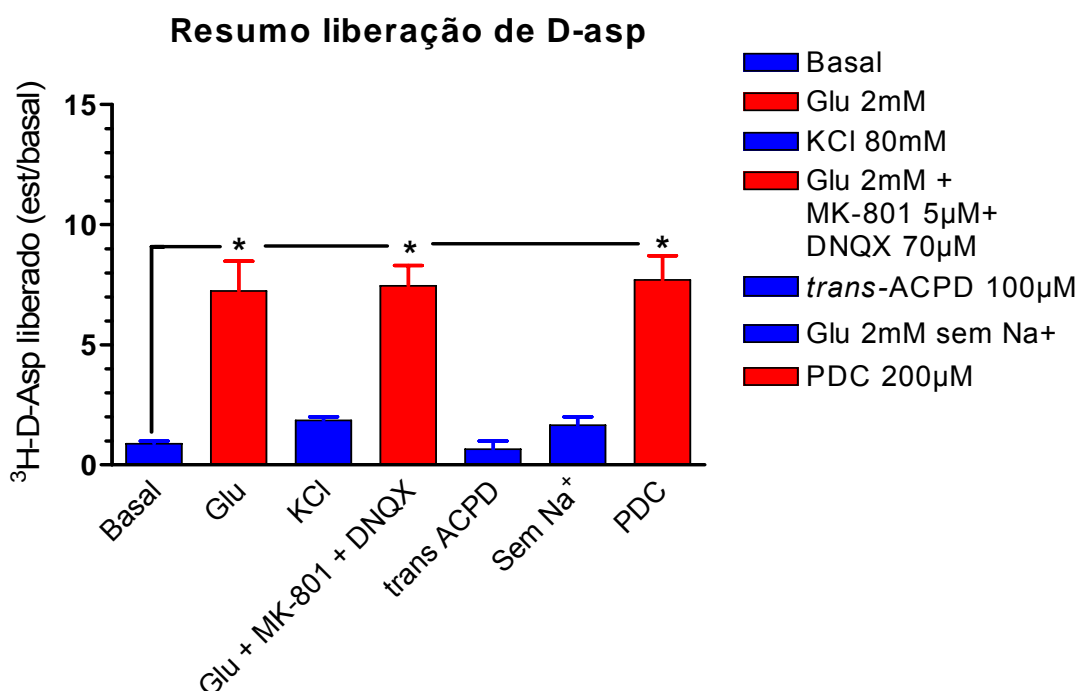


Fig 30 – Resumo da liberação de  $^3\text{H}$ -D-aspartato em explantes de E13. Cada barra representa a relação estimulado/basal para cada condição testada. Média  $\pm$  SEM. N=3.  $p < 0.01$ .

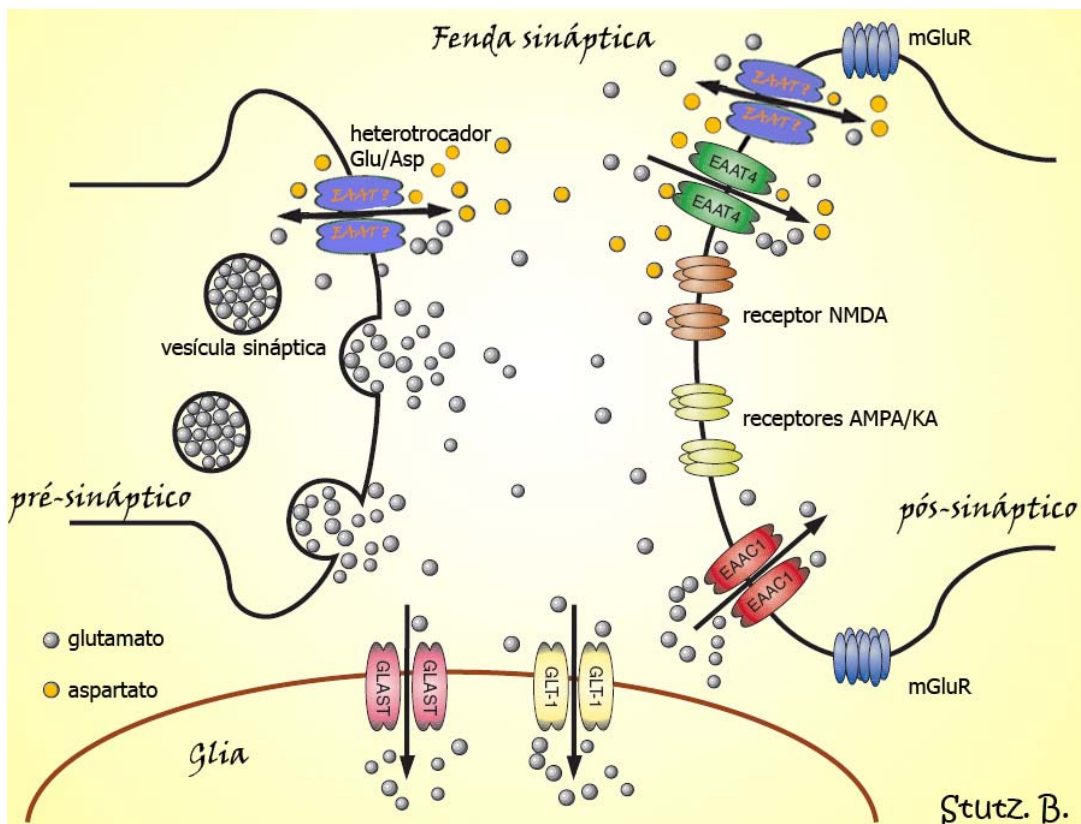


Fig 31 – Modelo de liberação de D-asp na retina de galinha. A possível existência de um heterotrocador glutamato/aspartato neuronal seria a responsável pela troca de um sinal geral (glutamato) por uma sinalização NMDA exclusiva (aspartato). Modificado de González e Robinson, 2004.

**Referências:**

ABE K, TAKAHASHI S, MUROKI Y, KERA Y E YAMADA RH (2006). Cloning and expression of the pyridoxal 5'-phosphate-dependent aspartate racemase gene from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii* and characterization of the recombinant enzyme. **J Biochem (Tokyo)** v. 139: p. 235–244.

ADACHI M, KOYAMA H, LONG Z, SEKINE M, FURUCHI T, IMAI K, NIMURA N, SHIMAMOTO K, NAKAJIMA T E HOMMA H (2004). L-Glutamate in the extracellular space regulates endogenous D-aspartate homeostasis in rat pheochromocytoma MPT1 cells. **Arch Biochem Biophys** v. 424: p. 89–96.

ALTSHULER DM, TURNER DL E CEPKO CL (1991). Specification of the cell type in the vertebrate retina. In: Developmental of the visual system. Press Boston, MA, EUA: p. 37–58.

AMARA SG E FONTANA ACK (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochem Int** v. 41: p. 313–318.

ARAQUE A, LI NZ, DOYLE RT E HAYDON PG (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. **J Neurosci** v. 20: p. 666–673.

ARRIZA JL, KAVANAUGH MP, FAIRMAN WA, WU YN, MURDOCH GH, NORTH RA E AMARA SG (1993). Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. **J Biol Chem** v. 268: p. 15329–15332.

ARRIZA JL, FAIRMAN WA, WADICHE JI, MURDOCH GH, KAVANAUGH MP E AMARA SG (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. **J Neurosci** v. 14: p. 5559–5569.

ARRIZA JL, ELIASOF S, KAVANAUGH MP E AMARA SG (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 94: p. 4155–4160.

ASSISI L, BOTTE V, D'ANIELLO A E DIFIIORE MM (2001). Enhancement of aromatase activity by D-aspartic acid in the ovary of lizard *Podarcis sicula*. **Reproduction** v. 121:p. 803–808.

ATTWELL D (1994). Neurobiology-glia and neurons in dialogue. **Nature** v. 369: p. 707–708.

AUGER C E ATTWELL D (2000). Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. **Neuron** v. 28: p. 547–558.

BAKER DA, SHEN H E KALIVAS PW (2002a). Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. **Amino Acids** v. 23: p. 161–162.

BAKER DA, XI Z, SHEN H, SWANSON CJ E KALIVAS PW (2002b). The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. **J. Neurosci** v. 22: p. 9134–9141.

BALCAR VJ E LI Y (1992). Heterogeneity of high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate in the mammalian central nervous system. **Life Sci** v. 51: p. 1467–1478.

BANNAI S E KITAMURA E (1980). Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. **J Biol Chem** v. 255: p. 2372–2376.

BANNAI S E KITAMURA E (1981). Role of proton dissociation in the transport of cystine and glutamine in human diploid fibroblasts in culture. **J Biol Chem** v. 256: p. 5770–5772.

BARBOUR B, BREW H E ATTWELL D (1991). Electrogenic uptake of glutamate and aspartate into glial cells isolated from the salamander (*Ambystoma*) retina. **J Physiol (Lond.)** v. 436: p. 169–193.

BELLOCCHIO EE, HU H, POHORILLE A, CHAN J, PICKEL VM E EDWARDS RH (1998). The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. **J Neurosci** v. 18: p. 8648–8659.

BELLOCCHIO EE, REIMER RJ, FREMEAU RTJR E EDWARDS RH (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. **Science** v. 289: p. 957–960.

BENJAMIN AM E QUASTEL JH (1976). Cerebral uptakes and exchange diffusion in vitro of L-and D-glutamates. **J Neurochem** v. 26: p. 431–441.

BENVENISTE M E MEYER ML (1991). Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. **Biophys J** v. 59: p. 560–573.

BERGLES DE E JAHR CE (1998). Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. **J Neurosci** v. 18: p. 7709–7716.

BERGLES DE, ROBERTS JD, SOMOGYI P E JAHR CE (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nature** v. 405: p. 187–191.

BEZZI P, CARMIGNOTO G, PASTI L, VESCE S, ROSSI D, RIZZINI BL, POZZAN T E VOLTERRA A, (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. **Nature** v. 391: p. 281–285.

BILLUPS B, ROSSI D E ATTWELL D (1996). Anion conductance behavior of the glutamate uptake carrier in salamander retinal glial cells. **J Neurosci** v. 16: p. 6722–6731.

BLITZBLAU R, GUPTA S, DJALI S, ROBINSON MB E ROSENBERG PA (1996). The glutamate transport inhibitor *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. **Eur J Neurosci** v. 8: p. 1840–1852.

BLOOMFIELD SA E DOWNLING JE (1985). Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. II. Inner plexiform layer. **J Neurophysiol** v. 53: p. 714–725.

BONANNO G, PITTALUGA A, FEDELE E, FONTANA G E RAITERI M (1993). Glutamic acid and gamma-aminobutyric acid modulate each other's release through heterocarriers sited on the axon terminals of rat brain. **J Neurochem** v. 61: p. 222–230.

BONANNO G E RAITERI M (1994). Release-regulating presynaptic heterocarriers. **Prog Neurobiol** v. 44: p. 451–462.



BONVENTO G, SIBSON N E PELLERIN L (2002). Does glutamate image your thoughts? **Trends Neurosci** v. 25: p. 359–364.

BORGES K E DINGLEDINE R (1998). AMPA receptors: molecular and functional diversity. **Prog Brain Res** v. 116: p. 153–170.

BOROWSKY B E HOFFMAN BJ (1995). Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. **Int Rev Neurobiol** v. 38: p. 139–199.

BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v. 72: p. 248–254.

BRANDSTÄTTER JH, KOULEN P E WÄSSLE H (1998). Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. **Vis Res** v. 38: p. 1385–1397.

BRASNJO G E OTIS TS (2001). Neuronal glutamate transporters control activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors and influence cerebellar long-term depression. **Neuron** v. 31: p. 607–616.

BRÄUNER-OSBORNE H, EGEBJERG J, NIELSEN EØ, MADSEN U E KROGSGAARD-LARSEN P (2000). Ligands for glutamate receptors: design and therapeutic prospects. **J Med Chem** v. 43: p. 2609–2645.

BREDARIOL ASS E HAMASSAKI-BRITTO DE (2001). Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. **J Comp Neurol** v. 441: p. 58–70.

BRIDGES RJ, STANLEY MS, ANDERSON MW, COTMAN CW E CHAMBERLIN AR (1991). Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. **J Med Chem** v. 34: p. 717–725.

BRIDGES RJ, KAVANAUGH MP E CHAMBERLIN AR (1999). A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. **Curr Pharm Des** v. 5: p. 363–379.

BRIDGES RJ E ESSLINGER CS (2005). The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. **Pharmacol Ther** v. 107: p. 271–285.

BRÖER A, BROOKES N, GANAPATHY V, DIMMER KS, WAGNER CA, LANG F E BRÖER S (1999). The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. **J Neurochem** v. 73: p. 2184–2194.

CALAZA KC, DE MELLO FG E GARDINO PF (2001). GABA release induced by aspartate-mediated activation of NMDA receptors is modulated by dopamine in a selective subpopulation of amacrine cells. **J Neurocytol** v. 30: p. 181–193.

CALAZA KC, DE MELLO MCF, DE MELLO FG E GARDINO PF (2003). Local differences in GABA release induced by excitatory amino acids during retina development: selective activation of NMDA receptors by aspartate in the inner retina. **Neurochem Res** v. 28: p. 1475–1485.

CAMACHO A E MASSIEU L (2006). Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. **Arch Med Res** v. 37: p. 11–18.

CARLSSON ML E CARLSSON A (1990). Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia – implications on schizophrenia and Parkinson's disease. (Review) **Trends Neurosci** v. 13: p. 272–276.

CARLSSON A, HANSSON LO, WATERS N E CARLSSON ML (1999). A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. **Br J Psychiatry** v. 174: p. 2–6.

CARTMELL J E SCHOEPP DD (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. **J Neurochem** v. 75: p. 889–907.

CASTRO NG, DE MELLO MC, DE MELLO FG E ARACAVA Y (1999). Direct inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor channel by dopamine and (+)-SKF38393. **Br J Pharmacol** v. 126: p. 1847–1855.

CESTÈLE S E CATTERALL WA (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochemie** v. 82: p. 883–892.

CHA JJ, O'BRIEN DR E DOWLING JE (1986). Effects of D-aspartate on 3 excitatory amino acid-induced release of [<sup>3</sup>H]GABA from goldfish retina. **Brain Res** v. 376: p. 140–148.

CHAUDHRY FA, REIMER RJ, KRIZAJ D, BARBER D, STORM-MATHISEN J, COPENHAGEN DR E EDWARDS RH (1999). Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. **Cell** v. 99: p. 769–780.

CHAUDHRY FA, SCHMITZ D, REIMER RJ, LARSSON P, GRAY AT, NICOLL R, KAVANAUGH M E EDWARDS RH (2002a). Glutamine Uptake by Neurons: Interaction of Protons with System A Transporters. **J Neurosci** v. 22: p. 62–72.

CHAUDHRY FA, REIMER RJ E EDWARDS RH (2002b). The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. **J Cell Biol** v. 157: p. 349–355.

CHEN W, AOKI C, MAHADOMRONGKUL V, GRUBER CE, WANG GJ, BLITZBLAU R, IRWIN N E ROSENBERG PA (2002). Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT-1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. **J Neurosci** v. 22: p. 2142–2152.

CHEN W, MAHADOMRONGKUL V, BERGER UV, BASSAN M, DESILVA T, TANAKA K, IRWIN N, AOKI C E ROSENBERG PA (2004). The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. **J Neurosci** v. 24: p. 1136–1148.

CHEN XK, XIONG YF E ZHOU Z (2006). “Kiss and Run” Exocytosis in Astrocytes. **The Neuroscientist** v. 12: p. 375–378.

CHEN Y E SWANSON RA (2003). The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. **J Neurochem** v. 84: p. 1332–1339.

CHO Y E BANNAI S (1990). Uptake of glutamate and cystine in C-6 glioma cells and cultured astrocytes. **J Neurochem** v. 55: p. 2091–2097.

CHOI DW E ROTHMAN SM (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu Rev Neurosci** v. 13: p. 171–182.

CHOI DW (1992). Excitotoxic cell death. **J Neurobiol** v. 23: p. 1261–1276.

CLARKE S (2003). Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. **Ageing Res Rev** v. 2: p. 263–285.

CLEMENTS JD E WESTBROOK GL (1991). Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartic acid receptors. **Neuron** v. 7: p. 605–613.

COLLINGRIDGE GL E LESTER RAJ (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev** v. 40: p. 143–210.

COOPER AJL E KRISTAL BS (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. **Biol Chem** v. 378: p. 793–802.

CORRIGAN JJ (1969). D-amino acids in animals. **Science** v. 164: p. 142–149.

COULOMBRE AJ (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. **Am J Anat** v. 96: p. 153–189.

COX DWG, HEADLEY MH E WATKINS JC (1977). Actions of L- and D-homocysteate in rat CNS: A correlation between low-affinity uptake and the time courses of excitation by microelectrophoretically applied L-glutamate analogues. **J Neurochem** v. 29: p. 579–588.

DANBOLT NC, PINES G E KANNER BI (1990). Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. **Biochemistry** v. 29: p. 6734–6740.

DANBOLT NC, STORM-MATHISEN J E KANNER BI (1992). An  $[Na^+ + K^+]$  coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell process. **Neuroscience** v. 51: p. 295–310.

DANBOLT NC (1994). The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. **Prog Neurobiol** v. 44: p. 377–396.

DANBOLT NC (1996). Brain glutamate transporters proteins from homomultimers. **J Biol Chem** v. 271: p. 27715–27722.

DANBOLT NC (2001). Glutamate uptake. **Prog Neurobiol** v. 65: p. 1–105.

D'ANIELLO A E GIUDITTA A (1977). Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris*. **J Neurochem** v. 29: p. 1053–1057.

D'ANIELLO A E GIUDITTA A (1978). Presence of D-aspartate in squid axoplasm and in other regions of the cephalopod nervous system. **J Neurochem** v. 31: p. 1107–1108.

D'ANIELLO A, NARDI G, DESANTIS A, VETERE A, DICOSMO A, MARCHELLI R, DOSSENA A E FISHER G (1995). Free L-aminoacids and D-aspartate contents in the nervous system of cephalopoda. **Comp Biochem Physiol** v. 112B: p. 661–666

D'ANIELLO A, DIFIORE MM, D'ANIELLO G, COLIN FE, LEWIS G E SETCHELL BP (1998a). Secretion of D-aspartic acid by the rat testis and its role in endocrinology of the testis and spermatogenesis. **FEBS Lett** v. 436: p. 23–27.

D'ANIELLO A, LEE MJ, PETRUCCELLI L E DIFIORE MM (1998b). Regional decreases of free D-aspartate levels in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** v. 250: p. 131–134.

D'ANIELLO A, DIFIORE MM, FISHER GH, MILONE A, SELENI A, D'ANIELLO S, PERNA A E INGROSSO D (2000a). Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. **FASEB J** v. 14: p. 699–714.

D'ANIELLO G, TOLINO A, D'ANIELLO A, FISHER GH E DI FIORE MM (2000b). The role of the aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in the regulation of prolactin release. **Endocrinology** v. 141: p. 3862–3870.

D'ANIELLO A (2007). D-aspartic acid: An endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. **Brain Res Rev** v. 53: p. 215–234.

D'ANIELLO G, TOLINO A, D'ANIELLO A, FISHER GH E DIFIORE MM (2000). The role of the aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in the regulation of prolactin release. **Endocrinology** v. 141: p. 3862–3870.

D'ANIELLO S, SPINELLI P, FERRANDINO PG, PETERSON K, TSESARSKIA M, FISHER GH E D'ANIELLO A (2005). Cephalopod vision involves dicarboxylic amino acids: D-aspartate, L-aspartate and L-glutamate. **Biochem J** v. 386: p. 331–340.

DAVIES LP E JOHNTON GA (1976). Uptake and release of D- and L-aspartate by rat brain slices. **J Neurochem** v. 26: p. 1007–1014.

DE LANGE RP, DE ROOS AD E BORST JG (2003). Two modes of vesicle recycling in the rat calyx of Held. **J Neurosci** v. 23: p. 10164–10173.

DELGADO R, MAUREIRA C, OLIVA C, KIDOKORO Y E LABARCA P (2000). Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, shibire. **Neuron** v. 28: p. 941–953.

DEVRIES SH (2000). Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. **Neuron** v. 28: p. 847–856.

DIETRICH D, KIRSCHSTEIN T, KUKLEY M, PEREVERZEV A, VON DER BRELIE C, SCHNEIDER T E BECK H (2003). Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca<sup>++</sup> channels. **Neuron** v. 39: p. 483–496.

DINGLELINE R, BORGES K, BOWIE D E TRAYNELIS SF (1999) The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev** v. 51: p. 7–61.

DISBROW JK, GERSHTEN MJ E RUTH JA (1982). Uptake of L-[<sup>3</sup>H]glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from rat brain. **Biochem Biophys Res Commun** v. 108: p. 1221–1227.

DO NASCIMENTO JL E DE MELLO FG (1985). Induced release of gamma-aminobutyric acid by a carrier-mediated, high-affinity uptake of L-glutamate in cultured chick retina cells. **J Neurochem** v. 45: p. 1820–1827.

DO NASCIMENTO JL, HOKOC JN, DE MELLO MCF E DE MELLO FG (1996). Neurotransmitter release in aggregate cultures of chick embryo retina cells. **Rev Bras Biol** v. 56: p. 135–143.

DO NASCIMENTO JL, KUBRUSLY RC, REIS RA, DE MELLO MC E DE MELLO FG (1998). Atypical effect of dopamine in modulating the functional inhibition of NMDA receptors of cultured retina cells. **Eur J Pharmacol** v. 343: p. 103–110.

DONLY C, JEVNIKAR J, MCLEAN H E CAVENEY S (2000). Substrate-stereoselectivity of a high-affinity glutamate transporter cloned from the CNS of the cockroach *Diploptera punctata*. **Insect Biochem Mol Biol** v. 30: p. 369–376.

DOWLING JE (1987). Retinal cells and information processing. In: *The retina: an approachable part of the brain*. London, The Belknap Press of Harvard University Press, 1ed, cap 2.

DOWNING JA, JOSS J E SCARAMUZZI RJ (1996). The effects of N-methyl-D,L-aspartic acid and aspartic acid on the plasma concentration of gonadotropin, GH and prolactin in the ewe. **J Endocrinol** v. 149: p. 63–72.

DRINGEN R (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol** v. 62: p. 649–671.

DUNLOP DS, NEIDLE A, MCHALE D, DUNLOP DM, LAJTHA A (1986). The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. **Biochem Biophys Res Commun** v. 141: p. 27–32.

ELIASOF S, ARRIZA JL, LEIGHTON BH, KAVANAUGH MP E AMARA SG (1998). Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization and function. **J Neurosci** v. 18: p. 698–712.

ELMQVIST D E QUASTEL DMJ (1965). A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. **J Physiol (Lond)** v. 178: p. 505–529.

ERECINSKA M E SILVER IA (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog Neurobiol** v. 35: p. 245–296.

ESTEVEZ AY, O'REGAN MH, SONG D E PHILLIS JW (1999). Effects of anion channel blockers on hyposmotically-induced amino acids release from the *in vivo* cerebral cortex. **Neurochem Res** v. 24: p. 447–452.

FAIRMAN WA, VANDENBERG RJ, ARRIZA JL, KAVANAUGH MP E AMARA SG (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. **Nature** v. 375: p. 599–603.

FAIRMAN WA, SONDEERS MS, MURDOCH GH E AMARA SG (1998). Arachidonic acid elicits a substrate-gated proton current associated with the glutamate transporter EAAT4. **Nat Neurosci** v. 1: p. 105–113.

FAIRMAN WA E AMARA SG (1999). Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. **Am J Physiol** v. 277: p. F481–F486.

FLETCHER EJ E LODGE D (1996). New developments in the molecular pharmacology of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors. **Pharmacol Ther** v. 70: p. 65–89.

FLYNN J E MCBEAN GJ (2000). Kinetic and pharmacological analysis of L-[<sup>35</sup>S]cystine transport in to rat brain synaptosomes. **Neurochem Int** v. 36: p. 513–521.

FONNUM F (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem** v. 42: p. 1–11.

FUJII N (2002). D-Amino acids in living higher organisms. **Orig Life Evol Biosphere** v. 32: p. 103–127.

FURUCHI T E HOMMA H (2005). D-Amino Acid Biosystem. **Biol Pharm Bull** v. 28: p. 1566–1570.

FYKSE EM, IVERSEN EG E FONNUM F (1992). Inhibition of L-glutamate uptake into synaptic vesicles. **Neurosci Lett** v. 135: p. 125–128.

GALEGO A (1971). Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. **Vision Res** v. 3: p. 33–50.



GARCIA O E MASSIEU L (2003). Glutamate uptake inhibitor L-*trans*-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. **J Neurosci Res** v. 74: p. 956–966.

GAY VL E PLANT TM (1987). N-methyl-D,L-aspartate elicits hypothalamic Gonadotropin-releasing hormone release in prepubertal male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) **Endocrinology** v. 120: p. 2289–2296.

GE WP, YANG XJ, ZHANG Z, WANG HK, SHEN W, DENG QD E DUAN S (2006). Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors. **Science** v. 312: p. 1533–1537.

GONZÁLEZ MI E ROBINSON MB (2004). Protein kinase C–dependent remodeling of glutamate transporter function. **Mol Interv** v. 4: p. 48–58.

GRAS C, HERZOG E, BELLENCHI GC, BERNARD V, RAVASSARD P, POHL M, GASNIER B, GIROS B E EL MESTIKAWY S (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. **J Neurosci** v. 22: p. 5442–5451.

GREWER C, WATZKE N, WIESSNER M E RAUEN T (2000). Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 97: p. 9706–9711.

GREWER C E RAUEN T (2005). Electrogenic Glutamate Transporters in the CNS: Molecular Mechanism, Pré-steady-state Kinetics, and their Impact on Synaptic Signaling. (Review) **J Membrane Biol** v. 203: p. 1–20.

GRUNEWALD M E KANNER BI (1995). Conformational changes monitored on the glutamate transporter GLT-1 indicate the existence of two neurotransmitter-bound states. **J Biol Chem** v. 270: p. 17017–17024.

GRUNEWALD M, BENDAHAN A E KANNER BI (1998). Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. **Neuron** v. 21: p. 623–632.

GRUNEWALD M, MENAKER D E KANNER BI (2002). Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1. **J Biol Chem** v. 277: p. 26074–26080.

GU S, RODERICK H, CAMACHO P E JIANG JX (2000). Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 97: p. 3230–3235.

GUENTHER E, SCHMID S, WHEELER-SCHILLING T, ALBACH G, GRÜNDER T, FAUSER S E KOHLER K (2004). Developmental plasticity of NMDA receptor function in the retina and the influence of light. **FASEB J** v. 18: p. 1433–1435.

GUNDERSEN V, DANBOLT NC, OTTERSEN OP E STORM-MATHISEN J (1993). Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. **Neuroscience** v. 57: p. 97–111.

GUNDERSEN V, OTTERSEN OP E STORM-MATHISEN J (1996). Selective excitatory amino acid uptake in glutamatergic nerve terminals and in glia in the rat striatum: quantitative electron microscopic immunocytochemistry of exogenous D-aspartate and endogenous glutamate and GABA. **Eur J Neurosci** v. 8: p. 758–765.

GUNDERSEN V, CHAUDHRY FA, BJAALIE JG, FONNUM F, OTTERSEN OP E STORM-MATHISEN J (1998). Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. **J Neurosci** v. 18: p. 6059–6070.

GUNDERSEN V E STORM-MATHISEN J (2000). aspartate — Neurochemical evidence for a transmitter role. In: Ottersen OP, Storm-Mathisen J (Eds.), *Glutamate*. Elsevier, Amsterdam: p. 45–62.

HAMBURGER V E HAMILTON HL (1951). A serial of normal stages in the development of the chick embryo. **J Morphol** v. 88: p. 49-92.

HANSSON E E RÖNNBÄCK L (2003). Glial neuronal signaling in the central nervous system. **FASEB J** v. 17: p. 341–348.

HASHIMOTO A, NISHIKAWA T, OKA T, TAKAHASHI K E HAYASHI T (1992). Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-

performance liquid chromatography after derivatization with *N-tert*-butyloxycarbonyl-L-cysteine and *o*-phthaldialdehyde. **J Chromatogr** v. 582: p. 41–48.

HASHIMOTO, A., NISHIKAWA, T., OKA, T., HAYASHI, T E TAKAHASHI, K (1993). Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. **FEBS Lett** v. 331: p. 4–8.

HASHIMOTO A, OKA T E NISHIKAWA T (1995). Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. **Eur J Neurosci** v. 7: p. 1657–1663.

HASHIMOTO A E OKA T (1997). Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. **Prog Neurobiol** v. 52: p. 325–353.

HASKEW RE, MONGIN AA E KIMELBERG HK (2002). Peroxynitrite enhances astrocytic volume-sensitive excitatory amino acid release via a src tyrosine kinase-dependent mechanism. **J Neurochem** v. 82: p. 903–912.

HAUGETO O, ULLENSVANG K, LEVY LM, CHAUDHRY FA, HONORÉ T, NIELSEN M, LEHRE KP E DANBOLT NC (1996). Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. **J Biol Chem** v. 271: p. 27715–27722.

HAYDON PG (2001). Glia: listening and talking to the synapse. **Nat Rev Neurosci** v. 2: p. 185–193.

HANSSON E E RONNBACK L (2003). Glial neuronal signaling in the central nervous system. **FASEB J** v. 17: p. 341–348.

HASSEL B E DINGLEDINE R (2006) In: Siegel GJ, Albers RW, Brandy ST e Price DL (Eds). *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects. Sétima edição.* Elsevier. p. 267–290.

HEADLEY PM E GRILLNER S (1990). Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends Pharmacol Sci** v. 11: p. 205–211.

HERB A, BURNASHEV N, WERNER P, SAKMANN B, WISDEN W E SEEBURG PH (1992). The KA2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. **Neuron** v. 8: p. 775–785.

HERTZ L, SCHOUSBOE A, BOECHLER N, MUKERJI S E FEDOROFF S (1978). Kinetic characteristics of the glutamate uptake into normal astrocytes in cultures. **Neurochem Res** v.3: p. 1–14.

HERTZ L (2006). Glutamate, a neurotransmitter—and so much more. A synopsis of Wierzba III. **Neurochem Int** v. 48: p. 416–425.

HEUSER JE E REESE TS (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuro-muscular junction. **J Cell Biol** v. 57: p. 315–344.

HOLLMANN M E HEINEMANN S (1994). Cloned glutamate receptors. **Ann Rev Neurosci** v. 17: p. 31–108.

HOMMA H (2006). Biochemistry of D-aspartate in mammalian cells. **Amino Acids** v. 32: p. 3–11.

HOPAINEN I E KONTRO P (1990). D-aspartate release from cerebellum astrocytes: Modulation of the high K-induced release by neurotransmitter amino acids. **Neuroscience** v. 36: p. 115–120.

HÖSLI E E HÖSLI L (1993). Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol** v. 40: p. 477–506.

HUANG AS, BEIGNEUX A, WEIL ZM, KIM PM, MOLLIVER ME, BLACKSHAW S, NELSON RJ, YOUNG SG E SNYDER SH (2006). D-aspartate regulates melanocortin formation and function: behavioral alterations in D-aspartate oxidase-deficient mice. **J Neurosci** v. 26: p. 2814–2819.

HUANG YH E BERGLES DE (2004a). Glutamate transporters bring competition to the synapse. **Curr Opin Neurobiol** v. 14: p. 346–352.

HUANG YH, SINHA SR, TANAKA K, ROTHSTEIN JD E BERGLES DE (2004b). Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. **J Neurosci** v. 24: p. 4551–4559.

HUANG YH, SINHA SR, FEDORYAK OD, ELLIS-DAVIES GC E BERGLES DE (2005). Synthesis and characterization of 4-methoxy-7-nitroindoliny-D-aspartate, a caged compound for selective activation of glutamate transporters and N-methyl-D-aspartate receptors in brain tissue. **Biochemistry** v. 44: p. 3316–3326.

HUETTNER JE (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. **Prog Neurobiol.** v. 70: p. 387–407.

HUGHES TE, HERMANS-BORGMEYER I E HEINEMANN S (1992). Differential expression of glutamate receptor genes (GluR1-5) in the rat retina. **Visual Neurosci** v. 8: p. 49–55.

IKEDA K, NAGASAWA M, MORI H, ARAKI K, SAKIMURA K, WATANABE M, INOUE Y E MISHINA M (1992). Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. **FEBS Lett** v. 313: p. 34–38.

INGRAM EM, TESLER S, BOWERY NG E EMSON PC (2000). Glial glutamate transporters mRNAs in the genetically absence epilepsy rat from Stasbourg. **Brain Res Mol Brain Res** v. 75: p. 96–104.

INNOCENTI B, PARPURA V E HAYDON PG (2000). Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. **J Neurosci** v. 20: p. 1800–1808.

INOUE K, SAKAITANI M, SHIMADA S E TOHYAMA M (1995). Cloning and expression of a bovine glutamate transporter. **Mol Brain Res** v. 28: p. 343–348.

ISHIDA AT E GORDON G (1981). D-aspartate potentiates the effects of L-glutamate on horizontal cells in goldfish retina. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 78: p. 5890–5894.

ISHII T, MORIYOSHI K, SUGIHARA H, SAKURADA K, KADOTANI H, YOKOI M, AKAZAWA C, SHIGEMOTO R, MIZUNO N, MASU M E NAKANISHI S (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. **J Biol Chem** v. 268: p. 2836–2843.

ISHII T, MORIYOSHI K, SUGIHARA H, SAKURADA K, KADOTANI H, YOKOI M, AKAZAWA C, ISHIO S, YAMADA H, HAYASHI M, YATSUSHIRO S, NOUMI T, YAMAGUCHI A E MORIYAMA Y (1998). D-aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes. **Neurosci Lett** v. 249: p. 143–146.

JABAUDON D, SHIMAMOTO K, YASUDA-KAMATANI Y, SCANZIANI M, GÄHWILER BH E GERBER U (1999). Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 96: p. 8733–8738.

JOHNSON JW E ASCHER P (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurones. **Nature** v. 325: p. 529–531.

JOHNSTON MV (1995). Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. **Brain Dev** v. 17: p. 301–306.

KANAI Y E HEDIGER MA (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. **Nature** v. 360: p. 467–471.

KANAI Y, STELZNER M, NUSSBERGER S, KHAWAJA S, HEBERT SC, SMITH CP E HEDIGER MA (1994). The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter — insights into structure and mechanism of transport. **J Biol Chem** v. 269: p. 20599–20606.

KANAI Y, BHIDE PG, DIFIGLIA M E HEDIGER MA (1995). Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. **Neuroreport** v. 6: p. 2357–2362.

KANNER BI E MARVA E (1982). Efflux of L-glutamate by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. **Biochemistry** v. 21: p. 3143–3147.

KANNER BI, KAVANAUGH MP E BENDAHAN A (2001). Molecular characterization of substrate-binding sites in the glutamate transporter family. **Biochem Soc Trans** v. 6: p. 707–710.

KANNER BI E BORRE L (2002). The dual-function glutamate transporters: structure and molecular characterization of the substrate-binding sites. **Biochim Biophys Acta** v. 1555: p. 92–95.

KAWANO T, TAKUWA K E NAKAJIMA T (1996). Molecular cloning of a cDNA for the glutamate transporter of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Biochem Biophys Res Commun** v. 228: p. 415–420.

KAWANO T, TAKUWA K E NAKAJIMA T (1997). Structure and activity of a new form of the glutamate transporter of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Biosci Biotechnol Biochem** v. 61: p. 927–929.

KAWANO T, TAKUWA K, KUNIYOSHI H, JUNI N, NAKAJIMA T, YAMAMOTO D E KIMURA Y (1999). Cloning and characterization of a *Drosophila melanogaster* cDNA encoding a glutamate transporter. **Biosci Biotechnol Biochem** v. 63: p. 2042–2044.

KEINÄNEN K, WISDEN W, SOMMER B, WERNER P, HERB A, VERDOORN TA, SAKMANN B E SEEBURG PH (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. **Science** v. 249: p. 556–560.

KIMELBERG HK E MONGIN AA (1998). Swelling-activated release of excitatory amino acids in the brain: relevance for pathophysiology. **Contrib Nephrol** v. 123: p. 240–257.

KIRSCHNER MA, ARRIZA JL, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, MAGENIS E E AMARA SG (1994a). The mouse and human excitatory amino acid transporter gene (EAAT1) maps to mouse chromosome 15 and a region of syntenic homology on human chromosome 5. **Genomics** v. 22: p. 631–633.

KIRSCHNER MA, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA E AMARA SG (1994b). Mouse excitatory amino acid transporter EAAT2: isolation, characterization, and proximity to neuroexcitability loci on mouse chromosome 2. **Genomics** v. 24: p. 218–224.

KIRYU S, YAO GL, MORITA N, KATO H E KIYAMA H (1995). Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. **J Neurosci** v. 15: p. 7872–7878.

KLÖCKNER U, STORCK T, CONRADT M E STOFFEL W (1993). Electrogenic L-glutamate uptake in *Xenopus laevis* oocytes expressing a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST-1). **J Biol Chem** v. 268: p. 14594–14596.

KNOTT GW, HOLTMAAT A, WILBRECHT L, WELKER E E SVOBODA K (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. **Nat Neurosci** v. 9: p. 1117–1124.

KOLB H (1970). Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** v. 258: p. 261–283.

KOLB H (1977). The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. **J Neurocytol** v. 6: p. 131–153.

KOLB H (2003). How the retina works. *American Scientist* 91:28–35.

KOMURO H E RAKIC P (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. **Science** v. 260: p. 95–97.

KOYAMA H, ADACHI M, SEKINE M, KATANE M, FURUCHI T E HOMMA H (2006). Cytoplasmic localization and efflux of endogenous D-aspartate in pheochromocytoma (PC)12 cells. **Arch Biochem Biophys** v. 446: p. 131–139.

KRAMER R E HEBERGER C (1986). Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column. **Biochim Biophys Acta** v. 863: p. 289–296.

KRAMER R E PALMIERI F (1989). Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. **Biochim Biophys Acta** v. 974: p. 1–23.

KUBRUSLY RC, DE MELLO MCF E DE MELLO FG (1998). aspartate as a selective NMDA receptor agonist in cultured cells from the avian retina. **Neurochem Int** v. 32: p. 47–52.

KUNISHIMA N, SHIMADA Y, TSUJI Y, SATO T, YAMAMOTO M, KUMASAKA T, NAKANISHI S, JINGAMI H E MORIKAWA K (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. **Nature** v. 407: p. 971–977.



KUROMI H E KIDOKORO Y (2003). Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. **J Neurocytol** v. 32: p. 551–565.

KUTSUWADA T, KASHIWABUCHI N, MORI H, SAKIMURA K, KUSHIYA E, ARAKI K, MEGURO H, MASAKI H, KUMANISHI T, ARAKAWA M E MISHINA M (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. **Nature** v. 358: p. 36–41.

LAAKE JH, SLYNGSTAD TA, HAUG FMS E OTTERSEN OP (1995). Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. **J Neurochem** v. 65: p. 871–881.

LAMANTIA AS (1995). The usual suspects: GABA and glutamate may regulate proliferation in the neocortex. **Neuron** v. 15: p. 1223–1225.

LANDI S, CENNI MC, MAFFEI L E BERADI N (2007). Environmental Enrichment Effects on Development of Retinal Ganglion Cell Dendritic Stratification Require Retinal BDNF. **Plos One** v. 2: p. e346.

LASATER EM E DOWNLING JE (1982). Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 79: p. 936–940.

LEBRUN B, SAKAITANI M, SHIMAMOTO K, YASUDA-KAMATANI Y E NAKAJIMA T (1997). New  $\beta$ -hydroxyaspartate derivatives are competitive blockers for the bovine glutamate/aspartate transporter. **J Biol Chem** v. 272: p. 20336–20339.

LEE JA, HOMMA H, IWATSUBO TK E IMAI K (1999). D-aspartate localization in the rat pituitary gland and retina. **Brain Res** v. 838: p. 193–199.

LEE JA, LONG Z, NIMURA N, IWATSUBO TK, IMAI K E HOMMA H (2001). Localization, transport, and uptake of D-aspartate in the rat adrenal and pituitary glands. **Arch Biochem Biophys** v. 385: p. 242–249.

LEIGHTON BH, SEAL RP, SHIMAMOTO K E AMARA SG (2002). A hydrophobic domain in glutamate transporters forms an extracellular helix associated with the permeation pathway for substrates. **J Biol Chem** v. 277: p. 29847–29855.

LEVI G, GORDON RD, GALLO V, WILKINS GP E BALAZS R (1982). Putative acidic amino acid transmitters in the cerebellum. I Depolarization-induced release. **Brain Res** v. 229: p. 425–445.

LEVY LM, ATTWELL D, HOOVER F, ASH JF, BJØRÅS M E DANBOLT NC (1998a). Inducible expression of the GLT-1 glutamate transporter in a CHO cell line selected for low endogenous glutamate uptake. **FEBS Lett** v. 422: p. 339–342.

LEVY LM, WARR O E ATTWELL D (1998b). Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. **J Neurosci** v. 18: p. 9620–9628.

LI X E FRANCKE U (1995). Assignment of the gene SLC1a2 coding for the human glutamate transporter EAAT2 to human chromosome 11 bands p13-p12. **Cytogenet. Cell Genet** v. 71: p. 212–213.

LIN CLG, TZINGOUNIS AV, JIN L, FURUTA A, KAVANAUGH MP E ROTHSTEIN JD (1998). Molecular cloning and expression of the rat EAAT4 glutamate transporter subtype. **Mol Brain Res** v. 63: p. 174–179.

LONG Z, LEE JA, OKAMOTO T, NIMURA N, IMAI K E HOMMA H (2000). D-aspartate in a prolactin-secreting clonal strain of rat pituitary tumor cells (GH3). **Biochem Biophys Res Commun** v. 276: p. 1143–1147.

LONG Z, SEKINE M, NIMURA N, LEE J-A, IMAI K, IWATSUBO T E HOMMA H (2001). Immunocytochemical study of D-aspartate in the 2068 rat pheochromocytoma cell line. **Bioimages** v. 9: p. 61–67.

LUCAS DR E NEWHOUSE JP (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **AMA Arch Ophthalmol** v. 58: p. 193–201.

LOUNGUEMARE MC, ROSE CR, FARREL K, RANSN BR, WAXMAN SG E SWANSON RA (1999). K<sup>+</sup>-induced reversal of astrocytic glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular Na<sup>+</sup>. **Neuroscience** v. 93: p. 285–292.

MACDERMOTT AB, MAYER ML, WESTBROOK GL, SMITH SJ E BARKER JL (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. **Nature** v. 321: p. 519–522.

MACKENZIE B E ERICKSON JD (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. **Pflügers Arch** v. 447: p. 784–795.

MAENO-HIKICHI Y, TANAKA K, SHIBATA T, WATANABE M, INOUE Y, MUKAINAKA Y E WADA K (1997). Structure and functional expression of the cloned mouse neuronal high-affinity glutamate transporter. **Mol Brain Res** v. 48: p. 176–180.

MALANDRO MS E KILBERG MS (1996). Molecular biology of mammalian amino acid transporters. **Annu Rev Biochem** v. 65: p. 305–336.

MALTHE-SORENSEN D, SKREDE KK E FONNUM F (1979). Ca<sup>++</sup>-dependent release of D-[<sup>3</sup>H]aspartate evoked by selective electrical stimulation of excitatory afferent fiber to hippocampal pyramidal cells *in vitro*. **Neuroscience** v. 4: p. 1255–1263.

MANN I (1964). The developing of human eye. Grune and Stratton, NY.

MARQUARDT T E GRUSS P (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. **Trends Neurosci** v. 25: p. 32–38.

MASSON J, SAGNÉ C, HAMON M E EL MESTIKAWY S (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. **Pharmacol Rev** v. 51: p. 439–464.

MASUDA W, NUOSO C, KITAMURA C, TERASHITA M E NOGUCHI T (2003). Free D-aspartic acid in salivary glands. **Arc Biochem Biophys** v. 420: p. 46–54.

MATSUMOTO Y, ENOMOTO T E MASUKO T (1999). Identification of truncated human glutamate transporter. **Tohoku J Exp Med** v. 187: p. 173–182.

MCDONALD JW E JOHNSTON MV (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Res Rev** v. 15: p. 41–70.

MCKENNA MC, SONNEWALD U, HUANG X, STEVENSON J E ZIELKE HR (1996). Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. **J Neurochem** v. 66: p. 386–393.

MEISTER A (1965): *Biochemistry of the Amino Acids*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York, London v. 1: p. 113–139.

MENNERICK S E MATTHEWS G (1996). Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. **Neuron** v. 17: p. 1241–1249.

MENNERICK S, DHOND RP, BENZ A, XU WY, ROTHSTEIN JD, DANBOLT NC, ISENBERG KE E ZORUMSKI CF (1998). Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. **J Neurosci** v. 18: p. 4490–4499.

MEYER T, MÜNCH C, KNAPPENBERGER B, LIEBAU S, VÖLKEL H E LUDOLPH AC (1998a). Alternative splicing of the glutamate transporter EAAT2 (GLT-1). **Neurosci Lett** v. 241: p. 68–70.

MEYER T, MÜNCH C, LIEBAU S, FROMM A, SCHWALENSTÖCKER B, VÖLKEL H E LUDOLPH AC (1998b). Splicing of the glutamate transporter EAAT2: a candidate gene of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** v. 65: p. 954.

MEYER T, FROMM A, MÜNCH C, SCHWALENSTÖCKER B, FRAY AE, INCE PG, STAMM S, GRÖN G, LUDOLPH AC E SHAW PJ (1999). The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. **J Neurol Sci** v. 170: p. 45–50.

MITANI A E TANAKA K (2003). Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1. **J Neurosci** v. 23: p. 7176–7182.

MIURA K, ISHII T, SUGITA Y E BANNAI S (1992). Cystine uptake and glutathione level in endothelial cells exposed to oxidative stress. **Am J Physiol** v. 262: p. C50–C58.

MONYER H, SPRENGEL R, SCHOEPFER R, HERB A, HIGUCHI M, LOMELI H, BURNASHEV N, SAKMANN B E SEEBURG PH (1992). Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. **Science** v. 256: p. 1217–1221.

MORIYAMA Y, MAEDA M E FUTAI M (1990). Energy coupling of L-glutamate transport and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in brain synaptic vesicles. **J Biochem (Tokyo)** v. 108: p. 689–693.

MORIYAMA Y, HAYASHI M, YAMADA H, YATSUSHIRO S, ISHIO S E YAMAMOTO A (2000). Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. **J Exp Biol** v. 203: p. 117–125.

MORIKAWA A, HAMASE H, INOUE T, KONNO R, NIWA A E ZAITSU K (2001). Determination of free D-aspartic acid, D-serine and D-alanine in the brain of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity. **J Chromatogr** v. B757: p. 119–125.

MORIYOSHI K, MASU M, ISHII T, SHIGEMOTO R, MIZUNO N E NAKANISHI S (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. **Nature** v. 354: p. 31–37.

MUKAINAKA Y, TANAKA K, HAGIWARA T E WADA K (1995). Molecular cloning of two glutamate transporter subtypes from mouse brain. **Biochim Biophys Acta** v. 1244: p. 233–237.

MÜNCH C, SCHWALENSTÖCKER B, KNAPPENBERGER B, LIEBAU S, VÖLKEL H, LUDOLPH AC E MEYER T (1998). 5-heterogeneity of the human excitatory amino acid transporter cDNA EAAT2 (GLT-1) **Neuroreport** v. 9: p. 1295–1297.

MURPHY TH, MIYAMOTO M, SASTRE A, SCHNAAR RL E COYLE JT (1989). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. **Neuron** v. 2: p. 1547–1558.

MURPHY TH, SCHNAAR RL E COYLE JT (1990). Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. **FASEB J** v. 4: p. 1624–1633.

NAITO S E UEDA T (1983). Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. **J Biol Chem** v. 258: p. 696–699.

NAITO S E UEDA T (1985). Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. **J Neurochem** v. 44: p. 99–109.

NAKANISHI S, NAKAJIMA Y, MASU M, UEDA Y, NAKAHARA K, WATANABE D, YAMAGUCHI S, KAWABATA S E OKADA M (1998). Glutamate receptors: brain function and signal transduction. **Brain Res Rev** v. 26: p. 230–235.

NAKANISHI S (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science** v. 258: p. 597–603.

NEALE JH, BZDEGA T E WROBLEWSKA B (2000) N-Acetylaspartylglutamate: the most abundant peptide neurotransmitter in the mammalian central nervous system. **J Neurochem** v. 75: p. 443–452.

NEALE JH, OLSZEWSKI RT, GEHL LM, WROBLEWSKA B E BZDEGA T (2005). The neurotransmitter N-Acetylaspartylglutamate in models of pain, ALS, diabetic neuropathy, CNS injury and schizophrenia. **Trends Pharmacol Sci** v. 26: p. 477–484.

NEIDLE A E DUNLOP DS (1990). Developmental changes of free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. **Life Sci** v. 46: p. 1517–1522.

NELSON N (1998). The family of  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  neurotransmitter transporters. **J Neurochem** v. 71: p. 1785–1803.

NEVES G E LAGNADO L (1999). The kinetics of exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish retinal bipolar cells. **J Physiol (Lond)** v. 515: p. 181–202.

NI B, ROSTECK PR, NADI NSJR E PAUL SM (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 91: p. 5607–5611.

NOWAK L, BREGESTOVSKI O, ASCHER P, HERBET A E PROCHIANTZ A (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature** v. 307: p. 462–465.

OHANA L, BARHAD O, PARNAS I E PARNAS H (2006). The metabotropic glutamate G-protein-coupled receptors are voltage sensitive. **J Biol Chem** v. 281: p. 24204–24215.

OHTSUKA Y, KONDO T E KAWAKAMI Y (1988). Oxidative stresses induced the cystine transport activity in human erythrocytes. **Biochem Biophys Res Commun** v.155: p. 160–166.

OKUMA E E ABE H (1994). Simultaneous determination of D- and L-amino acids in the nervous tissues of crustaceans using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethylchloroformate and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr** v. 660: p. 243–250.

OSSOWSKA K (2005). Metabotropic glutamate receptors. In: Schmidt WJ, Reith ME (eds) Dopamine and glutamate in psychiatric disorders. **Humana Press Totowa** p. 117–149.

OTIS TS E KAVANAUGH MP (2000). Isolation of current components and partial reaction cycles in the glial glutamate transporter EAAT2. **J Neurosci** v. 20: p. 2749–2757.

OTTERSEN OP E STORM-MATHISEN J (1984). Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: Björklund A, Hökfelt T, Kuhar MJ (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. In: Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS*, Elsevier, Amsterdam. v. 3, part 2, p. 141–246.

OTTERSEN OP, ZHANG N E WALBERG F (1992). Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. **Neuroscience** v. 46: p. 519–534.

OZAWA S, KAMIYA H E TSUZUKI K (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol** v. 54: p. 581–618.

PAMPILLO M, SCIMONELLI T, BOTTIN MC, DUVILANSKI BH, RETTORI V, SEILICOVICH A E LASAGA M (2002a). The effect of D-aspartate on luteinizing hormone-releasing hormone,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone, GABA and dopamine release. **Neuro Report** v. 13: p. 2341–2344.

PAMPILLO M, THEAS S, DUVILANSKI B, SEILICOVICH A E LASAGA M (2002b). Effect of ionotropic and metabotropic glutamate agonists and D-aspartate on prolactin release from anterior pituitary cells. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** v. 110: p. 138–144.

PARPURA V, BASARSKY TA, LIU F, JEFTINIJA K, JEFTINIJA S E HAYDON PG (1994). Glutamate-mediated astrocyte neuron signalling. **Nature** v. 369: p. 744–747.

PASTEUR L (1851). Anwendung des polarisirten lichtes in chemischen untersuchungen. **Annal Chem** v. 80: p. 146–152.

PASTI L, ZONTA M, POZZAN T, VICINI S E CARMIGNOTO G (2001). Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. **J Neurosci** v. 21: p. 477–84.

PATNEAU DK E MAYER ML (1990). Structure–activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. **J Neurosci** v. 10: p. 2385–2399.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO DE (1994). Free radicals and the pathogenesis of neuronal death: cooperative role of excitatory amino acids. **Adv Exp Med Biol** v. 366: p. 59–71.

PENG YW, BLACKSTONE CD, HUGANIR RL E YAU KW (1995). Distribution of glutamate receptors subtypes in the vertebrate retina. **Neuroscience** v. 66: p. 483–497.

PHILLIS JW, SONG D E O'REGAN MH (1997). Inhibition by anion channel blockers of ischemia-evoked release of excitotoxic and others amino acids from rat cerebral cortex. **Brain Res** v. 758: p. 9–16.



PHILLIS JW, SONG D E O'REGAN MH (1999). Effects of hyperosmolarity and ion substitutions on amino acid efflux from the ischemic rat cerebral cortex. **Brain Res** v. 828: p. 1–11.

PHILLIS JW, REN J E O'REGAN MH (2000). Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with D,L-threo-beta-benzyloxyaspartate. **Brain Res** v. 868: p. 105–112.

PIANI D E FONTANA A (1994). Involvement of the cystine transport system Xc<sup>-</sup> macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. **J Immunol** v. 152: p. 3578–3585.

PILC A E OSSOWSKA K (2007). Metabotropic glutamate receptors. Editorial. **Amino Acids** v. 32: p. 165–167.

PINES G E KANNER BI (1990). Counterflow of L-glutamate in plasma membrane vesicles and reconstituted preparations from rat brain. **Biochemistry** 29, 11209–11214.

PINES G, DANBOLT NC, BJØRÅS M, ZHANG Y, BENDAHAN A, EIDE L, KOEPESELL H, STORM-MATHISEN J, SEEBERG E E KANNER BI (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature** v. 360: p. 464–467.

POLYAK SL (1941). The retina: The anatomy and the histology of the retina in man, ape and monkey, including the consideration of visual functions, the history of physiological optics and the histological laboratory technique. University of Chicago Press, Chicago.

POVLOCK SL E AMARA SG (1997). The structure and function of norepinephrine, dopamine, and serotonin transporters. In: Reith, MEA (Ed.), Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. Humana Press Totowa, NJ. p. 1–28.

PROVIS JM E VAN DRIEL D (1985). Retinal development in humans: the roles of differential growth rates, cell migration and naturally occurring cell death. **Aust NZJ Ophthalmol** v. 13: p. 125–133.

QIN P E POURCHO RG (1996). Distribution of AMPA-selective glutamate receptors subunits in the cat retina. **Brain Res** v. 710: p. 303–307.

RADICE AD E LUSTIGMAN S (1996). Cloning and characterization of cDNAs encoding putative glutamate transporters from *Caenorhabditis elegans* and *Onchocerca volvulus*. **Mol Biochem Parasitol** v. 80: p. 41–53.

RAMACHANDRAN B, HOUBEN K, ROZENBERG YY, HAIGH JR, VARPETIAN A E HOWARD BD (1993). Differential expression of transporters for norepinephrine and glutamate in wild type, variant, and WNT1-expressing PC12 cells. **J Biol Chem** v. 268: p. 23891–23897.

RAMÓN Y CAJAL S (1893). The vertebrate retina. San Francisco: W. H. Freeman.  
Raucci F, Santillo F, D'Aniello A, Chieffi P e Chieffi Baccari G (2005). D-aspartate modulates transcriptional activity in harderian gland of frog, *Rana esculenta*: morphological and molecular evidence. **J Cell Physiol** v. 204: p. 445–454.

RAUEN T E WIESSNER M (2000). Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST and GS. **Neurochem Int** v. 37: p. 179–189.

RICHARDS DA, GUATIMOSIM C, RIZZOLI SO E BETZ WJ (2003). Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. **Neuron** v. 39: p. 529–541.

RIZZOLI SO E BETZ WJ (2005). Synaptic Vesicle Pools. **Nature Neurosci Rev** v. 6: p. 57–69.

RONDART P, LIU J, HUANG S, MALHAIRE F, VOL C, PINAULT A, LABESSE G E PIN JP (2006). Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. **J Biol Chem** v. 281: p. 24653–24661.

ROSENMUND C E STEVENS CF (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. **Neuron** v. 16: p. 1197–1207.

ROSSETTO O, SEVESO M, CACCIN P, SCHIAVO G E MONTECUCCO C (2001). Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. **Toxicon** v. 39: p. 27–41.

ROSSI DJ E SLATER NT (1993). The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. **Neuropharmacology** v. 32: p. 1239–1248.

ROTHSTEIN JD (1995). Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Clin Neurosci** v. 3: p. 348–359.

SAIER MH (1999). Eukaryotic transmembrane solute transport systems. **Int Rev Cytol** v. 190: p. 61–136.

SANCHEZ-CARBENTE MR E MASSIEU L. (1999). Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. **J Neurochem** v. 72: p. 129–138.

SARANTIS M, EVERETT K E ATTWELL D (1988). A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse. *Nature* 332:451–453.

SARANTIS M E ATTWELL D (1990). Glutamate uptake in mammalian retinal glia is voltage-dependent and potassium-dependent. **Brain Res** v. 516: p. 322–325.

SATO K, INABA M, SUWA Y, MATSUU A, HIKASA Y, ONO K E KAGOTA K (2000). Inherited defects of sodium-dependent glutamate transport mediated by glutamate/aspartate transporter in canine red cells due to a decreased level of transporter protein expression. **J Biol Chem** v. 275: p. 6620–6627.

SCATTON B (1983). The NMDA receptor complex. **Fundamen Clin Pharmacol** v. 7: p. 389–400.

SCHELL MJ, COOPER OB E SNYDER SH (1997). D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 94: p. 213–2018.

SCHLAG BD, VONDRASEK JR, MUNIR M, KALANDADZE A, ZELENIAIA OA, ROTHSTEIN JD E ROBINSON MB (1998). Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. **Mol Pharmacol** v. 53: p. 355–369.

SCHMITT A, ASAN E, PÜSCHEL B, JÖNS T E KUGLER P (1996). Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. **Neuroscience** v. 71: p. 989–1004.

SCHMITT A, ASAN E, LESCH KP E KUGLER P (2002). A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. **Neuroscience** v. 109: p. 45–61.

SCHNEGGENBURGER R, MEYER AC E NEHER E (1999). Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. **Neuron** v. 23: p. 399–409.

SCHOEPFER R, MONYER H, SOMMER B, WISDEN W, SPRENGEL R, KUNER T, LOMELI H, HERB A, KOHLER M, BURNASHEV N, GUNTHER W, RUPPERSBERG P E SEEBURG P (1994). Molecular biology of glutamate receptors. **Prog Neurobiol** v. 42: p. 353–357.

SCHOEPP DD (2001). Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. **J Pharmacol Exp Ther** v. 299: p. 12–20.

SCHOEPP DD, JOHNSON BG E MONN JA (1992). Inhibition of cyclic AMP formation by selective metabotropic glutamate receptor agonist. **J Neurochem** v. 58: p. 1184–1186.

SEAL RP E AMARA SG (1998). A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. **Neuron** v. 21: p. 1487–1498.

SEAL RP, DANIELS GM, WOLFGANG WJ, FORTE MA E AMARA SG (1998). Identification and characterization of a cDNA encoding a neuronal glutamate transporter from *Drosophila melanogaster*. **Receptors Channels** v. 6: p. 51–64.

SEAL RP E AMARA SG (1999). Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** v. 39: p. 431–456.

SEAL RP, LEIGHTON BH E AMARA SG (2000). A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. **Neuron** v. 25: p. 695–706.

SEKI Y, FEUSTEL PJ, KELLER RW JR, TRANMER BI E KIMELBERG HK (1999). Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokainate and an anion channel blocker. **Stroke** v. 30: p. 433–440.

SHELTON MK E MCCARTHY KD (1999). Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors *in situ*. **Glia** v. 26: p. 1–11.

SHEN J, PETERSEN KF, BEHAR KL, BROWN P, NIXON TW, MASON GF, PETROFF OAC, SHULMAN GI, SHULMAN RG E ROTHMAN DL (1999). Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by *in vivo* <sup>13</sup>C NMR. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 96: p. 8235–8240.

SHIGA H, MURAKAMI J, NAGAO T, TANAKA M, KAWAHARA K, MATSUOKA I E ITO E (2006). Glutamate release from astrocytes is stimulated via the appearance of exocytosis during cyclic AMP-induced morphologic changes. **J Neurosci Res** v. 84: p. 338–347.

SHIGEMOTO RS, MIZUNO NS, MASU M E NAKANISHI S (1993). Molecular characterization of the family of the N-Methyl-D-aspartate receptor subunit. **J Biol Chem** v. 268: p. 2836–2843.

SHIGERI Y, SEAL RP E SHIMAMOTO K (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. **Brain Res Rev** v. 45: p. 250–265.

SHIMAMOTO K, LEBRUN B, YASUDA-KAMATANI Y, SAKAITANI M, SHIGERI Y, YUMOTO N ET AL., (1998) DL-*threo*- β-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. **Mol Pharmacol** v. 53: p. 195–201

SHIMAMOTO K, SHIGERI Y, YASUDA-KAMATANI Y, LEBRUN B, YUMOTO N E NAKAJIMA T (2000). Syntheses of optically pure β-hydroxyaspartate derivatives as glutamate transporters blockers. **Bioorg Med Chem Lett** v. 10: p. 2407–2410.

SMITH CP, WEREMOWICZ S, KANAI Y, STELZNER M, MORTON CC E HEDIGER MA (1994). Assignment of the gene coding for the human high-affinity glutamate transporter EAAC1 to 9p24 – potential role in dicarboxylic amino acid uria and neurodegenerative disorders — brief report. **Genomics** v. 20: p. 335–336.

SOBCZYK A E SVOBODA K (2007). Activity-dependent plasticity of the NMDA-receptor fractional  $\text{Ca}^{2+}$  current. **Neuron** v. 53: p. 17–24.

SOMMER B, KOHLER M, SPRENGEL R E SEEBURG PH (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. **Cell** v. 67: p. 11–19.

SONDERS MS E AMARA SG (1996). Channels in transporters. **Curr Opin Neurobiol** v. 6: p. 294–302.

SPINELLI P, BROWN E, FERRANDINO G, BRANNO M, MONTAROLO PG, D'ANIELLO E, RASTOGI RK, D'ANIELLO B, CHIEFFI G, FISHER GH E D'ANIELLO A (2006). D-Aspartic acid in the nervous system of *Aplysia limacina*: Possible role in neurotransmission. **J Cell Physiol** v. 206: p. 672–681.

STEINHAUSER C E GALLO V (1996). News on glutamate receptors in glial cells. **Trends Neurosci** v. 19: p. 339–345.

STIGLIANI S, ZAPPETTINI S, RAITERI L, PASSALACQUA M, MELLONI E, VENTURI C, TACCHETTI C, DIASPRO A, USAI C E BONANNO G (2006). Glia resealed particles freshly prepared from adult rat brain are competent for exocytotic release of glutamate. **J Neurochem** v. 96: p. 656–658.

STORCK T, SCHULTE S, HOFMANN K E STOFFEL W (1992). Structure, expression and functional analysis of a  $\text{Na}^{+}$ -dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 89: p. 10955–10959.

STRANGE K, EMMA F E JACKSON PS (1996). Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. **Am J Physiol** v. 270: p. C711–C730.

STUTZ B, FLEMING RL, DE MELLO MC E DE MELLO FG (2007). Glutamate–aspartate exchange as a mechanism of enforcing NMDA signaling in the avian retina. **FeSBE** 2007.

SU ZZ, LESYCYNIECKA M, KANG DC, SARKAR D, CHAO W, VOLSKY DJ E FISHER PB (2003). Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). **Proc Natl Acad Sci USA** v. 100: p. 1955–1960.

SÜDHOF TC (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. **Nature** v. 375: p. 645–653.

SÜDHOF TC (2004). The synaptic vesicle cycle. **Annu Rev Neurosci** v. 27: p. 509–547.

SUN H E CROSSLAND WJ (2000). Quantitative assessment of localization and colocalization of glutamate, aspartate, glycine, and GABA immunoreactivity in the chick retina. **Anat Rec** v. 260: p. 158–179.

SUTHERLAND ML, DELANEY TA E NOEBELS JL (1995). Molecular characterization of a high-affinity mouse glutamate transporter. **Gene** v. 162: p. 271–274.

SZATKOWSKI M, BARBOUR B E ATTWELL D (1991). The potassium-dependence of excitatory amino acid transport — resolution of a paradox. **Brain Res** v. 555: p. 343–345.

TABB JS, KISH PE, VANDYKE R E UEDA T (1992). Glutamate transport into synaptic vesicles — roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. **J Biol Chem** v. 267: p. 15412–15418.

TAKAHASHI T, FORSYTHE ID, TSUJIMOTO T, BARNES-DAVIES M E ONODERA K (1996). Presynaptic calcium current modulation by metabotropic glutamate receptor. **Science** v. 274: p. 594–597.

TAKAI S, YAMADA K, KAWAKAMI H, TANAKA K E NAKAMURA S (1995). Localization of the gene (SLC1A3) encoding human glutamate transporter (GluT-1) to 5p13 by fluorescence *in situ* hybridization. **Cytogenet Cell Genet** v. 69: p. 209–210.

TAKAMORI S, RHEE JS, ROSENMUND C E JAHN R (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. **Nature** v. 407: p. 189–194.

TAKAMORI S (2006). VGLUTs: 'Exciting' times for glutamatergic research? **Neurosci Res** v. 55: p. 343–351.

TAKEI K, MUNDIGL O, DANIELL L E DE CAMILLI P (1996). The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. **J Cell Biol** v. 133: p. 1237–1250.

TAKIGAWA Y, HOMMA H, LEE JA, FUKUSHIMA T, SANTA T, IWATSUBO T E IMAI K (1998). D-aspartate uptake into cultured rat pinealocytes and the concomitant effect on L-aspartate levels and melatonin secretion. **Biochem Biophys Res Commun** v. 248: p. 641–647.

TANAKA K (1993a). Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain. **Neurosci Lett** v. 159: p. 183–186.

TANAKA K (1993b). Expression cloning of a rat glutamate transporter. **Neurosci Res** v. 16: p. 149–153.

TANAKA K, WATASE K, MANABE T, YAMADA K, WATANABE M, TAKAHASHI K, IWAMAH, NISHIKAWA T, ICHIHARA N, HORI S, TAKIMOTO M E WADA K (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science** v. 276: p. 1699–1702.

TANAKA K, WATASE K, MANABE T, YAMADA K, WATANABE M, TAKAHASHI K, IWAMA H, NISHIKAWA T, ICHIHARA N, KIKUCHI T, OKUYAMA S, KAWASHIMA N, HORI S, TAKIMOTO M, ULLIAN EM, SAPPERSTEIN SK, CHRISTOPHERSON KS E BARRES BA (2001). Control of synapse number by glia. **Science** v. 291: p. 657–660.

TANG CM, DICHTER M E MORAD M (1989). Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons. **Science** v. 243: p. 1474–1477.



TORP R, DANBOLT NC, BABAIE E, BJØRÅS M, SEEBERG E, STORM-MATHISEN J E OTTERSEN OP (1994). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an *in situ* hybridization study. **Eur J Neurosci** v. 6: p. 936–942.

TORP R, HOOVER F, DANBOLT NC, STORM-MATHISEN J E OTTERSEN OP (1997). Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and EAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an *in situ* hybridization analysis. **Anat Embryol** v. 195: p. 317–326.

TRUSSELL LO, ZHANG S E RAMAN IM (1993). Desensitization of AMPA receptors upon multi quantal neurotransmitter release. **Neuron** v. 10: p. 1185–1196.

TZINGOUNIS AV, LIN CL, ROTHSTEIN JD E KAVANAUGH MP (1998). Arachidonic acid activates a proton current in the rat glutamate transporter EAAT4. **J Biol Chem** v. 273: p. 17315–17317.

ULLIAN EM, CHRISTOPHERSON KS E BARRES BA (2004). Role for glia in synaptogenesis. **Glia** v. 47: p. 209–216.

UTSUNOMIYA-TATE N, ENDOU H E KANAI Y (1996). Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter. **J Biol Chem** v. 271: p. 14883–14890.

UTSUNOMIYA-TATE N, ENDOU H E KANAI Y (1997). Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. **FEBS Lett** v. 416: p. 312–316.

VALLANO ML (1998). Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit Rev Neurobiol** v. 12: p. 177–204.

VANDENBERG RJ, ARRIZA JL, AMARA SG E KAVANAUGH MP (1995). Constitutive ion fluxes and substrate binding domains of human glutamate transporters. **J Biol Chem** v. 270: p. 17668–17671.

VAUQUELIN LN E ROBIQUET PJ (1806). The discovery of a new plant principle in *Asparagus sativus*. **Ann Chim (Paris)** v. 57: p. 88–93.

VON GERSDORFF H, VARDI E, MATTHEWS G E STERLING P (1996). Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. **Neuron** v. 16: p. 1221–1227.

VOLTERRA A, BEZZI P, RIZZINI BL, TROTTI D, ULLENSVANG K, DANBOLT NC E RACAGNI G (1996). The competitive transport inhibitor L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. **Eur J Neurosci** v. 8: p. 2019–2028.

WADA K (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science** v. 276: p. 1699–1702.

WADICHE JI E KAVANAUGH MP (1998). Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter chloride channel. **J Neurosci** 18:7650–7661.

WANG H, WOLOSKER H, PEVSNER J, SNYDER SH E SELKOE DJ (2000). Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role(s) of a naturally occurring free D-amino acid in mammals. **J Endocrinol** v. 167: p. 247–252.

WANG X, LOU N, XU Q, TIAN GF, PENG WG, HAN X, KANG J, TAKANO T E NEDERGAARD M (2006). Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by sensory stimulation *in vivo*. **Nat Neurosci** v. 9: p. 816–823.

WATANABE M, MISHINA M E INOUE Y (1994). Differential distributions of the NMDA receptor subunits mRNAs in the mouse retina. **Brain Res** v. 634: p. 328–332.

WATANABE T, SHIBATA K, KERA Y E YAMADA RH (1998). Occurrence of free D-aspartate and aspartate racemase in the blood shell *Scapharca broughtonii*. **Amino Acids** v. 14: p. 353–360.

WERSINGER E, SCHWAB Y, SAHEL JA, RENDON A, POW DV, PICAUD S E ROUX MJ (2006). The glutamate transporter EAAT5 works as a presynaptic receptor in mouse rod bipolar cells. **J Physiol** v. 577: p. 221–234.

WOLOSKER H, BLACKSHAW S E SNYDER SH (1999). Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate N-methyl-D-aspartate neurotransmission. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 96: p. 13409–13414.

WOLOSKER H, D'ANIELLO A E SNYDER SH (2000). D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. **Neuroscience** v. 100: p. 183–189.

WROBLEWSKA B, WROBLEWSKI JT, PSHENICHKIN S, SURIN A, SULLIVAN SE E NEALE JH (1997). N-acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells. **J Neurochem** v. 69: p. 174–181.

WYLLIE DJA, BEHE P E COLQUHOUN D (1998). Single-channel activation and concentration jumps: Comparison of recombinant NR1a/NR2<sub>A</sub> and NR1a/NR2<sub>D</sub> NMDA receptors. **J Physiol (London)** v. 263: p. 1079–1086.

XU HP E TIAN N (2007). Retinal Ganglion Cell Dendrites Undergo a Visual Activity-Dependent Redistribution After Eye Opening. **J Comp Neurol** v. 503: p. 244–259.

YAQUB A, ELDRED WD (1991). Localization of aspartate-like immunoreactivity in the retina of the turtle *Pseudemys scripta*. **J Comp Neurol** v. 312: p. 584–598.

YE ZC, ROTHSTEIN JD E SONTHEIMER H (1999). Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine–glutamate exchange. **J Neurosci** v. 19: p. 10767–10777.

YI JH E HAZELL AS (2006). Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. **Neurochem Int** v. 48: p. 394–403.

ZERANGUE N E KAVANAUGH MP (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. **Nature** v. 383: p. 634–637.

ZHANG Q, FUKUDA M, VAN BOCKSTAELE E, PASCUAL O E HAYDON PG (2004). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 101: p. 9441–9446.

ZHENG S, RAMACHANDRAN B, HAIGH JR, PALOS TP, STEGER K E HOWARD BD (1996) The induction of ret by Wnt-1 in PC12 cells is atypically dependent on continual Wnt-1 expression. **Oncogene** v. 12: p. 555–562.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)